

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 934 704**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2016 PCT/US2016/054045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17062238**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2016 E 16854098 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3359256**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para diagnosticar y tratar discapacidades intelectuales**

30 Prioridad:

05.10.2015 US 201562237130 P

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

24.02.2023

73 Titular/es:

**MITZ, HOWARD (100.0%)
220 Cottage Street
Littleton, NH 03561, US**

72 Inventor/es:

MITZ, HOWARD

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 934 704 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

Composiciones y procedimientos para diagnosticar y tratar discapacidades intelectuales

SOLICITUD RELACIONADA

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/237.130, presentada el 5 de octubre de 2015.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La discapacidad intelectual (ID) o el término más antiguo, retraso mental, afecta a entre el 1 y el 4% de la población. Según una estimación, los gastos para las personas con discapacidad intelectual alcanzaron los 52.900 millones en 2009. También se ha demostrado que las personas con discapacidad intelectual tienen una menor esperanza de vida. La etiología del retraso mental fue revisada por McLaren y Bryson (McLaren, J., Bryson, S. American Journal of Mental Retardation 1987, Vol. 92, No 3, 243-254). Afirmaron que sólo una minoría de la ID procedía de instancias perinatales o postnatales identificables que podían ser alterables. Un artículo de revisión de 2010 de Ropers sugiere que hay 91 anomalías cromosómicas en el cromosoma X 1 que podrían causar deterioro cognitivo. Moeschler (Moeschler, J.B. Genetic Evaluation of Intellectual Disabilities. Elsevier, Seminars in Pediatric Neurology 1071-9091/08) sugiere que un clínico experto encontrará dos tercios de las causas de discapacidad intelectual, mientras que un grupo de Alemania (Rauch, A. et al. The Lancet, Vol 380 10 de noviembre de 2012) sugiere que entre el 45% y el 55% de los casos de discapacidad intelectual grave podrían deberse a una mutación *de novo*.

20 La proteína de la zona de embarazo (PZP) fue descubierta por primera vez en 1959 por Smithies (Smithies, O Adv. Protein Chemistry 1959 14, 68-118). El gen de la PZP se encuentra en el cromosoma 12. Su localización es 12 P 13 - P 12.2 (Pregnancy zone protein OS=Homo sapiens GN=PZP PE=1 SV=4, Accession# sp|P20742|PZP_HUMAN y GenBank: X54380.1). La PZP utiliza un mecanismo de captura que puede inhibir las cuatro clases de proteasas. Se han encontrado niveles de PZP en tejidos, incluido el cerebro. También se ha encontrado en suero y plasma. Se ha planteado la hipótesis de que la PZP, en concierto con otra proteína, puede modular la activación de las células T. Normalmente, la PZP es una proteína traza que aumenta considerablemente durante el embarazo. Sin embargo, aún se desconoce la finalidad de la PZP en el estado no embarazado.

30 Las enfermedades asociadas a la ID suelen ser difíciles de detectar y diagnosticar, lo que retrasa el tratamiento adecuado de la ID y de las enfermedades subyacentes responsables de la ID. Sería deseable desarrollar procedimientos de diagnóstico fiables para evaluar el riesgo de discapacidad intelectual en un sujeto y procedimientos para diagnosticar la discapacidad intelectual en un sujeto. También es deseable un agente terapéutico capaz de tratar la ID.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona composiciones y procedimientos para tratar o mejorar la ID en un sujeto, preferentemente un paciente humano, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Tales composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un agente terapéutico capaz de aumentar o disminuir los niveles o la actividad de la PZP en un sujeto, preferentemente un sujeto humano, y un portador opcional farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona composiciones y procedimiento para evaluar el riesgo de discapacidad intelectual (ID), o diagnosticar ID en un sujeto que comprende, detectar la sobreexpresión o infraexpresión de la proteína de la zona de embarazo (PZP) en una muestra del sujeto en la que la sobreexpresión o infraexpresión de PZP en comparación con los niveles normales de PZP en un sujeto de la misma especie que no está embarazada, es indicativa de que el sujeto está en riesgo de tener una discapacidad intelectual síndrome de Koolen de Vries, síndrome de X frágil, síndrome de Down o enfermedad de Niemann Pick.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La Figura es una ilustración gráfica de los niveles de PZP determinados por espectrometría de masas (MS).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

