

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 169**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4545** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2011 PCT/DK2011/050444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2011 E 11844130 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2646044**

54 Título: **Procedimientos para aumentar la actividad intracelular de Hsp70**

30 Prioridad:

**30.11.2010 DK 201070520**

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

**07.04.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JENSEN, THOMAS KIRKEGAARD y  
HINSBY, ANDERS MØRKEBERG**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 753 169 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

Procedimientos para aumentar la actividad intracelular de Hsp70

### 5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal que surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor; tales como enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

### 15 Antecedentes

Las chaperonas moleculares se encuentran en todos los compartimentos de una célula donde se producen reordenamientos conformacionales de proteínas, y aunque la síntesis de proteínas es la principal fuente de péptidos desplegados en la célula, un problema para la célula por la alta temperatura u otros estímulos que podrían hacer que las proteínas sean estructuralmente lábiles y, por lo tanto, propensas al desarrollo y la agregación, se solucionan con una respuesta celular específica que implica la producción de proteínas protectoras. Esta respuesta es un fenómeno observado en todos los tipos de células que van desde procariotas a eucariotas y se conoce como la respuesta al choque térmico o al estrés. Las proteínas inducidas por esta respuesta se conocen como proteínas de choque térmico (HSP), de las cuales existen varias familias.

Un ejemplo primario de una familia de chaperonas son las proteínas Hsp70. Esta familia ha sido recientemente implicada en otros aspectos de la homeostasis celular, además de servir como chaperona, principalmente por sus características antiapoptóticas, sus funciones en la inmunidad y la aparente dependencia de las células cancerosas en la regulación positiva de Hsp70. Además, Hsp70 puede desempeñar un papel en la protección de la integridad lisosómica.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son un grupo poco frecuente de enfermedades, caracterizadas por la acumulación de sustancias en el compartimento lisosómico y la consiguiente desestabilización del mismo, con un efecto devastador para los individuos afectados. Las sustancias se acumulan en el compartimento lisosómico debido a deficiencias en las enzimas involucradas en su catabolismo. Hasta la fecha, no hay tratamiento disponible para la mayoría de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. El uso de la terapia de reemplazo enzimático (ERT), al proporcionar a un paciente la enzima recombinante de la que se carece, se ha empleado para un subconjunto de estas enfermedades. Sin embargo, la ERT es una forma de terapia muy costosa que puede limitar su uso en algunas áreas, y también es efectiva solo para el tipo específico de enfermedad para la cual se ha producido la enzima recombinante.

La solicitud de patente internacional WO 2009/155936 tiene como objetivo proporcionar nuevos medios para tratar los trastornos de almacenamiento lisosómico mediante la explotación de la interacción recientemente identificada entre Hsp70 y el fosfolípido lisosomal Bis(monoacilglicero)fosfato (BMP) para promover la estabilización lisosómica. Se demostró que esta interacción revierte la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico que surgen de un defecto en una enzima cuya actividad está asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor; como la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Farber.

Los presentes inventores ahora han hallado sorprendentemente que HSP70 también es beneficioso para revertir la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico que surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor; tales como enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

### Resumen

Se sabe por la literatura que Hsp70 puede desempeñar un papel en la protección de la integridad lisosómica. Sin embargo, el mecanismo molecular no ha quedado claro. En la presente descripción, la base molecular de la contribución de Hsp70 a la estabilidad de la membrana lisosómica se examina más a fondo y se aborda su efecto sobre la reversión de la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico; específicamente cuando dichas enfermedades de almacenamiento lisosómico no surgen de un defecto en una enzima cuya actividad está asociada

con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

La presente invención es como se define en las presentes reivindicaciones. La presente descripción proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico al aumentar directa o indirectamente la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 en individuos que lo necesitan, proporcionando Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, o proporcionando un inductor o coinductor de Hsp70.

La presente descripción se refiere en un aspecto a un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal que no surge de un defecto en una enzima cuya actividad está asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

La presente descripción se refiere en un aspecto a un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterolesis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, mannosidosis y sialidosis tipo II.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal no se selecciona de entre el grupo de Enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

En una realización de la presente descripción, dicho agente bioactivo es Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma. En otra realización de la presente descripción, dicho agente bioactivo es un inductor o coinductor de Hsp70.

También es un aspecto de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente divulgación a un individuo que lo necesite. Dicho tratamiento puede ser profiláctico, curativo o de mejora.

La descripción también se refiere a un procedimiento para aumentar la absorción de un compuesto, donde dicho procedimiento comprende la etapa de administrar dicho compuesto junto con Hsp70 o un fragmento funcional o variante de la misma. En una realización de la presente descripción, dicho Hsp70 o un fragmento funcional o variante de la misma se une covalentemente a dicho compuesto. En otra realización de la presente descripción, dicho Hsp70 o un fragmento funcional o variante de la misma está unido de forma no covalente a dicho compuesto.

La presente divulgación también se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal que comprende la administración del agente bioactivo según la presente divulgación en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento.

En una realización de la divulgación, Hsp70 se administra junto con terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.

En otra realización de la presente descripción, Hsp70 se usa para facilitar la absorción de enzimas en la terapia de reemplazo enzimático, lo que aumenta la cantidad de enzima que las células relevantes han absorbido.

### Definiciones

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

Fragmento funcional de Hsp70: El término «fragmento funcional de Hsp70» debe interpretarse como cualquier fragmento de Hsp70 que tenga la función deseada. En una realización de la presente descripción, un fragmento funcional es un fragmento capaz de revertir la patología de una enfermedad de almacenamiento lisosomal como se especifica en el presente documento. En otra realización de la presente descripción, un fragmento funcional es un fragmento capaz de inducir autofagia. En relación con el aumento de la absorción de una sustancia, un fragmento funcional de Hsp70 es un fragmento capaz de aumentar la absorción de dicha sustancia. Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto del fragmento funcional puede ser distinto del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, el fragmento funcional puede ser más efectivo que la molécula de longitud completa. Además, el uso de fragmentos en lugar de moléculas de longitud completa puede ser ventajoso en vista del menor tamaño de los

fragmentos.

Variante funcional de Hsp70: El término «variante funcional de Hsp70» debe interpretarse como cualquier variante de Hsp70 que tenga la función deseada. En una realización de la presente descripción, un fragmento funcional es un  
 5 fragmento capaz de revertir la patología de una enfermedad de almacenamiento lisosomal como se especifica en el presente documento. En otra realización de la presente descripción, una variante funcional es un fragmento capaz de inducir autofagia. En relación con el aumento de la absorción de una sustancia, una variante funcional de Hsp70 es un fragmento capaz de aumentar la absorción de dicha sustancia. Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto de la  
 10 variante funcional puede ser distinto del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, la variante funcional puede ser más efectivo que la molécula de longitud completa.

Un «agente bioactivo» (es decir, sustancia/agente biológicamente activo) es cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporciona algún efecto farmacológico, a menudo beneficioso, que puede demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Como se usa en el presente documento, este término incluye además cualquier sustancia  
 15 fisiológica o farmacológicamente activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un individuo. Otros ejemplos de agentes bioactivos incluyen, entre otros, agentes que comprenden o consisten en un oligosacárido, agentes que comprenden o consisten en un polisacárido, agentes que comprenden o consisten en un péptido opcionalmente glucosilado, agentes que comprenden o consisten en un polipéptido opcionalmente glucosilado, agentes que comprenden o consisten en un ácido nucleico, agentes que comprenden o consisten en un oligonucleótido, agentes  
 20 que comprenden o consisten en un polinucleótido, agentes que comprenden o consisten en un lípido, agentes que comprenden o consisten en un ácido graso, agentes que comprenden o consisten en un éster de ácido graso y agentes que comprenden o consisten en metabolitos secundarios. Se puede usar de manera profiláctica, terapéutica, en relación con el tratamiento de un individuo, como un humano o cualquier otro animal. Como se usa en el presente documento, un agente bioactivo es una sustancia capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de  
 25 Hsp70.

Los términos «fármaco» o «medicamento» como se usan en el presente documento incluyen sustancias biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activas que actúan local o sistémicamente en el cuerpo humano o animal.

30 Los términos «tratar», «tratamiento» y «terapia» tal como se usan en el presente documento se refieren igualmente a la terapia curativa, a la terapia profiláctica o preventiva y a la terapia de mejora o paliativa. El término incluye una técnica para obtener resultados fisiológicos beneficiosos o deseados, que pueden establecerse clínicamente. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de  
 35 síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, enfermedad estabilizada (es decir, que no está empeorando), retraso o desaceleración de la progresión o empeoramiento de la enfermedad/síntomas, mejora o paliación de la enfermedad o síntomas, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término «paliación», y sus variaciones, como se usa en el presente documento, significa que la extensión y/o manifestaciones indeseables de una enfermedad o síntoma fisiológico se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o alarga, en  
 40 comparación con la no administración de composiciones de la presente divulgación.

Un «efecto de tratamiento» o «efecto terapéutico» se manifiesta si hay un cambio en la afección que se está tratando, según lo medido por los criterios que constituyen la definición de los términos «tratar» y «tratamiento». Hay un  
 45 «cambio» en la enfermedad que se está tratando si hay al menos un 5 % de mejora, preferiblemente un 10 % de mejora, más preferiblemente al menos un 25 %, incluso más preferiblemente al menos un 50 %, tal como al menos un 75 %, y lo más preferiblemente es al menos un 100 % de mejora. El cambio puede basarse en mejoras en la gravedad de la enfermedad tratada en un individuo, o en una diferencia en la frecuencia de enfermedades mejoradas en poblaciones de individuos con y sin tratamiento con el agente bioactivo, o con el agente bioactivo en combinación con una composición farmacéutica de la presente divulgación.

50 «Cantidad farmacológicamente efectiva», «cantidad farmacéuticamente efectiva» o «cantidad fisiológicamente efectiva» de un «agente bioactivo» es la cantidad de un agente activo presente en una composición farmacéutica como se describe en el presente documento que se necesita para proporcionar un nivel deseado de agente activo en el flujo sanguíneo o en el sitio de acción en un individuo (por ejemplo, los pulmones, el sistema gástrico, el sistema  
 55 colorrectal, la próstata, etc.) a tratar para dar una respuesta fisiológica anticipada cuando se administra dicha composición. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el agente activo, la actividad de la composición, el dispositivo de administración empleado, las características físicas de la composición, el uso previsto del paciente (es decir, el número de dosis administradas por día), consideraciones del paciente, y similares, y puede ser determinado fácilmente por un experto en la materia, en base a la información proporcionada en este documento.  
 60 Se puede administrar una «cantidad efectiva» de un agente bioactivo en una administración, o mediante múltiples administraciones de una cantidad que totalice una cantidad efectiva, preferiblemente dentro de un período de 24 horas. Se puede determinar utilizando procedimientos clínicos estándar para determinar las cantidades y el momento de

administración apropiados. Se entiende que la «cantidad efectiva» puede ser el resultado de una determinación empírica y/o individualizada (caso por caso) por parte del profesional sanitario y/o individuo responsable.

Los términos «potenciar» y «mejorar» un efecto beneficioso, y las variaciones de los mismos, como se usan en el presente documento, se refieren al efecto terapéutico del agente bioactivo frente al placebo, o un aumento en el efecto terapéutico de un tratamiento médico de última generación por encima del que normalmente se obtiene cuando se administra una composición farmacéutica sin el agente bioactivo de esta descripción. «Un aumento en los efectos terapéuticos» se manifiesta cuando hay una aceleración y/o aumento en la intensidad y/o extensión de los efectos terapéuticos obtenidos como resultado de la administración de los agentes bioactivos. También incluye la extensión de la longevidad de los beneficios terapéuticos. También puede manifestarse cuando se requiere una cantidad menor de la composición farmacéutica para obtener los mismos beneficios y/o efectos cuando se administra conjuntamente con los agentes bioactivos proporcionados por la presente descripción en comparación con la administración en una cantidad mayor de la composición farmacéutica en ausencia de agente bioactivo. El efecto potenciador preferiblemente, pero no necesariamente, da como resultado el tratamiento de síntomas agudos para los cuales la composición farmacéutica por sí sola no es efectiva o es menos efectiva terapéuticamente. La mejora se logra cuando hay al menos un 5 % de aumento en los efectos terapéuticos, tal como al menos un 10 % de aumento en los efectos terapéuticos cuando un agente bioactivo de la presente descripción se administra conjuntamente con una composición farmacéutica en comparación con la administración de la composición farmacéutica sola. Preferiblemente, el aumento es de al menos un 25 %, más preferiblemente al menos 50 %, incluso más preferiblemente al menos 75 %, lo más preferible es al menos un 100 %.

«Administrar conjuntamente» o la «administración conjunta» de uno o más agentes bioactivos, o agentes bioactivos y medicamentos de última generación, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más agentes bioactivos de la presente descripción, o administración de uno o más agentes bioactivos de la presente descripción y una composición farmacéutica de última generación dentro de un cierto período de tiempo. El período de tiempo es preferiblemente menor que 72 horas, tal como menor que 48 horas, por ejemplo menor que 24 horas, tal como menor que 12 horas, por ejemplo, menor que 6 horas, tal como menor que 3 horas. Sin embargo, estos términos también significan que el agente bioactivo y una composición terapéutica pueden administrarse juntos (simultáneamente o esencialmente simultáneamente).

El término «individuo» se refiere a vertebrados, en particular a un miembro de una especie de mamífero, preferiblemente primates, incluidos humanos. En una realización preferida de la presente descripción, un individuo como se usa en el presente documento es un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad.

Un «individuo que lo necesita» se refiere a un individuo que puede beneficiarse de la presente descripción. En una realización de la presente descripción, dicho individuo que lo necesita es un individuo enfermo, en el que dicha enfermedad es una enfermedad de almacenamiento lisosomal.

El término «nucleótido natural» o «nucleótido» se refiere a cualquiera de los cuatro desoxirribonucleótidos, dA, dG, dT y dC (constituyentes del ADN), y los cuatro ribonucleótidos, A, G, U y C (constituyentes del ARN), tal como se encuentran en la naturaleza. Cada nucleótido natural comprende o consiste esencialmente en un resto de azúcar (ribosa o desoxirribosa), un resto de fosfato y un resto de base natural/estándar. Los nucleótidos naturales se unen a nucleótidos complementarios según reglas bien conocidas de emparejamiento de bases (Watson y Crick), donde la adenina (A) se empareja con timina (T) o uracilo (U); y donde la guanina (G) se empareja con citosina (C), donde los pares de bases correspondientes son parte de cadenas de nucleótidos antiparalelas complementarias. El emparejamiento de bases da como resultado una hibridación específica entre nucleótidos predeterminados y complementarios. El emparejamiento de bases es la base por la cual las enzimas pueden catalizar la síntesis de un oligonucleótido complementario al oligonucleótido molde. En esta síntesis, los bloques de construcción (normalmente los trifosfatos de los derivados ribo o desoxirribo de A, T, U, C o G) son dirigidos por un oligonucleótido molde para formar un oligonucleótido complementario con la secuencia complementaria correcta. El reconocimiento de una secuencia de oligonucleótidos por su secuencia complementaria está mediado por bases correspondientes e interactuantes que forman pares de bases. En la naturaleza, las interacciones específicas que conducen al emparejamiento de bases se rigen por el tamaño de las bases y el patrón de los donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno de las bases. Una gran base de purina (A o G) se combina con una pequeña base de pirimidina (T, U o C). Además, el reconocimiento de pares de bases entre bases está influenciado por enlaces de hidrógeno formados entre las bases. En la geometría de pares de bases Watson y Crick, un anillo de seis miembros (una pirimidina en oligonucleótidos naturales) se yuxtapone a un sistema de anillo compuesto por un anillo fusionado de seis miembros y un anillo de cinco miembros (una purina en oligonucleótidos naturales), con un enlace de hidrógeno medio que une dos átomos en anillo, y enlaces de hidrógeno a cada lado que unen grupos funcionales unidos a cada uno de los anillos, con grupos donantes emparejados con grupos aceptores.

Como se usa en el presente documento, «ácido nucleico» o «molécula de ácido nucleico» se refiere a polinucleótidos,

tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquier opción entre ligadura, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos de origen natural (como ADN y ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas alfa de nucleótidos de origen natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcares y/o en restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, todo el resto del azúcar se puede reemplazar con estructuras similares estérica y electrónicamente, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término «molécula de ácido nucleico» también incluye p. ej., los denominados «ácidos nucleicos peptídicos», que comprenden bases de ácido nucleico modificadas o de origen natural unidas a una cadena principal de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

El término «complemento de una molécula de ácido nucleico» se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

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

Una «construcción de molécula de ácido nucleico» es una molécula de ácido nucleico, de cadena simple o doble, que se ha modificado mediante intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

«ADN lineal» denota moléculas de ADN no circulares que tienen extremos libres 5' y 3'. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circulares cerradas, como los plásmidos, por digestión enzimática o interrupción física.

El «ADN complementario (ADNc)» es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de una plantilla de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se usa un cebador complementario a porciones de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la materia también usan el término «ADNc» para referirse a una molécula de ADN de doble cadena que consiste en una molécula de ADN de cadena sencilla y su cadena de ADN complementaria. El término «ADNc» también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de una plantilla de ARN.

«ADN heterólogo» se refiere a una molécula de ADN, o una población de moléculas de ADN, que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas a una célula huésped particular pueden contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que ese ADN huésped se combine con ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de transcripción se considera una molécula de ADN heteróloga. Por el contrario, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente con un promotor exógeno. Como otra ilustración, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula de tipo silvestre se considera ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen de tipo silvestre.

Un «polipéptido» es un polímero de residuos de aminoácidos preferiblemente unidos exclusivamente por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Un polipéptido producido por la expresión de una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido «heterólogo». El término «polipéptido» como se usa en el presente documento cubre proteínas, péptidos y polipéptidos, donde dichas proteínas, péptidos o polipéptidos pueden o no haber sido modificados postraduccionalmente. La modificación postraduccional puede ser, por ejemplo, fosforilación, metilación o glucosilación.

El término «expresión» se refiere a la biosíntesis de un gen o un producto génico.

«Hibridar» significa reconocer hebras de ácido nucleico de distintas fuentes; es decir, formar pares de bases entre regiones complementarias de dos cadenas de ADN que originalmente no estaban emparejadas. El término «hibridación en condiciones estrictas» se define según Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. Preferiblemente, la hibridación en condiciones rigurosas significa que después del lavado durante 1 h con 1 vez SSC y SDS al 0,1 % a 50 grados C, preferiblemente a 55 grados C, más preferiblemente a 62 grados C y lo más preferible es a 68 grados C, particularmente durante 1 h en 0,2 veces SSC y 0,1 % SDS a 50 grados C, preferiblemente a 55 grados C, más preferiblemente a 62 grados C y lo más preferible es a 68 grados C, se observa una señal de hibridación positiva.

10

Un tramo de «homología completa» se define como una combinación de nucleótidos de emparejamiento a lo largo de la secuencia de los nucleótidos que interactúan; p.ej., en ARN natural, el emparejamiento de A con U y G con C.

Un «promotor» es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor se localiza en la región 5' no codificante de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos de consenso. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la tasa de transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores representables.

Un «elemento regulador» es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares que permiten la transcripción exclusiva o preferencial en células, tejidos u órganos particulares. Estos tipos de elementos reguladores normalmente están asociados con genes que se expresan de una manera «específica de célula», «específica de tejido» o «específica de órgano».

Un «potenciador» es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficiencia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

30

Un «vector de clonación» es una molécula de ácido nucleico, como un plásmido, cósmido o bacteriófago que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores suelen incluir genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o la ampicilina.

Un «vector de expresión» es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Típicamente, un vector de expresión comprende un promotor de transcripción, un gen y un terminador de transcripción. La expresión génica generalmente se coloca bajo el control de un promotor, y se dice que dicho gen está «operativamente unido» al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor central están operativamente unidos si el elemento regulador modula la actividad del promotor central. Los vectores más simples llamados «vectores de transcripción» solo pueden transcribirse pero no traducirse: pueden replicarse en una célula objetivo pero no expresarse, a diferencia de los vectores de expresión. Los vectores de transcripción se utilizan para amplificar su inserción.

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

50

La transfección describe la introducción de material extraño en las células eucariotas. El término «transfección» para procedimientos no virales se usa con mayor frecuencia en referencia a las células de mamíferos, mientras que el término «transformación» se prefiere para describir la transferencia de ADN no viral en bacterias y células eucariotas no animales como hongos, algas y plantas. Se pueden emplear procedimientos químicos y físicos para transfectar células.

Un «polipéptido» es un polímero de residuos de aminoácidos preferiblemente unidos exclusivamente por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Un polipéptido producido por la expresión de una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido «heterólogo». El término «polipéptido» como se usa en el presente documento cubre proteínas, péptidos y polipéptidos, donde dichas proteínas, péptidos o polipéptidos pueden o no haber sido modificados postraduccionalmente. La modificación postraduccional puede ser, por ejemplo, fosforilación, metilación o glucosilación.

60

Un «residuo de aminoácido» puede ser un enlace peptídico natural o no natural unido a enlaces peptídicos o enlaces distintos de los enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácidos pueden estar en configuración D o configuración L. Un residuo de aminoácido comprende una parte amino terminal (NH<sub>2</sub>) y una parte carboxilo terminal (COOH) separadas por una parte central que comprende un átomo de carbono, o una cadena de átomos de carbono, al menos uno de los cuales comprende al menos una cadena lateral o grupo funcional. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino presente en el extremo amino terminal de un aminoácido o péptido, y COOH se refiere al grupo carboxi presente en el extremo carboxilo terminal de un aminoácido o péptido. El término genérico aminoácido comprende aminoácidos tanto naturales como no naturales. Aminoácidos naturales de nomenclatura estándar como se enumeran en J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) y adoptados en 37 C.F.R., sección 1.822(b)(2) pertenecen al grupo de aminoácidos enumerados en la Tabla a continuación. Los aminoácidos no naturales son aquellos que no figuran en la tabla a continuación. Ejemplos de aminoácidos no naturales son los enumerados, p. ej., en 37 C.F.R. sección 1.822(b)(4). Además, los residuos de aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, residuos de aminoácidos modificados, residuos de L-aminoácidos y estereoisómeros de residuos de D-aminoácidos.

15

Símbolos		Aminoácido
1 letra	3 letras	
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
M	Met	Metionina
A	Ala	Alanina
S	Ser	Serina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
P	Pro	Prolina
K	Lys	Lisina
H	His	Histidina
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Ácido aspártico
N	Asn	Asparagina
C	Cys	Cisteína

*Aminoácidos naturales y sus respectivos códigos.*

Un «residuo de aminoácido equivalente» se refiere a un residuo de aminoácido capaz de reemplazar otro residuo de aminoácido en un polipéptido sin alterar sustancialmente la estructura y/o funcionalidad del polipéptido. Los aminoácidos equivalentes tienen propiedades similares, como el volumen de la cadena lateral, la polaridad de la cadena lateral (polar o no polar), la hidrofobicidad (hidrófobo o hidrófilo), el pH (ácido, neutro o básico) y la organización de la cadena lateral de las moléculas de carbono (aromático/alifático). Como tal, los «residuos de aminoácidos equivalentes» pueden considerarse como «sustituciones de aminoácidos conservativas».

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

En el sentido del término «sustitución de aminoácidos equivalente» como se aplica en este documento, un aminoácido puede ser sustituido por otro, en una realización de la presente descripción, dentro de los grupos de aminoácidos indicados aquí a continuación:

30

- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr, y Cys.)
- ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro, y Met)

- iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
- iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
- vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
- 5 vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
- viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida (Asn, Gln)
- ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxilo (Ser, Thr)
- x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),
- xi) Aminoácidos neutros, débilmente hidrófobos (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
- 10 xii) Aminoácidos ácidos hidrófilos (Gln, Asn, Glu, Asp), y
- xiii) Aminoácidos hidrófobos (Leu, Ile, Val)

La presente descripción también se refiere a variantes de Hsp70, o fragmentos de las mismas, donde las sustituciones se han diseñado mediante análisis computacional que usa homología de secuencia para predecir si una sustitución  
15 afecta a la función de la proteína (por ejemplo, Pauline C. Ng and Steven Henikoff, *Genome Research*, Vol. 11, Issue 5, 863-874, May 2001).

Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como «alrededor de» X o  
20 «aproximadamente» X, se entenderá que el valor establecido de X es exacto a +/- 20 %, como +/- 10 %, por ejemplo, +/- 5 %.

### DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Figura 1: *Esquema de la hidrólisis de esfingolípidos principales y enfermedades asociadas.* La descomposición exohidrolítica de los esfingolípidos con grupos de cabeza hidrófilos cortos requiere cofactores no enzimáticos, proteínas activadoras de los esfingolípidos (SAP o saposinas). Las deficiencias hereditarias de la enzima respectiva, así como de la proteína activadora correspondiente, provocan el almacenamiento de lípidos lisosomales y dan como resultado la expresión de diversas esfingolipidosis. From Ferlitz et al., *Chem. Phys. Lipids*, (102) 35-43, 1999. Un  
30 círculo punteado marca las enfermedades asociadas con una deficiencia en una enzima que interactúa con BMP; las enfermedades no marcadas con un círculo punteado, por lo tanto, no están asociadas con enzimas dependientes de BMP.

Figura 2: *La Hsp70 lisosómica estabiliza las membranas lisosómicas.* (a) Imágenes confocales representativas de  
35 células U-2-OS incubadas con rHsp70-AF488 300 nM (verde) durante 24 h, fijadas y teñidas para la proteína de membrana integral lisosómica 1 (LIMP-1; rojo). Para la colocalización con otros marcadores de orgánulos, véase la figura 3. (b) Las células U-2-OS se incubaron con rHsp70-AF488 300 nM durante 24 h antes de la cuantificación de rHsp70-AF488 en membranas (memb.) y el sobrenadante (sup.) obtenido mediante ciclos repetidos de congelación/descongelación y centrifugación de la fracción de membrana ligera (LMF). Los análisis de  
40 inmunotransferencia de la proteína 2 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-2) y la cathepsina B (Cat B) demuestran la validez del procedimiento de fraccionamiento. (c) Imágenes fijas representativas de células U-2-OS expuestas a la fotooxidación (naranja y azul de acridina). La pérdida de integridad lisosómica se visualiza por la pérdida de rojo y el aumento de la tinción verde. (d y e) Las células U-2-OS se incubaron con proteínas recombinantes indicadas (300 nM) durante 24 h y se analizaron para determinar la integridad lisosómica tras la fotooxidación. Cuando se indicó, las  
45 células se trataron con ARNip indicados durante 48 h antes de la adición de proteínas recombinantes (e). Los valores representan medias  $\pm$  DE (desviación estándar) para tres (d) o cinco (e) experimentos independientes. Las inmunotransferencias representativas de proteínas indicadas de células U-2-OS que no se trataron o trataron con control o ARNip de Hsp70 se muestran a la derecha. Escala: 20  $\mu$ m (a y c).

50 Figura 3: *Colocalización de rHsp70-AF488 endocitada con lisosomas.* Imágenes confocales representativas de células U-2-OS incubadas con rHsp70-AF488 300 nM (verde) durante 24 h, fijadas y teñidas para los siguientes marcadores de orgánulos (rojo): proteína 1 de membrana asociada a lisosoma (LAMP-1; lisosomas), LAMP-2 (lisosomas), LBPA/BMP (6C4; compartimento endolisosomal), Cyt c (mitocondrias), SERCA (ER) y golgin-97 (Golgi). Escala: 20  $\mu$ m (LAMP-1, LAMP-2 y BMP) o 10  $\mu$ m (Cyt c, SERCA y Golgin-97).

55 Figura 4: *Hsp70 aumenta la absorción endocítica de otras moléculas.* Panel A: fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (iMEF), ya sean de tipo silvestre (WT) o transgénicos para Hsp70 (TG), donde se incubaron con 20  $\mu$ g/ml de BSA (BSA\*) marcado con Alexa Fluor 488 durante 24 h. La absorción endocítica se verificó mediante microscopía de fluorescencia (no mostrada). Las células fueron cultivadas y analizadas para la absorción de BSA\*.  
60 Como es evidente en la figura, los iMEF transgénicos para Hsp70 tenían una absorción significativamente mayor de BSA\* que los iMEF de tipo silvestre. Panel B: Las células de osteosarcoma U2OS se incubaron con 20  $\mu$ g/ml de BSA\* durante 24 horas con 3000 nM de rHsp70 o sin ellos, como se indica. La absorción endocítica se verificó mediante

microscopía de fluorescencia (no mostrada). Las células fueron cultivadas y analizadas para la absorción de BSA\*. Como es evidente en la figura, las células U2OS en las que BSA\* y rHsp70 se agregaron juntos tuvieron una absorción significativamente mayor de BSA\* que las células incubadas solo con BSA\*.

- 5 Figura 5: Experimento de pulso y caza. Se añadió rhHSP70 (HSP70 humano recombinante) a fibroblastos primarios del paciente con enfermedad de Niemann-Pick tipo A (identificación del paciente: 83/24) a T = 0, las mediciones del área de la sección transversal lisosómica se realizaron a las 24h, 48h, 72h y 1 semana después de la administración. El panel superior A muestra datos sin procesar, el panel inferior B muestra células tratadas con rhHSP70 normalizadas a células no tratadas en el mismo punto temporal. Conclusión: El efecto de rhHSP70 es reversible y dura  
10 aproximadamente 1 semana.

- Figura 6: Experimento de ajuste posológico del arimoclomol. Se agregaron varias concentraciones de Arimoclomol ('Ari') durante 48 h a fibroblastos primarios del paciente con enfermedad de Niemann-Pick tipo A (identificación del paciente: 83/24). Lectura: área de sección transversal lisosómica. Conclusión: El inductor de HSP70 de molécula  
15 pequeña arimoclomol revierte eficazmente la patología primaria lisosómica (acumulación de lisosomas) de una manera dependiente de la dosis.

- Figura 7: Prueba de rhHSP70 en no esfingolipidosis. Se añadió rhHSP70 marcada con Alexa Fluor 488 (para la visualización de la absorción) durante 48 horas a fibroblastos primarios del paciente con enfermedad de Niemann-Pick  
20 tipo C1 (identificación del depósito de células Coriell: GM17918). Lectura: área de sección transversal lisosómica (patología celular primaria), realizada mediante microscopía confocal con láser. Conclusión: rhHSP70 revierte eficazmente la patología primaria lisosómica en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C1 (es decir, la acumulación de lisosomas).

- 25 Figura 8: Prueba de rhHSP70 en no esfingolipidosis. Se añadió rhHSP70 marcada con Alexa Fluor 488 (para la visualización de la absorción) durante 48 h a fibroblastos primarios de pacientes con mucopolisacaridosis tipo IIIA (también conocida como Sanfilippo tipo IIIA) (identificación del depósito de células Coriell: GM00879). Lectura: área de sección transversal lisosómica (patología celular primaria), realizada mediante microscopía confocal con láser. Conclusión: rhHSP70 revierte efectivamente la patología primaria lisosómica en la mucopolisacaridosis tipo IIIA (es  
30 decir, la acumulación de lisosomas)

- Figura 9: Prueba de rhHSP70 en no esfingolipidosis. rhHSP70 marcada con Alexa Fluor 488 (para la visualización de la absorción) se agregó durante 48 h a fibroblastos primarios de pacientes con mucopolisacaridosis tipo IVA (también conocida como Morquio tipo IVA (Morbus)) (identificación del depósito de células Coriell: GM00958). Lectura: área de  
35 sección transversal lisosómica (patología celular primaria), realizada mediante microscopía confocal con láser. Conclusión: rhHSP70 revierte efectivamente la patología primaria lisosómica en la mucopolisacaridosis tipo IVA (es decir, la acumulación de lisosomas).

- Figura 10: Prueba de rhHSP70 en no esfingolipidosis. Se añadió rhHSP70 durante 48 h a fibroblastos primarios de  
40 pacientes con enfermedad de Sandhoff y mucopolisacaridosis tipo IIIA (también conocida como Sanfilippo tipo IIIA) (identificación del depósito de células Coriell: Sandhoff: GM11098, MPSIIIA: GM00879). Ctrl = fibroblastos de control normales Lectura: Volumen del compartimento ácido (VAC) (patología celular primaria), realizado por FACS. Conclusión: rhHSP70 revierte eficazmente la patología primaria lisosómica en la enfermedad de Sandhoff y en los fibroblastos de pacientes primarios con mucopolisacaridosis tipo IIIA (es decir, acumulación de lisosomas).

- 45 Figura 11: rhHSP70 induce autofagia en células MCF-7-LC3-EGFP. La adición de 20 µg/ml de rhHSP70 al medio de cultivo conduce a la translocación y acumulación de LC3-EGFP, un marcador para la macroautofagia.

- Figura 12: Los ratones de control NPC -/- (A) tienen patrones de crecimiento más superficiales y esporádicos que los ratones tratados con HSP70 (B). Los puntos donde las curvas de crecimiento se detienen abruptamente, indican ratones asesinados por órganos. En el panel A: Las series 1 y 3 son femeninas; las series 2 y 5-8 son masculinas. En el panel B: Las series 2 y 4-7 son femeninas; Las series 1, 3 y 8 son masculinas.

- Figura 13: (A) La distribución de frecuencia de temblor representativa muestra un aumento promedio en los ratones  
55 tratados, especialmente en el intervalo de frecuencia más bajo. (n = 5 para tratamiento y control. Wt n=1). Los intentos de erguirse sobre las patas en los laterales (B) son relativamente iguales, pero los ratones de control no logran completar ninguno con éxito (C). La situación es similar cuando se trata de erguirse sobre las patas en el centro (D), aunque los ratones de control logran completar el 50 % de estos (E). (n = 5, tratado, n = 4, control).

- 60 Figura 14: El colesterol medido después de 7 semanas (panel A) y 9 semanas (panel B) en animales control y tratados.

Figura 15: GSL medido después de 7 semanas (panel A) y 9 semanas (panel B) en animales control y tratados.

Figura 16: La esfingosina se midió después de 7 y 9 semanas en animales control y tratados.

Figura 17: El arimoclomol induce un aumento de la expresión de HSP70 en células de pacientes con enfermedad de Niemann-Pick de tipo C. Panel A: Células de pacientes NPC GM18453 sometidas a choque térmico (HS) 60 min a 42 grados. Panel B: Células de pacientes NPC GM18453 sin HS.

Figura 18: La iroxanadina induce un aumento de la expresión de HSP70 en las células de pacientes con enfermedad de Niemann-Pick tipo A. Células NPDA (B534 R496L), choque térmico de 40 grados durante 60 minutos. Eje vertical: Inducción de proteína 70 de choque térmico (A.U.).

Figura 19: El arimoclomol induce un aumento de la expresión de HSP70 en células de pacientes con enfermedad de Fabry. Células de pacientes con enfermedad de Fabry tratadas con arimoclomol. Eje vertical: Inducción de proteína 70 de choque térmico (A.U.).

**Descripción detallada:**

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.

Como lo demuestran los presentes inventores, HSP70 es beneficiosa para revertir la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico; incluidas aquellas enfermedades de almacenamiento lisosómico que surgen de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente relacionada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor; tales como enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, mannosidosis y sialidosis tipo II.

**Lisosomas**

Desde el descubrimiento de los lisosomas por de Duve en 1955, la visión de este orgánulo ha estado dominada por el dogma de que es únicamente el término de la vía endocítica en las células animales: un compartimento que alberga una amplia gama de hidrolasas, que, si se liberan en el citosol, provocan necrosis e inflamación de los tejidos. Esta visión de los lisosomas como, en el mejor de los casos, una unidad de eliminación de basura, y en el peor de los casos, una «bolsa de suicidio» inespecífica ha cambiado dramáticamente debido a descubrimientos recientes que proporcionan evidencia de numerosas tareas más específicas para los lisosomas y sus contenidos.

**Hidrolasas lisosomales**

Como compartimento principal para la degradación intracelular y el posterior reciclaje de los componentes celulares, los lisosomas reciben carga tanto hetero como autofágica, que en la luz de este orgánulo encuentra su destino final. La degradación se lleva a cabo por una serie de hidrolasas ácidas (fosfatasas, nucleasas, glucosidasas, proteasas, peptidasas, sulfatasas, lipasas, etc.) capaces de digerir todas las macromoléculas celulares principales. Entre las proteasas lisosómicas mejor estudiadas se encuentra la familia de las proteasas de catepsina. Las catepsinas se pueden dividir en tres subgrupos según su aminoácido del sitio activo, es decir, catepsinas de cisteína (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W y X/Z), de aspartato (D y E) y de serina (G). Las catepsinas funcionan de manera óptima en el pH ácido de los lisosomas (pH 4-5) aunque todavía pueden funcionar en el pH neutro fuera de los lisosomas, aunque tengan una estabilidad disminuida y/o especificidad alterada.

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

Además de la descomposición de las proteínas, los lisosomas y los endosomas tardíos también son responsables del metabolismo de los lípidos celulares, como los glucosfingolípidos, a través de una serie de enzimas endolisomales y coenzimas, cuya función adecuada depende de la composición lipídica de las membranas intralisosomales. La importancia del metabolismo funcional de los lípidos endolisosómicos puede apreciarse fácilmente por el hecho de que la enfermedad clínica es evidente en caso de disfunción en cualquier etapa del metabolismo de los esfingolípidos, lo que da lugar a enfermedades como enfermedad de Tay-Sachs, Sandhoff, Farber, Fabry, Gaucher, Krabbe y

Niemann-Pick.