45 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

50 La presente invención se basa, en parte, en los resultados que demuestran que la subexpresión o sobreexpresión de la Proteína de la Zona de Embarazo humana (hPZP) está asociada con la discapacidad intelectual (ID) resultante de causas dispares si ID. Un sujeto con ID suele tener una inteligencia inferior a la media. La inteligencia describe la capacidad de un sujeto para pensar, aprender y resolver problemas. La ID se suele clasificar según el Cociente Intelectual (CI). The Diagnostic & Statistical Manual of Mental (4ª Edición; DSM-IV, 1994) identifica el RM leve en el intervalo de CI de 50-55 a 70, el RM moderado de 35-40 a 55-55, el RM grave de 20-25 a 35-40 y el RM profundo por debajo de 20-25. Un sujeto con ID puede tener dificultades para aprender, puede tardar más en aprender habilidades sociales, como la forma de comunicarse, y puede ser menos capaz de cuidar de sí mismo y de vivir por su cuenta cuando sea adulto.

La invención proporciona procedimientos para evaluar el riesgo de discapacidad intelectual en un sujeto y procedimientos para diagnosticar la discapacidad intelectual en un sujeto que comprenden la detección de la sobreexpresión o subexpresión de PZP en una muestra biológica del sujeto, donde la sobreexpresión o subexpresión de PZP en comparación con los niveles normales de PZP en un sujeto de la misma especie que no está embarazada, es indicativa de que el sujeto está en riesgo de tener una discapacidad intelectual. El término "sujeto" incluye a los mamíferos. Preferentemente, el sujeto es un sujeto humano y, aún más preferentemente, el sujeto es un sujeto humano con riesgo de padecer ID o que necesita diagnosticar o tratar la ID. Un sujeto humano incluye embriones y fetos humanos. Los términos "sujeto" y "paciente" pueden utilizarse indistintamente en el presente documento.

Los procedimientos de la invención comprenden el paso de comparar el nivel de expresión de PZP en una muestra de prueba biológica de un sujeto que se va a probar con un nivel de control correspondiente de PZP que se sabe que está en los intervalos, por ejemplo, de 0,02 mg/l a 11 mg/l para un varón humano y, por ejemplo, de 0,47mg/l a 77 mg/l para una hembra humana que no está embarazada.

Una diferencia (por ejemplo, un aumento o una disminución) en el nivel de expresión de PZP en la muestra en relación con el nivel de control correspondiente es predictiva de que un sujeto tiene una ID. Como se utiliza en el presente documento, "diferencia" se refiere a cualquier diferencia estadísticamente significativa en el nivel de un biomarcador seleccionado en una muestra de prueba en relación con el nivel del mismo biomarcador en una muestra de control correspondiente. Los procedimientos estadísticos para determinar diferencias significativas en la expresión génica son bien conocidos en la técnica. Si el nivel de uno o más fragmentos peptídicos seleccionados en la muestra problema es idéntico o esencialmente el mismo que el nivel de control correspondiente (por ejemplo, sin diferencia estadísticamente significativa), es poco probable que el sujeto tenga ID (es decir, una predicción negativa). Si el nivel de PZP en la muestra es significativamente diferente del nivel de control correspondiente, determinado por una(s) prueba(s) estadística(s) apropiada(s), es probable que el sujeto tenga ID (es decir, una predicción positiva). Preferentemente, la PZP se sobreexpresa o subexpresa al menos un 10%, un 20%, un 50%, un 75%, un 90% o un 100% en relación con el nivel de expresión normal. Algunas condiciones de ID pueden dar lugar a un nivel de expresión de PZP reducido en la muestra de ensayo en relación con un nivel de control correspondiente. Algunas condiciones de ID pueden dar lugar a un nivel de expresión de PZP aumentado en la muestra de ensayo en relación con un nivel de control correspondiente.

Ejemplos de afecciones en las que un sujeto puede sobreexpresar PZP incluyen el síndrome de Down. El síndrome de Down es un trastorno que incluye una combinación de defectos congénitos, como cierto grado de ID, rasgos faciales característicos y, a menudo, defectos cardíacos, aumento de infecciones, problemas de visión y audición y otros problemas de salud. La gravedad de estos problemas varía mucho entre los sujetos afectados. El síndrome de Down suele estar causado por una copia extra del cromosoma 21 y también se conoce como trisomía 21.

Ejemplos de afecciones en las que un sujeto puede subexpresar PZP incluyen el síndrome de Koolen-deVries y el síndrome X frágil.

El síndrome del cromosoma X frágil se asocia a un sitio frágil expresado como una brecha isocromátida en el cromosoma metafásico en la posición Xq 27.3 del mapa. El síndrome del cromosoma X frágil es un trastorno genético causado por una mutación en la región 5'-no traducida del gen del retraso mental 1 del cromosoma X frágil (FMR1), situado en el cromosoma X. La mutación que causa el síndrome del cromosoma X frágil está asociada a una repetición CGG en el gen FMR-1 del retraso mental del cromosoma X frágil. Cuando un sujeto tiene más de unas 200 repeticiones CGG, el gen X frágil está hipermetilado, silenciado, no se produce la proteína X frágil del retraso mental (FMRP) y el sujeto es diagnosticado de síndrome X frágil. El síndrome del cromosoma X frágil se segrega como un trastorno dominante ligado al cromosoma X con penetrancia reducida. Cualquiera de los sexos portadores de la mutación del cromosoma X frágil puede presentar ID, cuya gravedad es variable. Los niños y adultos con síndrome del cromosoma X frágil presentan diversos grados de discapacidad intelectual o de aprendizaje y problemas de comportamiento y emocionales, incluidos rasgos y tendencias de tipo autista. El síndrome del cromosoma X frágil puede diagnosticarse mediante una prueba genética establecida realizada en una muestra (por ejemplo, muestra de sangre, muestra bucal) del sujeto. La prueba determina si existe una mutación o premutación en el gen FMR-1 del sujeto.

El síndrome de Koolen de Vries, anteriormente conocido como síndrome de microdelección 17q21.31, es una afección causada por una pequeña delección de material genético del cromosoma 17. La delección se produce en un lugar designado como q21.31. Las personas con síndrome de microdelección 17q21.31 pueden presentar retraso del desarrollo, discapacidad intelectual, convulsiones, hipotonía, rasgos faciales distintivos y problemas de visión. Algunos afectados presentan defectos cardíacos, problemas renales y anomalías esqueléticas como deformidades en los pies. El tamaño exacto de la delección varía entre los individuos afectados, pero contiene al menos seis genes. Esta delección afecta a una de las dos copias del cromosoma 17 en cada célula. Los signos y síntomas del síndrome de microdelección 17q21.31 están probablemente relacionados con la pérdida de uno o más genes en esta región.

La enfermedad de Niemann-Pick es un ejemplo de enfermedad en la que un sujeto puede sobreexpresar o subexpresar PZP. La enfermedad de Niemann-Pick hace referencia a un grupo de enfermedades de almacenamiento lisosómico que incluyen los tipos A (NPA), B (NPB), C (NPC) y, en ocasiones, un tipo D (NPD) que también se conoce como tipo A/B. En la forma de tipo C de la enfermedad de Niemann-Pick (NPC), los pacientes no son capaces de metabolizar correctamente el colesterol y otros lípidos en la célula. En consecuencia, se acumulan cantidades

excesivas de colesterol en el hígado y el bazo, y cantidades excesivas de otros lípidos en el cerebro, lo que provoca síntomas neurológicos como ID, problemas de aprendizaje y retraso en el desarrollo de la motricidad fina. NPC siempre es fatal. La mayoría de los niños con NPC mueren antes de los 20 años. Los niños diagnosticados de APN también mueren a una edad temprana debido a las graves complicaciones neurológicas derivadas de la APN.