### **Tráfico hacia y desde los lisosomas**

5 El tráfico de las membranas endocíticas cumple una función esencial en la célula de los mamíferos a través del suministro de componentes de la membrana, diversas moléculas de soluto y ligandos asociados al receptor a una serie de compartimentos intracelulares. Mientras que las diversas rutas endocíticas hasta hace poco parecían simples, con las principales vías convergiendo en los lisosomas, donde se produciría la degradación y el posible reciclaje de regreso a la membrana plasmática, la evidencia reciente muestra que estas vías son más complejas de lo que se  
10 había imaginado.

### **La ruta endocítica**

La endocitosis se entiende mejor en términos de la endocitosis mediada por receptores de moléculas a través de la  
15 formación de fosas recubiertas de clatrina, aunque también se han identificado una variedad de rutas endocíticas no mediadas por clatrina (por ejemplo, macropinocitosis, fagocitosis, captación a través de la formación de caveolas y formación de fosas no recubiertas de clatrina). La nomenclatura del sistema endocítico no se ha estandarizado por completo, y el término comúnmente utilizado «endosoma temprano» en realidad describe dos compartimentos endosómicos distintos: el endosoma de clasificación y el compartimento de reciclaje endocítico (ERC). En la vía  
20 endocítica mediada por receptores convencionales, los receptores como el receptor de transferrina, el receptor de lipoproteína de baja densidad y el receptor de manosa 6-fosfato (MPR) se concentran en fosas recubiertas de clatrina en la superficie de la membrana plasmática en virtud de las interacciones entre motivos de secuencia en sus colas citoplasmáticas y elementos en la capa de clatrina. Después de deshacerse de su cubierta de clatrina, el endosoma recién formado se fusiona con otros endosomas y endosomas de clasificación preexistentes para convertirse en un  
25 endosoma de clasificación. Como su nombre lo indica, su tarea principal es ordenar los componentes recién adquiridos en sus ubicaciones correctas. Los tres destinos conocidos incluyen la membrana plasmática, los endosomas tardíos y el ERC. A medida que madura el endosoma de clasificación, experimenta una caída en el pH, lo que facilita la liberación de ligandos unidos al receptor en la luz del endosoma. Sin embargo, antes de la maduración completa del endosoma de clasificación en el endosoma tardío, las moléculas destinadas al reciclaje deben clasificarse. Se cree  
30 que este proceso tiene lugar a través del pellizco de los túbulos estrechos, un proceso que favorece la clasificación de las proteínas de membrana de las moléculas de soluto, ya que la relación superficie-área-volumen de los túbulos es mayor que la del endosoma de clasificación vesicular. Los túbulos pellizcados pueden transmitir las proteínas de membrana directamente de vuelta a la membrana plasmática (la vía de retorno directo) o al ERC. El ERC es principalmente una colección de orgánulos tubulares, cuya localización varía entre los tipos de células. Mientras que  
35 el ERC es capaz de clasificar moléculas a varios destinos distintos, la mayoría de las moléculas que transitan a través del ERC regresan a la membrana plasmática.

A medida que madura el endosoma de clasificación, su pH luminal disminuye constantemente, principalmente debido a la acción de la ATPasa de protones de tipo vacuolar (V-ATPasa), mientras que también se producen cambios en la  
40 composición de lípidos y proteínas de la membrana. El tráfico de membrana desde el endosoma de clasificación hasta el endosoma tardío y luego hacia el lisosoma ha sido escenario de cierta controversia. La disputa se refiere a si este transporte se explica mejor a través del transporte vesicular o por la maduración del endosoma de clasificación. Ambos modelos proporcionan un intermedio entre la clasificación y el endosoma tardío. Mientras que el modelo de maduración argumenta que la vesícula, que alcanza el endosoma tardío, es lo que queda después de la eliminación de  
45 componentes del antiguo endosoma de clasificación, el modelo de compartimento preexistente argumenta que el transporte de moléculas a los endosomas tardíos se produce a través de una vesícula transportadora endocítica (ECV), una vesícula de transporte específica entre la clasificación preexistente y los compartimentos endosómicos tardíos. Tanto los compartimentos endosomales de clasificación como los tardíos se consideran estructuralmente más complejos y tienen funciones más especializadas que las vesículas transportadoras. Sin embargo, estudios recientes  
50 de imágenes de células vivas han reconciliado los aspectos mecanicistas de ambos modelos, ya que las vesículas que surgen de una red dinámica de endosomas tempranos pueden experimentar una conversión en la que pierden la pequeña GTPasa RAB5 y reclutan RAB7, un marcador de endosomas tardíos. Aunque la organización de la vía endocítica está funcionalmente bien definida, la nomenclatura puede ser confusa. Funcionalmente, la vía endocítica se define por los receptores de mantenimiento (por ejemplo, el receptor de transferrina) y otros lípidos y proteínas que  
55 se ciclan a través del endosoma temprano/ endosoma de clasificación donde se produce el desacoplamiento receptor-ligando, pero no a través de endosomas tardíos donde puede ocurrir proteólisis. Sin embargo, más allá de estos criterios funcionales, la imagen se vuelve más nublada cuando se trata de la nomenclatura, sobre todo porque la generación de vesículas intraluminales, que comienzan en los endosomas tempranos y se vuelven cada vez más prominentes durante la maduración hasta los endosomas tardíos, ha dado lugar al término «cuerpos multivesiculares»  
60 (MVB). Este término se ha usado indistintamente como otro nombre para las ECV y los endosomas tardíos, así como para todas las vesículas endocíticas que contienen regiones o elementos multivesiculares, incluido el orgánulo híbrido que se forma cuando los lisosomas se fusionan con los endosomas tardíos (que contienen estructuras

multivesiculares). Sin embargo, los endosomas tardíos contienen más vesículas de membrana luminal que los endosomas tempranos y, por lo tanto, a menudo son el compartimento descrito por el término «cuerpos multivesiculares».

- 5 Finalmente, una gran cantidad de confusión en el campo ha surgido de la definición, o más bien de la falta de ella, de endosomas tardíos frente a lisosomas. Ambos compartimentos son igualmente ácidos y la mayoría, si no todas, las proteínas presentes en los lisosomas también se encuentran en los endosomas tardíos. Según el modelo de maduración, los endosomas tardíos serían precursores de los lisosomas, pero dado el desarrollo gradual, como sugiere la teoría, una clasificación estricta podría ser muy difícil de lograr. Recientemente, sin embargo, se han  
 10 presentado pruebas de que los lisosomas y los endosomas tardíos son compartimentos separados, que luego sufren tanto eventos de «besos» (fusiones transitorias) como eventos completos de fusión, después de lo cual los lisosomas pueden reformarse a partir del orgánulo híbrido.

**La ruta biosintética**

- 15 Además de la endocitosis, los endosomas tardíos también reciben carga a través de la vía MPR desde la red *trans*-golgi (TGN) (la ruta biosintética). El MPR dependiente de cationes y el MPR independiente de cationes/ receptor del factor de crecimiento II similar a la insulina (IGF-II) comparten la tarea de administrar hidrolasas ácidas recién sintetizadas desde la TGN a los lisosomas. El reconocimiento de las hidrolasas ácidas por los MPR requiere la adición  
 20 de carbohidratos en el retículo endoplásmico y la posterior modificación y fosforilación de los residuos de carbohidratos en restos de manosa-6-fosfato en el *cis*-Golgi. Las hidrolasas unidas a MPR se administran primero a los endosomas, donde se disocian de los receptores debido a la caída del pH luminal, lo que permite que los receptores se reciclen a la TGN. La proteína principalmente responsable de la clasificación de los MPR en fosas recubiertas de clatrina en la TGN, es una proteína adaptadora 1 (AP-1), aunque las proteínas de unión al factor de ribosilación de ADP que  
 25 contienen  $\gamma$ -tubulina localizadas en el aparato de Golgi (GGA) también desempeñan una tarea importante. Actualmente, se desconoce si AP-1 y los GGA funcionan en conjunto o de hecho dirigen los dos MPR a distintas ubicaciones subcelulares. AP-1 es parte de una familia de proteínas adaptadoras que consta de cuatro miembros, todos los cuales son proteínas heterotetraméricas utilizadas ampliamente en las vías secretoras y endocíticas. Además del papel mencionado anteriormente de AP-1 en fosas recubiertas de clatrina formadas en TGN, AP-1 y AP-2 se usan  
 30 en fosas recubiertas de clatrina durante la endocitosis en la membrana plasmática, mientras que AP-3 y AP-4 funcionan en el tráfico de las proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP).

**La ruta autofágica**

- 35 La autofagia es la tercera ruta bien caracterizada por la cual las macromoléculas alcanzan el lisosoma. La autofagia es una vía conservadora evolutiva involucrada en el recambio de proteínas y orgánulos de larga vida. Suele funcionar a niveles basales bajos, aunque puede inducirse, por ejemplo, en condiciones de inanición de nutrientes. En estas condiciones, la macroautofagia es la principal vía responsable de administrar material a los lisosomas. La macroautofagia se caracteriza por una cisterna de membrana plana que envuelve orgánulos citoplasmáticos y/o una  
 40 porción de citosol, lo que forma una vacuola unida de doble membrana cerrada, el autofagosoma. El autofagosoma finalmente se fusiona con los lisosomas, por lo que forma autofagolisosomas/autolisosomas, donde se produce la degradación y el reciclaje de las macromoléculas engullidas. El origen de la membrana del autofagosoma aún no está aclarado. El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, un compartimento de membrana peor caracterizado llamado fagoforo, así como la síntesis *de novo*, se han propuesto como orígenes de la membrana del autofagosoma. El reciente  
 45 progreso a través de la genética de levadura y el posterior descubrimiento de homólogos de mamíferos está mejorando rápidamente la comprensión del proceso de autofagia y, con suerte, aclarará también el origen de la membrana autofagosomal en el futuro cercano.

- También hay otras rutas por las cuales los lisosomas reciben carga autofágica. Un proceso bastante indiscriminado  
 50 denominado microautofagia se caracteriza por la envoltura del citosol por los lisosomas a través de las invaginaciones de la membrana lisosómica. Además de las macromoléculas, que están presentes en el citosol envuelto, este proceso también puede implicar la absorción de orgánulos como los peroxisomas. Finalmente, el transporte mediado por chaperonas de proteínas citosólicas hacia la luz lisosómica presenta una forma más directa y selectiva de autofagia. Esta vía depende de la presencia del miembro expresado constitutivamente de la familia de la proteína 70 de choque  
 55 térmico, Hsc70, a ambos lados de la membrana lisosómica. El proceso depende además del reconocimiento de un motivo de secuencia KDEL en proteínas diana por LAMP-2a.

- Los presentes inventores han demostrado previamente que rhHSP70 se une a BMP y facilita una mayor actividad  
 60 enzimática para aquellas enzimas que dependen de BMP como cofactor. Se demostró que la interacción HSP70-BMP es importante para revertir la patología de los LSD asociados con las enzimas que interactúan con BMP (WO 2009/155936).

Los presentes inventores ahora han demostrado además que rhHSP70 es un inductor potencial de autofagia (véase figura 11). Se puede contemplar un aumento del flujo autofágico que afecta a los lisosomas debido a la fusión de autofagosomas en lisosomas, como el último paso en la vía autofágica. También se puede contemplar que una inducción de autofagia por HSP70 conduce a un aclaramiento autofágico aumentado de lisosomas que tienen una  
5 acumulación patológica de sustrato debido a un LSD.

**Reforma de lisosomas y secreción lisosómica**

Después de la fusión de lisosomas con endosomas tardíos o autofagosomas, los lisosomas se reforman a partir de  
10 los orgánulos híbridos resultantes mediante el secuestro de proteínas de membrana y la condensación del contenido luminal. De las proteínas de membrana que deben eliminarse o reciclarse del orgánulo híbrido, las más obvias son los MPR, ya que, por definición, están ausentes de los lisosomas. Sin embargo, los lisosomas no pueden verse como el punto terminal de las vías endocíticas, ya que también pueden formar lisosomas secretores mediante fusión con gránulos secretores, un proceso que depende del  $Ca^{2+}$  y se reconoció por primera vez en las células secretoras de  
15 origen hematopoyético. Sin embargo, también existe evidencia de un compartimento lisosómico proximal a la membrana regulado por  $Ca^{2+}$  responsable de la exocitosis en las células no secretoras. El proceso de exocitosis depende de la proteína Rab27a, un miembro de la familia de proteínas Rab, que cuenta con más de 60 miembros. Las Rab son pequeñas GTPasas que tienen funciones reguladoras clave en la mayoría de los pasos de transporte de membrana, incluida la formación de vesículas, la motilidad, el acoplamiento y la fusión. Se utilizan al menos 13  
20 proteínas Rab en las vías endocíticas para determinar el destino de las diversas moléculas endocíticas y sus vesículas.

**Muerte celular programada**

La regulación del número total de células, así como la cantidad de células que constituyen los diferentes tejidos junto  
25 con la necesidad de un mecanismo para eliminar las células no deseadas, es de fundamental importancia en los organismos multicelulares. La muerte celular programada es el medio para este fin, dotando al organismo multicelular del potencial de deshacerse de las células no deseadas sin la pérdida de constituyentes celulares, lo que evita la inflamación asociada con la necrosis, la contrapartida conceptual de la muerte celular programada.

**30 Apoptosis**

La palabra apoptosis se usa en griego para describir la «caída» de pétalos de flores u hojas de árboles y fue acuñada por Currie y sus colegas en 1972 para describir un tipo común de muerte celular programada, que los autores habían observado en varios tejidos y tipos de células. Los autores habían notado que los acontecimientos que observaron  
35 tenían similitudes morfológicas significativas, que eran distintas de las características morfológicas que caracterizan a las células que sufren muerte patológica, necrótica, y sugirieron que estas características morfológicas comunes podrían deberse a un proceso subyacente idéntico.

Cuando las células mueren por apoptosis, sufren una serie de eventos transformadores. Entre estos eventos, y  
40 esencial para el fenotipo apoptótico característico, está la activación de caspasas (proteasa específica de aspartato de cisteína), una familia de endopeptidasas de cisteína, que escinden sustratos en residuos de aspartato específicos, de ahí el nombre. La activación de las caspasas conduce al procesamiento proteolítico de otras caspasas, así como a una serie de otros cambios en las actividades proteicas generales dentro de las células, lo que produce en última instancia las características morfológicas características asociadas con la activación de caspasas y, por definición, la  
45 apoptosis. Las características apoptóticas clásicas incluyen el encogimiento celular y la formación de ampollas en la membrana citoplasmática, la condensación de cromatina dentro del núcleo en formas geométricas claras, la fragmentación del ADN en enteros de unos 200 pb, la llamada escalera nucleosómica, el desprendimiento celular de sus células vecinas y la desintegración de la célula en pequeñas vesículas cerradas denominadas cuerpos apoptóticos. En un entorno multicelular, estos cuerpos apoptóticos son finalmente fagocitados por macrófagos o células vecinas,  
50 por lo que se completa la eliminación de la célula no deseada.

**Muerte celular programada**

La muerte celular programada (PCD) no es sinónimo de apoptosis, aunque uno podría inclinarse a pensarlo en función  
55 de la cantidad de literatura que utiliza estos términos de forma indiscriminada. El término PCD se está imponiendo gradualmente, pero el término apoptosis todavía se usa para describir un programa de muerte celular orquestado por la activación de caspasas, en particular la caspasa-3. Sin embargo, la capacidad de ciertas células para sobrevivir a la activación de caspasas proapoptóticas, así como PCD con ausencia total de activación de caspasa y activación de caspasa que conduce a PCD no apoptótica, ha revelado una notable plasticidad de la muerte celular programada y  
60 PCD puede definirse con mayor precisión como muerte celular dependiente de señales o actividades dentro de la célula moribunda. Se ha sugerido que la PCD se puede subdividir en apoptosis, PCD similar a la apoptosis y a la necrosis, según la morfología nuclear de las células moribundas, cada definición acuñada a características

morfológicas distintas, la característica principal es la forma de la condensación de la cromatina o su ausencia, aunque sería preferible hacer distinciones de PCD en función de las vías de señalización que participan en cualquier conjunto dado de condiciones que conducen a PCD. Sin embargo, esta forma de distinguir entre los distintos modos de PCD aún no es aplicable, ya que los hilos que conducen a los diversos tipos de muerte celular aún no se han resuelto.

5

### **Necrosis**

La necrosis es la contrapartida conceptual de la PCD, ya que no puede prevenirse por ningún otro medio que no sea eliminar el estímulo que origina la necrosis. Este modo de muerte celular generalmente se observa durante las

10

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

#### **Apoptosis**

15

Como se mencionó en la sección anterior, la apoptosis se define por la activación de los miembros de la familia de las cisteína endopeptidasas conocidas como caspasas y la morfología asociada con su activación. Las caspasas residen en las células como zimógenos inactivos, que pueden activarse rápidamente mediante procesamiento proteolítico. Este procesamiento se realiza en una cascada jerárquica en la que un estímulo apoptótico activa una caspasa

20 iniciadora (por ejemplo, caspasa-8 y -9), que a su vez activa el siguiente nivel en la jerarquía, las caspasas efectoras (por ejemplo, caspasa-3, -6 y -7). Estos últimos son considerados los ejecutores de la apoptosis, ya que cortan una serie de sustratos, cuyo procesamiento conduce finalmente al fenotipo asociado con la apoptosis. El programa apoptótico puede ser activado por una variedad de estímulos, que se pueden dividir ampliamente en estímulos extracelulares e intracelulares, y este último ve a la mitocondria como un jugador esencial. Los estímulos extracelulares

25 y la siguiente respuesta que da lugar a la apoptosis también se conocen como la vía de señalización extrínseca y se componen de una serie de acontecimientos que comienzan con la activación de uno de una variedad de receptores de muerte como Fas/Apo-1/CD95, TNFR o TRAIL. Al unirse a su ligando apropiado, estos receptores reclutan moléculas adaptadoras que contienen el dominio de la muerte (DD), tales como TRADD (proteína asociada al dominio de la muerte asociada a TNFR1) y FADD (proteína que se asocia a Fas con el dominio de la muerte), a través de la

30 interacción con el DD presente en los receptores. Estas moléculas adaptadoras reclutan caspasa-8 al complejo receptor, donde la caspasa se activa, posiblemente por procesamiento autocatalítico inducido por proximidad. En ciertas células (las llamadas células tipo I), la caspasa-8 escinde y activa directamente la procaspasa-3, mientras que en las células de tipo II, el sustrato de la caspasa-8 es la proteína citoplasmática Bid. La escisión de Bid genera un fragmento (Bid truncado (tBid)), que induce la oligomerización, translocación e inserción de dos miembros de la familia

35 Bcl-2 proapoptóticos, Bax y Bak, en la membrana mitocondrial externa. Esta inserción media la liberación del citocromo c transportador de electrones (CytC) desde el espacio intermembrana mitocondrial junto con una serie de otras proteínas, entre las que destacan el factor inductor de apoptosis (AIF), Smac/DIABLO, que antagoniza los efectos de las proteínas conocidas como proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y la endonucleasa G, una ADNasa. Cabe señalar que, aunque este es el punto fundamental en las teorías de la activación de la caspasa a través de las

40 mitocondrias, no se han presentado pruebas concluyentes sobre cómo la inserción de Bax y Bak facilita la liberación del citocromo c. Tras la liberación de la mitocondria, el CytC se acumula en el citoplasma, donde se une a la proteína Apaf-1 (factor de activación de la proteasa apoptótica-1) y da como resultado un cambio conformacional, que promueve la oligomerización de Apaf-1. Este oligómero se une a la procaspasa-9 a través de interacciones homotípicas entre los dominios de reclutamiento de caspasa (CARD), lo que resulta en la formación de un complejo

45 llamado apoptosoma. La formación de este complejo conduce a una actividad enzimática muy mejorada de la procaspasa-9, cuya actividad conduce a la activación proteolítica de la caspasa-3.

La apoptosis también puede desencadenarse por factores intracelulares que provocan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), un proceso conocido como la vía intrínseca. Estos factores incluyen

50 segundos mensajeros asociados con el estrés celular, como  $Ca^{2+}$ , NO y ácido araquidónico, así como bilirrubina, sales biliares y estímulos que pueden dar lugar a desnaturalización de proteínas y daño al ADN nuclear y mitocondrial, como radiación ionizante, estrés por calor, especies reactivas de oxígeno (ROS) y agentes quimioterapéuticos. En el caso de daño en el ADN nuclear, esto es detectado por una variedad de proteínas quinasas, que dependen de la forma del

55 daño en el ADN pero también de la noxa que lo provoca. La actividad de estas quinasas induce la acumulación de p53, que luego puede actuar como un factor de transcripción, lo que da lugar a una transcripción mejorada de genes proapoptóticos como Bax, Noxa y PUMA, todos los cuales pueden inducir MOMP. A nivel mitocondrial, p53 induce la expresión de enzimas mitocondriales que generan localmente ROS, así como una proteína de matriz mitocondrial (p53AIP1), cuya sobreexpresión desencadena la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la apoptosis.

60 La inducción de MOMP por p53 o por la acción de los estímulos intrínsecos descritos anteriormente es el punto en el que convergen las vías intrínseca y extrínseca, la ruta de la ruta intrínseca que sigue a la ya descrita para la extrínseca con liberación de citocromo c, formación del apoptosoma y la activación de caspasa-3 constituyen los pasos finales

hacia la desaparición de la célula no deseada.

### ***Las alternativas a la apoptosis***

- 5 En la última década, el papel exclusivo de las caspasas como ejecutores de PCD ha sido cuestionado y la creciente evidencia sugiere que hay más en la vida, y especialmente la muerte, de una célula de lo que se puede atribuir solo a las caspasas.

Como los inhibidores farmacológicos específicos de caspasa recientemente desarrollados, así como la inactivación de las vías de caspasa por factores como el agotamiento de la energía, el estrés nitrativo/oxidativo y los miembros de la familia de inhibidores de la proteína de la apoptosis (IAP) no siempre detuvieron la progresión hacia la muerte, revelaron, o incluso mejoraron, un subconjunto de programas de muerte subyacentes independientes de caspasa. Estos programas incluyen vías iniciadas por el receptor de muerte, así como vías provocadas por fármacos contra el cáncer, privación del factor de crecimiento, estaurosporina, proteínas relacionadas con Bax y el agotamiento de Hsp70.

15 Las características morfológicas de estos programas de muerte independientes de caspasas a menudo recuerdan a las observadas en la apoptosis clásica, y el apoyo experimental para el papel de otras proteasas como catepsinas, calpaínas y proteasas de serina como cofactores esenciales, ya sea corriente atrás o corriente adelante de las caspasas estaba creciendo rápidamente. El argumento se ve reforzado por los hallazgos de que muchas proteasas que no son caspasas pueden escindir al menos algunos de los sustratos clásicos de las caspasas, lo que podría explicar algunas de las similitudes observadas entre los programas de muerte dependientes e independientes de caspasas.

20

Aunque se puede argumentar la relevancia de tales programas de muerte, ya que están enmascarados por la eficacia de las caspasas, se está recopilando evidencia de una tarea conservada evolutivamente para las proteasas de catepsina lisosomal en los programas de muerte celular iniciados como respuesta a diversos estímulos, como los receptores de muerte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, hipoxia, estrés oxidativo, estrés osmótico, calor y fármacos contra el cáncer.

25

### **Compromiso lisosómico en la muerte celular programada**

30 Si bien la tarea de los lisosomas y sus hidrolasas en la fase de limpieza de la PCD, es decir, la absorción de células y cuerpos apoptóticos por las células vecinas o los fagocitos, está bien establecido, ha llevado mucho tiempo reconocer la importancia de los lisosomas y las hidrolasas lisosómicas en los eventos más inmediatos de la PCD. Una de las razones de este retraso puede ser el hecho de que los inhibidores del péptido de metil cetona comúnmente utilizados para evaluar el papel de las caspasas en la PCD (por ejemplo, zVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk, Boc-D-fmk, etc.) también inhiben otras proteasas de cisteína, incluidas varias catepsinas de cisteína. Incluso nueve años después del reconocimiento de esta reacción cruzada, los efectos protectores con estos inhibidores en concentraciones capaces de inhibir las proteasas que no son caspasas a menudo todavía se interpretan como una prueba de las vías de muerte mediadas por caspasas y, por lo tanto, el papel de otras proteasas de cisteína en la PCD sigue siendo subestimado.

35 El descubrimiento de la PCD lisosomal puede haberse retrasado adicionalmente, porque la ultraestructura lisosomal aparece intacta en las células apoptóticas analizadas por microscopía electrónica. Por lo tanto, la ruptura lisosómica se ha considerado hasta hace poco como un cambio de todo o nada durante las últimas etapas de la muerte celular necrótica no controlada y la autólisis tisular. Sin embargo, las nuevas técnicas que permiten una evaluación más precisa de la integridad de la membrana lisosómica han revelado que los lisosomas con ultraestructura normal pueden haber filtrado parte de sus enzimas, y que la permeabilización parcial de la membrana lisosómica (LMP) no solo ocurre temprano en muchos paradigmas de muerte, sino que puede, de hecho, desencadenar la apoptosis y la PCD similar a la apoptosis.

40

45

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

50 Los estudios con diversos compuestos que se dirigen directamente a la integridad de las membranas lisosómicas, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éster metílico de L-leucil-L-leucina, estrés osmótico, esfingosina, antibióticos lisosomotrópicos norfloxacina y ciprofloxacina y daño lisosómico fotooxidativo (fotólisis), han demostrado convincentemente que la permeabilización lisosómica moderada puede provocar PCD. Se ha sugerido una relación cuantitativa entre la cantidad de ruptura lisosómica y el modo de muerte celular para explicar los resultados morfológicos muy diferentes después de la LMP. Según este modelo, las bajas intensidades de estrés desencadenan una liberación limitada de contenido lisosómico al citoplasma seguido de apoptosis o muerte celular similar a la apoptosis, mientras que las tensiones de alta intensidad conducen a una ruptura lisosómica generalizada y a una rápida necrosis celular. En consecuencia, las bajas concentraciones de esfingosina, un metabolito de ceramida generado a partir de ceramidasa ácida con propiedades similares a detergentes a pH bajo, induce la apoptosis mediada por caspasa y LMP parcial, mientras que concentraciones más altas resultan en LMP masiva y muerte celular necrótica independiente de caspasa. En este modelo, la muerte desencadenada por LMP parcial puede ser inhibida por inhibidores farmacológicos de cisteína y

60

cathepsinas de aspartato, y el aumento en la actividad de cathepsina citosólica precede a la activación de caspasas y cambios potenciales en la membrana mitocondrial que sugieren una tarea directa para las cathepsinas citosólicas en el proceso de la muerte. Es importante destacar que el papel de la LMP y las cathepsinas en la muerte celular no se limita a los modelos experimentales que emplean disruptores lisosomales directos. La LMP también participa en la ejecución de la muerte celular en respuesta a una amplia variedad de estímulos apoptóticos clásicos, como la activación de los receptores de muerte de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF), la activación de la interleucina-1, p53, el factor de crecimiento, la inanición del factor de crecimiento, los agentes estabilizadores de microtúbulos, etopósido, activación del receptor sigma-2, retinoide sintético CD437, activación del receptor de células B, estaurosporina, estrés osmótico, así como pequeñas moléculas identificadas en una selección para nuevos fármacos contra el cáncer que inducen la apoptosis independiente de p53.

#### ***LMP como desencadenante de la vía de la apoptosis mitocondrial***

Los efectos citotóxicos de la LMP a menudo dependen, al menos parcialmente, de la activación de la vía de muerte mitocondrial. Un elegante estudio de microinyección ha demostrado que cuando se localiza en el citosol, una sola hidrolasa lisosómica, la cathepsina D, es suficiente para desencadenar la permeabilización y apoptosis de la membrana externa mitocondrial en los fibroblastos humanos a dosis celulares que corresponden a la mitad de la actividad total de la cathepsina D celular. Sin embargo, la cathepsina D no es suficiente para desencadenar PCD en todos los modelos de muerte celular que involucran LMP. Otros mediadores bien documentados de PCD desencadenada por LMP incluyen cathepsinas de cisteína B y L, así como especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, debe enfatizarse que el papel de otras hidrolasas lisosómicas, segundos mensajeros derivados de lisosomas y la acidificación del citosol inducida por LMP no se ha descartado adecuadamente. Uno de los enlaces entre las cathepsinas y la permeabilización de la membrana mitocondrial puede ser Bid, una proteína proapoptótica BH3 de la familia Bcl-2 que puede ser procesada y activada por varias cathepsinas de cisteína, pero no por la cathepsina D, a pH citosólico. Sin embargo, se ha sugerido que la cathepsina D escinde y activa Bid en el ambiente ácido del compartimento endolisosomal después de la internalización del receptor de TNF-1 (TNF-R1). Según este modelo, la endocitosis del TNF-R1 activado por ligando da como resultado la generación de ceramida mediada por esfingomielinasa ácida, que luego se une a la cathepsina D inactiva y la activa a través del procesamiento autocatalítico. La cathepsina D también puede activar Bax de una manera independiente de Bid, como se demuestra en las células T tratadas con estaurosporina. También en fibroblastos tratados con ciprofloxacina, LMP desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de una activación independiente de Bid de Bax y Bak. En este sistema modelo, la activación de Bax es independiente de la cathepsina D, pero se basa en especies reactivas de oxígeno. Cabe señalar que la permeabilización de la membrana mitocondrial inducida por ciprofloxacina no se inhibe por completo en las células que carecen de Bax y Bak. Los mecanismos alternativos que conectan la LMP a la permeabilización de la membrana mitocondrial pueden incluir los efectos directos de especies reactivas de oxígeno y/o mediadores de lípidos como el ácido araquidónico que se pueden generar de una manera dependiente de la cathepsina B.

Los estudios que emplean fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados (MEF) de ratones con deficiencia de cathepsinas individuales, han revelado claramente que distintas cathepsinas participan en la ejecución de la muerte celular dependiendo del estímulo que desencadena la LMP. Los MEF inmortalizados de ratones con deficiencia de cathepsina B y L, pero no de ratones con deficiencia de cathepsina D, son altamente resistentes al TNF, mientras que la imagen opuesta surge cuando las células se tratan con estaurosporina. Amplios estudios sobre las vías de muerte celular inducidas por TNF han revelado además que el papel de las cathepsinas individuales en la PCD depende del tipo de célula estudiada. Como se indicó anteriormente, la muerte inducida por TNF de MEF inmortalizados depende de las cathepsinas de cisteína, pero no de la cathepsina D. Sin embargo, el agotamiento de la cathepsina D protege eficazmente las células de cáncer de cuello uterino HeLa contra la citotoxicidad inducida por TNF y cisplatino. Esta diferencia no parece deberse a diferencias generales entre las células humanas y murinas, porque la cathepsina B sola o junto con otras cathepsinas de cisteína también es crucial para la destrucción efectiva inducida por TNF en las líneas celulares de cáncer de cuello uterino (ME-180) y mama (MCF-7). La explicación de esta diversidad es aún desconocida, pero los niveles variables de expresión de cathepsinas individuales y sus inhibidores en diferentes líneas celulares podrían desempeñar una tarea. Por consiguiente, la capacidad variable de distintos estímulos de muerte para regular los niveles de expresión de cathepsinas individuales o sus inhibidores podría explicar la diferencia en respuesta a distintos estímulos. Por ejemplo, se sabe que la adriamicina y el etopósido mejoran la expresión de la cathepsina D mediante la activación de p53. Alternativamente, otras vías de señalización inducidas por diversos estímulos pueden cooperar con cathepsinas específicas.

#### ***Vías de muerte independientes de mitocondrias inducidas por LMP***

Es importante destacar que los efectos letales de la LMP y las cathepsinas citosólicas no se limitan a la activación de la vía de apoptosis intrínseca. En las células de cáncer de pulmón de células pequeñas tratadas con fármacos estabilizadores de microtúbulos (paclitaxel, epotilona B y discodermolida), la LMP ocurre temprano en el proceso de muerte y las cathepsinas de cisteína median la micronucleación y la muerte celular de manera independiente de la

caspasa. En las líneas celulares de carcinoma humano tratadas con TNF, la LMP se produce corriente adelante de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, la inhibición de la actividad o expresión de las catepsinas de cisteína confiere una protección importante contra la muerte celular inducida por TNF sin inhibir significativamente la activación de la caspasa efectora. Además, la catepsina B es responsable de los cambios similares a la apoptosis, como la condensación de cromatina, la exposición a fosfatidilserina y la formación de ampollas en la membrana plasmática, en ausencia de actividad de la caspasa en células de fibrosarcoma WEHI-S murino tratadas con TNF. Además, el agotamiento de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) en varias células cancerosas humanas, así como la activación supraóptima de las células T, desencadena LMP y PCD similar a la apoptosis mediada por catepsina sin la activación de la vía de apoptosis intrínseca. En línea con estos datos, la catepsina B puede inducir apoptosis nuclear en núcleos aislados. Por lo tanto, las catepsinas parecen tener la capacidad de actuar como proteasas iniciadoras y efectoras de la muerte celular programada dependiendo del estímulo y el contexto celular. Especialmente su capacidad para mediar PCD en células cancerosas, donde la vía de muerte mitocondrial está bloqueada, por ejemplo, debido a la sobreexpresión de Bcl-2, aumenta las esperanzas de que los tratamientos que inducen LMP puedan resultar efectivos en el tratamiento de cánceres que son resistentes a inductores de la apoptosis clásica. Esta idea está respaldada por datos que muestran que la inmortalización y la transformación pueden sensibilizar las células a la muerte celular lisosómica.

### **Señalización a LMP**

Como se describió anteriormente, la LMP seguida de la liberación del contenido lisosómico, especialmente las catepsinas, al citosol se considera el paso clave de activación de la vía de muerte lisosómica. Sin embargo, las vías de señalización que conducen a LMP todavía están comenzando a emerger. Uno de los mecanismos mejor estudiados es la señalización del receptor 1 del factor de necrosis tumoral, aunque la aclaración de esta vía de señalización a la LMP se ha complicado enormemente por las respuestas ampliamente distintas en distintas células diana.

En resumen, TNF puede inducir LMP dependiente o independiente de caspasa dependiendo del contexto celular. Además, los ligandos relacionados con TNF FasL, TRAIL y TWEAK también se han asociado con PCD independiente de caspasa con morfología apoptótica o necrótica. Los estudios farmacológicos y genéticos indican que la vía mediada por caspasas que conduce de TNF a LMP depende de las caspasas -8 y -9, aunque la activación de caspasa-9 difiere ampliamente entre las células humanas y murinas. El vínculo entre caspasas y LMP es aún desconocido, y aunque se ha sugerido que la escisión de Bid mediada por caspasa-8 inducida por TNF contribuye a LMP, estos hallazgos no pudieron ser verificados por LMP inducida por TNF en iMEF con deficiencia de Bid. Además, se ha sugerido que Bid es un objetivo para las catepsinas en las vías de muerte lisosomales que implican a Bid corriente adelante, en lugar de corriente atrás, de la LMP.

El TNF también estimula la descomposición de la esfingomielina en fosforilcolina y ceramida mediante la activación de la esfingomielinasa neutra (SMasa) en la membrana plasmática y la SMasa ácida (aSMase) en el compartimento lisosómico. Ambos acontecimientos se han implicado en las vías de muerte celular inducidas por TNF, pero hasta ahora solo la SMasa neutra se ha relacionado con la LMP a través del factor asociado con la SMasa neutra (FAN). Los estudios basados en iMEF con deficiencia de FAN, así como en fibroblastos humanos que expresan una forma negativa dominante de FAN, han demostrado que FAN no solo media la producción de ceramida inducida por TNF, sino que también contribuye al procesamiento de caspasa-8 y la muerte celular. Dado que la LMP inducida por TNF en los hepatocitos murinos depende de la caspasa-8, su procesamiento reducido puede explicar la LMP reducida en los hepatocitos tratados con TNF que expresan FAN negativa dominante. Sin embargo, no se puede descartar el papel de la ceramida y sus metabolitos. Su papel en la señalización de muerte inducida por TNF está respaldado por la reducción de TNF y hepatotoxicidad inducida por Fas en ratones con deficiencia de aSMase, que se activa corriente adelante de caspasa-8. Especialmente, la esfingosina que se genera a partir de la ceramida en una reacción catalizada por la enzima lisosómica, el ácido ceramidasa es un candidato tentador, ya que, a diferencia de la ceramida, puede actuar como detergente, desestabilizando directamente la membrana lisosómica. Además de aumentar la generación del precursor de esfingosina, la ceramida, mediante la activación de SMasas, el TNF regula los niveles de esfingosina también mediante la regulación negativa mediada por catepsina B de la esfingosina quinasa-1, una enzima que convierte la esfingosina proapoptótica en una esfingosina-1-fosfato antiapoptótica. Esta actividad de la catepsina B podría provocar la acumulación de esfingosina en los lisosomas y, por lo tanto, al menos parcialmente, explicar el requisito de la catepsina B para una LMP eficiente en los hepatocitos tratados con TNF.

TNF también puede desencadenar LMP y muerte celular en presencia de inhibidores de caspasa. Esta vía es independiente de la caspasa-8, pero requiere que el receptor que contiene el dominio de muerte interactúe con la proteína-1 (RIP-1) e implica la generación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo puede, junto con el hierro intralisosómico, generar radicales de oxígeno a través de una química de tipo Fenton y, por lo tanto, puede causar la oxidación de los lípidos de la membrana lisosómica, lo que resulta en la desestabilización de la membrana y la liberación del contenido lisosómico. Sin embargo, todavía faltan los enlaces moleculares entre RIP-1, estrés oxidativo y LMP.

La inducción de la muerte celular por varios inductores de apoptosis clásicos (p. ej., p53, etopósido y estaurosporina) también implica LMP seguida de permeabilización de la membrana mitocondrial dependiente de catepsina. Sin embargo, las vías de señalización de estos estímulos a la LMP aún no se han revelado.

5

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

Dado el posible desenlace fatal de la LMP, no es sorprendente que las células hayan desarrollado numerosas estrategias para contrarrestarla, ya sea inhibiendo la propia LMP o protegiendo a las células contra las hidrolasas ácidas que se filtran al citosol como consecuencia de la LMP. Entre sus muchas otras funciones, se ha informado que la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) protege los lisosomas contra la desestabilización. La inhibición de PI3K en células endoteliales vasculares humanas induce la liberación de catepsina B al citosol, lo que argumenta un papel bastante directo de PI3K en la preservación de la integridad de la membrana lisosómica. Además, los inhibidores de PI3K sensibilizan las células a las vías de muerte lisosomal inducidas por TNF e interleucina-1. La alteración de las funciones lisosómicas y el aumento de los niveles de expresión de las catepsinas en las células cancerosas pueden representar una amenaza en forma de disminución de la estabilidad de los lisosomas. Por lo tanto, PI3K, que se activa comúnmente en las células cancerosas humanas, también puede contribuir a la estabilidad lisosómica de las células tumorales y, por lo tanto, aumentar su resistencia a la muerte celular. Mientras que el papel de PI3K en la estabilidad de los lisosomas de células tumorales es puramente especulativo, los datos recientes abogan por un papel de Hsp70 en la protección de los lisosomas contra los estímulos disruptivos de la membrana. Este trabajo se ha realizado principalmente en células tumorales, que a menudo también demuestran una localización de Hsp70 en la membrana plasmática, así como en el compartimento endolisosómico.

En el caso de la liberación de proteasas lisosómicas al citosol en la LMP, los inhibidores de la proteasa citosólica presentan un baluarte contra sus consecuencias perjudiciales. Si bien no se conocen inhibidores endógenos de la catepsina D, las catepsinas de cisteína pueden inhibirse eficazmente por al menos tres inhibidores de la proteasa citosólica, es decir, la cistatina A y B y el inhibidor de la proteasa de serina 2A (Spi2A), que recientemente se descubrió que posee una potente actividad inhibidora también contra varias catepsinas de cisteína (B, H, K, L y V) y catepsina G. La importancia de estos inhibidores en la prevención de la PCD en condiciones fisiológicas y patológicas se demuestra en ratones con deficiencia de cistatina B que muestran un aumento de la apoptosis de las células granulares cerebelosas. Además, la expresión de Spi2A se induce tras el tratamiento con TNF a través de la ruta NF-κB e inhibe eficazmente la actividad de la catepsina B citosólica inducida por TNF y la muerte celular en los MEF. Curiosamente, se acaba de informar que en *C. Elegans*, el inhibidor de la proteasa de serina citosólica (serpina) -6 puede proteger tanto contra la inducción como contra los efectos letales de la lesión lisosómica causada por el estrés hipoosmótico, así como una variedad de otros estreses lisosomales, lo que demuestra que la protección contra la LMP es un mecanismo conservado evolutivamente.

#### **Enfermedades de almacenamiento lisosomal**

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) son un grupo de aproximadamente 40 trastornos metabólicos hereditarios poco frecuentes que resultan de defectos en la función lisosómica. Los LSD son causados por disfunción lisosómica, generalmente como consecuencia de la deficiencia de una sola enzima requerida para el metabolismo de los lípidos, glucoproteínas o mucopolisacáridos. Aunque cada trastorno resulta de distintas mutaciones genéticas que se traducen en una deficiencia en la actividad enzimática, todos comparten una característica bioquímica común: todos los trastornos lisosómicos se originan a partir de una acumulación anormal de sustancias dentro del lisosoma.

Individualmente, la mayoría de los LSD ocurren con incidencias de menos de 1:100.000, sin embargo, como grupo, la incidencia es de aproximadamente 1:5000-1:10.000. La mayoría de estos trastornos se heredan de forma autosómica recesiva, sin embargo, algunos se heredan de forma recesiva ligada al cromosoma X. Las mucopolisacaridosis representan un grupo de enfermedades con una prevalencia de aproximadamente 1:25.000.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico generalmente se clasifican según la naturaleza del material almacenado primario involucrado, y pueden dividirse en términos generales en lo siguiente:

55 - trastornos de almacenamiento de lípidos (o lipidosis)

- esfingolipidosis (incluidas las enfermedades de Gaucher y Niemann-Pick)
- gangliosidosis (incluida la enfermedad de Tay-Sachs)
- leucodistrofias

60

- mucopolisacaridosis (incluido el síndrome de Hunter y la enfermedad de Hurler)

- mucopolisidosis
- trastornos de almacenamiento de glucoproteínas (glucoproteinosis)

- 5 ◦ mannosidosis
- fucosidosis

- enfermedades de almacenamiento de glucógeno

- 10 Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, los pacientes mueren a una edad joven e impredecible, muchos dentro de unos pocos meses o años de nacimiento, mientras que otros sobreviven hasta la edad adulta y finalmente sucumben a las diversas patologías de su trastorno particular. Los síntomas del LSD varían, dependiendo del trastorno particular y pueden ser leves o graves. Pueden incluir retraso del desarrollo, trastornos del movimiento, convulsiones, demencia, sordera y/o ceguera. Algunas personas con LSD tienen hígados agrandados (hepatomegalia) y bazo agrandados (esplenomegalia), problemas pulmonares y cardíacos y un crecimiento óseo anormal.

- La mayoría de los pacientes son examinados inicialmente por un ensayo enzimático, que es el procedimiento más eficiente para llegar a un diagnóstico definitivo. En algunas familias donde se conocen las mutaciones que causan la enfermedad y en ciertos aislados genéticos, se puede realizar un análisis de mutaciones. Como puede haber
- 20 numerosas mutaciones diferentes, la secuenciación del gen que codifica la enzima afectada particular a veces es necesaria para confirmar el diagnóstico. El diagnóstico prenatal puede ser útil cuando hay un factor de riesgo genético conocido.

- La presente descripción se refiere en una realización a un procedimiento para tratar una enfermedad de
- 25 almacenamiento lisosomal que surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

- En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I,
- 30 leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

- En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterolesis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de
- 35 colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, mannosidosis y sialidosis tipo II.

### **Hidrólisis de esfingolípidos lisosomales**

- 40 Una multitud de enzimas están involucradas en el catabolismo lisosómico de los esfingolípidos (o glucofingolípidos) (véase figura 1). Estas enzimas, o más específicamente las hidrolasas, son responsables de la degradación de un esfingolípido específico.

- Las hidrolasas de esfingolípidos lisosomales interactúan con las proteínas activadoras de esfingolípidos (SAP o
- 45 saposinas) para estimular la actividad de dichas hidrolasas. Se considera que los SAP facilitan la interacción enzima/sustrato entre enzimas solubles en agua y sustratos unidos a la membrana.

- Además, la composición lipídica de los compartimentos endosómico y lisosómico tardío se caracteriza por la presencia de fosfolípidos cargados negativamente, como BMP y PI (fosfatidilinositol), que también estimula la actividad de
- 50 algunas hidrolasas. Las hidrolasas lisosómicas dependientes de BMP incluyen sialidasa,  $\alpha$ -galactosidasa A, glucosilceramidasa,  $\beta$ -galactosilceramidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida y esfingomielinasa.

### ***Saposinas cofactorizadas***

- 55 Las saposinas son pequeñas proteínas lisosomales que sirven como activadores de varias enzimas lisosomales degradantes de lípidos. Probablemente actúan aislando el sustrato lipídico del entorno de la membrana, por lo que lo hacen más accesible a las enzimas degradantes solubles. Todas las saposinas de mamíferos se sintetizan como una molécula precursora única (prosaposina) que contiene cuatro dominios de saposina B, que producen las saposinas activas después de la escisión proteolítica, y dos dominios de saposina A que se eliminan en la reacción de activación.
- 60 Los dominios saposina B también se encuentran en otras proteínas, muchas de ellas activas en la lisis de las membranas.

- La prosaposina (PSAP) es una proteína que en los humanos está codificada por el gen PSAP. Este gen codifica una glucoproteína altamente conservada que es un precursor de 4 productos de escisión: saposina A, B, C y D. La saposina es un acrónimo de proteína activadora de esfingolípidos o SAP. Cada dominio de la proteína precursora tiene aproximadamente 80 residuos de aminoácidos de largo con una ubicación casi idéntica de residuos de cisteína y sitios de glucosilación. Las saposinas A-D se localizan principalmente en el compartimento lisosómico donde facilitan el catabolismo de los glucosfingolípidos con grupos oligosacáridos cortos. La proteína precursora existe tanto como una proteína secretora como una proteína de membrana integral y tiene actividades neurotróficas. Las saposinas A-D son necesarias para la hidrólisis de ciertos esfingolípidos por hidrolasas lisosómicas específicas.
- 10 Las saposinas son coactivadores importantes de la sialidasa (SAP-B),  $\alpha$ -galactosidasa A (SAP-B), glucosilceramidasa (SAP-C),  $\beta$ -galactosilceramidasa (SAP-C), arilsulfatasa A (SAP-B) y ceramidasa ácida (SAP-D). La esfingomielinasa ácida (aSMase) no depende críticamente de ninguna de las proteínas activadoras conocidas, sin embargo, la presencia de saposinas aumenta la actividad de esta enzima. Una quinta saposina, la proteína activadora GM2, también se ha caracterizado.

15

**BMP**

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

BMP se aisló por primera vez del pulmón de conejo, pero ahora se sabe que es un componente común, aunque menor, de todos los tejidos animales. Su configuración estereoquímica difiere de la de otros glicerofosfolípidos animales en que el resto fosfodiéster está unido a las posiciones sn-1 y sn-1' de glicerol, en lugar de a la posición sn-3. No está claro si las posiciones sn-3 y 3' o sn-2 y sn-2' en los restos de glicerol están esterificadas con ácidos grasos. Cualesquiera que sean las posiciones de los ácidos grasos en la molécula de glicerol, sus composiciones pueden ser distintas con 18:1 (n-9) y 18:2 (n-6), 20:4 y 22:6 (n-3) siendo abundantes, aunque esto depende en gran medida del tejido específico, tipo de célula u orgánulo. Tales composiciones distintas sugieren funciones bastante específicas, algunas de las cuales aún no se han revelado.

30

BMP es generalmente un componente bastante menor de los tejidos animales. Sin embargo, está altamente enriquecido en los lisosomas del hígado y otros tejidos, donde puede representar el 15 % o más de los fosfolípidos de membrana, y ahora se reconoce como un marcador para este orgánulo. Son los endosomas tardíos y los lisosomas los que contienen el lípido único, BMP. De hecho, parece haber membranas internas de los endosomas tardíos que contienen hasta un 70 % de los fosfolípidos como BMP.

35

Hay buena evidencia de que BMP se sintetiza a partir de fosfatidilglicerol, principalmente en el sistema endosómico. En lo que se cree que es la ruta principal, una fosfolipasa A2 elimina el ácido graso de la posición sn-2 de fosfatidilglicerol en el primer paso. En el segundo paso, el lisofosfatidilglicerol se acila en la posición sn-2' del resto del glicerol del grupo principal para producir ácido sn-3:sn-1' lisofosfatidofásico, por medio de una reacción de transacilasa con lisofosfatidilglicerol como el donante de acilo y el acilo aceptador. El tercer paso aún tiene que describirse adecuadamente, pero debe implicar la eliminación del ácido graso de la posición sn-1 de la unidad de glicerol primario y una reorganización del éster fosforílico desde la posición sn-3 a la posición sn-1. Finalmente, la posición sn-2 de la unidad de glicerol primario se esterifica, probablemente por una reacción de transacilación con otro fosfolípido como donante (de ahí las composiciones distintas de ácidos grasos). Otras rutas biosintéticas pueden ser posibles.

45

La función de BMP en los lisosomas está bajo investigación activa. Puede tener un papel estructural en el desarrollo del complejo sistema de membrana intraluminal, ayudado por una tendencia a no formar una bicapa. Es una molécula en forma de cono, y fomenta la fusión de membranas al pH en los endosomas. Además, su estereoquímica única significa que es resistente a las fosfolipasas, por lo que obstaculizará o evitará la auto digestión de las membranas lisosómicas. Los constituyentes de los ácidos grasos pueden cambiar rápidamente por transacilación, pero el esqueleto de glicerofosfato es estable. Otra posibilidad es que este lípido pueda asociarse con proteínas específicas en dominios de membrana, funcionalmente similares a las balsas. Se ha sugerido que la red característica de membranas ricas en BMP contenidas dentro de endosomas tardíos multivesiculares regula el transporte de colesterol al actuar como un punto de recolección y redistribución. Por ejemplo, cuando las membranas lisosómicas se incuban con anticuerpos contra BMP, el colesterol tiende a acumularse. El proceso está bajo el control de Alix/AIP1, que es una proteína que interactúa específicamente con BMP y participa en la clasificación en endosomas multivesiculares.

55

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

60

alveolares.

Para las enzimas dependientes de BMP, la tasa de hidrólisis aumenta drásticamente cuando BMP está presente en la membrana, para aSMase incluso sin la presencia de una proteína activadora como la saposina. En la figura 1, un círculo punteado marca las enzimas, o la enfermedad en la que esta enzima es defectuosa, que muestran una dependencia de BMP.

BMP está involucrado en la patología de enfermedades de almacenamiento lisosómico como la enfermedad de Niemann-Pick C (acumulación de colesterol) y ciertas lipidosis inducidas por fármacos. En estas circunstancias, su composición tiende a cambiar para favorecer las especies moleculares que contienen menos componentes poliinsaturados. Es un antígeno reconocido por los sueros autoinmunes de pacientes con una enfermedad poco frecuente y poco conocida, conocida como síndrome antifosfolípido, por lo que probablemente sea un factor en la base patológica de esta enfermedad.

### 15 **Los trastornos de almacenamiento de lípidos**

Los trastornos de almacenamiento de lípidos (o lipidosis) son un subgrupo de los trastornos de almacenamiento de lisosomas en los que se acumulan cantidades dañinas de lípidos en el espacio intracelular debido a la expresión o función reducida de las enzimas necesarias para metabolizar los lípidos. Con el tiempo, este almacenamiento excesivo de lípidos puede causar daño celular y tisular permanente, particularmente en el cerebro, el sistema nervioso periférico, el hígado, el bazo y la médula ósea.

Se han caracterizado varios trastornos de almacenamiento lisosómico caracterizados por la acumulación de lípidos (es decir, trastornos de almacenamiento de lípidos); incluidos la enfermedad de Niemann-Pick (NPD), la enfermedad de Farber, la enfermedad de Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, la sialidosis tipo I, la leucodistrofia metacromática y la deficiencia de saposina.

Otros trastornos de almacenamiento de lípidos incluyen: gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida y otros trastornos de almacenamiento de lípidos, como se describe a continuación.

#### 30 **Gangliosidosis**

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la gangliosidosis.

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de gangliosidosis seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad de Sandhoff (o gangliosidosis GM2 tipo II), enfermedad de Sandhoff infantil clásica, enfermedad de Sandhoff juvenil, enfermedad de Sandhoff de inicio tardío/ adulta, enfermedad de Tay-Sachs (o gangliosidosis GM2 tipo I), enfermedad de Tay-Sachs infantil, enfermedad de Tay-Sachs juvenil, enfermedad de Tay-Sachs de inicio tardío/ adulta, gangliosidosis GM2 variante AB, gangliosidosis GM1, gangliosidosis GM1 infantil temprana, gangliosidosis GM1 infantil tardía, gangliosidosis GM1 adulta, gangliosidosis GM3 y mucopolisidosis IV.

Las enfermedades mencionadas anteriormente se agrupan juntas como gangliosidosis según la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS.

Las gangliosidosis son trastornos de almacenamiento de lípidos causados por la acumulación de lípidos conocidos como gangliósidos. Los gangliósidos son moléculas compuestas de un glucoesfingolípido (ceramida y oligosacárido) con uno o más ácidos siálicos (también conocido como ácido n-acetilneuramínico, NANA) unidos en la cadena de azúcar. Los más de 60 gangliósidos conocidos difieren principalmente en la posición y el número de residuos de NANA. Es un componente de la membrana plasmática celular que modula los eventos de transducción de señales celulares. Se encuentran predominantemente en el sistema nervioso, donde constituyen el 6 % de todos los fosfolípidos.

Las gangliosidosis GM1 (también conocidas como gangliosidosis NOS) son causadas por una deficiencia de beta-galactosidasa, con el consiguiente almacenamiento anormal de materiales lipídicos ácidos en las células del sistema nervioso central y periférico, pero particularmente en las células nerviosas. GM1 tiene tres formas: infantil temprana, infantil tardía y adulta.

Las *gangliosidosis GM2* son un grupo de trastornos genéticos relacionados que resultan de una deficiencia de la enzima beta-hexosaminidasa. Esta enzima cataliza la biodegradación de los derivados de ácidos grasos conocidos como gangliósidos. Las enfermedades son mejor conocidas por sus nombres individuales.

La beta-hexosaminidasa es una enzima hidrolítica vital que se encuentra en los lisosomas y descompone los lípidos. Cuando la beta-hexosaminidasa ya no funciona correctamente, los lípidos se acumulan en el tejido nervioso del cerebro. Los gangliósidos se fabrican y biodegradan rápidamente en la vida temprana a medida que se desarrolla el cerebro.

5

Los tres trastornos son poco frecuentes en la población general: La enfermedad de Tay-Sachs, la variante AB y la enfermedad de Sandhoff podrían haberse definido fácilmente juntas como una sola enfermedad, porque los tres trastornos están asociados con el fracaso de la misma vía metabólica y tienen el mismo resultado. Cada uno representa un punto molecular de fallo distinto en una subunidad que se requiere para la activación de la enzima.

10

La enfermedad de Tay-Sachs (TSD abreviada, también conocida como gangliosidosis GM2 tipo I o deficiencia de hexosaminidasa A) es un trastorno metabólico autosómico recesivo poco frecuente que causa la destrucción progresiva de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La enfermedad resulta de mutaciones en el cromosoma 15 en el gen HEXA que codifica la subunidad alfa de la enzima lisosómica beta-N-acetilhexosaminidasa

15 A.

La enfermedad de Tay-Sachs se clasifica en formas variantes, según el momento de aparición de los síntomas neurológicos. Las formas variantes reflejan la diversidad en la base de la mutación: TSD infantil, juvenil y adulta/ de inicio tardío.

20

La enfermedad de Sandhoff (también conocida como síndrome de Jatzkewitz-Pilz, gangliosidosis GM2 tipo II y deficiencia de hexosaminidasa A y B) es un trastorno metabólico autosómico recesivo poco frecuente que causa la destrucción progresiva de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La enfermedad es el resultado de mutaciones en el cromosoma 5 en el gen HEXB, crucial para las enzimas lisosómicas beta-N-acetilhexosaminidasa A

25

y B. La enfermedad de Sandhoff es clínicamente indistinguible de la enfermedad de Tay-Sachs. Hay tres subconjuntos de la enfermedad basados en cuándo el paciente muestra síntomas: inicio clásico infantil, juvenil y adulto tardío.

GM2-gangliosidosis, variante AB es un trastorno metabólico autosómico recesivo poco frecuente que causa la destrucción progresiva de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La variante AB es causada por un

30

fallo en el gen que produce un cofactor enzimático para la beta-hexosaminidasa, llamado activador GM2.

*La gangliosidosis GM3* es un trastorno de biosíntesis de gangliósidos causado por deficiencia de (N-acetilneuraminil)-galactosilglucosilceramida N-acetil transferasa con acumulación excesiva de gangliósido GM3 en el hígado y el tejido cerebral y la ausencia de homólogos de gangliósidos superiores.

35

La mucopolipidosis tipo IV (ML IV) es un trastorno de almacenamiento lisosómico autosómico recesivo. El trastorno es causado por mutaciones en el gen MCOLN1, que codifica un canal catiónico no selectivo, la mucolipina1. Se cree que mucolipina1 se localiza en los endosomas. Una propiedad importante de mucolipina1 es que la disminución del pH (acidificación) da como resultado la desactivación de la proteína, probablemente a través de un defecto de ensamblaje.

40

Hay al menos 29 mutaciones conocidas en MCOLN1, ubicadas a lo largo de todo el gen. Muchas de las mutaciones conocidas no producen expresión de mucolipina1, mientras que las mutaciones más leves producen una forma disfuncional del canal catiónico. Las mutaciones que alteran solo el terminal C de la proteína dan como resultado un fenotipo leve del trastorno, que generalmente evita el cerebro. ML IV hace que las células afectadas acumulen vacuolas autofluorescentes consideradas lisosomas anómalos.

45

#### ***Lipofuscinosis neuronal cerioidea***

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la lipofuscinosis neuronal cerioidea.

50

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la lipofuscinosis neuronal cerioidea seleccionada de entre el grupo que consiste en la enfermedad de Batten (o enfermedad de Spielmeyer-Vogt), Enfermedad de Bielschowsky-Jansky, enfermedad de Kufs y enfermedad de Santavuori-Haltia.

55

Las enfermedades mencionadas anteriormente se agrupan juntas como lipofuscinosis neuronal cerioidea según la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS.

60

Lipofuscinosis Neuronales Cerioideas (NCL) es el nombre general de una familia de trastornos neurodegenerativos genéticamente separados que resultan de la acumulación excesiva de lipopigmentos (lipofuscina) en los tejidos del cuerpo. Estos lipopigmentos están compuestos de grasas y proteínas. La clasificación anterior de las NCL dividió la enfermedad en cuatro tipos según la edad de inicio, mientras que las clasificaciones más nuevas la dividen por el gen

asociado.

- NCL infantil (enfermedad de Santavuori-Haltia, INCL o tipo 1) se ha asociado con palmitoil-proteína tioesterasa.
- La NCL infantil tardía (enfermedad de Bielschowsky- Jansky o Jansky-Bielschowsky, LINCL o tipo II) se asocia con una deficiencia de tripeptidil peptidasa I.
- La NCL juvenil (enfermedad de Batten, JNCL o tipo III, también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjögren-Batten o enfermedad de Spielmeyer-Vogt) se ha relacionado con mutaciones en el gen CLN3. Es la forma más frecuente.
- NCL de adultos (enfermedad de Kufs, ANCL o tipo IV): el gen implicado no está identificado.

10

### **Otros trastornos de almacenamiento de lípidos**

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo.

15

La lipasa ácida lisosomal es la enzima esencial para la hidrólisis de triglicéridos y ésteres de colesterilo en los lisosomas. Su deficiencia produce 2 fenotipos humanos: Enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo. La enfermedad de Wolman es mortal en la infancia, y la enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo es una forma más leve y generalmente se manifiesta en la edad adulta.

20

El curso más grave de la enfermedad de Wolman es causado por defectos genéticos de la lipasa ácida lisosomal que no dejan actividad enzimática residual. La enfermedad de Wolman también se llama xantomatosis familiar primaria con afectación y calcificación de las glándulas suprarrenales. La enfermedad de Wolman tiene acumulación de triglicéridos y ésteres de colesterilo, mientras que la enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterilo tiene principalmente niveles elevados de ésteres de colesterilo. Los genotipos de la lipasa ácida lisosomal determinan el nivel de actividad enzimática residual, lo que resulta en la gravedad del fenotipo.

25

La xantomatosis cerebrotendinosa o xantomatosis cerebrotendinosa (CTX), también llamada colesterosis cerebral (o "síndrome de Van Bogaert-Scherer-Epstein), es una forma autosómica recesiva de xantomatosis asociada con el depósito de una forma de colesterol (colestanol) en el cerebro y otros tejidos y con niveles elevados de colesterol en plasma pero con niveles normales de colesterol total. La CTX está asociada con mutaciones en el gen CYP27A1 (esterol 27-hidroxilasa).

30

35

### **Mucopolisacaridosis**

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la mucopolisacaridosis.

40

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en una mucopolisacaridosis tipo I, una mucopolisacaridosis tipo II, una mucopolisacaridosis tipo III, una mucopolisacaridosis tipo IV, una mucopolisacaridosis tipo VI, una mucopolisacaridosis tipo VII, una mucopolisacaridosis tipo VIII y una mucopolisacaridosis tipo IX.

45

También es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en síndrome de Hurler, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de DiFerrante, síndrome de Maroteaux-Lamy (leve o grave), síndrome de Morquio (clásico o similar a Morquio) y síndrome de Sanfilippo (tipo A, B, C o D).

50

Las enfermedades mencionadas anteriormente se agrupan como mucopolisacaridosis según la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS.

55

Los mucopolisacáridos son polímeros sulfatados compuestos de una fracción proteica central unida a ramificaciones disacáridas repetitivas normalmente degradadas en monosacáridos sulfatados inorgánicos en los lisosomas.

- El sulfato de dermatán consta de unidades alternas de ácido L-idurónico y N-acetilgalactosamina, que generalmente se encuentran en la matriz de muchos tejidos conectivos distintos.

60

- El sulfato de heparán se forma mediante la unión de un ácido urónico (ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico) que se alterna con N-acetilglucosamina y se asocia con la membrana plasmática celular de casi todas las células.

- El sulfato de queratán está hecho de residuos de D-galactosa que se alternan con N-acetilglucosamina y se encuentra principalmente en el cartílago, el núcleo pulposo y la córnea.

- El sulfato de condroitina está compuesto de ácido D-glucurónico y N-acetilgalactosamina y se encuentra principalmente en el cartílago y la córnea.

5

Las mucopolisacaridosis (MSP) son el resultado de la degradación anormal de los glucosaminoglucanos como el sulfato de dermatán, el sulfato de heparán y el sulfato de condroitina, lo que resulta en la acumulación de órganos y la disfunción final. Los glicosaminoglucanos o mucopolisacáridos son normalmente un componente de la córnea, cartílago, hueso, tejido conectivo y el sistema reticuloendotelial y, por lo tanto, son órganos

10

diana para el almacenamiento excesivo. Las enzimas catabólicas involucradas en la descomposición de glucosaminoglucanos o mucopolisacáridos son insuficientes. La degradación gradual de los glicosaminoglucanos requiere 4 glicosidasas, 5 sulfatasas y 1 transferasa no hidrolítica. Los MPS comparten características clínicas similares de curso crónico y progresivo, afectación

15

multisistémica, organomegalia, disostosis múltiple y facies anómalas. El modo de transmisión es autosómico recesivo, excepto para MPS II, que está ligado al cromosoma X. Se describe una variedad de mutaciones, y la correlación del genotipo con la gravedad de la enfermedad comienza a emerger del análisis de mutaciones.

20

En general, las MPS son trastornos progresivos, caracterizados por la participación de múltiples órganos, incluidos el cerebro, el hígado, el bazo, el corazón y los vasos sanguíneos, y muchos están asociados con rasgos faciales gruesos, nubosidad de la córnea y retraso mental. El diagnóstico a menudo se puede hacer mediante el examen de orina, que revela una mayor concentración de fragmentos de glicosaminoglucanos.

25

MPS tipo I incluye Hurler (MPS tipo I H), Hurler-Scheie (MPS tipo I H/S) y síndromes de Scheie (MPS tipo I S). La alfa-L-iduronidasa, que escinde los residuos terminales del ácido L-idurónico tanto del dermatán como del heparán sulfato, es insuficiente.

30

En la MPS tipo II (síndrome de Hunter), la iduronato-2 sulfatasa (conocida como factor correctivo de Hunter), que elimina específicamente el grupo sulfato de la posición 2 del ácido L-idurónico en el dermatán sulfato y en el heparán sulfato, es insuficiente. Se ha demostrado que la idursulfatasa recombinante humana purificada altera las manifestaciones de la enfermedad en individuos con síndrome de Hunter.

35

En la MPS tipo III (síndrome de Sanfilippo), pueden producirse deficiencias en heparán N-sulfatasa (tipo A), alfa N-acetilglucosaminidasa (tipo B), acetil CoA:alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa (tipo C) y N-acetilglucosamina 6-sulfatasa (tipo D). Las 4 enzimas son necesarias para la degradación del heparán sulfato.

40

La MPS tipo IV (síndrome de Morquio) resulta de la degradación defectuosa del sulfato de queratán. Se reconocen dos deficiencias enzimáticas: N-acetilgalactosamina-6-sulfatasa (también conocida como galactosa-6-sulfatasa) en el tipo IV A y beta-galactosidasa en el tipo IV B.

45

En la MPS tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), se produce una deficiencia de arilsulfatasa B (es decir, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa). Hidroliza el grupo sulfato en la posición 4 de los residuos de N-acetilgalactosamina del sulfato de dermatán.

50

La MPS tipo VII (síndrome de Sly o deficiencia de beta-glucuronidasa) es causada por una deficiencia de beta-glucuronidasa, que elimina los residuos de ácido glucurónico presentes en el sulfato de dermatán, el sulfato de heparán y los sulfatos de condroitina.

55

El síndrome de DiFerrante (mucopolisacaridosis VIII) es un trastorno descrito en muy pocos pacientes.

### **Trastorno de almacenamiento de glucógeno**

60

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento de glucógeno (GSD).

65

Es un aspecto de la presente divulgación proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento de glucógeno seleccionada de entre el grupo que consiste en glucogenosis cardíaca, enfermedad de Andersen, enfermedad de Cori (o enfermedad de Forbes), enfermedad de Hers, enfermedad de McArdle, enfermedad de Pompe, enfermedad de Tauri (o enfermedad de Tarui) y enfermedad de von Gierke.

Las enfermedades mencionadas anteriormente se agrupan como enfermedades de almacenamiento de glucógeno según la Clasificación Internacional de Enfermedades de la OMS (<http://www.who.int/classifications/icd/en/>).

5 La enfermedad de almacenamiento de glucógeno (GSD, también glucogenosis y dextrinosis) es el resultado de defectos en el procesamiento de la síntesis o degradación de glucógeno dentro de los músculos, el hígado y otros tipos celulares. GSD tiene dos clases de causas: genéticas y adquiridas. La GSD genética es causada por cualquier error innato del metabolismo (enzimas genéticamente defectuosas) involucrado en estos procesos.

10 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la glucogenosis cardíaca (cardiomegalia debida al depósito excesivo de glucógeno en el músculo cardíaco como parte de una glucogenosis generalizada).

15 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Andersen (también conocida como GSD tipo IV; deficiencia enzimática: enzima ramificadora del glucógeno).

20 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Cori o la enfermedad de Forbes (también conocida como GSD tipo III; deficiencia enzimática: enzima desramificadora del glucógeno).

25 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Hers (también conocida como GSD tipo VI; deficiencia enzimática: glucógeno fosforilasa hepática).

25 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de McArdle (también conocida como GSD tipo V; deficiencia enzimática: glucógeno fosforilasa muscular).

30 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe (también conocida como GSD tipo II; deficiencia enzimática: alfa-glucosidasa ácida / maltasa ácida).

35 La enfermedad de Pompe también se conoce como enfermedad de la maltasa ácida infantil; Una variante de GSD tipo II. Otra variante del GSD tipo II es la «enfermedad de la maltasa ácida lentamente progresiva» o enfermedad de Danon.

40 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Tauri o la enfermedad de Tarui (también conocida como GSD tipo VII; deficiencia enzimática: fosfofructoquinasa muscular).

40 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de von Gierke (también conocida como GSD tipo I; deficiencia enzimática: glucosa-6-fosfatasa).

#### **Defectos en la modificación postraduccional de enzimas lisosomales**

45 Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en mucopolidosis II (enfermedad de células I) y mucopolidosis III (polidistrofia pseudo-Hurler).

50 Tanto la enfermedad de células I (mucopolidosis II) como la polidistrofia pseudo-Hurler (mucopolidosis III) se producen por anomalías en el transporte de enzimas lisosomales en las cuales las enzimas lisosomales recién sintetizadas se secretan al medio extracelular en lugar de dirigirse correctamente a los lisosomas.

55 La enzima defectuosa es la enzima lisosómica UDP-N-acetilglucosamina N-acetilglucosamina 1-fosfotransferasa. Esta enzima cataliza el primer paso en la síntesis del marcador de reconocimiento de la manosa 6-fosfato, que media las enzimas lisosómicas para alcanzar su lisosoma diana después de ser procesado en el aparato de Golgi. Su modo de transmisión es autosómico recesivo.

#### **Defectos en la degradación de las glucoproteínas - trastornos de almacenamiento de glucoproteínas**

60 Es un aspecto de la presente divulgación proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que

consiste en aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis, alfa-manosidosis, alfa-manosidosis tipo I, alfa-manosidosis tipo II, beta-manosidosis y sialidosis tipo II (mucopolidosis I).

5 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de las manosidosis, tales como alfa-manosidosis y/o beta-manosidosis.

10 La alfa-manosidasa lisosómica es una exoglucosidasa importante en la vía de degradación de la glucoproteína. Una deficiencia de esta enzima causa la enfermedad de almacenamiento lisosomal alfa-manosidosis. La alfa-D-manosidasa lisosomal está implicada en el catabolismo de las glucoproteínas ligadas a N a través de la degradación secuencial de oligosacáridos complejos, de alta manosa e híbridos.

15 La alfa-manosidosis se puede dividir en el fenotipo infantil (o tipo I) y el fenotipo juvenil-adulto (o tipo II) según sus manifestaciones clínicas

20 La beta-manosidosis es una enfermedad de almacenamiento lisosomal autosómica recesiva que resulta de una deficiencia de la enzima lisosomal beta-manosidasa. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad en los casos humanos registrados son heterogéneas, y varían de relativamente leves a moderadamente graves. La enzima corta el enlace beta-manósido del disacárido Man-beta 1,4-GlcNAc. La deficiencia genética de esta actividad enzimática da como resultado la manifestación patológica de la enfermedad de almacenamiento lisosomal beta-manosidosis, que se caracteriza por la acumulación y excreción de productos de almacenamiento no degradados que contienen enlaces beta-1,4.

25 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de la aspartilglucosaminuria.

30 La aspartilglucosaminuria (AGU), también llamada aspartilglucosaminuria, es un trastorno de almacenamiento lisosómico autosómico recesivo poco frecuente causado por la actividad deficiente de la enzima N-aspartil-beta-glucosaminidasa (aspartilglucosaminidasa). Esta enzima normalmente corta largas cadenas de azúcar conocidas como oligosacáridos en el lisosoma.

En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de la fucosidosis.

35 La fucosidosis, también llamada deficiencia de alfa-l-fucosidasa, es una enfermedad de almacenamiento lisosomal autosómica recesiva poco frecuente en la cual la enzima fucosidasa no se usa adecuadamente en las células para descomponer la fucosa. Esta enzima normalmente corta largas cadenas de azúcar conocidas como oligosacáridos en el lisosoma.

40 En una realización de la presente descripción, se proporciona un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de la sialidosis tipo II o mucopolidosis I (también conocida como deficiencia de neuraminidasa).

En una realización de la presente descripción, la sialidosis tipo I no es un objetivo de la presente descripción.

45 Se entiende que la sialidosis tipo II en el contexto de la presente descripción pretende referirse a la variante o enfermedad asociada con una enzima que no es directamente dependiente de BMP como un cofactor, más correctamente denotada mucopolidosis I (o deficiencia de neuraminidasa).

50 La mucopolidosis tipo I (ML I) es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria poco frecuente que tiene hallazgos clínicos e histológicos similares a las mucopolisacaridosis y las esfingolipidosis. Inicialmente clasificada como lipomucopolisacaridosis, esta enfermedad se clasificó más tarde en el grupo de enfermedades similares ahora conocidas como mucopolidosis. Posteriormente, se descubrió que los pacientes con ML I tenían una deficiencia aislada de alfa-N-acetil neuraminidasa (neuraminidasa o sialidasa) en leucocitos y fibroblastos cultivados y, por lo tanto, tienen  
55 mayores cantidades de sialiloligosacárido en la orina. Debido a la deficiencia de neuraminidasa, ML I ahora se clasifica con las sialidosis, un grupo de entidades de enfermedad bioquímicamente distintas debido a una deficiencia aislada de neuraminidasa. Se reconocen dos fenotipos clínicos principales de ML I.

### **Varios tipos de defectos**

60 Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para usar en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal

seleccionada de entre el grupo que consiste en una enfermedad que implica un defecto enzimático, un defecto en la modificación postraduccional de enzimas, un defecto en una proteína no enzimática, un defecto en una proteína transportadora de membrana, un defecto en una proteína protectora de enzimas, un defecto en una proteína transmembrana y/o un defecto en una proteína no transmembrana.

5

#### **Modalidades de tratamiento actuales para el LSD**

No hay cura para las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el tratamiento es en su mayoría sintomático, aunque el trasplante de médula ósea y la terapia de reemplazo enzimático (ERT) se han probado con cierto éxito.

10 Además, el trasplante de sangre del cordón umbilical se realiza en centros especializados para varias de estas enfermedades. Sin embargo, la terapia de trasplante se acompaña de efectos secundarios importantes y, a menudo, presenta complicaciones para los pacientes. Además, la terapia de reducción de sustrato, un procedimiento utilizado para disminuir la acumulación de material de almacenamiento, se está evaluando actualmente para algunas de estas enfermedades.

15

Para la mayoría de las enfermedades de almacenamiento lisosómico, sigue existiendo una gran necesidad insatisfecha de proporcionar una modalidad de tratamiento eficaz.