- 5 La NPC está causada por mutaciones en el gen NPC1 (NPC tipo 1C) o en el gen NPC2 (NPC tipo 2C) y se hereda de forma autosómica recesiva. Los investigadores han determinado que el gen NPC1 se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 18 (18q11.2). El gen NPC2 está situado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q24.3). Se cree que la sobreexpresión o subexpresión de la PZP en el NPC, por ejemplo, depende de qué genes estén mutados.

- 10 Una "muestra biológica", tal como se utiliza aquí, se refiere a una muestra que comprende ácidos nucleicos, como ADN o ARN total o ARNm o proteínas de un sujeto individual humano, feto o embrión de preimplantación. Normalmente, si la muestra biológica es una muestra de un feto o de un embrión de preimplantación, la muestra comprende sólo unas pocas o una única célula. Sin embargo, en algunas realizaciones, el término también se refiere a material biológico no celular, como el plasma, por ejemplo en procedimientos de diagnóstico prenatal no invasivos, en los que la muestra suele ser sangre o plasma materno. Muestras biológicas no celulares, como fracciones de
15 sangre, saliva u orina que pueden utilizarse para analizar la presencia o ausencia de las mutaciones de la presente invención. La muestra suele ser fresca, pero también puede ser una muestra almacenada desde hace horas o días, o congelada. La muestra congelada puede descongelarse antes de emplear los procedimientos, ensayos y sistemas de la invención. Tras la descongelación, una muestra congelada puede centrifugarse antes de someterla a los procedimientos, ensayos y sistemas de la invención.

- 20 Según se define en el presente documento, los "niveles normales de PZP" en un sujeto humano se definen en los intervalos de 0,02 mg/l-11 mg/l para un varón humano y 0,47mg/l-77 mg/l para una hembra humana que no esté embarazada. La invención proporciona procedimientos para establecer niveles normales de PZP en un sujeto humano. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la administración de PZP purificada o recombinante a un paciente que subexpresa PZP. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la administración de un agente que reduce
25 la expresión de PZP a un paciente que sobreexpresa PZP.

- "Tratamiento" se refiere a la administración de un agente terapéutico o la realización de procedimientos médicos con respecto a un paciente o sujeto, ya sea para la profilaxis (prevención) o para curar o reducir los síntomas de la enfermedad o dolencia en el caso en que el paciente esté afectado. Los compuestos descritos en el presente documento y/o identificados mediante los procedimientos de cribado descritos en el presente documento pueden
30 utilizarse como parte de un régimen de tratamiento en cantidades terapéuticamente eficaces. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para disminuir, prevenir o mejorar los síntomas asociados a la ID.

- La presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico basados en ADN, ARN y proteínas que detectan directa o indirectamente la sobreexpresión o subexpresión de PZP. La presente invención también proporciona composiciones y kits para fines de diagnóstico. En algunas realizaciones, la sobreexpresión o subexpresión de PZP se detecta como ARNm correspondiente o ADN genómico (por ejemplo, amplificación del número de copias) utilizando una variedad de técnicas de ácido nucleico conocidas por los expertos en la materia, incluyendo, entre otras:
35 secuenciación de ácido nucleico; hibridación de ácido nucleico; y amplificación de ácido nucleico. Las técnicas de hibridación incluyen, pero no se limitan a, la hibridación *in situ* (ISH), el micromatriz y la transferencia Southern o Northern.

- 40 El ADN genómico y el ARNm pueden amplificarse antes o simultáneamente a la detección. Ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación basada en la secuenciación de ácidos nucleicos (NASBA). Los expertos en la materia
45 reconocerán que ciertas técnicas de amplificación (por ejemplo, PCR) requieren que el ARN se transcriba inversamente a ADN antes de la amplificación (por ejemplo, RT-PCR), mientras que otras técnicas de amplificación amplifican directamente el ARN (por ejemplo, TMA y NASBA).

- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos de detección de proteína PZP y niveles de proteína PZP. Las proteínas se detectan mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia,
50 como la secuenciación de proteínas y los inmunoensayos. Ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas de secuenciación de proteínas incluyen, pero no se limitan a, la espectrometría de masas y la degradación de Edman.