20 La terapia de reemplazo de enzimas se ha desarrollado para un subconjunto de las enfermedades de almacenamiento lisosómico, y Cerezyme® ha estado en el mercado durante varios años para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. La enzima defectuosa, la glucocerebrosidasa, se produce mediante técnicas recombinantes y se administra por infusión intravenosa durante unas pocas horas. El tratamiento no es una cura y los pacientes requieren un tratamiento de por vida para detener la progresión de la enfermedad. Algunos síntomas pueden mejorar con ERT.

25 Sin embargo, para la mayoría de los LSD, no se ha desarrollado una ERT eficiente. Esto puede deberse a que la producción de enzima activa ha demostrado ser una tarea difícil, debido a la compleja estructura de subunidades de las enzimas defectuosas. De hecho, las enzimas pueden plegarse incorrectamente tras la producción.

30 Para aquellos LSD en los que la ERT está disponible, existen inconvenientes que hacen que esta forma de terapia sea menos deseable. En primer lugar, la ERT es una forma de terapia muy costosa, que es una carga financiera para la sociedad y la hace inaccesible para algunos pacientes. Además, la ERT está dirigida específicamente a una sola enfermedad. Se han informado algunos efectos secundarios para Cerezyme®, incluido el desarrollo de una respuesta inmunitaria, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, erupción cutánea, cansancio, dolor de cabeza, fiebre, mareos, escalofríos, dolor de espalda y frecuencia cardíaca rápida, así como síntomas sugestivos de reacciones alérgicas.

35

Las descripciones realizadas en la presente divulgación proporcionan así un procedimiento nuevo e innovador para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. Esto es particularmente relevante para estas enfermedades para las cuales no se ha desarrollado una terapia eficaz, aquellas que pueden beneficiarse de un tratamiento menos costoso y aquellas que pueden beneficiarse de una terapia combinada que comprende el agente bioactivo de la presente descripción.

40

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

45

#### **Las chaperonas moleculares**

Habiendo gastado grandes cantidades de energía en la primera transcripción y luego en la traducción del código genético del ADN, la célula finalmente ha producido un polipéptido, cuya función presumiblemente se requiere en este punto de la vida de la célula. Sin embargo, algunos obstáculos finales deben superarse para lograr una proteína completamente funcional, uno de los cuales es el plegamiento correcto de esta cadena naciente de polipéptidos. Los imperativos evolutivos para lograr el plegamiento correcto son obvios: no solo sería un terrible desperdicio de energía sintetizar un péptido sin la conformación y la función adecuadas, sino que también la agregación de tales proteínas en la luz celular podría ser perjudicial para la célula. De hecho, esta agregación es un resultado muy probable, teniendo en cuenta el entorno intracelular de alta concentración de proteínas, por lo que no sorprende que exista una maquinaria complicada y sofisticada de proteínas para ayudar al plegamiento de proteínas, que permite que el estado funcional de las proteínas se mantenga bajo tales condiciones. Estas proteínas se denominan colectivamente chaperonas moleculares porque, al igual que sus contrapartes humanas, evitan interacciones no deseadas entre sus clientes inmaduros.

60

Las chaperonas moleculares se encuentran en todos los compartimentos de una célula donde se producen reordenamientos conformacionales de proteínas, y aunque la síntesis de proteínas es la principal fuente de péptidos

desplegados en la célula, un problema para la célula por la alta temperatura u otros estímulos que podrían hacer que las proteínas sean estructuralmente lábiles y, por lo tanto, propensas al desarrollo y la agregación, se solucionan con una respuesta celular específica que implica la producción de proteínas protectoras. Esta respuesta es un fenómeno observado en todos los tipos de células que van desde procariotas a eucariotas y se conoce como la respuesta al choque térmico o al estrés. Las proteínas inducidas por esta respuesta se conocen como proteínas de choque térmico (HSP), de las cuales existen varias familias. Estas familias están compuestas de proteínas relacionadas secuencial, estructural y funcionalmente, mientras que las chaperonas de distintas familias pueden diferir notablemente tanto en la estructura como en la función celular. Un ejemplo principal de una familia de chaperonas son las proteínas Hsp70, que constituyen la parte central de un sistema de chaperonas ubicuo presente en la mayoría de los compartimentos de las células eucariotas, en las eubacterias y en muchas arqueas. Esta familia ha sido recientemente implicada en otros aspectos de la homeostasis celular, además de servir como chaperona, principalmente por sus características antiapoptóticas, sus funciones en la inmunidad y la aparente dependencia de las células cancerosas en la regulación positiva de Hsp70.

**15 La familia de proteínas de choque térmico 70**

Las proteínas Hsp70 están involucradas en una amplia gama de procesos celulares que incluyen el plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas celulares inestables, además de cumplir otras funciones citoprotectoras. La función común de las Hsp70 en estos procesos parece ser la unión de segmentos hidrófobos cortos en polipéptidos parcialmente plegados, lo que facilita el plegamiento adecuado y evita la agregación. En eucariotas, las chaperonas Hsp70 interactúan *in vivo* con distintas clases de proteínas que sirven para regular los pasos críticos de su ciclo funcional; entre estas, la proteína Hsp40 de la familia de dominio J. Además, se han identificado proteínas asociadas adicionales, algunas de las cuales están uniendo Hsp70 a otros sistemas de chaperona como el sistema Hsp90.

**25 Miembros de la familia Hsp70 humana**

Algunas de las funciones importantes atribuidas a las chaperonas moleculares incluyen la importación de proteínas en los compartimentos celulares, el plegamiento de proteínas en el citosol, el retículo endoplásmico y las mitocondrias, la prevención de la agregación de proteínas y el replegamiento de proteínas mal plegadas. En la actualidad, la familia Hsp70 humana incluye 10 miembros codificados por distintos genes, y esta sección está destinada a proporcionar una visión general de estos miembros de la familia con respecto a la función, los patrones de expresión y la identidad de homología/secuencia. Existe cierta confusión acerca de la nomenclatura de los distintos miembros de la familia Hsp70 humana, aunque Tavaría *et al.*, han establecido un conjunto de pautas generales, que proporciona un vínculo lógico entre los nombres de locus, genes y proteínas. Sin embargo, como todavía existe cierta confusión entre especies, los genes y proteínas Hsp70 se mencionan aquí por su nombre de locus. El nombre Hsp70 puede referirse a los dos miembros de la familia Hsp70 inducibles con nombres de locus HSPA1A y HSPA1B o a toda la familia Hsp70 en general, como se desprende del consenso del texto. Sin embargo, como se usa a lo largo de la presente descripción, Hsp70 significa cualquiera de los dos miembros inducibles de la familia Hsp70 con los nombres de locus HSPA1A y HSPA1B.

**40 HspA1A y HspA1B**

Los genes transcritos de los locus HSPA1A y HSPA1B son los dos genes Hsp70 inducibles por calor/estrés y la mayoría de la literatura sobre Hsp70 humana se refiere a las proteínas codificadas por estos dos genes. Los genes dan lugar a proteínas que consisten en 641 aminoácidos, que tienen una identidad del 99 % entre sí y fueron los primeros miembros humanos de la familia Hsp70 en ser clonados y caracterizados. Los genes están unidos en el complejo MHC-clase III en 6p21.3, no tienen intrones y tienen regiones promotoras que contienen HSE, lo que les permite unirse a HSF e inducir la transcripción en respuesta a una variedad de ataques celulares.

50 La secuencia proteica para la proteína 70kDa de choque térmico del *Homo sapiens* 1A (HSPA1A) es (SEQ ID NO:1) (N.º de acceso NM\_005345.5):

```
MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFD
KRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPV
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLRTACERAKRTLSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAIIMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTI
PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPQIEVTFDIDANGILNVTA
TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEEVQRERVSAKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KISEADKKKVLDDKQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQGPKGG
SGSGPTIEEVD
```

## ES 2 753 169 T3

La secuencia de ácido nucleico (ADN) para la proteína 70kDa de choque térmico del *Homo sapiens* 1A (HSPA1A) es (SEQ ID NO:2) (N.º de acceso NM\_005345.5):

```

1 ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acgggtagcc tgaggagctg ctgcgacagt
61 ccactacctt tttcgagagt gactcccgtt gtcccaaggc ttcccagagc gaacctgtgc
121 ggctgcaggc accggcgcggt cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgcgg
181 atccagtgtt ccgtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcagggaaacc
241 ggcatggcca aagccgcggc gatcggcatc gacctgggca ccacctactc ctgctggtggg
301 gtgttccaac acggcaaggt ggagatcatc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc
361 agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgctggcaa gaaccaggtg
421 gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagtctcggc
481 gacccggtgg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac
541 aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccc cgaggagatc
601 tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgccgagg cgtacctggg ctaccgggtg
661 accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca ggccaccaag
721 gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgctggatca tcaacgagcc cacggccggc
781 gccatcgcct acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac
841 ctgggctggg gcaccttoga cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat cttcgaggtg
901 aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac
961 cacttcgtgg aggagttaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc
1021 gtgagggcgg tgcgcaccgc ctgcgagagg gccaaagagg ccctgtcgtc cagcaccag
1081 gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcatcgact tctacacgtc catcaccagg
1141 gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag
1201 gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc
1261 tccaccgcga tccccaaagt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg
1321 aacaagagca tcaacccca gaggctgtg gcctacgggg cggcggtgca ggcggccatc
5 1381 ctgatggggg acaagtcgga gaactgtcag gacctgctgc tgctggagct ggctcccctg

1441 tcgtggtggc tggagacggc cggaggcgtg atgactgccc tgatcaagcg caactccacc
1501 atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg
1561 atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc
1621 gtagctgagcg gcatccctcc ggcccccagg ggcgtgcccc agatcgaggt gacctcgac
1681 atcgatgcca acggcctcct gaacgtcacg gccacggaca agagcaccgg caaggccaac
1741 aagatcacca tcaccaacga caaggccgc ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg
1801 caggagggcg agaagtacaa agcggaggac gagggtgcagc gcgagagggg gtcagccaag
1861 aacgccctgg agtcctacgc cttcaacatg aagagcgccg tggaggatga ggggctcaag
1921 ggcaagatca gcgagggcga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg
1981 tggctggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag gaaggagctg
2041 gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg tcccggcct
2101 ggggcttcg gggctcaggg tcccgaaggga gggctcgggt caggccccac cattgaggag
2161 gtatagtagg ggcctttcca agattgctgt ttttgtttt gagcttcaag actttgcatt
2221 tcctagtatt tctgtttgtc agttctcaat ttctgtgtt tgcaatgtt aaattttttg
2281 gtgaagtact gaacttgctt tttttcgggt ttctacatgc agagatgaa ttactcgcc
2341 atcttacgac tatttcttct ttttaataca cttaactcag gccattttt aagttggtta
2401 cttcaaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaa

```

La secuencia proteica para la proteína 70kDa de choque térmico del *Homo sapiens* 1B (HSPA1B) es (SEQ ID NO:3) 10 (N.º de acceso NM\_005346):

```

MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEI IANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFD
KRLIGRKFQDPVQSDMKHWPQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEI SSMVLTKMKEIAEAYLGYPT
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRI INEPTAAAIAAYGLDRTGKGERNVLI FDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDI SQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTS ITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQI HDLVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLLLDVAPLSLGLLETAGGVMTALIKRNSTI
PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLGRFELSGIPPAPRGVQPQIEVTFDIDANGILNVTA
TDKSTGKANKIITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEVRERVSARKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPI ISGLYQAGGPGPGGFGAQGPKGG
SGSGPTIEEVD

```

La secuencia de ácido nucleico (ADN) para la proteína 70kDa de choque térmico del *Homo sapiens* 1B (HSPA1B) es 15 (SEQ ID NO:4) (N.º de acceso NM\_005346):

## ES 2 753 169 T3

```

1 ggaaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg agggctccgct tcgtctttcg agagtgactc
61 ccgcggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgctggctg caggcaccgg cgtgttgagt
121 ttccggcggt ccgaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtccgctgtt tccagccccc
181 agtctcagag cggagcccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc
241 atcgacctgg gcaccaccta ctctgctggt ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc
301 atcgccaacg accagggcaa ccgcaccacc cccagctacg tggccttcac ggacaccgag
361 cggctcatcg gggatgcggc caagaaccag gtggcgctga acccgcagaa caccgtgttt
421 gacgcgaagc ggctgatcgg ccgcaagttc ggcgaccocg tgggtgcagtc ggacatgaag
481 cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag
541 ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca tgggtgctgac caagatgaag
601 gagatcgccg aggcgtacct gggctacccg gtgaccaacg cgggtgatcac cgtgccggcc
661 tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggctcaac
721 gtgtgctgga tcatcaacga gccacggccc gccgccatcg cctacggcct ggacagaacg
781 ggcaaggggg agcgcacagt gctcatcttt gacctgggcg ggggcacctt cgactgttcc
841 atctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg
901 ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg tggagagatt caagagaaaa
961 cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgctcac cgctgctgag
1021 agggccaaga ggacctgtc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt
1081 gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggt tcgaggagct gtgtccgac
1141 ctgttccgaa gcaccctgga gccctgaggag aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaa

1201 gccagattc acgacctggt cctggtcggg ggctccacc gcaccccaa ggtgcagaag
1261 ctgtctcagg acttcttcaa cgggctcgac ctgaacaaga gcaccaacc cgacgaggct
1321 gtggcctacg gggcgcggt gcaggcgcc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg
1381 caggacctgc tgctgctgga cgtggctccc ctgtcgtctg ggctggagac ggccggaggc
1441 gtgatgactg cctgatcaa gcgcaactcc accatccca ccaagcagac gcagatcttc
1501 accacctact ccgacaacca acccggggtg ctgatccag tgtacgagg cgagaggcc
1561 atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggcccc
1621 agggcgctgc ccagatcga ggtgacctc gacatcgat ccaacggcat cctgaacgtc
1681 acggccacg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatc ccatcaccaa cgacaaggcc
1741 cgctgagca aggaggagat cgagcgcag gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag
1801 gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgcc tggagtctca cgcttcaac
1861 atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggcaaga tcagcagggc ggacaagaag
1921 aaggttctgg acaagtgtca agaggtcatc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag
1981 aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaacc catcatcagc
2041 ggactgtacc aggtgcccgg tggctccggg cctggcggct tcggggctca gggctccaa
2101 ggaggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtggatt aggggccttt gttctttagt
2161 atgtttgtct ttgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgctgctgtt ttctatgtc
2221 atttctgctt cagctctttg ctgcttcact tctttgtaa gttgtaacct gatggtatt
2281 agctggcttc attatttttg tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgatttaa
2341 tgttgatact gtaagggtgt ttcgttccct ttaaataaat caacactgcc accttctgta
2401 cgagtttgtt tgttttttt ttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaaca ctacaaaggc
2461 tgggaatgta tgtttttata atttgtttat ttaaataatga aaataaaat gttaaactt
2521 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

### 5 *HspA1L* y *HspA2*

Dos miembros de la familia Hsp70 han sido denominados "genes chovinistas" porque las células germinales masculinas favorecen su expresión con fuertes prejuicios. El gen *hspA1L* es un miembro de la familia Hsp70 sin intrón expresado constitutivamente ubicado a 4 kb telomérico al locus HSPA1A en el mismo complejo MHC-clase III en el cromosoma 6. Se expresa en pequeñas cantidades tanto antes como después del choque térmico, pero con el patrón de expresión que favorece a los testículos en ratones, ratas y humanos con una proteína de 641 aminoácidos (aa) que es 90 % idéntica a HspA1A. El gen *hspA2* se aisló primero de una biblioteca genómica de ratón y luego se ha demostrado que se expresa constitutivamente, aunque en niveles bajos, en varios tejidos del cuerpo humano, incluidos el músculo esquelético, el ovario, el intestino delgado, el colon, el cerebro, la placenta y los riñones, pero altamente expresado en testículos. Su expresión, o más bien la falta de la misma, se ha relacionado con espermatogénesis humana anómala y los ratones macho *hspA2*<sup>(-/-)</sup> son estériles. El gen está ubicado en el cromosoma 14, lo que da lugar a una proteína de 639 aa con 84 % de identidad con HspA1A, aunque la ubicación exacta está sujeta a discusión ya que dos documentos han presentado distintas posiciones de locus: 14q24.1 frente a 14q22.

### 20 *HspA6* y *HspA7*

Los genes *hspA6* y *hspA7* son miembros inducibles por calor de la familia Hsp70 sin contrapartidas aparentes en ratones. Contienen HSE en sus sitios promotores y los genes no tienen intrones. Están colocalizados en el cromosoma

1 y son 94 % idénticos entre sí en la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, solo HspA6 es funcional ya que el gen hspA7 alberga una única inserción de nucleótidos que genera un codón de parada prematuro a +1324. La proteína HspA6 tiene una longitud de 643 aa y muestra un 77 % de identidad con HspA1A y HspA1B.

### 5 HspA5 y HspA9

Los genes hspA5 y hspA9 son los dos miembros específicos del compartimiento de la familia Hsp70. La proteína HspA5 de 655 aa se encuentra en el retículo endoplásmico (ER) y facilita el plegamiento y el transporte de proteínas recién sintetizadas en este compartimiento. La proteína es 64 % idéntica a HspA1A, el gen se encuentra en 9q34. La proteína HspA9 de 679 aa se encuentra en las mitocondrias, donde ayuda a plegar las proteínas después de su transporte a través de la membrana mitocondrial. HspA9 se encuentra en 5q31.1, siendo la proteína 52 % idéntica a HspA1A.

### HspA8

15 El miembro asociado Hsp70 conocido como Hsc70 está codificado por un gen llamado hspA8 en 11q24, lo que da lugar a una proteína de 646 aa con 86 % de identidad con HspA1A, y se expresa constitutivamente en todos los tejidos y líneas celulares. La proteína es análoga a Hsp70 en sus funciones celulares, lo que proporciona el acompañamiento requerido en circunstancias normales, pero también se le ha atribuido un papel en el desenredado de las vesículas 20 recubiertas de clatrina, así como en la autofagia mediada por chaperonas.

### HspA3 y HspA4

25 Esto no se expondrá en la presente descripción, ya que hay dudas sobre si HSPA3 existe en absoluto y debido a que HSPA4 es probablemente un miembro de la familia Hsp110 y hasta ahora no se sabe nada, excepto su ubicación cromosómica en 5q31.1-2.

30 **Tabla 1: Lista de la familia de genes humanos Hsp70.** Los genes se enumeran según el nombre del locus, los nombres utilizados en este documento, la ubicación (posición) cromosómica, la identidad de la secuencia de aminoácidos para HspA1A, así como los nombres alternativos que se ven a menudo en la literatura.

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

### Regulación transcripcional de Hsp70

35 La impresión genómica del pie del promotor Hsp70 humano ha revelado que el choque térmico/estrés induce una unión rápida de los factores de transcripción del choque térmico (HSF) a una región que abarca secuencias nGAAn denominadas elementos de choque térmico (HSE). En condiciones normales, Hsp70 se une a HSF, que reside en el citosol, pero durante el estrés, los HSF se separan de Hsp70 y adaptan una conformación homotrimérica tras la fosforilación por PKC u otras serinas/treonina quinasas. Los trímeros de HSF entran al núcleo, donde se unen a HSE 40 ubicados en la región promotora de los genes Hsp70 y se fosforilan aún más por las HSF quinasas.

Hasta el momento, tres HSF se han caracterizado en humanos (HSF1, HSF2 y HSF4). HSF1 es el principal factor de transcripción activado en la mayoría de las condiciones de estrés y responde a una amplia gama de estímulos, que

pueden clasificarse en fisiológicos (por ejemplo, división celular, estimulación hormonal), patológicos (por ejemplo, infecciones, fiebre, inflamación, malignidad) y condiciones ambientales (por ejemplo, choque térmico, metales pesados, etanol). HSF2 responde solo a hemina, mientras que HSF4 se expresa preferentemente en el corazón humano, el páncreas, el cerebro y el músculo esquelético, carece de la repetición hidrofóbica c-terminal que se comparte entre todos los HSF de vertebrados y parece reprimir la expresión de HSP. La regulación del gen Hsp70 responsable de la síntesis de la Hsp70 expresada constitutivamente (Hsc70) no se entiende claramente, pero los HSF no parecen estar involucrados.

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

### 15 Propiedades estructurales y funcionales de Hsp70

La estructura y función del sistema Hsp70 se entiende mejor para la Hsp70 eubacteriana, DnaK, su cochaperona Hsp40 DnaJ y el factor de intercambio de nucleótidos GrpE. Sin embargo, el mecanismo generalmente se considera análogo en eucariotas, aunque la evidencia sugiere un desacoplamiento de GrpE. Esta sección se centrará en el sistema eucariota Hsp70, pero también incluirá comentarios sobre el sistema eubacteriano, donde esto se considere apropiado.

Hsp70 se compone de dos entidades funcionales: un dominio ATPasa N-terminal y un dominio de unión a péptido C-terminal más pequeño. El dominio ATPasa se compone de dos subdominios separados por una hendidura que contiene el sitio de unión a nucleótidos, que determina las propiedades de unión a péptidos del dominio C-terminal. Cuando se une el ATP, los sustratos peptídicos se unen y disocian rápidamente, aunque con baja afinidad, mientras que en un estado donde no hay nucleótidos ni ADP se unen al dominio N-terminal, las tasas de unión al péptido y disociación disminuyen y la afinidad aumenta. Por lo tanto, la hidrólisis de ATP sirve como un interruptor molecular entre dos estados de Hsp70, cuyo ciclo está regulado por la proteína de la familia de dominio J Hsp40 en eucariotas y DnaJ y GrpE en eubacterias. El dominio J N-terminal de Hsp40 se une a la hidrólisis de ATP aceleradora de Hsp70, lo que facilita la captura de péptidos, mientras que la parte C-terminal de Hsp40 funciona como una chaperona al reconocer péptidos hidrófobos, por lo que Hsp70 se recluta para cadenas de polipéptidos nacientes. Es importante tener en cuenta que las chaperonas moleculares no proporcionan información estérica específica para el plegamiento de la proteína unida, sino que inhiben las interacciones improductivas, lo que permite que la proteína se pliegue más eficientemente en su estructura nativa.

En las eubacterias, GrpE induce la liberación de ADP de DnaK (Hsp70 bacteriana), mientras que para las proteínas eucariotas de Hsp70 dicho factor parece prescindible porque el paso limitante de la velocidad en este ciclo de ATPasa no es la disociación de ADP unido sino la hidrólisis de ATP en sí. Sin embargo, proteínas adicionales sirven para regular la función Hsp70 en eucariotas; la proteína hipoligomérica Hip (proteína que interactúa con Hsp70) que sirve como un regulador positivo al estabilizar el estado unido a ADP de Hsp70, mientras que las proteínas Carboxy-terminus de la proteína de unión a Hsp70 (CHIP) y el antagonén-1 asociado a Bcl-2 (Bag-1), ambos tienen efectos inhibitorios: CHIP al inhibir la actividad ATPasa de Hsp70 y Bag-1 al antagonizar la actividad de replegamiento de Hsp70. Las dos proteínas Hsp40 humanas, Hdj1 y Hdj2, proporcionan interacciones adicionales que, además de sus funciones Hsp40 (descritas anteriormente), han demostrado que facilitan el acoplamiento de Hsp70 y Hsp90 a través de Hop (proteína organizadora de Hsp), una proteína adaptadora que físicamente une las chaperonas a través de sus dos dominios de repetición de tetrapéptido (TPR) que se unen a las secuencias C-terminales extendidas de Hsp70 y Hsp90, respectivamente. Recientemente se ha demostrado que algunas de las proteínas mencionadas anteriormente son reguladoras en la transferencia de proteínas mal plegadas irreversibles o no nativas de las chaperonas al mecanismo de ubiquitina-proteasoma. La proteína CHIP es, además de su papel regulador negativo en Hsp70, capaz de asociarse con Hsp90 a través de un dominio TPR N-terminal y se dirige a los sustratos Hsp90 para degradación a través de un dominio de ubiquitina ligasa C-terminal, pero también es capaz de cooperar funcionalmente con BAG-1, que se une a Hsp70 (así como al proteasoma). Estos hallazgos proporcionan un posible vínculo entre los mecanismos que integran el plegamiento asistido por chaperona y la degradación proteolítica, los dos componentes principales del control de calidad de proteínas en el citosol.

### Citoprotección a través de Hsp70

Además de sus capacidades antiapoptóticas como consecuencia de ser una chaperona molecular, es decir, que facilita el plegamiento de proteínas en condiciones desnaturalizantes, Hsp70 también puede afectar la supervivencia de las células de varias otras maneras, incluida la protección de la función mitocondrial después de la lesión por isquemia-reperfusión, lo que bloquea la activación de la quinasa de estrés quinasa N-terminal c-jun (JNK) tras la estimulación

de fibroblastos primarios con TNF, y se ha propuesto un complejo Hsp70/Bag-1 para regular el crecimiento celular y la mitogénesis durante condiciones de estrés celular. La capacidad de Hsp70 para proteger las células de la muerte celular inducida por una serie de estímulos como TNF, TRAIL, estrés oxidativo, radiación UV y los fármacos contra el cáncer doxorubicina, etopósido y taxol enfatizan aún más sus características antiapoptóticas. Finalmente, los informes también han proporcionado evidencia de interacciones más directas entre Hsp70 y la maquinaria apoptótica, ya que se ha demostrado que Hsp70 antagoniza el factor inductor de apoptosis (AIF) y ejerce una función antiapoptótica corriente adelante de la caspasa-3.

La evidencia reciente también sugiere que partes del potente efecto citoprotector de Hsp70 se deben a la estabilización de las membranas lisosómicas. Como evidencia de esto, el agotamiento de Hsp70 desencadena una permeabilización temprana de las membranas lisosómicas y la muerte celular mediada por catepsina en las células cancerosas, y la Hsp70 exógena inhibe efectivamente la desestabilización lisosómica inducida por diversas tensiones. Además, los ratones con deficiencia de Hsp70 sufren de pancreatitis causada por la fuga de proteasas lisosómicas en el citosol. Todos estos eventos enfatizan el papel de Hsp70 como un regulador importante de PCD y, por lo tanto, factor de supervivencia para las células.

### **Hsp70 extracelular**

Como se desprende de los párrafos anteriores, las funciones intracelulares de Hsp70 son esenciales para la homeostasis celular adecuada, especialmente ante los desafíos nocivos. Sin embargo, también están surgiendo funciones interesantes para la Hsp70 extracelular (eHsp70), especialmente cuando se trata de respuestas inmunes e inflamatorias, que podrían tener funciones importantes para la eliminación de las células cancerosas. Además, la participación en una adaptación fisiológica general al estrés y la protección frente al daño celular también son temas emergentes para eHsp70.

### ***Hsp70 extracelular y neuroprotección***

La primera evidencia de la presencia de eHsp70 provino de estudios en el axón gigante de calamar, donde se demostró que la elevación de la temperatura inducía un conjunto de proteínas de choque térmico en la vaina glial que rodeaba el axón que se transfirió al axón. Estos hallazgos se reprodujeron pronto en células de embrión de rata cultivadas y, lo que es más importante, ya en este punto, se presentó evidencia de una vía no clásica de exocitosis responsable de la liberación de Hsp70, ya que ni la monensina ni la colchicina, ambos inhibidores de la vía secretora clásica, pudieron bloquear la secreción de Hsp70. Desde estas publicaciones, otros informes han proporcionado ejemplos de liberación de Hsps por la glía y la absorción por las neuronas en varios sistemas de modelos animales, como ranas, cangrejos de río y ratas. Un estudio de células de glioblastoma humano en cultivo proporcionó el respaldo de una función para las células gliales como fuentes de eHsp70 en humanos. Este estudio mostró que, bajo condiciones de control, las células liberaron ~ 10 pg de Hsp70 por millón de células al medio en un período de tiempo de 24 h. Esta liberación se incrementó 2,5-5 veces cuando se aplicó un choque térmico de 20 minutos al comienzo del período de tiempo. Es importante destacar que este estudio también mostró que la liberación de eHsp70 fue mayor de lo que podría explicarse por la muerte celular. Todos estos datos respaldan la hipótesis sugerida originalmente por Tytell *et al.*, de que la liberación glial de Hsps puede ser una forma de apoyar la función neuronal durante el estrés metabólico.

La evidencia *in vivo* de que eHsp70 tiene un papel neuroprotector durante el estrés agudo proviene de una variedad de estudios. Un estudio de Tidwell *et al.* descubrió que eHsp70 es capaz de reducir la cantidad de muerte celular postaxotomía de la neurona motora, cuando se aplicó eHsp70 mediante una esponja de gel después de la axotomía. En el mismo estudio, también se observó el aumento de la supervivencia de las células neuronales sensoriales del ganglio de la raíz dorsal tras la administración de Hsp70, aunque esto dependía de dosis ligeramente más altas de Hsp70 que las neuronas motoras. Además, se ha demostrado que eHsp70 protege las neuronas motoras que de otro modo estarían destinadas a morir durante el desarrollo embrionario de los pollitos, y también protege las neuronas motoras aisladas de las médulas espinales de los pollitos tras la privación del factor trófico. También se ha descrito un papel protector *in vivo* para eHsp70 cuando se trata del daño leve de la retina. En este estudio, Yu *et al.*, inyectaron por vía intravítrea una disolución de Hsp70 y Hsc70 recombinante después de la exposición a la luz que induce el daño a una dosis que previamente se había descrito que causaba una degeneración extensa de los fotorreceptores. Curiosamente, la presencia de la mezcla eHsp70 en la cámara vítrea del ojo derecho dio como resultado que sobrevivieran significativamente más fotorreceptores en la retina. Además, la evaluación de la absorción de Hsc/Hsp70 marcada con fluoresceína demostró que estaba presente en la retina 6 h después de la administración. También se ha demostrado que la Hsp70 extracelular administrada mediante tratamiento intranasal previene las consecuencias del estrés inevitable en ratas y recientemente se describió que la Hsp70 humana recombinante inyectada por vía intraperitoneal fue eficaz para aumentar la vida útil, retrasar el inicio de los síntomas, preservar la función motora y prolongar la supervivencia de la neurona motora en un modelo de ratón de esclerosis lateral amiotrófica. El trabajo *in vitro* adicional usando Hsp70 o la mezcla Hsc/Hsp70 en sistemas neuronales ha demostrado además que eHsp70 puede mejorar la tolerancia al estrés de las células neuronales y reducir la toxicidad y agregación de la poliglutamina.

**Hsp70 extracelular e inmunidad**

Además de los roles en la citoprotección, se ha documentado que tanto la eHsp70 sistémica libre como asociada a la membrana plasmática cumple funciones en la inmunidad. Teniendo en cuenta que una de las principales funciones de Hsp70 es acompañar a las proteínas intracelulares, quizás no sea sorprendente que pueda estar involucrada en la unión de péptidos inmunogénicos y ayudar en la presentación de estos mediante moléculas de clase 1 del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). Además, se ha demostrado que la eHsp70 derivada del tumor acompaña a los péptidos inmunogénicos y se une selectivamente a las células presentadoras de antígeno (APC). Después de la endocitosis mediada por el receptor, estos complejos de péptido Hsp70 se presentan en moléculas de MHC de clase 1 que conducen a una respuesta de células T citotóxicas. Además del acompañamiento de autoantígenos, Hsp70 también es capaz de unir péptidos microbianos y motivos CpG no metilados en el ADN bacteriano.

Además de su papel como chaperona presentadora de antígeno, eHsp70 también se ha implicado en la estimulación de la inmunidad innata. Mientras que se ha demostrado que varios tipos celulares liberan Hsp70, también se ha demostrado que eHsp70 se une a varios receptores en diferentes subpoblaciones de leucocitos, incluidas las células asesinas naturales (NK), los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas. Los receptores involucrados en el reconocimiento de eHsp70 incluyen principalmente receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y consisten en una variedad de receptores de distintas familias de receptores, como los receptores tipo Toll (TLR), receptores depuradores y lectinas de tipo C. Tras la unión al receptor, eHsp70 es capaz de provocar una respuesta de citocina amplia que incluye la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6 y GM-CSF, un proceso desencadenado por la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, lo que sugiere una acción de citocina de eHsp70, lo que también ha llevado a la sugerencia de acuñar el término chaperoquina a eHsp70 para describir mejor las funciones únicas de eHsp70 como chaperona y citocina.

Gran parte del trabajo *in vivo* sobre el papel de eHsp70 en la inmunidad se ha llevado a cabo en modelos de roedores. Por ejemplo, los aumentos en la concentración de eHsp70 en respuesta al choque de la cola se asociaron con una inflamación reducida y tiempos de recuperación más rápidos después de una inyección por vía subcutánea de *E. Coli*. Además, el suministro *in vivo* de Hsp70 en ratones aceleró el cierre de la herida, una característica que probablemente se debió a la fagocitosis por macrófagos mejorada de los restos de la herida.

Faltan pruebas de las funciones inmunomoduladoras de Hsp70 en humanos, pero los estudios han demostrado relaciones entre un aumento de eHsp70 y un pronóstico/resultado mejorado para el trauma cerebral, aunque también se ha demostrado lo contrario. Sin embargo, también se sabe que las concentraciones de eHsp70 disminuyen con la edad avanzada, lo que puede ser indicativo de una capacidad reducida relacionada con la edad para generar una respuesta completa al estrés, lo que nuevamente podría explicar el aumento de la morbilidad y la mortalidad observadas con el envejecimiento, aunque esto sigue siendo puramente especulativo.

**Liberación de Hsp70**

Aparte de los datos que demuestran la transferencia de eHsp70 entre células vecinas, como en el modelo glia/axon, varios informes han documentado la presencia de eHsp70 libre en la circulación. Para que Hsp70 esté presente en este compartimento, necesariamente tiene que ser liberado por un órgano/célula. Por lo general, se consideran dos formas principales de lograr esto. Una es una forma pasiva en la que la observación de eHsp70 en la circulación periférica es la consecuencia de la liberación de un grupo intracelular de Hsp70 debido a la lisis celular o la muerte. Alternativamente, o quizás adicionalmente, Hsp70 se libera activamente a través de una vía exocitótica no clásica.

Se ha sugerido que Hsp70 junto con otras proteínas de choque térmico solo se liberan bajo circunstancias patológicas que resultan en muerte necrótica y no durante la muerte celular programada. Sin duda, un trauma severo y condiciones patológicas que resultan en necrosis pueden conducir a la liberación de Hsp70 al torrente sanguíneo. Esto ha sido bien documentado y lógicamente también se esperaría. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que Hsp70 puede liberarse de las células intactas mediante mecanismos activos y que el grado de estímulo determina el modo de liberación. Una fuerte evidencia de la liberación no necrótica de Hsp70 también proviene de estudios sobre la liberación inducida por el ejercicio de eHsp70 al torrente sanguíneo periférico. Dependiendo del modo de ejercicio (cuanto mayor es la tensión física, más liberación), se pueden detectar aumentos importantes de eHsp70 en el torrente sanguíneo periférico y, lo que es más importante, ningún estudio conocido ha informado una correlación directa entre eHsp70 y los marcadores de daño muscular. Además, Fleshner y sus colegas han demostrado con elegancia que eHsp70 puede liberarse independientemente del daño celular o tisular y han demostrado que el estrés psicológico, como el miedo predador y la descarga eléctrica, puede provocar una liberación de eHsp70 inducida por el estrés, un proceso que se sugirió dependiente de la señalización de catecolaminas.

Sin embargo, la forma en que hsp70 abandona la célula aún no está clara, entre otras cosas porque Hsp70 no contiene

ninguna secuencia líder de péptidos clásica, lo que podría apuntar a la secreción. Además, como la secreción clásica ya se cuestionó al inicialmente, esto sugiere que deben existir mecanismos alternativos para la liberación de eHsp70. Se ha demostrado que eHsp70 se puede liberar en vesículas caracterizadas como exosomas, pero también se ha presentado evidencia de que eHsp70 se puede liberar como eHsp70 libre, tanto en sistemas celulares como *in vivo*.  
 5 Se ha sugerido que se necesitan balsas lipídicas para la liberación de eHsp70, aunque esto también se ha discutido. Además, se ha demostrado que es necesario un compartimento lisosómico funcional para la liberación de eHsp70 y que esta liberación se acompaña de la presencia de proteínas marcadoras lisosómicas en la superficie de las células, lo que sugiere una secreción dependiente de la fusión de la membrana plasmática y lisosómica. Independientemente de si la liberación se realiza a través de exosomas o por liberación directa de lisosomas, es interesante observar que  
 10 algún tipo de compartimento secretor de MVB / endosómico tardío / lisosomal aparentemente está involucrado en todos los modos de liberación.

Como las catecolaminas a través del receptor adrenérgico  $\alpha_1$  pueden conducir a flujos de calcio intracelulares, y dado que se ha sugerido que los mismos flujos de calcio causan exocitosis de exosomas, cuerpos multivesiculares y  
 15 lisosomas, una hipótesis actual es que bajo momentos de estrés, aumentos de la actuación de la noradrenalina sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  producen un flujo de calcio dentro de la célula y una posterior liberación de Hsp70 dentro de los exosomas.

#### **Agente bioactivo según la presente descripción**

20 La presente descripción se refiere en una realización al uso de un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70.

El aumento de la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 según la presente descripción se puede obtener  
 25 proporcionando una de las siguientes clases de compuestos y terapias:

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

- 30
- Fármacos de molécula pequeña como el bimoctamol y el arimoctamol
  - Fluidificantes de membrana como el alcohol bencílico
  - Terapia de calor subletal ( $\leq 42$  °C) o hipertermia
  - Ciertos fármacos del grupo de fármacos antiinflamatorios y antineoplásicos
  - Estrés celular
- 35
- Especies reactivas de oxígeno (ROS), adrenalina, noradrenalina, luz UV, radioterapia

Un agente bioactivo según la presente descripción es, por lo tanto, cualquier agente, químico o compuesto que aumente la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70; e incluye HSP70 en sí mismo, o un fragmento funcional o variante de la misma, y cualquier inductor o coinductor de Hsp70 conocido por la persona experta.  
 40

Se deduce que un agente bioactivo puede aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70, ya sea directa o indirectamente.

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción es Hsp70, o un fragmento funcional o variante  
 45 de la misma.

En otra realización, el agente bioactivo según la presente descripción es un inductor o coinductor de Hsp70.

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción comprende una combinación de Hsp70, o un  
 50 fragmento funcional o variante de la misma, y un inductor o coinductor de Hsp70.

Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70, para su uso como fármaco.

55 Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del  
 60 metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar el uso de un agente bioactivo capaz de aumentar la

concentración y/o actividad intracelular de Hsp70, para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de coleserilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, 5 trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Otro aspecto adicional de la presente descripción es proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento 10 lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima. cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, 15 leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de 20 coleserilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

En una realización de la presente descripción, dicho tratamiento puede ser profiláctico, curativo o de mejora. En una realización particular de la presente descripción, dicho tratamiento es profiláctico. En otra realización de la presente 25 divulgación, dicho tratamiento es curativo. En una realización adicional de la presente descripción, dicho tratamiento es de mejora.

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

30 Es un aspecto de la presente descripción proporcionar Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, para usar como medicamento.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en 35 enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de coleserilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

40 Es un aspecto adicional de la presente divulgación proporcionar el uso de Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de coleserilo, 45 trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Es otro aspecto adicional de la presente descripción proporcionar Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, para usar en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente relacionada con 50 la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, 55 leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de 60 coleserilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Se entiende que Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, según la presente descripción puede ser

cualquier producto natural o sintético, y puede producirse mediante cualquier técnica convencional conocida por el experto en la materia.

5 En una realización de la presente descripción, Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, se purifica a partir de una fuente natural. Dicha fuente natural puede ser cualquier planta, animal o bacteria que exprese, o pueda inducirse a expresar, Hsp70 en una forma adecuada para administrar a un individuo que lo necesite.

10 Sin embargo, en una realización preferida de la presente descripción, Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, se fabrica sintéticamente. De ello se deduce que Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede en una realización preferida de la presente descripción ser una proteína recombinante hecha así por técnicas convencionales y como tal se denomina rHsp70.

15 La Hsp70 según la presente descripción, sintética o natural, puede tener una secuencia que se deriva de cualquier especie adecuada de planta, animal o bacteria. En una realización de la presente descripción, dicha rHsp70 se deriva de un mamífero. Dicho mamífero puede seleccionarse del grupo que consiste en humano (*homo sapiens*), ratón (*mus musculus*), vaca, perro, rata, hurón, cerdo, oveja y mono. En otra realización de la presente divulgación, dicho rHsp70 se deriva de bacterias.

20 La Hsp70 se caracteriza en parte por tener un grado muy alto de conservación de la secuencia interespecies, lo que posiblemente permite que la Hsp70 derivada de una especie se use en otra especie sin provocar una respuesta inmune dañina.

25 En una realización particular de la presente descripción, dicha rHsp70 tiene una secuencia derivada de la Hsp70 humana.

En una realización particular de la presente descripción, dicha rHsp70 tiene una secuencia derivada de más de una especie. Dicha Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede por lo tanto en una realización de la presente descripción ser una quimera.

30 Una proteína recombinante es una proteína que se deriva del ADN recombinante. El ADN recombinante es una forma de ADN que no existe naturalmente, que se crea combinando secuencias de ADN que normalmente no ocurrirían juntas. En términos de modificación genética, el ADN recombinante se introduce mediante la adición de ADN relevante en un ADN organismal existente, como los plásmidos de bacterias, para codificar diferentes rasgos para un propósito específico. Se diferencia de la recombinación genética, en que no ocurre a través de procesos dentro de la célula, sino  
35 que está diseñada por el hombre.

40 En una realización, la Hsp70 según la presente descripción tiene una identidad del 100 % con la proteína Hsp70 de tipo silvestre. En otra realización, la Hsp70 según la presente descripción tiene menos del 100 % de identidad con la proteína Hsp70 de tipo silvestre, tal como entre 99,9 y 95 % de identidad, por ejemplo, 95 a 90 % de identidad, tal como 90 a 85 % de identidad, por ejemplo, del 85 al 80 % de identidad, como del 80 al 75 % de identidad, por ejemplo del 75 al 60 % de identidad con la proteína de tipo silvestre. Independientemente del grado de identidad, la presente descripción abarca cualquier variante de Hsp70 que conserve todas o la mayoría de sus funciones biológicas.

45 En una realización de la presente descripción, el agente bioactivo es Hsp70. En una realización de la presente descripción, dicha Hsp70 es Hsp70 de longitud completa.

También es una realización de la presente descripción proporcionar un fragmento funcional o variante de Hsp70. Como se define aquí, un fragmento funcional o variante es cualquier fragmento de Hsp70 que tiene la función deseada, que en términos de la presente descripción es una capacidad para revertir la patología de una enfermedad de  
50 almacenamiento lisosomal y/o aumentar la captación celular de otras moléculas.

En una realización de la presente descripción, el agente bioactivo es un fragmento funcional o variante de Hsp70.

55 En una realización de la presente divulgación, el agente bioactivo es un fragmento funcional o variante de Hsp70, en el que Hsp70 se modifica por delección(es), adición(es) o sustitución(es) de la Hsp70 de tipo silvestre.

La proteína Hsp70 de tipo silvestre tiene una longitud total de 641 aminoácidos. En una realización de la presente descripción, un fragmento de Hsp70 pretende comprender cualquier fragmento con una longitud total menor que la proteína de tipo silvestre de 641 aminoácidos, tal como menos de 625 aminoácidos, por ejemplo menos de 600  
60 aminoácidos, como menos de 575 aminoácidos, por ejemplo menos de 550 aminoácidos, como menos de 525 aminoácidos, por ejemplo menos de 500 aminoácidos, como menos de 475 aminoácidos, por ejemplo menos de 450 aminoácidos, como menos de 425 aminoácidos, por ejemplo menos de 400 aminoácidos, como menos de 375

aminoácidos, por ejemplo menos de 350 aminoácidos, como menos de 325 aminoácidos, por ejemplo menos de 300 aminoácidos, como menos de 275 aminoácidos, por ejemplo, menos de 250 aminoácidos, como menos de 225 aminoácidos, por ejemplo menos de 200 aminoácidos, como menos de 175 aminoácidos, por ejemplo menos de 150 aminoácidos, como menos de 125 aminoácidos, por ejemplo, menos de 100 aminoácidos, como menos de 75 aminoácidos, por ejemplo, menos de 50 aminoácidos, como menos de 25 aminoácidos.

La proteína Hsp70 de tipo silvestre tiene una longitud total de 641 aminoácidos. En una realización de la presente descripción, un fragmento de Hsp70 pretende comprender cualquier fragmento con una longitud total de más de 10 aminoácidos, como más de 25 aminoácidos, por ejemplo más de 50 aminoácidos, como más de 75 aminoácidos, por ejemplo más de 100 aminoácidos, como más de 125 aminoácidos, por ejemplo más de 150 aminoácidos, como más de 175 aminoácidos, por ejemplo más de 200 aminoácidos, como más de 225 aminoácidos, por ejemplo, más de 250 aminoácidos, como más de 275 aminoácidos, por ejemplo más de 300 aminoácidos, como más de 325 aminoácidos, por ejemplo más de 350 aminoácidos, como más de 375 aminoácidos, por ejemplo más de 400 aminoácidos, como más de 425 aminoácidos, por ejemplo más de 450 aminoácidos, como más de 475 aminoácidos, por ejemplo más de 500 aminoácidos, como más de 525 aminoácidos, por ejemplo más de 550 aminoácidos, como más de 575 aminoácidos, por ejemplo más de 600 aminoácidos, como más de 625 aminoácidos.

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

En una realización de la presente descripción, el fragmento o variante de Hsp70 comprende todo o parte del dominio ATPasa de Hsp70. Se deduce que el fragmento o variante de Hsp70 según la presente descripción en una realización comprende la totalidad o parte de los aminoácidos número 30 a 382. En otra realización de la presente descripción, el fragmento o variante de Hsp70 comprende triptófano en la posición del aminoácido 90 del dominio ATPasa de Hsp70.

Un fragmento de Hsp70 puede ser una versión truncada de la proteína de tipo silvestre, lo que significa que es una versión más corta. Un fragmento puede truncarse acortando la proteína de los extremos amino terminal o carboxi terminal de la proteína, o puede truncarse por delección de una o más regiones internas de cualquier tamaño de la proteína.

Un fragmento o variante de Hsp70 puede en una realización de la presente descripción tener un 100 % de identidad con la proteína de tipo silvestre. En otra realización de la presente descripción, el fragmento o variante de Hsp70 también puede ser una variante de Hsp70 que tiene menos del 100 % de identidad con la proteína de tipo silvestre, tal como entre 99,9 y 95 % de identidad, por ejemplo, 95 a 90 % identidad, tal como 90 a 85 % de identidad, por ejemplo 85 a 80 % de identidad, tal como 80 a 75 % de identidad, por ejemplo 75 a 60 % de identidad con la proteína de tipo silvestre.

Un fragmento o variante de Hsp70 puede en una realización de la presente descripción tener un 100 % de identidad con la proteína de tipo silvestre. En otra realización de la presente descripción, el fragmento o variante de Hsp70 también puede ser una variante de Hsp70 que tiene menos del 100 % de identidad con la proteína de tipo silvestre, tal como entre 99,9 y 95 % de identidad, por ejemplo, 95 a 90 % identidad, tal como 90 a 85 % de identidad, por ejemplo 85 a 80 % de identidad, tal como 80 a 75 % de identidad, por ejemplo 75 a 60 % de identidad con la proteína de tipo silvestre.

Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto del fragmento funcional o variante puede ser distinto del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, el fragmento funcional o variante puede ser más eficaz que la molécula de longitud completa. Además, el uso de fragmentos en lugar de moléculas de longitud completa puede ser ventajoso en vista del menor tamaño de los fragmentos.

En una realización de la presente descripción, un fragmento funcional o variante de Hsp70 puede ser una variante de Hsp70 en la que uno o más aminoácidos han sido sustituidos. Dichas sustituciones pueden ser sustituciones equivalentes o conservadoras, o sustituciones no equivalentes o no conservadoras.

En una realización de la presente descripción, se ha sustituido entre el 0,1 y el 1 % de los residuos de aminoácidos de Hsp70 de tipo silvestre, como entre el 1 y el 2 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre el 2 y el 3 % de

residuos de aminoácidos, como entre 3 y 4 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 4 y 5 % de residuos de aminoácidos, como entre 5 y 10 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 10 y 15 % de residuos de aminoácidos, como entre 15 y 20 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 20 y 30 % de residuos de aminoácidos, como entre 30 y 40 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 40 y 50 % de residuos de aminoácidos, como entre 50 y 60 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 60 y 70 % de residuos de aminoácidos, como entre 70 y 80 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 80 y 90 % de residuos de aminoácidos, como entre 90 y 100 % de residuos de aminoácidos.

En una realización de la presente descripción, se han sustituido entre 1 y 5 de los residuos de aminoácidos de Hsp70 de tipo silvestre, como entre 5 y 10 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 10 y 15 residuos de aminoácidos, como entre 15 y 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 20 y 30 residuos de aminoácidos, como entre 30 y 40 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 40 y 50 residuos de aminoácidos, como entre 50 y 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 75 y 100 residuos de aminoácidos, como entre 100 y 150 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 150 y 200 residuos de aminoácidos, como entre 200 y 300 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 300 y 400 residuos de aminoácidos, como entre 400 y 500 residuos de aminoácidos.

En una realización de la presente descripción, el fragmento funcional o variante de Hsp70 es una proteína de fusión. En una realización de la presente descripción, dicho fragmento funcional o variante de Hsp70 se fusiona a un identificador.

**Ventajas de usar Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma**

Como se discutió anteriormente en este documento, no existen curas para las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el tratamiento es principalmente sintomático, con la excepción del desarrollo de terapias de reemplazo enzimático (ERT) para la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry. Como se mencionó, la ERT es una forma de terapia muy costosa que es eficaz solo para una enfermedad específica.

Hasta donde saben los inventores, hasta la fecha no se ha hecho ningún intento exitoso de proporcionar ERT para las enfermedades de almacenamiento lisosomal restantes asociadas con la acumulación de lípidos, por lo tanto, hoy en día sigue siendo una necesidad insatisfecha importante un tratamiento efectivo y específico de estos LSD.

La administración de Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, a un individuo que lo necesita tiene una serie de ventajas en comparación con las modalidades de tratamiento convencionales para los trastornos de almacenamiento lisosómico.

Primero, producir una proteína recombinante, como rHsp70 o un fragmento funcional o variante de la misma, es con la tecnología moderna una forma simple y directa de producir cantidades suficientes de rHsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma. Las técnicas convencionales para producir enzimas recombinantes son bien conocidas por los expertos.

Además, la producción de una proteína recombinante, como rHsp70, un fragmento funcional o una variante de la misma, es un procedimiento barato para producir cantidades suficientes de rHsp70, o un fragmento funcional o una variante de la misma. En comparación con la producción de enzimas para ERT, el coste se reduce drásticamente.

Además, el uso de Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede usarse para el tratamiento de más de un trastorno de almacenamiento lisosómico específico. Esto se aplica también a los inductores y coinductores de Hsp70 de la presente descripción. De hecho, el agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 puede usarse para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento lisosomal que pueda revertirse modulando la actividad enzimática de la enzima defectuosa involucrada, donde dicha enzima interactúa con BMP.

Finalmente, como Hsp70 es una molécula endógena, es decir, una molécula que se origina dentro de un organismo, tejido o célula, es de esperar que no se active una respuesta inmunitaria muy limitada o se administre Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma. Esta es una gran ventaja, ya que facilita el tratamiento y reduce los posibles efectos secundarios cuando se administra a un individuo.

### **Expresión ectópica de Hsp70**

En una realización de la presente descripción, Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede expresarse a partir de un vector. La descripción, por lo tanto, en una realización se refiere a un vector que codifica Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma.

En una realización de la presente descripción, Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede administrarse a un individuo que lo necesite en forma de un vector.

5 El vector usado para expresar Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede seleccionarse del grupo que consiste en: vectores virales (retrovirales y adenovirales) o vectores no virales (plásmido, cósmido, bacteriófago).

En una realización de la presente descripción, dicho vector comprende uno o más de un origen de replicación, un marcador para selección y uno o más sitios de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. En otra realización de la presente divulgación, dicho vector está operativamente unido a secuencias reguladoras que controlan la transcripción de dicha Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, en una célula huésped adecuada.

10 La presente divulgación en una realización se refiere a un procedimiento para producir Hsp70, o un fragmento funcional o de la misma, como se describe en el presente documento; dicho procedimiento comprende las etapas de proporcionar un vector que codifica dicha Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, y expresar dicho vector *in vitro* o *in vivo* en un organismo huésped adecuado, lo que produce de ese modo dicha Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma.

15 La descripción se refiere además a una célula huésped aislada recombinante o transgénica que comprende un vector que codifica Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, según la presente descripción.

20 La descripción también se refiere a un procedimiento para generar una célula huésped recombinante o transgénica, dicho procedimiento comprende los pasos de proporcionar un vector que codifica Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, introducir dicho vector en dicha célula huésped recombinante o transgénica y opcionalmente también expresar dicho vector en dicha célula huésped recombinante o transgénica, lo que genera así una célula huésped recombinante o transgénica que produce dicha Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma.

En otra realización, la presente descripción se refiere a un organismo de mamífero transgénico que comprende la célula huésped descrita anteriormente.

30 En una realización adicional, el organismo transgénico de mamífero que comprende la célula huésped recombinante o transgénica según la presente descripción no es humano.

La célula huésped transgénica puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en una célula huésped de mamífero, planta, bacteria, levadura u hongo.

35 Para mejorar la administración del ADN a la célula, el ADN debe protegerse del daño y debe facilitarse su entrada en la célula. Se han creado lipoplexos y poliplexos que tienen la capacidad de proteger el ADN de la degradación indeseable durante el proceso de transfección. El ADN plasmídico puede cubrirse con lípidos en una estructura organizada como una micela o un liposoma. Cuando la estructura organizada forma un complejo con el ADN, se llama lipoplex. Hay tres tipos de lípidos que pueden emplearse para formar liposomas; aniónico (con carga negativa), neutro o catiónico (con carga positiva). Los complejos de polímeros con ADN se denominan poliplexos. La mayoría de los poliplexos consisten en polímeros catiónicos y su producción está regulada por interacciones iónicas.

40 En otra realización de la presente descripción, Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, puede administrarse como ADN desnudo. Esta es la forma más simple de transfección no viral. El suministro de ADN desnudo se puede realizar mediante el uso de electroporación, sonoporación o el uso de una "pistola de genes", que dispara partículas de oro recubiertas de ADN en una célula usando gas a alta presión.

#### **Agente bioactivo: inductores y coinductores de Hsp70**

50 En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción es un inductor o coinductor de Hsp70.

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

55 Un coinductor de Hsp70 es un compuesto que no puede amplificar la expresión del gen Hsp70 y la expresión de proteínas sin un estrés concomitante (leve), pero el aumento inducido por el estrés en los niveles de Hsp70 se eleva o aumenta aún más por su presencia.

60 Es un aspecto de la presente descripción proporcionar un inductor o coinductor de Hsp70 para su uso como medicamento.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un inductor o coinductor de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar el uso de un inductor o coinductor de Hsp70, para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Es otro aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un inductor o coinductor de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente relacionada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción es un inductor o coinductor de Hsp70. En una realización particular, el agente bioactivo según la presente descripción es un inductor de Hsp70. En otra realización particular, el agente bioactivo según la presente descripción es un coinductor Hsp70.

#### **Fármacos tradicionales - derivados de la hidroxilamina**

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción es un coinductor de Hsp70. En una realización adicional de la presente descripción, dicho coinductor de Hsp70 es un fármaco tradicional.

En una realización particular, el coinductor de Hsp70 según la presente descripción es un derivado de la hidroxilamina. Dicho derivado de la hidroxilamina puede seleccionarse en una realización adicional de la presente descripción de entre el grupo de bimoclomol (BRLP-42), arimoclomol (BRX-220), BRX-345 y BGP-15.

En una realización particular de la presente descripción, dicho derivado de la hidroxilamina es el arimoclomol (BRX-220).

El bimoclomol ([2-hidroxi-3-(1-piperidinil)propoxi]-3-piridina-carboximidoil-cloruro maleato) es un compuesto no tóxico que se desarrolló originalmente para el tratamiento de complicaciones diabéticas como las neuropatías. Se ha demostrado que el bimoclomol mejora la supervivencia celular en condiciones de estrés experimental, en parte al aumentar las proteínas de choque térmico intracelular (HSP), incluida Hsp70, a través de una activación de HSF-1. Se ha demostrado que el bimoclomol posee la capacidad de coinducción de Hsp70 en ausencia de proteínas desplegadas, y que el bimoclomol interactúa y aumenta la fluidez de los lípidos de membrana cargados negativamente. BRX-345 es un análogo estructural de bimoclomol con una capacidad algo menor para inducir HSP.

El arimoclomol (BRX-220) es un análogo del bimoclomol, que también interactúa y amplifica la respuesta al choque térmico. El arimoclomol se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la ELA (esclerosis lateral amiotrófica); un trastorno neurodegenerativo progresivo. El arimoclomol es propiedad de CytRx Corporation.

En algunas realizaciones, el agente bioactivo según la presente divulgación es irovanadina (5-(piperidin-1-ilmetil)-3-piridin-3-il-5,6-dihidro-2H-1,2,4-oxadiazina).

Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es proporcionar un coinductor de Hsp70 derivado de la hidroxilamina para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en

enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

5

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar el uso de un coinductor de Hsp70 derivado de la hidroxilamina para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

10

Es otro aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un coinductor Hsp70 derivado de la hidroxilamina para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente relacionada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

15

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

20

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

25

#### **Fluidificadores de membrana**

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción es un inductor de Hsp70. En una realización adicional de la presente descripción, dicho inductor de Hsp70 es un fluidificador de membrana.

30

El tratamiento con un fluidificador de membrana también puede denominarse terapia de lípidos.

En una realización particular, el inductor de Hsp70 según la presente descripción es un fluidificador de membrana seleccionado del grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como la lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por la persona experta.

35

Además de la desnaturalización de una proporción de proteínas celulares durante el calor (proteotoxicidad), también se propone un cambio en la fluidez de las membranas como un termosensor celular que inicia la respuesta al choque térmico e induce HSP. De hecho, las perturbaciones de membrana inducidas químicamente, análogas a la fluidificación de la membrana plasmática inducida por el calor, son capaces de activar HSP, sin causar desnaturalización de proteínas.

40

45

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

Los fluidificadores de membrana actúan intercalándose entre los lípidos de la membrana, lo que induce un efecto de desorden al debilitar las interacciones de van der Waals entre las cadenas de acilo lipídico.

50

Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción es proporcionar un fluidificador de membrana seleccionado de entre el grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como la lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por la persona experta, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

55

60

Es un aspecto adicional de la presente descripción el proporcionar el uso de un fluidificador de membrana seleccionado de entre el grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico,

dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como la lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por la persona experta, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

Es otro aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un fluidificador de membrana seleccionado del grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como la lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por la persona experta, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, donde dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico no se selecciona de entre el grupo de enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, sialidosis tipo I, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry y deficiencia de saposina.

En una realización de la presente descripción, dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

#### **Otros medios para inducir Hsp70**

Se prevé que cualquier medio para inducir la expresión de Hsp70 esté abarcado por la presente divulgación, algunos de los cuales se describen a continuación.

El aumento de la temperatura de un individuo es un potente inductor de HSP que incluye Hsp70, y, como tal, la terapia térmica subletal es un aspecto de la presente descripción. En una realización de la presente descripción, la terapia de calor subletal comprende aumentar la temperatura de un individuo a una temperatura central de aproximadamente 38 °C, tal como aproximadamente 39 °C, por ejemplo aproximadamente 40 °C, tal como aproximadamente 41 °C, por ejemplo, aproximadamente 42 °C, tal como aproximadamente 43 °C.

Por lo tanto, es un aspecto de la presente descripción proporcionar terapia de calor subletal para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterois cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

También es un aspecto de la presente descripción proporcionar terapia de calor subletal para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente relacionada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

El estrés psicológico, como el miedo a los depredadores y las descargas eléctricas, puede provocar una liberación de eHsp70 inducida por el estrés, un proceso que se sugiere que depende de la señalización de catecolaminas. Además, la adrenalina y la noradrenalina pueden provocar la liberación de Hsp70.

Se ha demostrado que los siguientes compuestos inducen (o coinducen) HSP, incluida Hsp70: el compuesto interactivo con membrana alquililfosfolípido Edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub> o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfolina); fármacos antiinflamatorios que incluyen inhibidores de la ciclooxigenasa 1/2 como el celecoxib y el rofecoxib, así como AINE como ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio e indometacina; prostaglandinas PGA<sub>1</sub>, PG<sub>2</sub> y 2-ciclopenteno-1-ona; agonistas de receptores gamma activados por proliferadores de peroxidasa; agentes anticancerígenos que interaccionan con la tubulina, incluidos la vincristina y el paclitaxel; el sensibilizador de insulina pioglitazona; agentes antineoplásicos tales como carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida y citarabina; los inhibidores de Hsp90 geldanamycin, 17-AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimicina-A y ácido araquidónico; inhibidores del proteasoma MG132 y lactacistina; inhibidores de las proteasas de serina DCIC, TLCK y TPCK; los medicamentos antiulcerosos geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona y polaprezinc (zinc L-carnosina); metales pesados (zinc y

estaño); el medicamento antiinflamatorio dexametasona; cocaína; nicotina; alcohol; agonistas alfa-adrenérgicos; prostanoides de ciclopentenona; así como las medicinas herbales paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcumina.

- 5 Por lo tanto, es un aspecto de la presente descripción proporcionar un compuesto seleccionado de entre el grupo de Edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub> o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfocolina), celecoxib, rofecoxib, acetil-salicílico ácido, salicilato de sodio, indometacina, PGA1, PGj2 2-ciclopenteno-1-ona, agonistas de receptores gamma activados por proliferadores de peroxidasa, vincristina, paclitaxel, pioglitazona, carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida citarabina, geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, radicol, herbimicina-A, ácido araquidónico, MG132, lactacistina, DCIC, 10 TLCK, TPCK, geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona, polaprezinc (zinc L-carnosina), dexametasona, cocaína, nicotina, alcohol, agonistas alfa-adrenérgicos, prostanoides de ciclopentenona, paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcumina, así como otros inductores de HSP conocidos por la persona experta, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, 15 colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

- También es un aspecto de la presente descripción proporcionar un compuesto seleccionado de entre el grupo de 20 Edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub> o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfocolina), celecoxib, rofecoxib, acetil-salicílico ácido, salicilato de sodio, indometacina, PGA1, PGj2 2-ciclopenteno-1-ona, agonistas de receptores gamma activados por proliferadores de peroxidasa, vincristina, paclitaxel, pioglitazona, carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida citarabina, geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, radicol, herbimicina-A, ácido araquidónico, MG132, lactacistina, DCIC, 25 TLCK, TPCK, geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona, polaprezinc (zinc L-carnosina), dexametasona, cocaína, nicotina, alcohol, agonistas alfa-adrenérgicos, prostanoides de ciclopentenona, paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcumina, así como otros inductores de HSP conocidos por la persona experta, para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en donde dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor.

30

#### **Composición farmacéutica según la presente descripción**

- La presente descripción se refiere al uso de un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad de Hsp70, beneficiando así a los pacientes que padecen una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste 35 en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II.

- 40 Si bien es posible que los agentes bioactivos de la presente descripción se administren como el producto químico en bruto, se prefiere presentarlos en forma de una formulación farmacéutica. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona además una composición farmacéutica, para aplicación medicinal, que comprende un agente bioactivo de la presente divulgación o sales farmacéuticamente aceptables de la misma, como se define aquí, y por lo tanto un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

Es un aspecto de la presente divulgación proporcionar una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende un agente bioactivo identificado en el presente documento que puede administrarse a un individuo que lo necesite. Una composición farmacéutica es una composición que es segura de administrar a un individuo; y por lo tanto puede ser una composición farmacéuticamente segura.

50

En una realización, la descripción se refiere a una composición que comprende un agente bioactivo según la presente descripción. La composición como se describe en el presente documento puede formularse en una realización en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. La composición como se describe en el presente documento puede formularse en una realización en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55

Las composiciones farmacéuticas que contienen un agente bioactivo de la presente descripción pueden prepararse mediante técnicas convencionales, p. ej., como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa.

- 60 Los agentes bioactivos de la presente divulgación pueden formularse para administración parenteral y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en envases multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones,

soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, vehículos, diluyentes o disolventes que incluyen soluciones acuosas de sales minerales u otras moléculas hidrosolubles, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, aceites animales, aceites sintéticos, ésteres orgánicos inyectables, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes, colorantes, 5 tampones, espesantes, agentes solubilizantes y similares. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la disolución para su constitución antes de su uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes bioactivos, donde se pueden preparar, también están 10 cubiertas por esta descripción, al igual que las formas específicas de hidrato de una sal. Estas sales serán las que sean aceptables en su aplicación a un uso farmacéutico. Con eso se entiende que la sal retendrá la actividad biológica del compuesto original y la sal no tendrá efectos perjudiciales o nocivos en su aplicación y uso en el tratamiento de enfermedades.

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

Se puede emplear cualquier formulación adecuada del agente bioactivo según la presente divulgación, conocida por 20 la persona experta.

En una realización de la presente descripción, el Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, se formula en una microesfera biodegradable, tal como un liposoma.

## 25 **Administración**

Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un mamífero, preferiblemente un ser humano, una cantidad eficaz de un agente bioactivo según la presente divulgación, donde dicho agente bioactivo en 30 una realización de la presente divulgación puede ser Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma.

La administración de agentes bioactivos o composiciones farmacéuticas a un individuo que lo necesite puede ocurrir a través de tres vías principales de suministro: 1) Tópica (aplicado a las superficies del cuerpo, como la piel o las membranas mucosas), 2) Enteral (a través del tracto gastrointestinal o digestivo) y 3) Parenteral (vías distintas al tracto gastrointestinal o digestivo). 35

La administración por vía tópica incluye epicutánea (aplicación sobre la piel), inhalación, enema, gotas para los ojos (en la conjuntiva), gotas para los oídos, administración por vía intranasal y por vía vaginal.

La administración enteral es cualquier forma de administración que involucre cualquier parte del tracto gastrointestinal e incluye administración por vía oral (por ejemplo, comprimidos, cápsulas o gotas), administración intrarrectal (por 40 ejemplo, supositorio o enema), además de por sonda de alimentación gástrica o duodenal.

El suministro parenteral, como por inyección o infusión, es efectivo para administrar el agente bioactivo a un sitio diana o para introducir el medicamento en el torrente sanguíneo e incluye por vía intravenosa (en una vena), intraarterial (en 45 una arteria), intramuscular (en un músculo), intracardíaca (en el corazón), subcutánea (debajo de la piel), intraósea (en la médula ósea), intradérmica, (en la piel misma), intratecal o intraespinal (en el canal espinal), intraperitoneal, (en el peritoneo), transdérmica (difusión a través de la piel intacta), transmucosa (difusión a través de una membrana mucosa, por ejemplo, insuflación (inhalación), supositorios sublinguales, bucales y vaginales), inhalatoria, epidural (en el espacio epidural) e intravítrea (en el ojo). La administración sublingual (debajo de la lengua) también es una forma 50 de administración parenteral, por la cual los agentes bioactivos se difunden en el torrente sanguíneo a través del tejido mucoso debajo de la lengua. El agente bioactivo de la presente divulgación puede administrarse por cualquier vía parenteral de administración y preferiblemente cualquiera de las anteriores.

La administración por vía parenteral tiene la ventaja de evitar la degradación en el tracto gastrointestinal, asociada con 55 la administración por vía enteral.

El parto parenteral tiene la ventaja adicional de abolir el metabolismo de primer paso, asociado con el parto enteral, porque permite que los compuestos se absorban directamente en la circulación sistémica.

60 El metabolismo de primer paso es un fenómeno del metabolismo del fármaco por el cual la concentración de un fármaco se reduce considerablemente antes de que alcance la circulación sistémica. Es la fracción de fármaco perdido durante el proceso de absorción que generalmente está relacionada con el hígado y la pared intestinal.

Después de que un fármaco sea tragado, es absorbido por el sistema digestivo y entra al sistema portal hepático. Se transporta a través de la vena porta hacia el hígado antes de que llegue al resto del cuerpo. El hígado metaboliza muchos fármacos, a veces hasta el punto de que solo una pequeña cantidad de fármaco activo emerge del hígado al resto del sistema circulatorio. Este primer paso a través del hígado reduce así la biodisponibilidad del fármaco.

Los cuatro sistemas principales que afectan el efecto de primer paso de un medicamento son las enzimas de la luz gastrointestinal, las enzimas de la pared intestinal, las enzimas bacterianas y las enzimas hepáticas.

10 Las formas de dosificación apropiadas para dicha administración pueden prepararse mediante técnicas convencionales. Las formas de dosificación apropiadas para la administración por inhalación, tales como una formulación de aerosol o un inhalador de dosis medida, se pueden preparar mediante técnicas convencionales.

En una realización, un modo particular de administración de un agente bioactivo según la presente descripción es mediante administración por vía parenteral.

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

20 En una realización, un modo particular de administración por vía parenteral de un agente bioactivo de la presente descripción es por inhalación.

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

25 La infusión intravenosa según la presente descripción puede ocurrir en una realización durante un período de tiempo de 10 minutos a 20 minutos, tal como 20 a 30 minutos, por ejemplo 30 a 40 minutos, tal como 40 a 50 minutos, por ejemplo 50 a 60 minutos, como 60 a 90 minutos, por ejemplo 90 a 120 minutos, como 2 horas a 3 horas, por ejemplo 3 a 4 horas, como 4 a 5 horas, por ejemplo 5 a 6 horas, como 6 a 7 horas, por ejemplo 7 a 8 horas.

30 En una realización particular, el modo de administración por vía parenteral de un agente bioactivo de la presente descripción es por administración transmucosa. Dicha administración por vía transmucosa es en una realización de la presente descripción administración por vía sublingual, en otro modo de realización de la presente descripción dicha administración por vía transmucosa es una administración por vía bucal, y en otra realización más de la presente descripción, dicha administración por vía transmucosa es una administración por vía intranasal o insuflación.

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

40 La dosis efectiva del ingrediente activo empleado puede variar dependiendo de la composición particular empleada, el modo de administración, la enfermedad a tratar y la gravedad de la enfermedad a tratar. Dicha dosis puede ser comprobada fácilmente por un experto en la materia.

En una realización, el agente bioactivo de la presente descripción se administra a una dosis diaria de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal del animal, administrado como una dosis diaria única o en dosis divididas, o en forma de liberación prolongada. El régimen de dosificación se puede ajustar dentro de este intervalo o incluso fuera de este intervalo para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

En una realización, el agente bioactivo de la presente descripción se administra a una dosis de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10 µg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg por kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 µg por kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 250 µg a aproximadamente 500 µg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 750 µg por kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 1000 µg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal.

Dicha dosis puede administrarse en ciertos intervalos de tiempo, y puede expresarse como mg por kg de peso corporal por unidad de tiempo. Dicha unidad de tiempo puede ser, en una realización de la presente descripción, por minuto, tal como por hora, por ejemplo, por día, tal como por semana.

**Tratamiento combinado**

Es un aspecto adicional de la presente descripción proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colestrosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesteroilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II en combinación con otras modalidades de tratamiento.

Otro aspecto adicional de la presente descripción es proporcionar un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración y/o actividad intracelular de Hsp70 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima, cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor en combinación con otras modalidades de tratamiento.

La presente descripción en un aspecto se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colestrosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesteroilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II en combinación con otras modalidades de tratamiento.

Por lo tanto, en una realización, el agente bioactivo según la presente descripción se administra a un individuo que lo necesite en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento, tal como modalidades de tratamiento convencionales o conocidas para la enfermedad en cuestión.

Se entiende que el agente bioactivo según la presente descripción puede ser Hsp70 o un fragmento funcional o variante de la misma, o un inductor o coinductor de Hsp70.

La administración de más de una modalidad de tratamiento en combinación puede ocurrir simultáneamente o secuencialmente. La administración simultánea puede ser de dos compuestos comprendidos en la misma composición o comprendidos en composiciones separadas, o puede ser una composición y otra modalidad de tratamiento realizada esencialmente al mismo tiempo. La administración secuencial significa que las más de una modalidad de tratamiento se administran en diferentes momentos, como administrar primero una modalidad de tratamiento y luego administrar la segunda modalidad de tratamiento. Una persona experta en la técnica puede determinar el marco de tiempo para administrar más de una modalidad de tratamiento secuencialmente para lograr el efecto óptimo, y en una realización de la presente descripción puede estar entre 30 minutos y 72 horas.

Las modalidades de tratamiento en forma de compuestos químicos pueden administrarse juntas o por separado, cada una en su dosificación más efectiva. La administración de más de un compuesto puede tener un efecto sinérgico, lo que reduce eficazmente la dosis requerida de cada medicamento.

En una realización, el agente bioactivo según la presente descripción se administra a un individuo que lo necesite en combinación con una o más de entre terapia de reemplazo enzimático (ERT), analgésicos, corticosteroides, un trasplante tal como trasplante de médula ósea, trasplante de sangre de cordón umbilical o trasplante de células madre, terapia de reducción de sustrato y/o terapia sintomática y de apoyo como la fisioterapia.

***Hsp70 aumenta la absorción de compuestos***

Los presentes inventores han demostrado además que Hsp70 aumenta la absorción endocítica de otras moléculas (figura 4). Esta mayor absorción puede ocurrir independientemente en Hsp70 debido a un mecanismo pasivo que permite que un compuesto sea absorbido más fácilmente por la célula en presencia de Hsp70, o puede ocurrir de manera dependiente de Hsp70 debido a una asociación directa con Hsp70.

La capacidad de Hsp70 para aumentar la captación celular de compuestos es una ventaja porque permite que Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, se administre a las células para ser absorbida fácilmente por la célula.

Además, la capacidad de Hsp70 para aumentar la captación celular de compuestos es una ventaja en los regímenes de tratamiento de combinación, ya que la presencia de Hsp70 puede aumentar la captación tanto de Hsp70 como del compuesto administrado en combinación con Hsp70.

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

- 5 En la situación en la que el agente bioactivo según la presente divulgación comprende una combinación de Hsp70, o un fragmento funcional o variante de la misma, y un inductor o coinductor de Hsp70, la presencia de Hsp70 puede por lo tanto aumentar la absorción de dicho inductor o coinductor de Hsp70.

**Procedimientos de tratamiento**

10

La presente divulgación se refiere en un aspecto a un procedimiento para tratar a un individuo que lo necesita.

Por lo tanto, es un aspecto de la presente descripción proporcionar un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolisacaridosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II, que comprende la administración del agente bioactivo según la presente descripción a un individuo que lo necesite.

15

20

También es un aspecto de la presente descripción proporcionar un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como cofactor, que comprende la administración del agente bioactivo según la presente descripción a un individuo que lo necesite.

25

Se deduce que, en una realización de la presente descripción, dicho tratamiento puede ser profiláctico, curativo o de mejora. En una realización particular de la presente descripción, dicho tratamiento es profiláctico. En otra realización de la presente divulgación, dicho tratamiento es curativo. En una realización adicional de la presente descripción, dicho tratamiento es de mejora.

30

El agente bioactivo usado según la presente divulgación puede formularse en una realización como una composición farmacéutica.

35

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

40

En una realización, el tratamiento según la presente descripción reduce la acumulación intracelular de una sustancia degradable lisosómicamente a menos del 100 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 90 % de la cantidad acumulada, por ejemplo menos del 80 % de la cantidad acumulada, como menos del 70 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 60 % de la cantidad acumulada, como menos del 50 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 40 % de la cantidad acumulada, como menos del 30 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 20 % de la cantidad acumulada, como menos del 10 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 5 % de la cantidad acumulada.

45

En una realización, el tratamiento según la presente descripción reduce la acumulación intracelular de una sustancia degradable lisosómicamente en al menos un 5 %, tal como al menos un 10 %, por ejemplo al menos un 15 %, tal como al menos un 20 %, por ejemplo al menos un 25 %, como al menos un 30 %, por ejemplo al menos un 35 %, como al menos un 40 %, por ejemplo al menos un 45 %, como al menos un 50 %, por ejemplo al menos un 55 %, como al menos un 60 %, por ejemplo al menos un 65 %, como al menos un 70 %, por ejemplo al menos un 75 %, como al menos un 80 %, por ejemplo al menos un 85 %, como al menos un 90 %, por ejemplo al menos un 95 %, como al menos un 100 %.

50

55

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

En una realización de la presente descripción, dicho tratamiento prolonga la esperanza de vida de dicho individuo que lo necesita.

60

De ello se deduce que la esperanza de vida puede incrementarse en una realización de la presente divulgación entre 6 meses y 1 año, por ejemplo de 1 año a 2 años, por ejemplo de 2 a 3 años, como de 3 a 4 años, por ejemplo de 4 a 5 años, como de 5 a 6 años, por ejemplo de 6 a 7 años, como de 7 a 8 años, por ejemplo de 8 a 9 años, como de 9 a

10 años, por ejemplo de 10 a 12 años, como de 12 a 14 años, por ejemplo de 14 a 16 años, como de 16 a 18 años, por ejemplo de 18 a 20 años, como de 20 a 25 años, por ejemplo de 25 a 30 años, como de 30 a 40 años, por ejemplo de 40 a 50 años, como de 50 a 60 años, por ejemplo de 60 a 70 años, como de 70 a 80 años, por ejemplo de 80 a 90 años, como de 90 a 100 años.

5

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

10

Es un aspecto de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosomal, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosomal surge de un defecto en una enzima cuya actividad no está directamente asociada con la presencia de BMP lisosomal como un cofactor, en el que dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo según la presente divulgación a un individuo que lo necesite.

15

También es un aspecto de la presente descripción proporcionar un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II, donde dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo según la presente divulgación a un individuo que lo necesite.

20

25

En una realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II, donde dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo según la presente divulgación a un individuo que lo necesite, donde dicha esperanza de vida se incrementa entre 6 meses y 1 año, como de 1 año a 2 años, por ejemplo de 2 a 3 años, como de 3 a 4 años, por ejemplo de 4 a 5 años, como de 5 a 6 años, para ejemplo de 6 a 7 años, como de 7 a 8 años, por ejemplo de 8 a 9 años, como de 9 a 10 años, por ejemplo de 10 a 12 años, como de 12 a 14 años, por ejemplo de 14 a 16 años, como de 16 a 18 años, por ejemplo de 18 a 20 años, como de 20 a 25 años, por ejemplo de 25 a 30 años, como de 30 a 40 años, por ejemplo de 40 a 50 años, como de 50 a 60 años, por ejemplo de 60 a 70 años, como de 70 a 80 años, por ejemplo de 80 a 90 años, como de 90 a 100 años.

30

35

40

En una realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades de almacenamiento de glucógeno, gangliosidosis, lipofuscinosis neuronal ceroida, colesterosis cerebrotendinosa, enfermedad de Wolman, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, trastornos del metabolismo de los glucosaminoglucanos, mucopolisacaridosis, trastornos del metabolismo de las glucoproteínas, mucopolipidosis, aspartilglucosaminuria, fucosidosis, manosidosis y sialidosis tipo II, donde dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo según la presente divulgación a un individuo que lo necesite, donde dicha esperanza de vida se incrementa por lo menos 6 meses, como al menos 1 año, como al menos 2 años, por ejemplo 3 años, como al menos 4 años, por ejemplo 5 años, como al menos 6 años, por ejemplo 7 años, como como al menos 8 años, por ejemplo 9 años, como al menos 10 años, por ejemplo 12 años, como al menos 14 años, por ejemplo 16 años, como al menos 18 años, por ejemplo 20 años, como al menos 25 años, por ejemplo 30 años, como al menos 40 años, por ejemplo 50 años, como al menos 60 años, por ejemplo 70 años, como al menos 80 años, por ejemplo 90 años, como al menos 100 años.

45

50

## EJEMPLOS

55

Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forman parte de la invención.

***Ejemplo 1: La interacción entre Hsp70 y fosfato de bis(monoacilglicerol) activa la esfingomielinasa ácida, estabiliza las membranas lisosómicas y promueve la supervivencia celular.***

60

La proteína de choque térmico 70 (Hsp70) es una chaperona molecular evolutivamente altamente conservada que promueve la supervivencia de las células estresadas al inhibir la permeabilización de la membrana lisosómica, un sello

distintivo de la muerte celular inducida por el estrés. Las pistas sobre su mecanismo de acción molecular pueden estar en la translocación recientemente asociada al estrés y al cáncer de una pequeña porción de Hsp70 al compartimento lisosómico. Aquí, mostramos que Hsp70 estabiliza los lisosomas al mejorar la actividad de la esfingomielinasa ácida (ASM), una lipasa lisosómica que hidroliza la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina. En un ambiente ácido, Hsp70 se une con alta afinidad y especificidad a un fosfolípido aniónico endolisosomal fosfato de bis(monoacilglicero) (BMP), un cofactor esencial para ASM, lo que facilita la unión de ASM a BMP y estimula la actividad de ASM. La inhibición de la interacción Hsp70-BMP por los anticuerpos BMP o una mutación puntual (W90A) en Hsp70, así como la inhibición de la actividad ASM por la desipramina revierte eficazmente la estabilización de lisosomas mediada por Hsp70. En particular, la actividad reducida de ASM en células de pacientes con enfermedad de Niemann-Pick A (NPDA), un trastorno grave de almacenamiento lisosómico causado por mutaciones en el gen ASM, también se asocia con una disminución dramática en la estabilidad lisosómica, y este fenotipo puede ser eficazmente corregido restaurando la actividad lisosomal de ASM mediante el tratamiento con Hsp70 recombinante o ASM. Tomados en conjunto, estos datos abren posibilidades interesantes para el tratamiento de los trastornos de almacenamiento lisosómico y el cáncer con compuestos no permeables a las células que ingresan a la luz lisosómica a través de la vía de administración endocítica.

Las proteasas lisosómicas, las catepsinas, son efectores importantes en los programas de muerte celular conservados evolutivamente inducidos por una amplia variedad de estreses. La muerte celular dependiente de catepsina se caracteriza por una permeabilización temprana de la membrana lisosómica y la posterior translocación de catepsinas al citosol, donde pueden iniciar vías de muerte celular dependientes e independientes de caspasa. Para probar si la localización lisosómica es crucial para la capacidad registrada de Hsp70 de estabilizar las membranas lisosómicas y proteger las células contra la muerte celular inducida por el estrés, aprovechamos el mecanismo endocítico de las células para dirigir la Hsp70 recombinante (rHsp70) a los lisosomas. El análisis inmunocitoquímico y bioquímico de las células de osteosarcoma U-2-OS incubadas con rHsp70 marcada con fluorocromo reveló la absorción eficaz de rHsp70, su colocalización específica con marcadores endosómicos y lisosómicos tardíos y la unión a membranas lisosómicas (figura 2a, b y figura 3). Usando una imagen en tiempo real para monitorizar la integridad de la membrana lisosómica (figura 3c), mostramos que la rHsp70 endocitosada protegía a los lisosomas contra la fotooxidación (figura 3d). Además, un ARN de interferencia pequeño (ARNip) específico para Hsp70 sensibilizó los lisosomas a la fotooxidación, y este efecto fue revertido completamente por la rHsp70 endocitosada, lo que demuestra acertadamente que el efecto protector de la Hsp70 endógena está mediado por la pequeña fracción de la proteína en la luz del lisosoma (figura 3e). A pesar de una absorción similar (datos no mostrados), no se observó estabilización lisosómica con Hsc70 y Hsp70-2 recombinantes, que son 86 % y 84 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de Hsp70, respectivamente (figura 3d).

La presencia de Hsp70 en las membranas lisosómicas y su capacidad para sobrevivir en el entorno lisosómico hidrofóbico sugiere que se une a los lípidos de la membrana lisosómica. Por lo tanto, investigamos la interacción de Hsp70 con grandes vesículas unilamelares (LUV) de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) que contienen varios lípidos aniónicos asociados a la membrana, es decir, palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (POPS; principalmente en la membrana plasmática), cardiolipina (principalmente mitocondrial) y BMP (principalmente en endosomas/lisosomas tardíos). Teniendo en cuenta el entorno cada vez más ácido del compartimento endolisosómico tras la maduración a los lisosomas, comparamos las interacciones proteína-lípidos en condiciones neutras (pH 7,4) y ácidas (pH 6,0). A pH 7,4, rHsp70 provocó un pequeño cambio relativo en la dispersión de la luz a 90 ° en los liposomas de POPC, lo que indica una unión muy débil. Como se informó anteriormente para la POPS, todos los lípidos cargados negativamente mejoraron la unión de rHsp70 a los liposomas a pH neutro aproximadamente 4 veces, independientemente de la densidad de carga en la superficie del liposoma (que varía de -1 a -2). Sorprendentemente, la unión a BMP fue casi 20 veces más fuerte a pH ácido en comparación con el pH neutro, mientras que la unión a la POPS solo aumentó ligeramente tras la acidificación. La unión de alta afinidad de Hsp70 a BMP en pH ácido se confirmó en un conjunto independiente de experimentos BIAcore. Es importante destacar que los anticuerpos BMP administrados al compartimento endolisosómico por endocitosis inhibieron efectivamente la capacidad de rHsp70 para estabilizar los lisosomas en las células vivas, y sensibilizaron las células al cisplatino, un medicamento contra el cáncer que induce la fuga lisosómica.

Para investigar qué parte de la proteína Hsp70 es responsable de la unión de BMP, medimos el desplazamiento de fluorescencia de los triptófanos al acoplar rHsp70 y sus mutantes en liposomas que contienen BMP. La pérdida de señal en la intensidad de fluorescencia pico relativa para el mutante Hsp70 que carece de los aminoácidos 119-426 en el dominio ATPasa amino-terminal (rHsp70-ΔATP), pero no para los aminoácidos que carecen de 437-617 en el dominio de unión del péptido carboxi-terminal (rHsp70-ΔPBD), indicó que se requería el dominio ATPasa para la unión de alta afinidad de Hsp70 a BMP (figura 6d). A continuación, sustituimos los dos triptófanos en Hsp70 con fenilalaninas (W90F y W580F) y estudiamos qué triptófano es responsable del cambio de fluorescencia inducido por la unión de lípidos. La reducción de la señal solo con rHsp70-W90F indicó que el terminal NH<sub>2</sub> de la proteína se acopló en la capa de lípidos. Un análisis BIAcore más cuantitativo de la interacción BMP-rHsp70 confirmó que Hsp70 interactuó con BMP principalmente a través de su dominio ATPasa. Sorprendentemente, la mutación W90F abolió específicamente

la interacción entre rHsp70 y BMP a la vez que retuvo los aspectos estructurales (plegamiento según lo analizado por el dicroísmo circular lejano y cercano a los rayos UV) y funcional (plegamiento de luciferasa e hidrólisis de ATP) de la chaperona Hsp70. Por lo tanto, el mutante rHsp70-W90F nos proporcionó una herramienta invaluable para probar aún más si la interacción directa entre Hsp70 y BMP dota a Hsp70 con sus atributos protectores de lisosoma. De hecho, el mutante rHsp70-W90F había perdido por completo su capacidad de proteger las membranas lisosómicas contra la fotooxidación y las células contra la muerte celular lisosómica inducida por cisplatino, mientras que el mutante rHsp70-W580F mostró el mismo efecto protector que la proteína de tipo silvestre. Es importante destacar que las proteínas Hsp70 mutantes fueron endocitosadas esencialmente tan eficazmente como la Hsp70 de tipo silvestre.

Debido a que la concentración de BMP aumenta en las vesículas endocíticas a medida que los endosomas maduran para formar lisosomas, la regulación del pH podría ser la forma en que Hsp70 se dirige a los lisosomas. Los cálculos (PROTPARAM, servidor de proteómica EXPaSy, Instituto Suizo de Bioinformática) revelaron que el dominio ATPasa de Hsp70 tiene 1,72 unidades de pI teórico más alto que el dominio de unión a péptidos (6,62 frente a 4,9). Esta característica sugiere que a pH ácido, el dominio de ATPasa está preferentemente cargado positivamente, lo que podría facilitar su interacción con los lípidos aniónicos. Nuestros datos que demuestran la dependencia de la interacción Hsp70-BMP en el pH ácido y el dominio ATPasa respaldan esta teoría. Además, el modelado molecular de la superficie electrostática del dominio ATPasa de Hsp70 reveló que forma una estructura casi similar a una cuña con una carga predominantemente positiva en el fondo de la cuña que contiene W90, lo que posiblemente explica el profundo impacto de la mutación W90F en la capacidad de Hsp70 para interactuar con BMP y estabilizar los lisosomas.

El BMP se une a ASM con alta afinidad y estimula su capacidad de hidrolizar la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina. El análisis BIAcore reveló que el pretratamiento de los LUV que contienen BMP con rHsp70 a concentraciones subequimolares facilitó la unión posterior de ASM, mientras que las concentraciones más altas de rHsp70 mostraron un efecto inhibitorio. Sorprendentemente, los fibroblastos embrionarios murinos transgénicos Hsp70 (Hsp70-MEF), que están protegidos contra el daño lisosómico inducido por el estrés, mostraron una actividad de ASM significativamente mayor que los MEF de tipo silvestre (WT-MEF) y el tratamiento de WT-MEF con rHsp70 con una concentración de citoprotector (300 nM) aumentó la actividad de ASM a un nivel comparable al de Hsp70-MEFs. Para probar si ASM es responsable del efecto estabilizador de los lisosomas, tratamos las células con desipramina, un inhibidor farmacológico de ASM bien caracterizado. La desipramina redujo la viabilidad de los MEF de una manera dependiente de la dosis y la muerte celular se asoció con una permeabilización masiva de lisosomas, como lo demuestra la filtración de catepsinas lisosómicas en el citosol. En particular, la muerte celular inducida por desipramina y la fuga lisosómica se redujeron significativamente en Hsp70-MEF en comparación con WT-MEF. Además, la inhibición de ASM con una concentración subtóxica de desipramina revierte la resistencia al estrés lisosómico de Hsp70-MEF al nivel de WT-MEF como se evidencia por la pérdida acelerada de la integridad de la membrana lisosómica tras la fotooxidación (figura 7e). La función protectora del lisosoma de ASM fue respaldada por datos que muestran que los lisosomas en fibroblastos de pacientes con NPDA, un trastorno mortal de almacenamiento lisosómico causado por mutaciones en el gen ASM, mostraron una sensibilidad extrema al daño inducido por la fotooxidación. Sorprendentemente, rHsp70 también fue capaz de mejorar la actividad enzimática de la ASM mutada endógena, así como la rASM cargada simultáneamente en las células del paciente. El aumento de la actividad de ASM obtenida al cargar los lisosomas con rHsp70, rASM o la combinación de ambos se correlacionó con su capacidad para estabilizar los lisosomas y normalizar el volumen del compartimento lisosómico dramáticamente ampliado en las células NPDA (figura 8b-d). Cabe señalar que similar a rHsp70, también se localizó rASM en los lisosomas.

Tomados en conjunto, nuestros datos indican que en la enfermedad de Niemann-Pick, una interacción Hsp70-BMP estabiliza los lisosomas mediante un mecanismo que implica la regulación del metabolismo de la esfingomielina en lugar de la estabilización física directa de la membrana. Tal efecto indirecto está respaldado por el hecho de que BMP se localiza exclusivamente en las membranas internas del compartimento endolisosómico, donde su función principal es apoyar la desintegración y extracción de lípidos de las vesículas lipídicas mediante ASM y proteínas activadoras de esfingolípidos. Curiosamente, el aumento mediado por la ASM en la concentración de ceramida lisosómica modifica la conformación estérica de las membranas lisosómicas y, por lo tanto, facilita su fusión con otras vesículas intracelulares y la membrana plasmática. Por lo tanto, los cambios en la composición y el volumen de la membrana lisosómica como resultado de la capacidad de fusión mejorada inducida por ceramida pueden contribuir al aumento mediado por Hsp70 en la estabilidad lisosómica. Por otro lado, varios estímulos apoptóticos inducen la translocación de la ASM a la valva externa de la membrana plasmática, donde la ceramida puede formar microdominios lipídicos que funcionan como sitios para la activación de moléculas de señalización asociadas a la membrana involucradas en la señalización apoptótica. Por lo tanto, la ceramida puede tener efectos opuestos sobre la supervivencia celular dependiendo de si se produce dentro del lisosoma o en la membrana plasmática.

El mecanismo molecular descrito anteriormente que subyace al efecto citoprotector de Hsp70 abre nuevas posibilidades para la sensibilización de las células cancerosas a los agentes que inducen vías de muerte celular lisosómica a través de la inhibición específica de la función estabilizadora del lisosoma de Hsp70. Viceversa, la capacidad de la rHsp70 administrada exógenamente sola o en combinación con rASM puede cuestionarse

directamente como un tratamiento novedoso para pacientes con NPD, cuyas opciones terapéuticas se limitan actualmente a las terapias de genes y células madre.

### **Resumen de procedimientos**

5 WT- y Hsp70-MEFs fueron generados, immortalizados y mantenidos como se describe en la técnica. Los fibroblastos humanos NPDA (83/24) se originan a partir de una biopsia de piel de un paciente de 5 meses con hepatoesplenomegalia. Las proteínas recombinantes se generaron usando el sistema de vector pET-16b y la purificación de afinidad Ni<sup>2+</sup> (Novagen), y se marcaron con Alexa Fluor 488 según el protocolo del fabricante (Molecular Probes). Para analizar la integridad lisosómica, desarrollamos un procedimiento de obtención de imágenes en tiempo real de células teñidas con naranja de acridina, una base débil metacromática que se acumula en el compartimento ácido de las células y las tiñe de rojo y las sensibiliza a la fotooxidación. La pérdida inducida por la fotooxidación del gradiente de pH lisosómico y la fuga de naranja de acridina al citosol de los lisosomas individuales se cuantificó visualmente como «pérdida de puntos rojos» en las células U2-O-S y como una disminución en la fluorescencia roja y un aumento en la verde por Zeiss LSM DUO Software en fibroblastos. Las actividades de catepsina total y citoplasmática (extraída con digitonina) se midieron en muestras tratadas con digitonina mediante la sonda zFR-AFC (Enzyme System Products) como se describe en la técnica. Los espectros de fluorescencia de triptófano y la dispersión de la luz del liposoma a 90 ° se analizaron en un tampón HEPES (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH como se indica) esencialmente como se describe en la técnica. Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron con LUV inmovilizados usando un sistema BIAcore 2000 como se describe en la técnica. ARNip de Hsp70 (5'-GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3') y un ARNip de Hsp70 control se transfecaron con oligofectamina (Invitrogen). La inmunodetección se realizó con protocolos estándar. La muerte celular similar a la apoptosis y la permeabilización de la membrana lisosómica se analizaron esencialmente como se describe en la técnica. La actividad de ASM se analizó mediante el kit de ensayo Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (A12220) de sondas moleculares con modificaciones descritas en la técnica. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T de Student de dos colas y pares, y todos los grupos de datos se probaron para la comparabilidad de sus variaciones utilizando una prueba F.

### **Procedimientos**

30 *Cultivo celular y reactivos.* Se cultivaron células de osteosarcoma humano U-2-OS en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero de ternera inactivado por calor al 6 % y penicilina-estreptomycin. Se generaron y mantuvieron Hsp70 transgénicos y MEF de control apropiados como se describe en la técnica. Los fibroblastos NPDA primarios humanos se cultivaron en medios MEF suplementados con 1 % de Na-Piruvato, 1 % de HEPES, 1 % de L-Glutamina. 35 Todas las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de aire humidificado con 5 % de CO<sub>2</sub> y se analizaron repetidamente y fueron halladas negativas para micoplasma. A menos que se indique lo contrario, todos los productos químicos se compraron a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Denmark A/S).

Ensayos de *integridad lisosómica.* Las células subconfluentes incubadas con 2 µg/ml de naranja de acridina durante 40 15 minutos a 37 °C se lavaron, irradiaron y analizaron en disolución salina equilibrada de Hanks complementada con suero de ternera fetal al 3 %. Las células para la obtención de imágenes de una sola célula se seleccionaron de 8 áreas predefinidas de cada pocillo en modo de luz transmitida, después de lo cual las mismas células se visualizaron inmediatamente y se expusieron a la luz azul del quemador de arco de mercurio USH102 100W (Ushio electric) instalado en una carcasa U-ULS100HG (Olympus) durante 20 seg. La microscopía de fluorescencia se realizó en un 45 microscopio invertido Olympus IX-70 con un objetivo LCPlanF1 x20 con NA=0,40. La pérdida del gradiente de pH lisosómico se cuantificó contando la pérdida de tinción roja intensa. Se desarrolló un procedimiento más elaborado para analizar la integridad lisosómica para manejar el compartimento lisosómico más grande de los diversos fibroblastos utilizados en este estudio. Las células para la obtención de imágenes de células individuales se seleccionaron de 8 áreas predefinidas de cada pocillo en modo de luz transmitida, después de lo cual las mismas 50 células se expusieron inmediata y continuamente a la luz de 489 nm de un láser de diodo de 100 mW, mientras que las micrografías de escaneo láser se capturaron cada 330 ms en un sistema confocal Zeiss LSM LIVE DUO en dos canales definidos por filtros de paso de banda para luz de 495-555 nm (verde) y LP650 nm (rojo). Las películas de cámara rápida resultantes fueron analizadas posteriormente por el software integrado Zeiss LSM DUO. Las actividades de catepsina total y citoplasmática (extraída con digitonina) se midieron en muestras tratadas con digitonina mediante 55 la sonda zFR-AFC (Enzyme System Products) como se describe en la técnica.

Ensayos de *viabilidad celular.* La densidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)-2,5-difeniltetrasodio (MTT, SIGMA-Aldrich) esencialmente como se describe en la técnica. La muerte celular similar a la apoptosis se evaluó tiñendo las células con Hoechst 33342 (Sondas Moleculares) 0,05 µg/ml y 60 contando las células con núcleos condensados en un Microscopio fluorescente Olympus IX-70 invertido (filtro U-MWU 330-385 nm). Para cada experimento se contaron un mínimo de ocho áreas elegidas al azar.

*Inmunodetección y microscopía.* Los anticuerpos primarios utilizados incluyeron anticuerpos monoclonales de ratón contra Hsp70 (2H9; amablemente proporcionado por Boris Margulis, Academia Rusa de Ciencias, San Petersburgo, Rusia), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; Biogenesis), BMP (6C4), proteína-1 de membrana integral lisosómica (H5C6; developed by J. Thomas August and James E.K. Hildreth and obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, USA). Las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10 % y transferidas a una membrana de nitrocelulosa se detectaron usando anticuerpos primarios indicados, anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa apropiados de Dako, reactivos de transferencia Western ECL (Amersham) y lector de imágenes luminiscentes (LAS-1000Plus, Fujifilm). Para la inmunocitoquímica se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor®-576 o Alexa Fluor®-488. Lysotracker Red® se utilizó para la visualización in vivo del compartimento lisosómico. Se tomaron imágenes de fluorescencia usando un microscopio de exploración láser Zeiss Axiovert 100M. La cuantificación de Lysotracker y las películas de cámara rápida para la integridad lisosómica se realizaron en un sistema Zeiss LSM LIVE DUO.

15 *Espectros de fluorescencia de triptófano y liposoma con dispersión de luz de 90 °.* Los espectros de fluorescencia de triptófano (RFI) y la dispersión de la luz del liposoma a 90° (RSI) se analizaron en un tampón HEPES (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 o 6,0 como se indica) empleando LUV que consisten en lípidos indicados esencialmente como se describe en la técnica. Para el RFI, se agregaron LUV en alícuotas de 10 µM y se registraron espectros después de un período de estabilización de 20 minutos. Para el RSI, se agregaron proteínas recombinantes en alícuotas de 0,12 nmol.

*Resonancia de plasmón superficial (BIAcore).* Para la preparación de LUV, una mezcla de lípidos que consiste en 10 mol% de esfingomielina, 50 mol% de fosfatidilcolina, 20 mol% de colesterol y 20 mol% de BMP disuelto en solventes orgánicos, se secó bajo una corriente de argón y se rehidrató en tampón Tris/HCl (pH 7,4). La mezcla se congeló y descongeló nueve veces en nitrógeno líquido y luego en una incubadora a 37 °C. Después del baño de ultrasonido durante 15 minutos, la mezcla se pasó 21 veces a través de una membrana de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm. Las mediciones de resonancia de plasmón superficial se realizaron utilizando un sistema BIAcore 2000 a 25 °C. Los LUV (concentración total de lípidos 0,1 mM) se inmovilizaron en la superficie de un chip sensor L1 (BIAcore) en PBS (tampón de carga). El tampón utilizado fue tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 4,5). Como control, se inyectó esfingomielinasa ácida (0,2 µM, 60 µl en tampón en funcionamiento) directamente sobre la superficie del liposoma. Se obtuvieron unidades de respuesta entre 4100 RU - 5250 RU. La proteína de interés se inyectó en tampón en funcionamiento a una velocidad de flujo de 20 µl/min a las concentraciones indicadas. Después de la inyección, se añadió una fase de disociación de 10 minutos. En el caso en que rASM siguió a rHsp70, se añadió rASM durante 180 segundos después de la fase de disociación de rHsp70 de 10 minutos seguida de una fase de disociación de 10 minutos.

*Modelado molecular.* El análisis de la estructura primaria, así como el modelado molecular, se realizaron con el software disponible del servidor de proteómica Expert System Analysis System (EXPaSy) del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://expasy.org/>). El modelado molecular se realizó sobre la base de la estructura cristalina del dominio humano Hsp70-ATPasa (código pdb: 1S3X) y el dominio de unión al sustrato Hsc70 humano (código pdb: 7HSC) con DeepView-Swiss PDB Viewer. Los modelos de superficie se basaron en la interacción de coulomb a pH 7.0 usando una constante dieléctrica solvente de 80 (H<sub>2</sub>O).

*Análisis estadístico.* El análisis estadístico se realizó mediante una prueba T de Student de dos colas y pares para evaluar la hipótesis nula. El nivel de corte para la significación estadística se estableció en 5 % y todos los grupos de datos evaluaron la comparabilidad de sus variaciones utilizando una prueba F. Todas las estadísticas se realizaron con un mínimo de n=3 experimentos independientes.

## Ejemplo 2 - Estudio piloto de NPC1 *in vivo*

### Objetivos

Determinar los efectos *in vivo* del tratamiento con HSP70 sobre las siguientes medidas de la patología NPC

- Resultados físicos (peso corporal, peso de órganos y supervivencia)
- Cambios de comportamiento en temblor, marcha y al erguirse sobre las patas.
- Cambios bioquímicos en los lípidos de almacenamiento (colesterol, GSL y esfingosina)
- Análisis inmunohistoquímico de la patología cerebelosa (grado de pérdida de células de Purkinje)

### Experimentos

#### Régimen de tratamiento

Ocho NPC<sup>-/-</sup> tratados (rHSP70) frente a ocho NPC<sup>-/-</sup> control (solo PBS). Los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal tres veces por semana con 10 mg/kg de rHSP70 o vehículo solo (PBS) a partir de las 3 semanas de edad. Se sacrificaron tres ratones control y tres tratados a las 7 o 9 semanas de edad (es decir, después de 4 o 6 5 semanas de tratamiento, respectivamente). Los órganos fueron perfundidos (PBS), pesados y congelados para análisis bioquímicos e inmunohistoquímicos.

### **Análisis de comportamiento**

10 Los experimentos de comportamiento se realizaron a partir de las 3 semanas de edad, como se describió anteriormente. Brevemente, el análisis de temblor se realizó utilizando un monitor de temblor automatizado (instrumental de San Diego). El análisis de la marcha se realizó pintando las patas delanteras y traseras con pintura no tóxica y permitiendo a los ratones caminar sobre el papel Whatman 3M. La colocación de la pata se midió para determinar qué tan cerca se superponían sus patas traseras, la longitud de la zancada y el ancho de su paso.

15 El análisis de erguirse sobre las patas se realizó solo a las 9 y 10 semanas de edad. Brevemente, los animales pueden aclimatarse en una caja de campo abierto. Después de 5', se realizan recuentos de la actividad de los ratones, incluida la cantidad de veces que el animal se pone a dos patas en el centro de la caja sin soporte, o en los bordes de la caja utilizando las paredes como soporte.

20

### **Análisis bioquímico**

Los órganos se homogeneizaron sin ningún tampón añadido y se congelaron como alícuotas de 10 ul. Alícuotas frescas se reconstituyeron a 100 ul con PBS antes del análisis bioquímico. La determinación de proteínas para cada 25 alícuota se realizó mediante el ensayo de proteínas BCA. Los ensayos de colesterol se realizaron usando el kit Amplex Red Cholesterol Assay de Invitrogen<sup>1</sup>. La esfingosina se aisló por extracción de base esfingóide y se analizó por HPLC<sup>1</sup>. Los GSL se extrajeron y analizaron por HPLC<sup>1</sup> fluorescente. Todos los resultados fueron estandarizados para el contenido de proteínas.

### **Immunohistoquímica**

Los cerebros perfundidos se incrustaron en OCT y se congelaron rápidamente en isopentano sobre hielo seco. Los cerebros se seccionaron en portaobjetos recubiertos con gelatina y se almacenaron a -80 C antes de la tinción de anticuerpos.

35

### **Resultados**

#### **Curvas de crecimiento (consultar la figura 12)**

40 Los animales control (panel superior) parecen tener curvas de crecimiento menos profundas que los animales tratados, que se elevan más constantemente y alcanzan pesos más altos.

#### **Pesos de órganos**

45 No se registraron diferencias en el peso de los órganos.

#### **Supervivencia**

Debido al pequeño número de animales que quedan después de los puntos de tiempo de 7 y 9 semanas, no pudimos sacar ninguna conclusión sobre el aumento de la supervivencia. La grabación en vídeo de los ratones a las 9 y 10 50 semanas mostró que los animales tratados con HSP70 eran más grandes, con una mejor condición del pelaje. Además, eran más activos y había aumentado el temblor, que parecía empeorar con el movimiento voluntario.

En el momento del sacrificio, los ratones tratados parecían haberse deteriorado bastante en unos pocos días.

55

La causa puede deberse inadvertidamente a la rápida pérdida de peso, ya que las dosis del medicamento hechas unos días antes se estaban convirtiendo en sobredosis a medida que los ratones se volvían más pequeños, lo que podría amplificar los efectos tóxicos.

#### **Resultados de comportamiento (consultar la figura 13)**

Los ratones tratados con HSP70 mostraron un temblor aumentado a partir de las 3 semanas de tratamiento y

permanecieron incrementados hasta el final del estadio. Este temblor fue particularmente pronunciado en el intervalo de frecuencia más bajo y fue claramente visible a simple vista.

El análisis de la marcha no mostró diferencias en ninguna de las tres variables medidas (frente: colocación de la pata trasera, longitud de zancada o ancho de la marcha).

El análisis de erguirse sobre las patas no mostró diferencias después de 6 semanas de tratamiento. Sobre la base de observar a los ratones, a las 9 semanas tomamos la decisión de contar por separado las veces que erguirse sobre las patas se completaron con éxito y las que no se completaron. Esto mostró una clara diferencia entre los dos grupos, ya que solo los ratones de control no pudieron erguirse sobre las patas. Esto sugiere que los ratones tratados tienen una mejor coordinación, aunque el tamaño de la muestra en este punto era bajo (n = 5 tratados, n = 4 control).

#### **Bioquímica - Colesterol (consultar la figura 14)**

A las 7 semanas (figura 14A), los ratones tratados con HSP70 muestran disminuciones significativas en el tejido periférico en comparación con el control (n = 3 ratones en cada grupo, realizados por duplicado, \* = p <0,05, \*\* = p <0,01, \*\*\* = p <0,001).

El colesterol cerebral muestra disminución, aunque la disminución solo se produjo en una repetición del experimento, otras dos mostraron que las animas tratadas tenían exactamente los mismos niveles que el control (n = 3 ratones en cada grupo, por triplicado)

A las 9 semanas (figura 14B) no hay diferencia entre los dos grupos (n = 3 ratones en cada grupo, por triplicado)

Cabe señalar que si bien hemos tratado de controlar las diferencias dentro de los kits analizando el control y el tratamiento de cada muestra de tejido, los niveles de colesterol total entre los puntos de tiempo podrían no ser directamente comparables.

#### **Bioquímica - GSL (consultar la figura 15)**

A las 7 semanas, el hígado muestra una reducción significativa de GSL en ratones tratados con HSP70 (p <0.05, \*) (figura 15A). También hay reducciones en el bazo y el cerebro, pero no son estadísticamente significativas (probablemente debido al bajo número de n).

A las 9 semanas (figura 15B), no hay diferencias significativas entre los tejidos de los animales tratados y no tratados.

A las 9 semanas, los niveles totales de GSL en el cerebro caen significativamente (p <0,05) en ratones tratados y no tratados. Este fenómeno es consistente con las mediciones de GSL del cerebro NPC1 de estudios previos, y posiblemente sea el resultado de la muerte celular neuronal. Curiosamente, parece que mientras los ratones de control experimentan una reducción de cinco veces del total de GSL, la reducción exhibida por los ratones tratados parece menos severa.

#### **Bioquímica - Esfingosina (consultar la figura 16)**

El análisis de esfingosina aún no se ha completado para todos los órganos. Los datos de cerebros de 7 y 9 semanas muestran que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los animales tratados y de control de 7 semanas. Mientras que el período de tiempo de 9 semanas muestra una disminución general en ambos grupos, los animales tratados retienen niveles leves, pero estadísticamente significativos (p <0.005, \*\*) de esfingosina en el cerebro.

#### **Conclusiones**

##### **Curvas de crecimiento**

Indican un aumento general en la salud de los ratones, especialmente en las etapas iniciales.

##### **Datos de comportamiento**

El aumento del temblor es un indicador interesante de un efecto que puede originarse en el SNC (el miglustat muestra un efecto similar, aunque menos extremo, a dosis altas en pacientes).

##### **Bioquímica**

El tratamiento con HSP70 da como resultado una reducción del almacenamiento periférico de colesterol en comparación con los ratones control a las 7 semanas, aunque el cerebro todavía está en disputa, ya que solo una de las tres repeticiones mostró una reducción. Sin embargo, a las 9 semanas, los niveles de colesterol son iguales en los 5 grupos tratados y de control. Esto puede deberse a cualquiera de varios factores. En primer lugar, los ratones pueden estar desarrollando anticuerpos contra la proteína, lo que inhibe sus efectos y provoca que el efecto inicial del fármaco desaparezca. En segundo lugar, la dosis alta puede estar causando efectos tóxicos crónicos, lo que afecta al metabolismo del colesterol y la salud general de los ratones.

- 10 La disminución del colesterol en los animales tratados a las 7 semanas está respaldada por una disminución concurrente en el almacenamiento de GSL. Los GSL periféricos en los animales tratados durante 9 semanas no han cambiado significativamente. Los GSL se redujeron en el cerebro de ratones tratados con HSP70 de 7 semanas de edad, pero el resultado no fue estadísticamente significativo. Un mayor número de animales ayudará a aclarar este punto. En el punto de tiempo de 9 semanas, los niveles de GSL totales han disminuido significativamente en ambos 15 grupos. Esto se ajusta a los datos históricos que muestran una caída marcada y estadísticamente significativa en la etapa final de la patología NPC1, posiblemente debido a la muerte celular. Se observó que la caída de GSL parecía menos severa en el cerebro tratado, pero no está claro si esto es estadísticamente significativo.

Esto está respaldado por los datos de esfingosina, que nuevamente siguen las tendencias históricas de reducción de 20 7 a 9 semanas de edad (probablemente debido a la muerte celular), el pequeño pero estadísticamente significativo aumento en el grupo tratado puede reflejar una mejor supervivencia celular. Este tema será más claro de interpretar una vez que los números de células cerebelosas de Purkinje se midan por inmunocitoquímica para dar una idea de la tasa de atrofia/pérdida neuronal en los animales tratados.

## 25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Orphazyme ApS

<120> Procedimientos para aumentar la actividad intracelular de Hsp70

30

<130> P2494PC00

<140> N/A

<141> 2011-11-22

35

<150> PA 2010 70520

<151> 2010-11-30

<160> 4

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 641

45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 753 169 T3

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser  
 1 5 10 15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp  
 20 25 30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu  
 35 40 45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln  
 50 55 60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp  
 65 70 75 80

Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn  
 85 90 95

Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys  
 100 105 110

Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys  
 115 120 125

Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile  
 130 135 140

Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp  
 145 150 155 160

ES 2 753 169 T3

Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro  
165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu  
180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser  
195 200 205

Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly  
210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His  
225 230 235 240

Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn  
245 250 255

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg  
260 265 270

Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe  
275 280 285

Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu  
290 295 300

Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala  
305 310 315 320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu  
325 330 335

Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp  
340 345 350

Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala  
355 360 365

Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys  
370 375 380

Ser Glu Asn Val Gln Asp Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Pro Leu Ser  
385 390 395 400

Leu Gly Leu Glu Thr Ala Gly Gly Val Met Thr Ala Leu Ile Lys Arg

ES 2 753 169 T3

405 410 415  
 Asn Ser Thr Ile Pro Thr Lys Gln Thr Gln Ile Phe Thr Thr Tyr Ser  
 420 425 430  
 Asp Asn Gln Pro Gly Val Leu Ile Gln Val Tyr Glu Gly Glu Arg Ala  
 435 440 445  
 Met Thr Lys Asp Asn Asn Leu Leu Gly Arg Phe Glu Leu Ser Gly Ile  
 450 455 460  
 Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln Ile Glu Val Thr Phe Asp Ile  
 465 470 475 480  
 Asp Ala Asn Gly Ile Leu Asn Val Thr Ala Thr Asp Lys Ser Thr Gly  
 485 490 495  
 Lys Ala Asn Lys Ile Thr Ile Thr Asn Asp Lys Gly Arg Leu Ser Lys  
 500 505 510  
 Glu Glu Ile Glu Arg Met Val Gln Glu Ala Glu Lys Tyr Lys Ala Glu  
 515 520 525  
 Asp Glu Val Gln Arg Glu Arg Val Ser Ala Lys Asn Ala Leu Glu Ser  
 530 535 540  
 Tyr Ala Phe Asn Met Lys Ser Ala Val Glu Asp Glu Gly Leu Lys Gly  
 545 550 555 560  
 Lys Ile Ser Glu Ala Asp Lys Lys Lys Val Leu Asp Lys Cys Gln Glu  
 565 570 575  
 Val Ile Ser Trp Leu Asp Ala Asn Thr Leu Ala Glu Lys Asp Glu Phe  
 580 585 590  
 Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser  
 595 600 605  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala  
 610 615 620  
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val  
 625 630 635 640  
 Asp

<210> 2  
 <211> 2445  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 753 169 T3

<400> 2

ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt	60
ccaactacctt ttctgagagt gactcccgtt gtcccaaggc ttcccagagc gaacctgtgc	120
ggctgcaggc accggcgcgt cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgagg	180
atccagtggt ccgtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcagggaaacc	240
ggcatggcca aagccgcggc gatcggcatc gacctgggca ccacctactc ctgctgaggg	300
gtgttccaac acggcaaggt ggagatcatc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc	360
agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgcggccaa gaaccaggtg	420
gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagttcggc	480
gacccggtgg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac	540
aagcccaag tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccc cgaggagatc	600
tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgcggagg cgtacctggg ctaccgggtg	660
accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca ggccaccaag	720
gatgccccgt tgatcgcggg gctcaacgtg ctgccgatca tcaacgagcc cacggcccgc	780
gccatcgcct acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac	840
ctgggcgggg gcaccttca cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat cttcgaggtg	900
aagcccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac	960
cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc	1020
gtgagggcgc tgcgcaccgc ctgagagagg gccaaagga ccctgtcgtc cagcaccag	1080
gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcacgact tctacacgtc catcaccagg	1140
gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag	1200
gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc	1260
tccacccgca tccccaaagt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg	1320
aacaagagca tcaacccccg cgaggctgtg gcctacgggg cggcgggtgca ggcggccatc	1380
ctgatggggg acaagtccga gaacgtgcag gacctgctgc tgctggacgt ggctcccctg	1440
tcgctggggc tggagacggc cggagcgtg atgactgccc tgatcaagcg caactccacc	1500
atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg	1560
atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc	1620
gagctgagcg gcatccctcc ggccccagc ggcgtgcccc agatcgaggt gaccttcgac	1680
atcgatgcca acggcatcct gaacgtcacg gccacggaca agagcaccgg caaggccaac	1740

ES 2 753 169 T3

```

aagatcacca tcaccaacga caagggccgc ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg      1800
caggaggcgg agaagtacaa agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggt gtcagccaag      1860
aacgccctgg agtcctacgc cttcaacatg aagagcgcgc tggaggatga ggggctcaag      1920
ggcaagatca gcgaggcgga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg      1980
tggttgacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagttt agcacaagag gaaggagctg      2040
gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg tcccgggcct      2100
gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga ggtctgggt caggcccccac cattgaggag      2160
gtagattagg ggcctttcca agattgctgt ttttgtttt gagcttcaag actttgcatt      2220
tcctagtatt tctgtttgc agttctcaat ttcctgtgtt tgcaatggtg aaatTTTTTg      2280
gtgaagtact gaacttgctt tttttccggt ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc      2340
atcttacgac tatttcttct ttttaataca cttaactcag gccatTTTTT aagttggtta      2400
cttcaaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaa      2445

```

<210> 3

<211> 641

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ala Lys Ala Ala Ala Ile Gly Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser
 1                5                10      15

Cys Val Gly Val Phe Gln His Gly Lys Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp
      20                25                30

Gln Gly Asn Arg Thr Thr Pro Ser Tyr Val Ala Phe Thr Asp Thr Glu
      35                40                45

Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala Lys Asn Gln Val Ala Leu Asn Pro Gln
      50                55                60

Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys Arg Leu Ile Gly Arg Lys Phe Gly Asp
      65                70                75                80

Pro Val Val Gln Ser Asp Met Lys His Trp Pro Phe Gln Val Ile Asn
      85                90                95

Asp Gly Asp Lys Pro Lys Val Gln Val Ser Tyr Lys Gly Glu Thr Lys
      100                105                110

Ala Phe Tyr Pro Glu Glu Ile Ser Ser Met Val Leu Thr Lys Met Lys
      115                120                125

```

ES 2 753 169 T3

Glu Ile Ala Glu Ala Tyr Leu Gly Tyr Pro Val Thr Asn Ala Val Ile  
 130 135 140

Thr Val Pro Ala Tyr Phe Asn Asp Ser Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp  
 145 150 155 160

Ala Gly Val Ile Ala Gly Leu Asn Val Leu Arg Ile Ile Asn Glu Pro  
 165 170 175

Thr Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Asp Arg Thr Gly Lys Gly Glu  
 180 185 190

Arg Asn Val Leu Ile Phe Asp Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser  
 195 200 205

Ile Leu Thr Ile Asp Asp Gly Ile Phe Glu Val Lys Ala Thr Ala Gly  
 210 215 220

Asp Thr His Leu Gly Gly Glu Asp Phe Asp Asn Arg Leu Val Asn His  
 225 230 235 240

Phe Val Glu Glu Phe Lys Arg Lys His Lys Lys Asp Ile Ser Gln Asn  
 245 250 255

Lys Arg Ala Val Arg Arg Leu Arg Thr Ala Cys Glu Arg Ala Lys Arg  
 260 265 270

Thr Leu Ser Ser Ser Thr Gln Ala Ser Leu Glu Ile Asp Ser Leu Phe  
 275 280 285

Glu Gly Ile Asp Phe Tyr Thr Ser Ile Thr Arg Ala Arg Phe Glu Glu  
 290 295 300

Leu Cys Ser Asp Leu Phe Arg Ser Thr Leu Glu Pro Val Glu Lys Ala  
 305 310 315 320

Leu Arg Asp Ala Lys Leu Asp Lys Ala Gln Ile His Asp Leu Val Leu  
 325 330 335

Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile Pro Lys Val Gln Lys Leu Leu Gln Asp  
 340 345 350

Phe Phe Asn Gly Arg Asp Leu Asn Lys Ser Ile Asn Pro Asp Glu Ala  
 355 360 365

Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val Gln Ala Ala Ile Leu Met Gly Asp Lys



ES 2 753 169 T3

Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val  
 625 630 635 640

Asp

<210> 4  
 <211> 2551  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

```

ggaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg agggctccgct tcgtctttcg agagtgactc      60
ccgcggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggtcg caggcaccgg cgtgttgagt      120
ttccggcggt ccgaaggact gagctcttgt cgggatccc gtcggcgtt tccagcccc      180
agtctcagag cggagccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc      240
atcgacctgg gcaccaccta ctctgctg ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc      300
atcgccaacg accagggcaa cgcaccacc cccagctacg tggccttcac ggacaccgag      360
cggctcatcg gggatgoggc caagaaccag gtggcgctga acccgagaa caccgtgttt      420
gacgcgaagc ggctgatcgg ccgcaagttc ggcgaccggc tggcgcagtc ggacatgaag      480
cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag      540
ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca tggcgtgac caagatgaag      600
gagatgccc aggcgtacct gggctacccg gtgaccaacg cggatgatcac cgtgccggcc      660
tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgagg gtgtgatcgc ggggtcaac      720
gtgctgcgga tcatcaacga gccacggcc gccgcatcg cctacggcct ggacagaacg      780
ggcaaggggg agcgcgaacgt gctcatcttt gacctggggc ggggcacctt cgacgtgtcc      840
atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg      900
ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg tggaggagt caagagaaaa      960
cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgcgcac cgcctgcgag     1020
agggccaaga ggaccctgtc gtccagcacc caggccagcc tgagatcga ctccctgttt     1080
gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggc tcgaggagct gtgctccgac     1140
ctgttccgaa gcaccctgga gccctgggag aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaag     1200
gccagattc acgacctggt cctggcggg ggctccacc gcatcccaa ggtgcagaag     1260
ctgctgcagg acttctcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcatcaacc cgacgaggct     1320
gtggcctacg gggcggcggc gcaggcggcc atcctgatgg ggacaagtc cgagaacgtg     1380
caggacctgc tgctgctgga cgtggctccc ctgtcgtg ggctggagac ggccggaggc     1440
gtgatgactg ccctgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc     1500
    
```

ES 2 753 169 T3

accacctact cgcacaacca acccggggtg ctgatccagg tgtacgaggg cgagagggcc 1560  
 atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggccccc 1620  
 aggggcgtgc cccagatcga ggtgaccttc gacatcgatg ccaacggcat cctgaacgtc 1680  
 acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcaccaa cgacaagggc 1740  
 cgcctgagca aggaggagat cgagcgcgat gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag 1800  
 gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgccc tggagtccca cgccttcaac 1860  
 atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggcaaga tcagcagggc ggacaagaag 1920  
 aaggttctgg acaagtgtca agaggtcatc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag 1980  
 aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaacct catcatcagc 2040  
 ggactgtacc aggtgcccgg tggccccggg cctggcggct tcggggctca gggccccaaag 2100  
 ggaggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtggatt aggggccttt gttctttagt 2160  
 atgtttgtct ttgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgctgctggt ttcctatgtc 2220  
 atttctgctt cagctctttg ctgcttcact tctttgtaa gttgtaacct gatgtaatt 2280  
 agctggcttc attatTTTTg tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgcatttaa 2340  
 tgttgatact gtaaggtgt ttcgttccct ttaaataaat caaactgcc accttctgta 2400  
 cgagtttggt tgtttttttt tttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc 2460  
 tgggaatgta tgtttttata atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt 2520  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2551

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración intracelular de Hsp70, donde dicho agente bioactivo es un derivado de la hidroxilamina capaz de amplificar la expresión del gen Hsp70; para uso en el tratamiento de la lipofuscinosis neuronal cerioidea (NCL).  
5
2. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 1, donde dicho agente bioactivo se selecciona de entre el grupo que consiste en arimoclomol, BRX-220, BRX-345, iroxanadina, bimoclomol, BRLP-42 y BGP-15.
- 10 3. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 1, donde dicho agente bioactivo es arimoclomol.
4. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 1, donde dicho agente bioactivo es iroxanadina.
5. El agente bioactivo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho agente  
15 bioactivo debe administrarse en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento.
6. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 5, donde dicha al menos otra modalidad de tratamiento se selecciona de entre el grupo que consiste en terapia de reemplazo enzimático (ERT), terapia de reducción de sustrato, analgésicos, corticosteroides; un trasplante tal como el trasplante de médula ósea, el trasplante de sangre del cordón umbilical y el trasplante de células madre; y terapia sintomática y de apoyo, como la fisioterapia.  
20
7. El agente bioactivo para usar según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha lipofuscinosis neuronal cerioidea se selecciona de entre el grupo que consiste en la enfermedad de Batten (enfermedad de Spielmeyer-Vogt), la enfermedad de Bielschowsky-Jansky, la enfermedad de Kufs y la enfermedad de Santavuori-Haltia.  
25
8. Uso de un agente bioactivo capaz de aumentar la concentración intracelular de Hsp70, donde dicho agente bioactivo es un derivado de la hidroxilamina capaz de amplificar la expresión del gen Hsp70 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la lipofuscinosis neuronal cerioidea (NCL).  
30



Figura 2

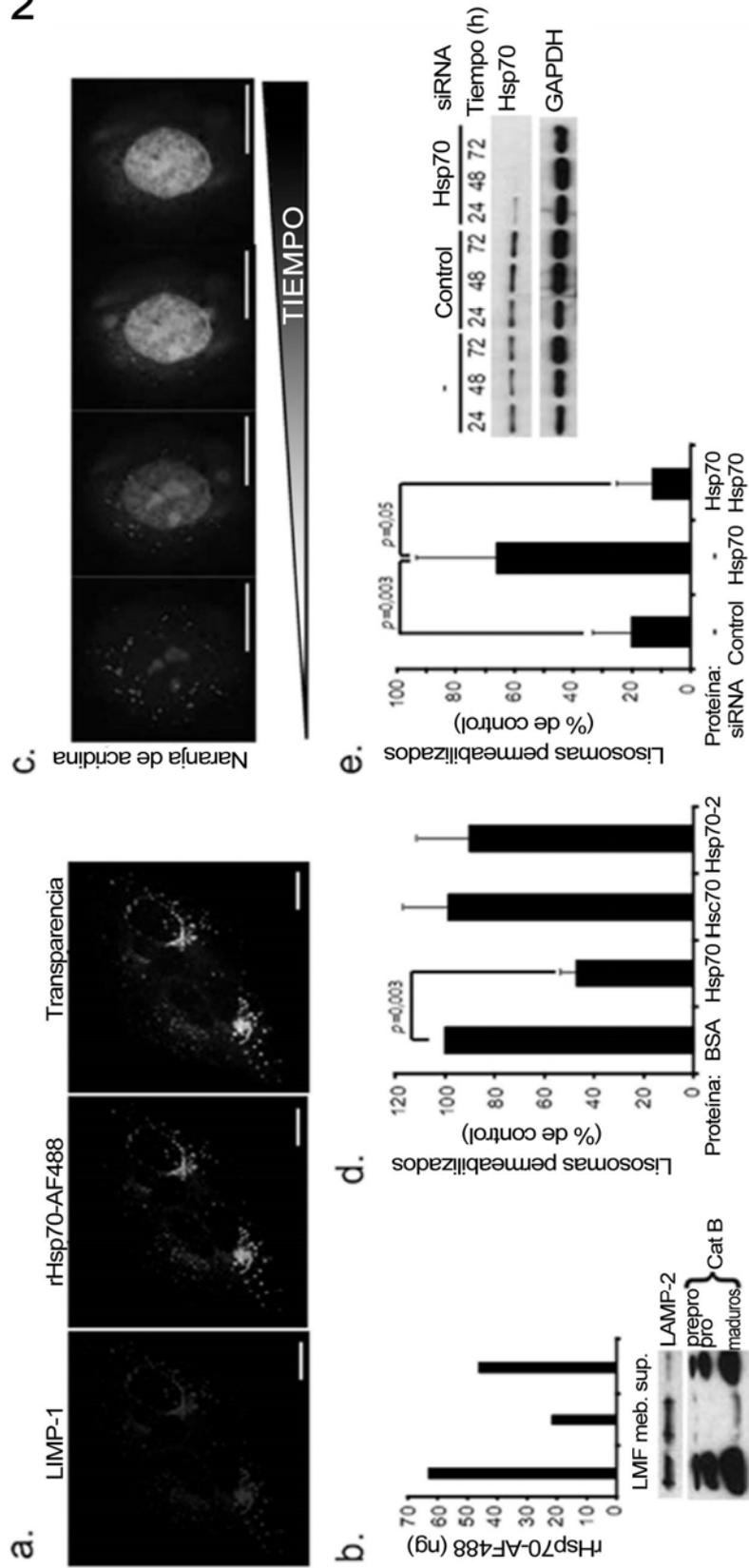


Figura 3

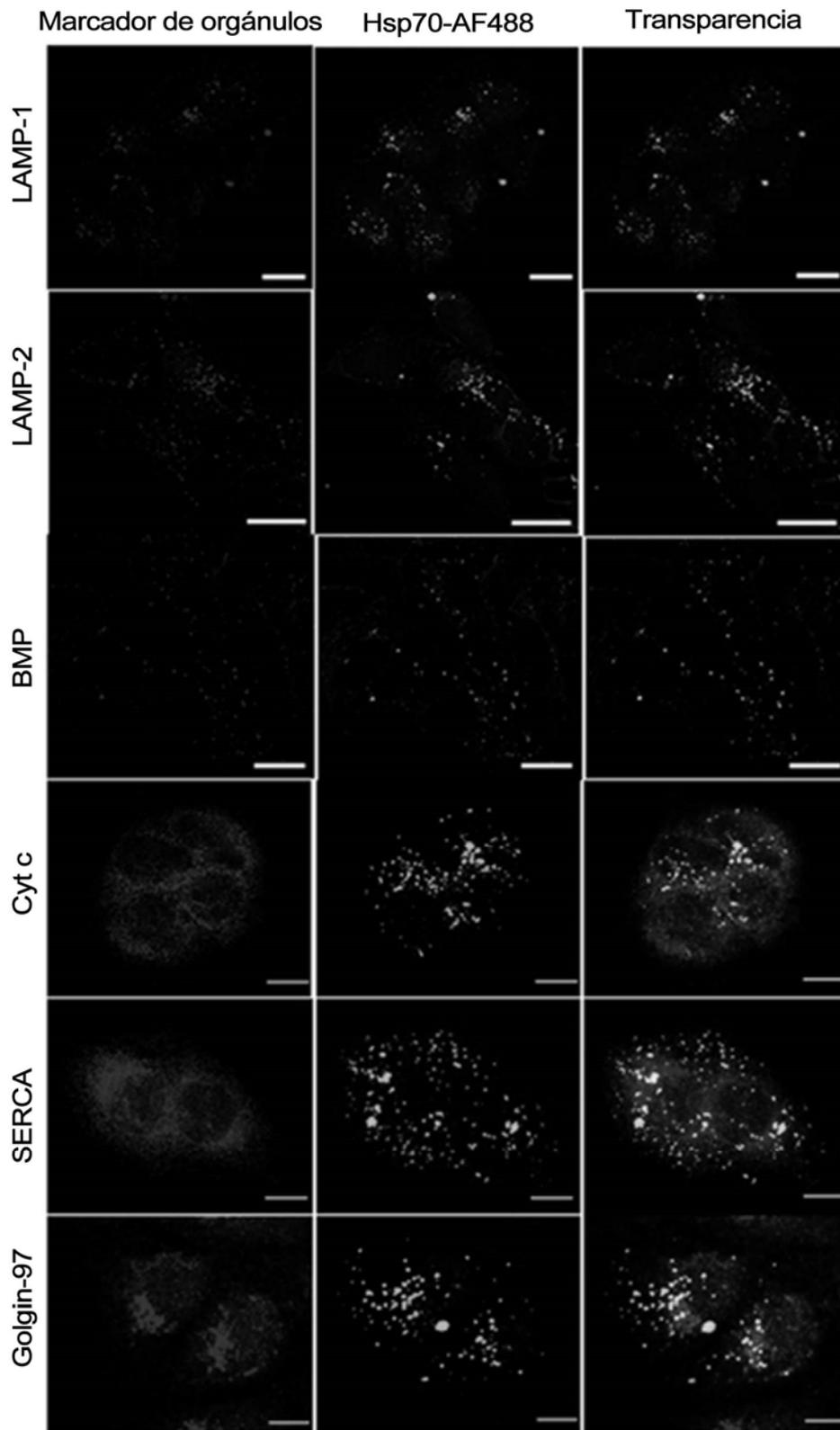


Figura 4

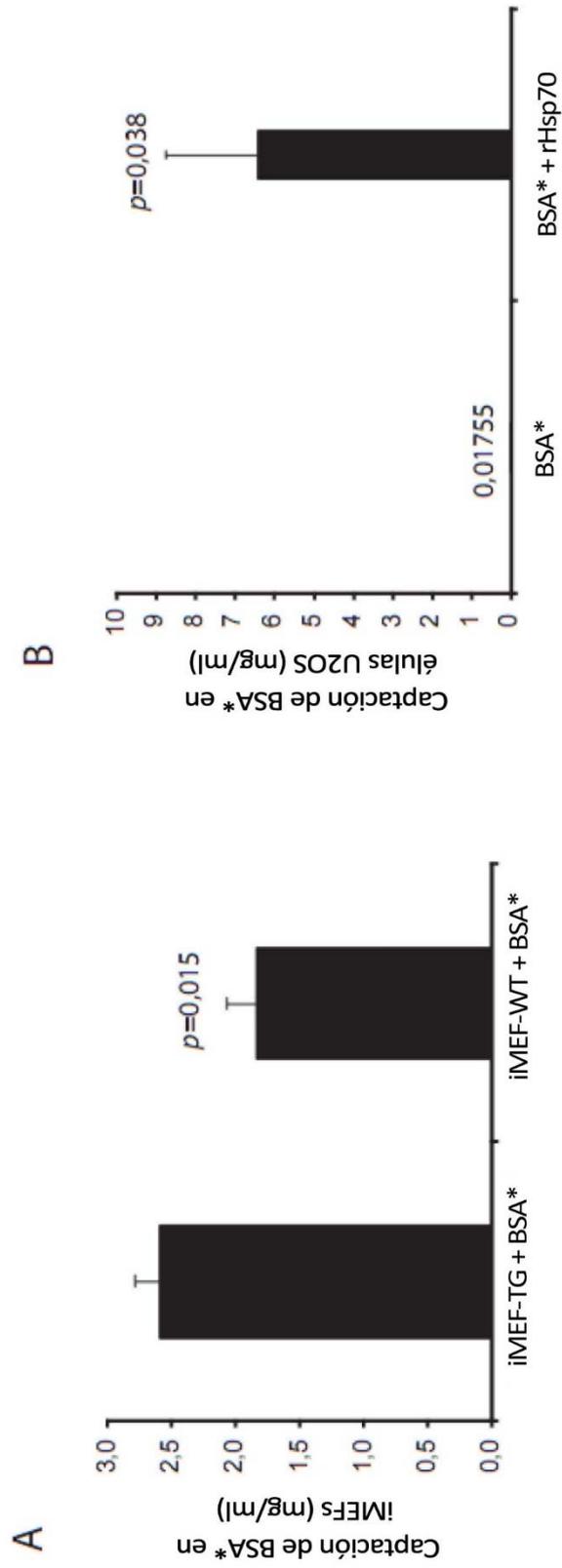


Figura 5

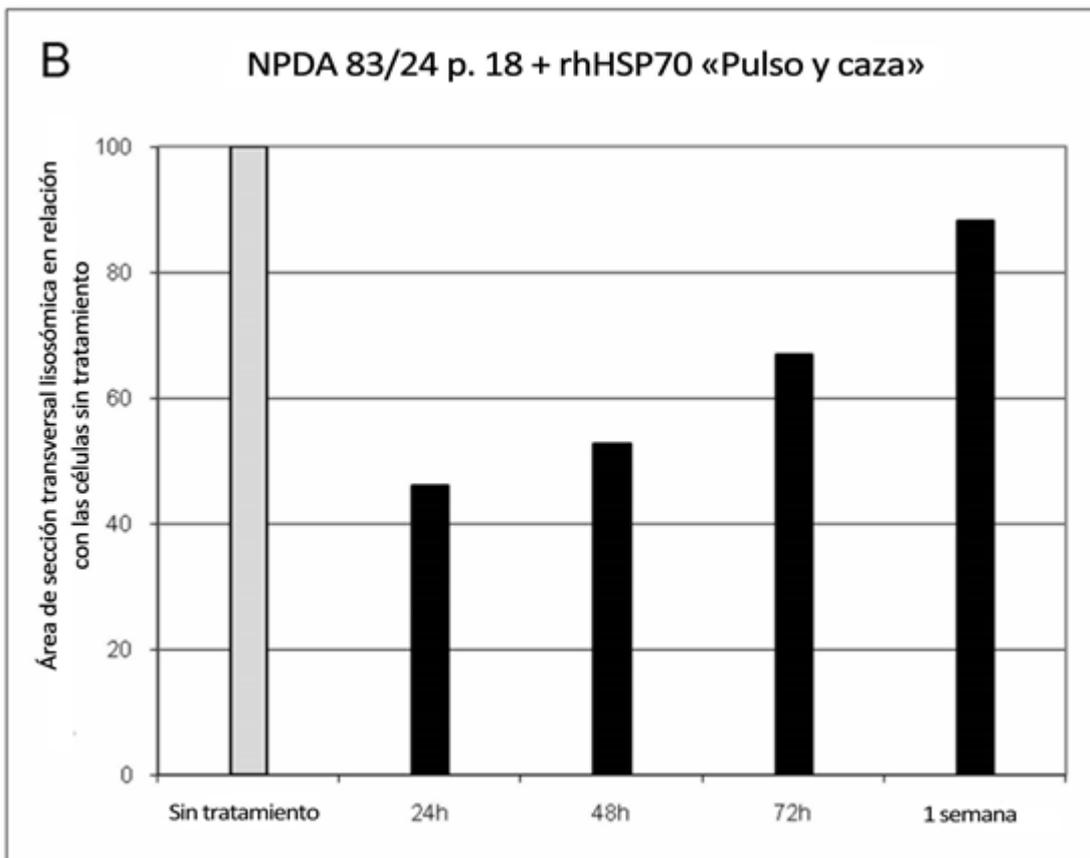
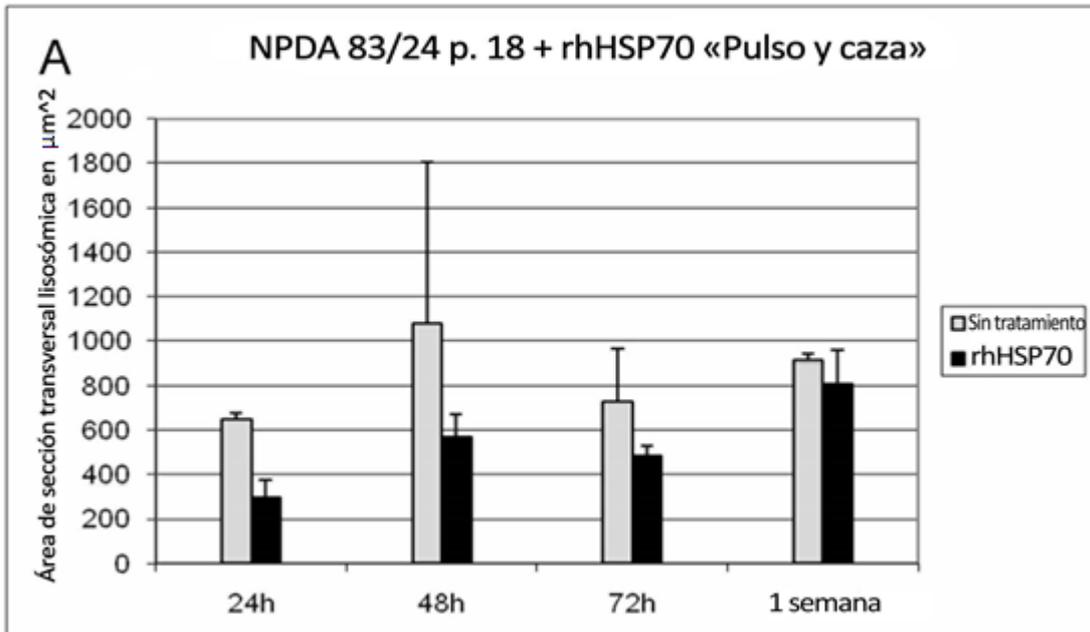


Figura 6

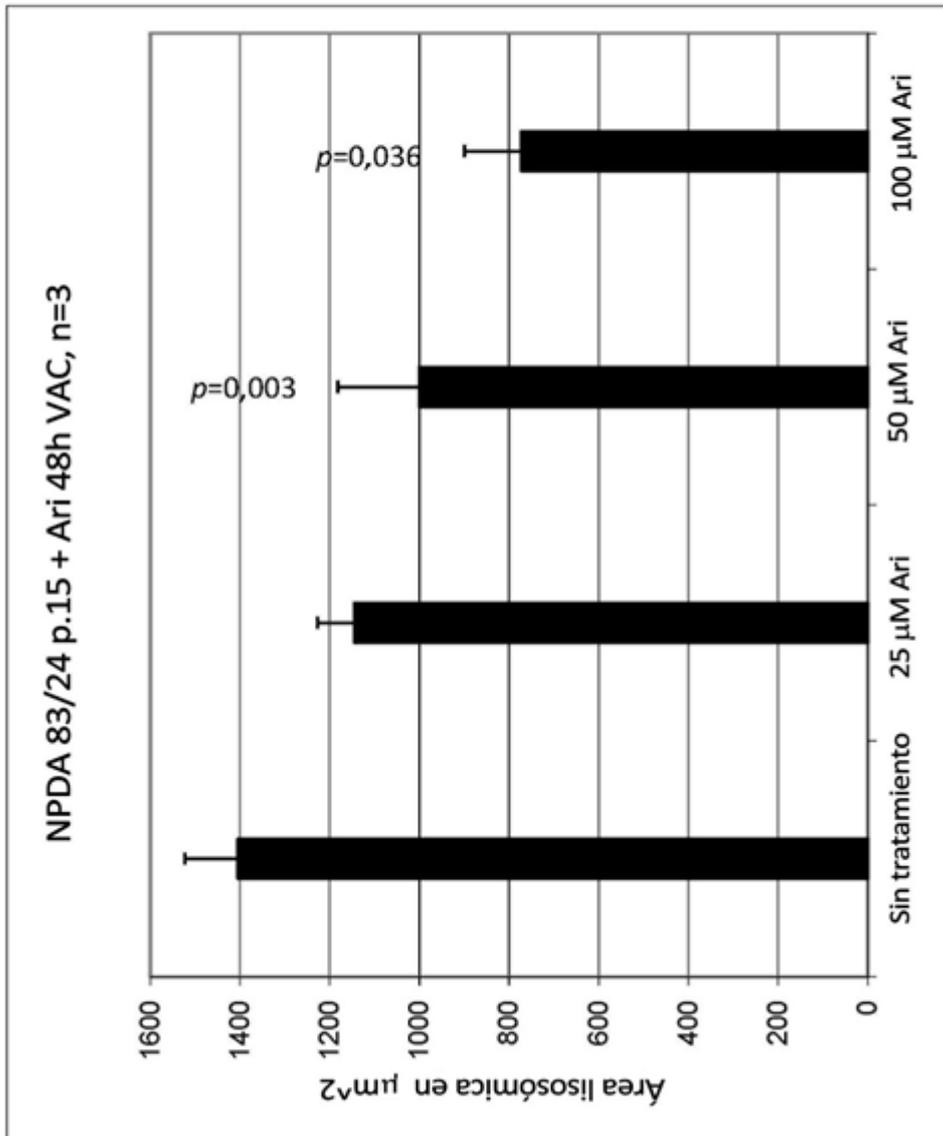


Figura 7

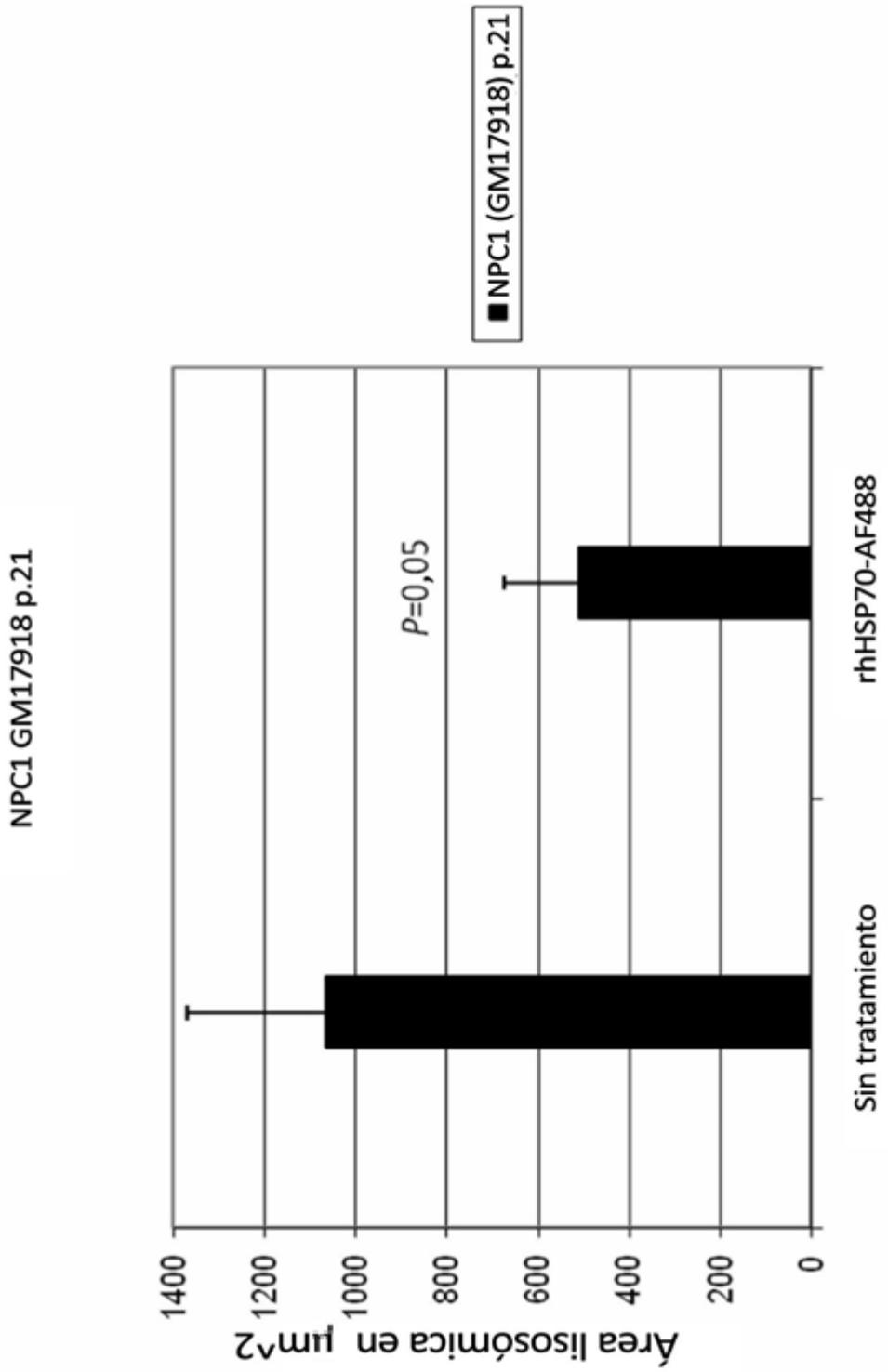


Figura 8

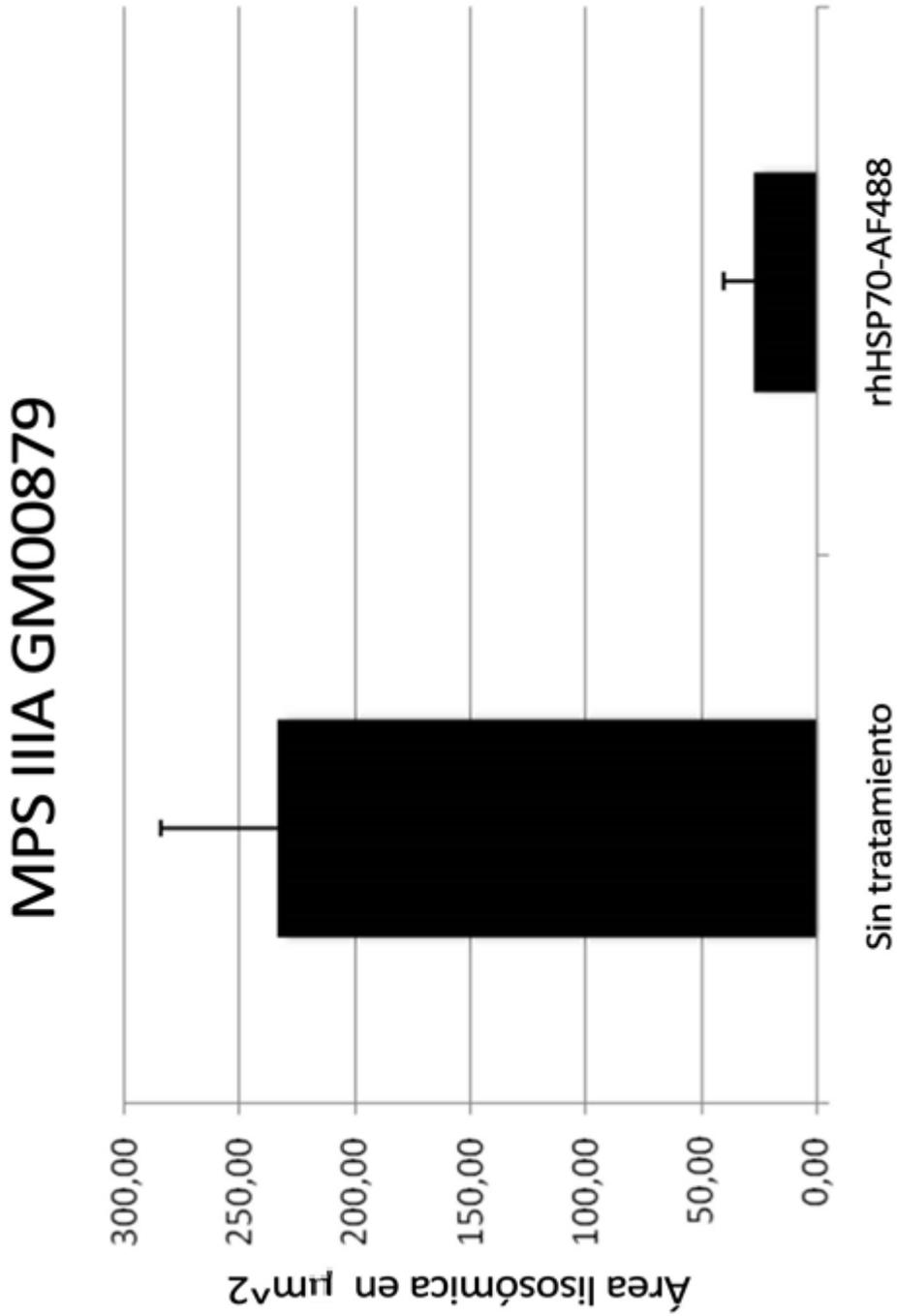


Figura 9

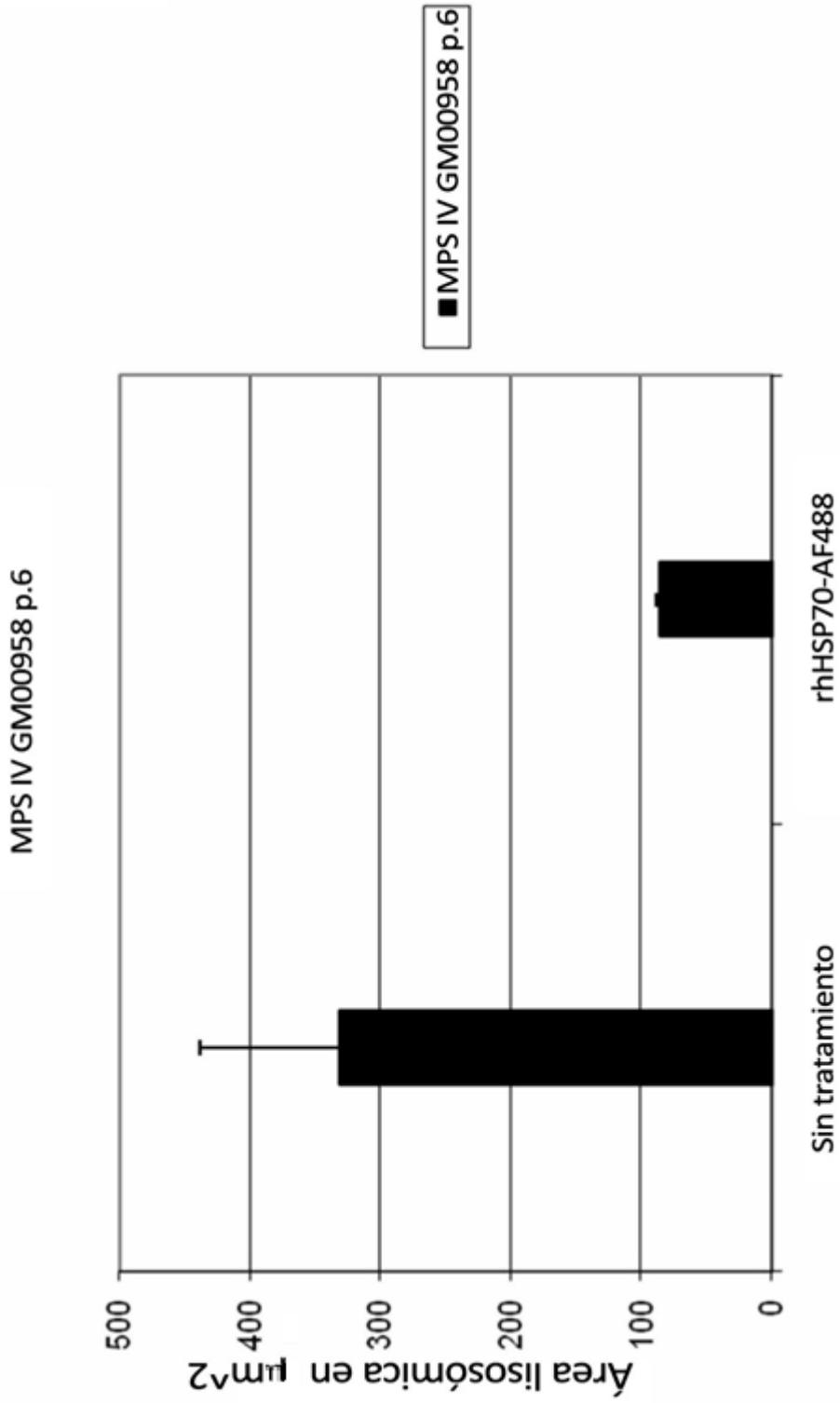


Figura 10

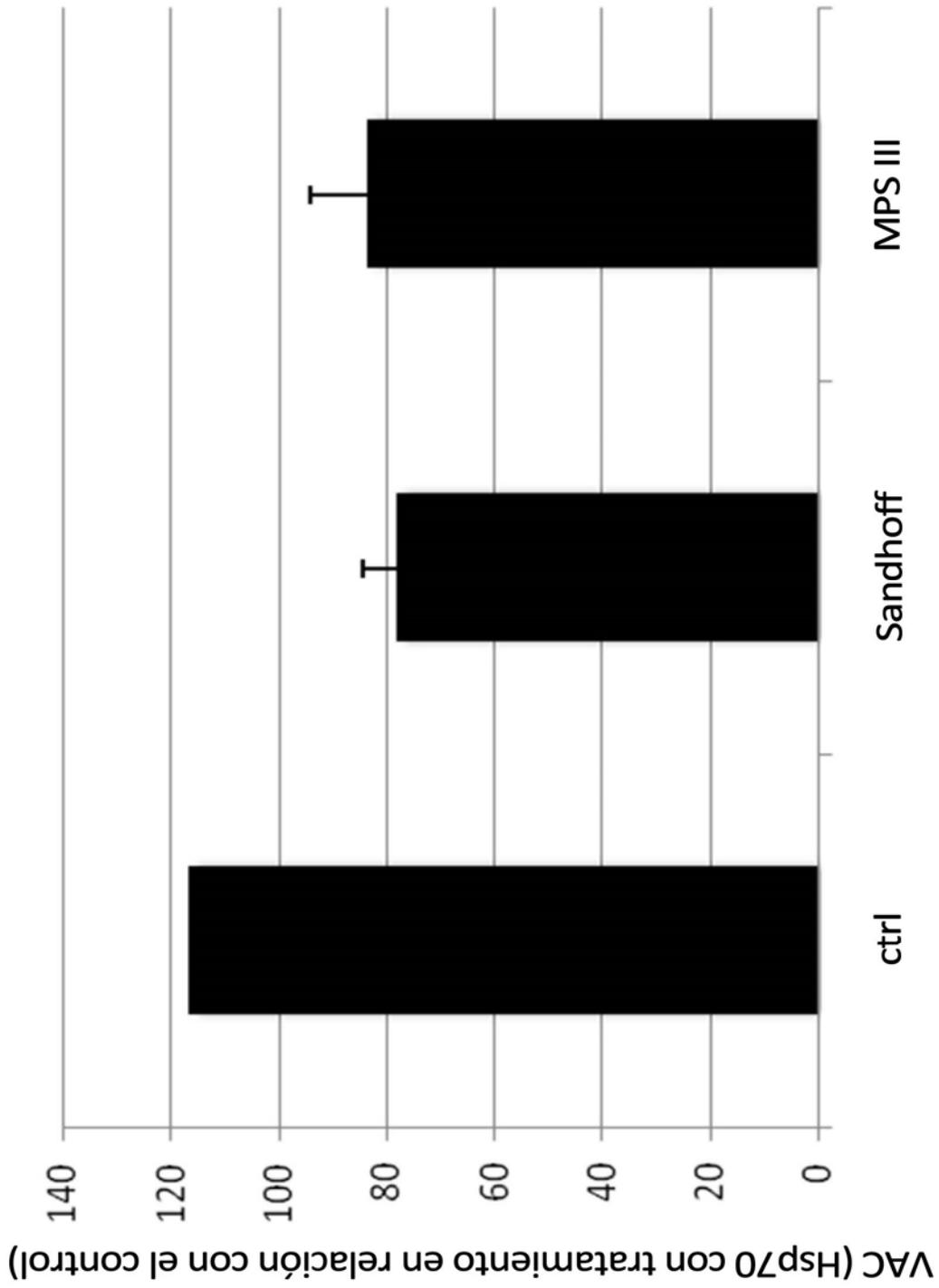


Figura 11

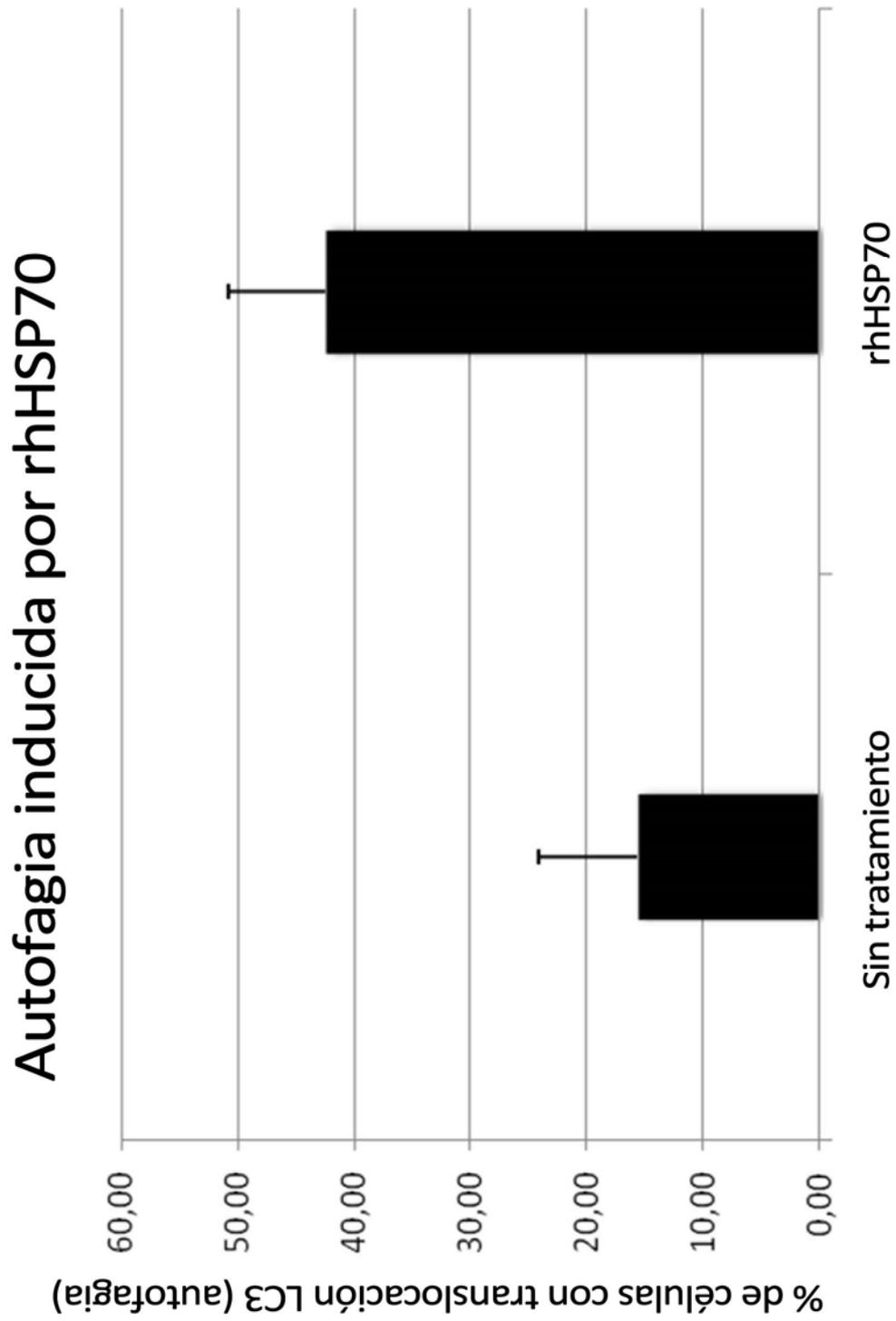


Figura 12

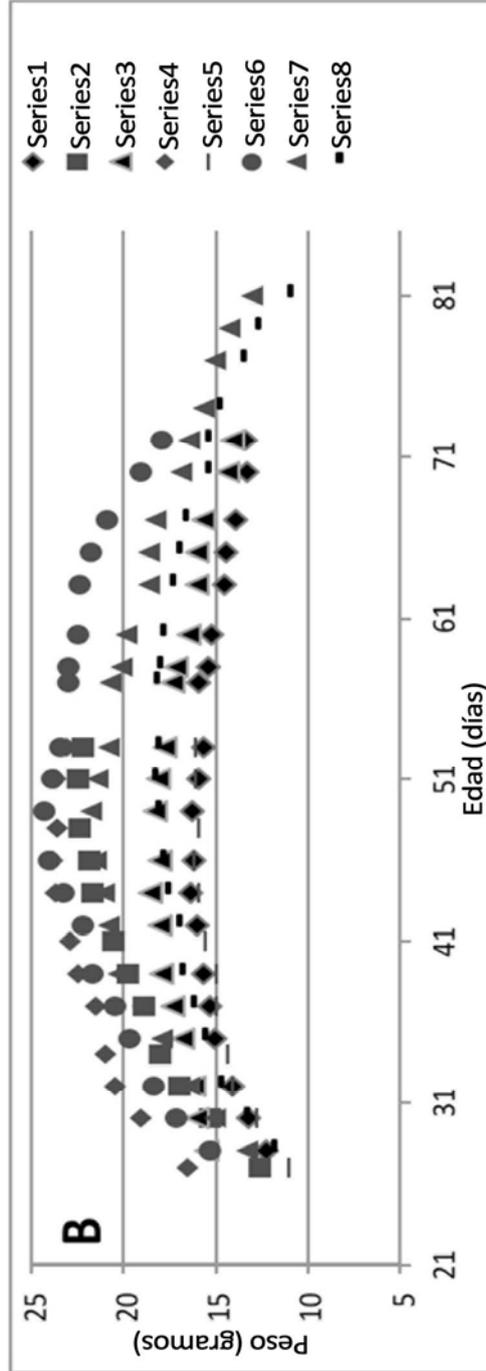
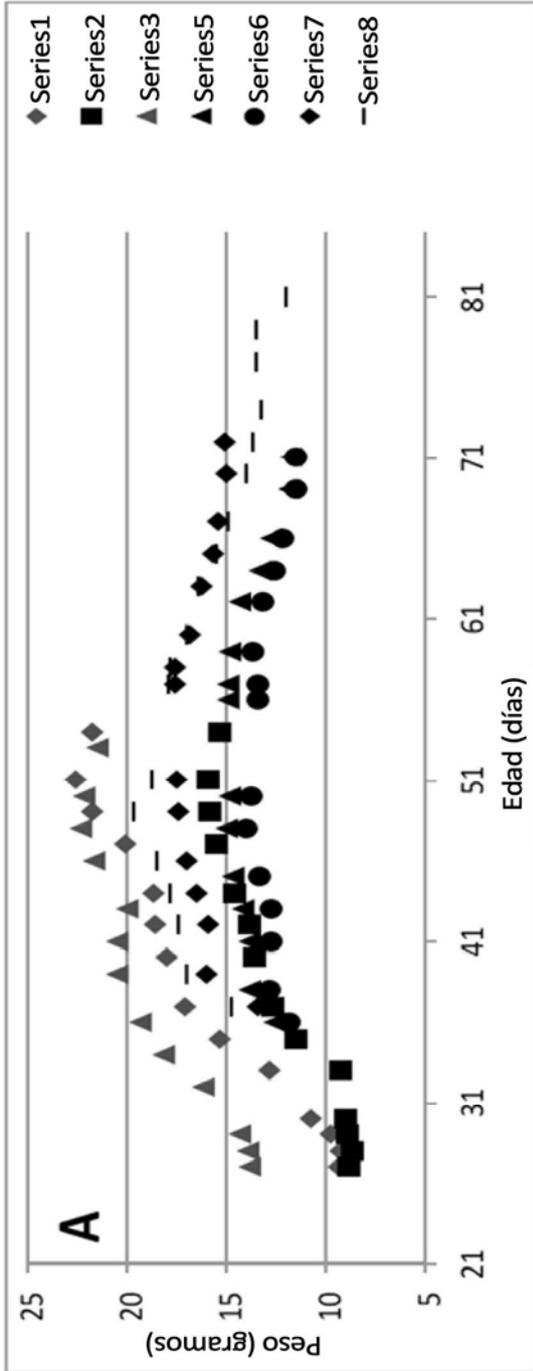


Figura 13

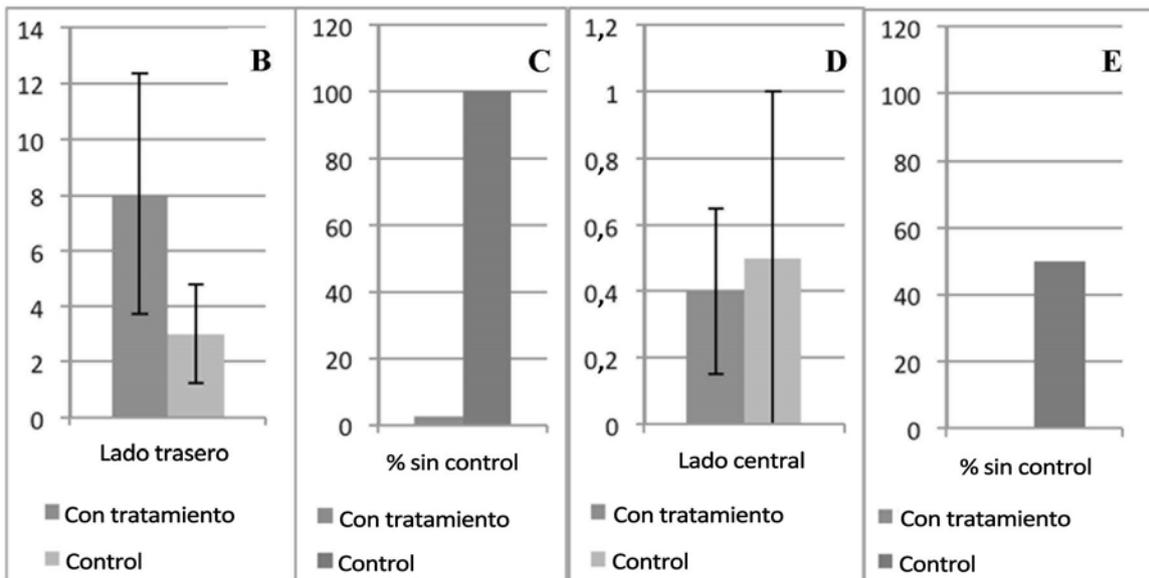
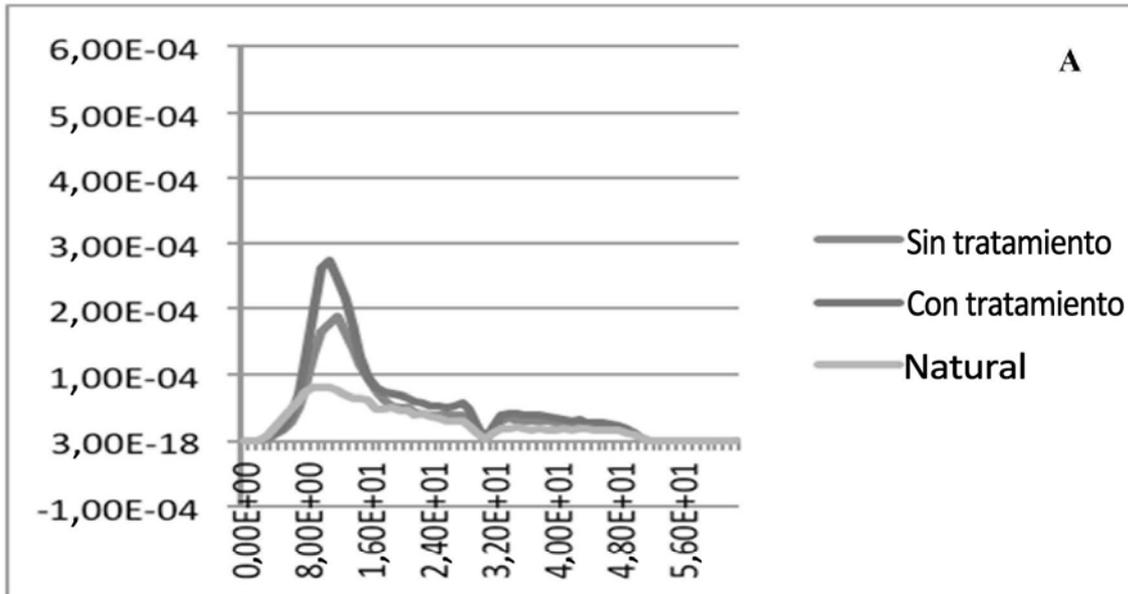


Figura 14

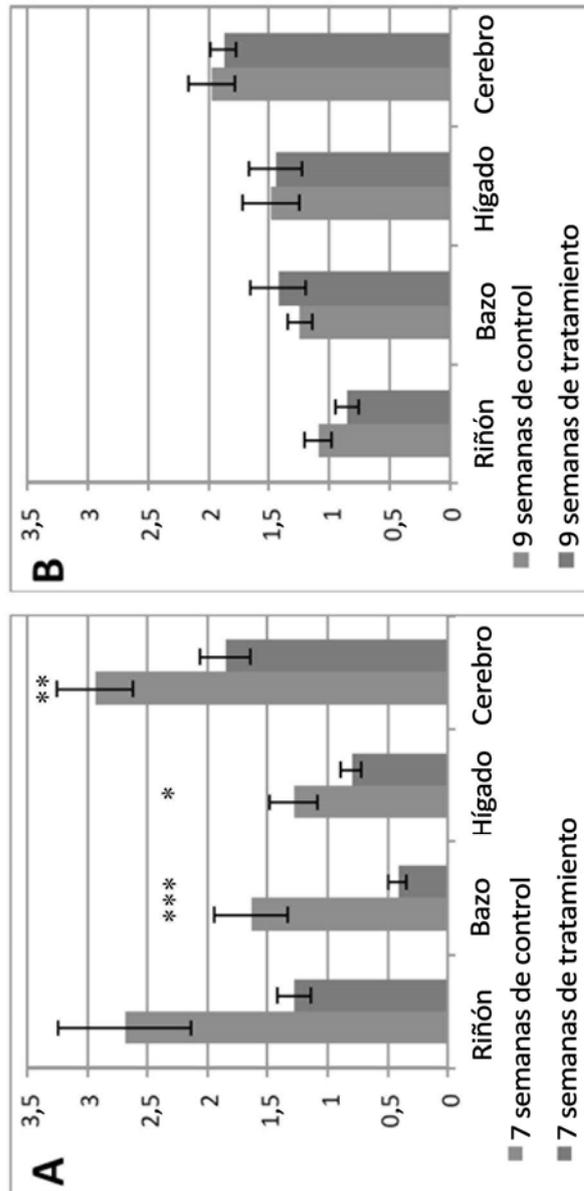


Figura 15

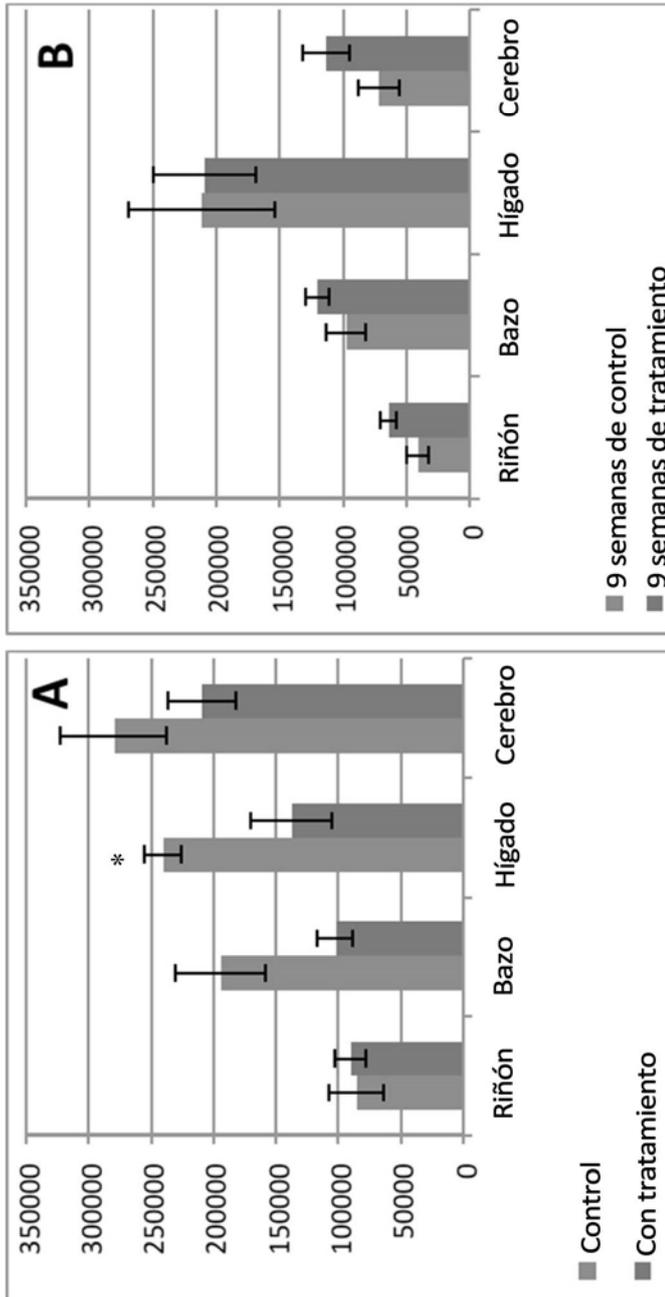


Figura 16

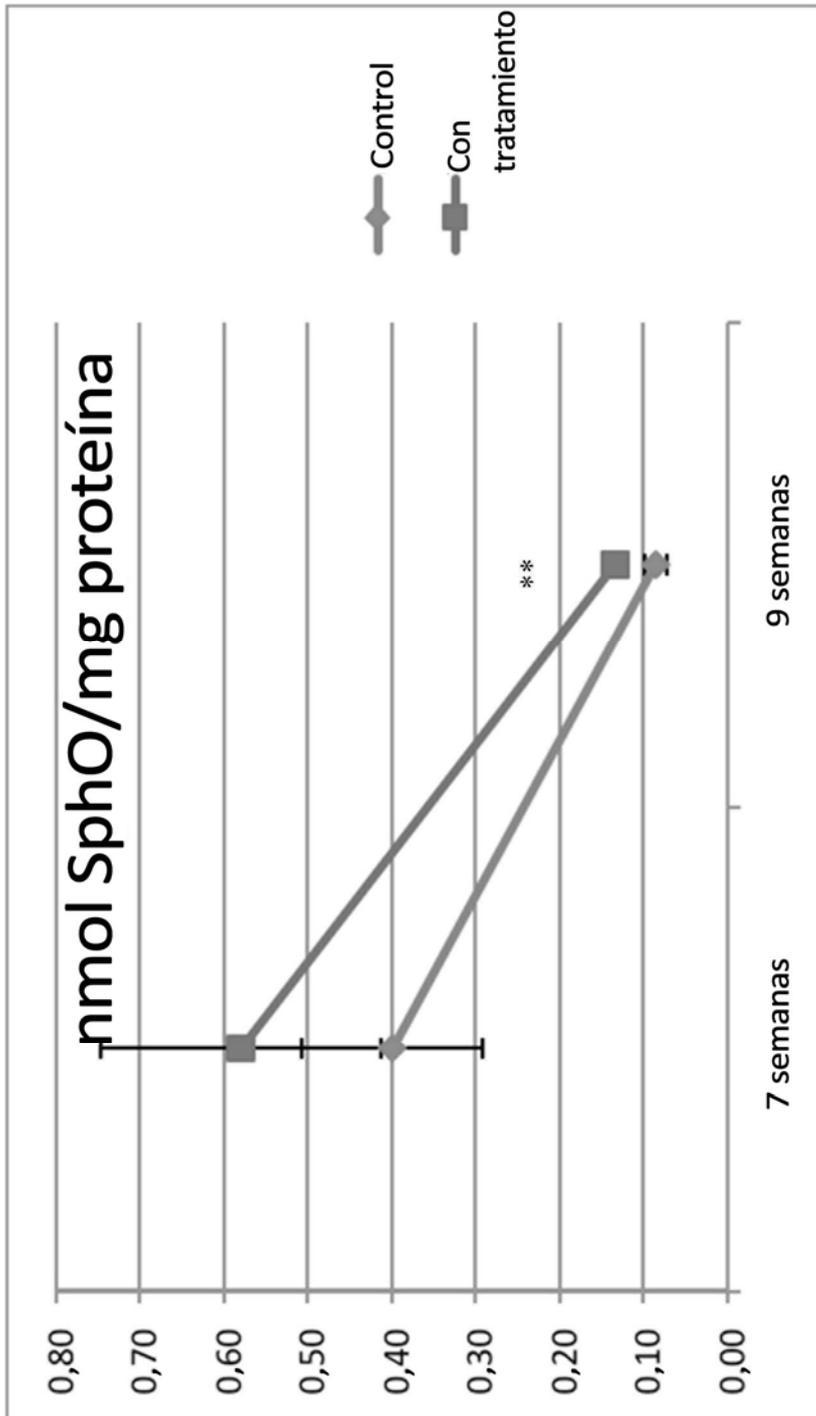


Figura 17

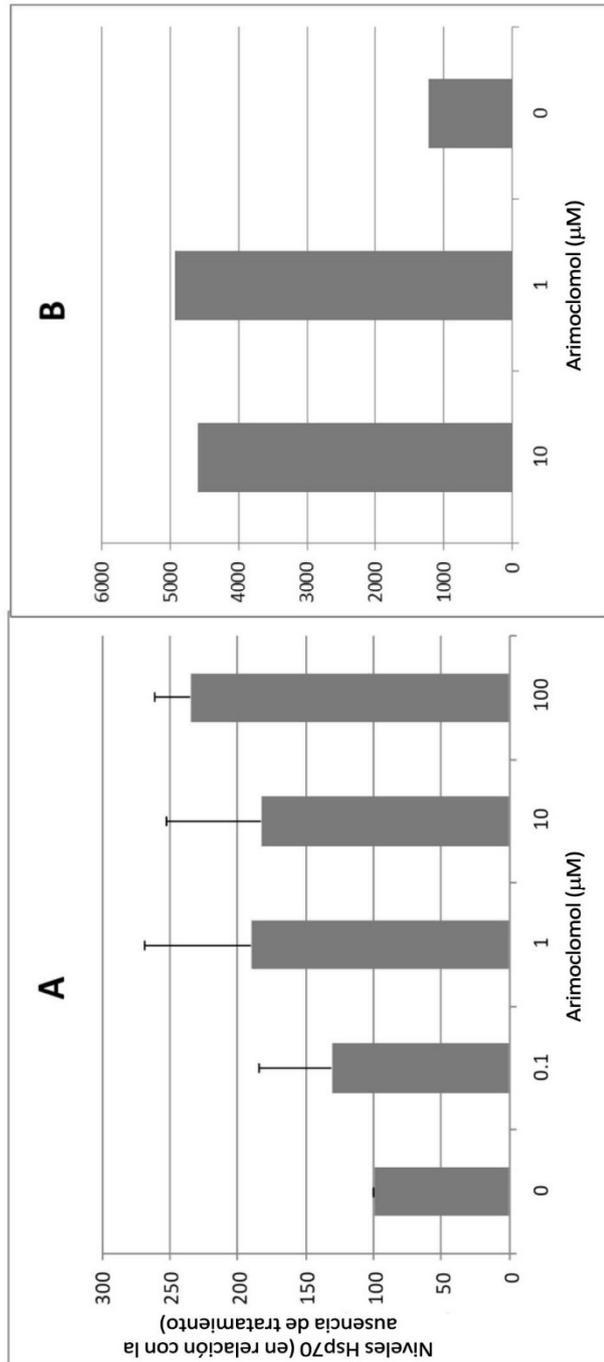


Figura 18

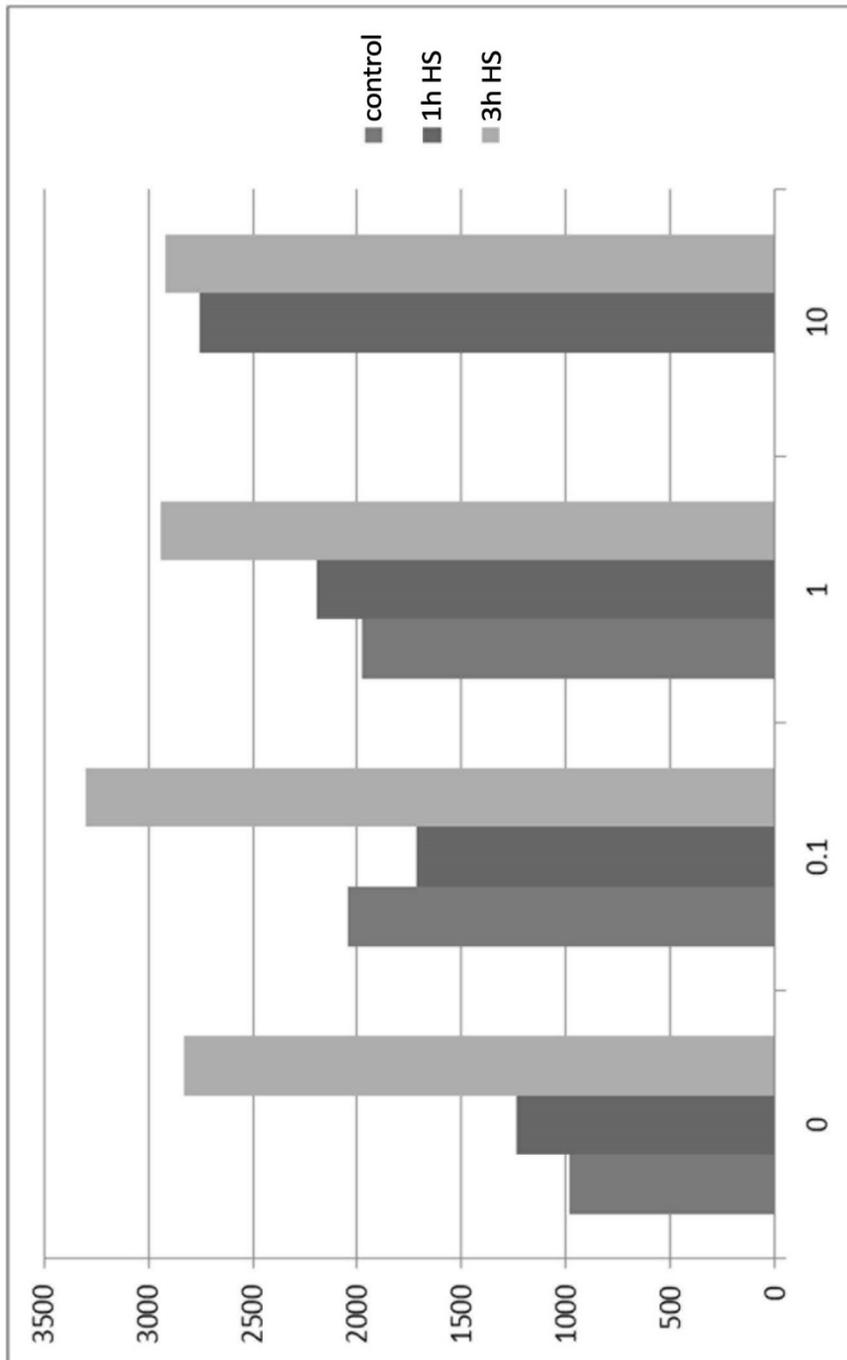


Figura 19