- La espectrometría de masas (MS) puede, en principio, secuenciar proteínas de cualquier tamaño, pero se vuelve computacionalmente más difícil a medida que aumenta el tamaño. Una proteína es digerida por una endoproteasa y la solución resultante se hace pasar por una columna de cromatografía líquida de alta presión. Al final de esta columna,
55 la solución se pulveriza por una boquilla estrecha cargada a un alto potencial positivo hacia el espectrómetro de masas. La carga de las gotas hace que se fragmenten hasta que sólo quedan iones individuales. A continuación, los péptidos se fragmentan y se mide la relación masa-carga de los fragmentos. El espectro de masas se analiza por ordenador y a menudo se compara con una base de datos de proteínas previamente secuenciadas para determinar las secuencias de los fragmentos. A continuación, se repite el proceso con una enzima de digestión diferente, y los solapamientos en
60 las secuencias se utilizan para construir una secuencia para la proteína.

En la reacción de degradación de Edman, la proteína a secuenciar se adsorbe sobre una superficie sólida (por ejemplo, una fibra de vidrio recubierta de polibreno). El reactivo Edman, fenilisotiocianato (PTC), se añade al péptido adsorbido, junto con una solución tampón ligeramente básica de trimetilamina al 12%, y reacciona con el grupo amino del aminoácido N-terminal. A continuación, el derivado aminoácido terminal puede desprenderse selectivamente mediante la adición de ácido anhídrido. El derivado se isomeriza para dar una feniltiohidantoína sustituida, que puede lavarse e identificarse por cromatografía, y el ciclo puede repetirse. La eficacia de cada paso es de aproximadamente el 98%, lo que permite determinar con fiabilidad unos 50 aminoácidos.

Ejemplos ilustrativos no limitantes de inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a: inmunoprecipitación; transferencia Western; ELISA; inmunohistoquímica; inmunocitoquímica; citometría de flujo; e, inmuno-PCR. Los anticuerpos policlonales o monoclonales marcados detectablemente mediante diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, calorimétricas, fluorescentes, quimioluminiscentes o radiactivas) son adecuados para su uso en los inmunoensayos.

Las composiciones para uso en los procedimientos de diagnóstico de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sondas, oligonucleótidos de amplificación y anticuerpos. Las composiciones particularmente preferidas detectan el nivel de expresión de PZP en una muestra.

Cualquiera de estas composiciones, sola o en combinación con otras composiciones de la presente invención, puede proporcionarse en forma de kit. Por ejemplo, la sonda marcada única y el par de oligonucleótidos de amplificación pueden suministrarse en un kit para la amplificación y detección de PZP. Los kits pueden comprender además controles apropiados y/o reactivos de detección. Las composiciones de sonda y anticuerpo de la presente invención también pueden proporcionarse en forma de matriz.

Además de procedimientos para evaluar el riesgo o diagnosticar la presencia de discapacidad intelectual en un sujeto, la presente invención proporciona composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas y procedimientos para tratar, mejorar, revertir o ralentizar la progresión de al menos un síntoma de ID. Por ejemplo, los procedimientos de la invención pueden prevenir, tratar, mejorar, revertir o ralentizar la progresión de la discapacidad intelectual y/o aumentar el CI (denominados colectivamente "tratamiento" o "tratar" a un paciente con ID).

Las composiciones de la invención pueden ser composiciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el término "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico e inerte, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son azúcares como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; almidones como el almidón de maíz y el almidón de patata; celulosa y sus derivados como la carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa y el acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles como propilenglicol; ésteres como el oleato de etilo y el laurato de etilo; agar; agentes tamponadores como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua, agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, además de colorantes, agentes liberadores, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

La invención proporciona composiciones y procedimientos para aumentar el nivel o la actividad de la PZP en un sujeto que la necesite, por ejemplo, en un sujeto con síndrome X frágil o síndrome de Koolen-deVries.

Las composiciones y procedimientos de la invención para aumentar los niveles de PZP en un sujeto incluyen la administración de un agente que aumenta el nivel o la actividad de PZP en un sujeto que lo necesita. Un agente que aumenta el nivel o la actividad de la PZP en un sujeto incluye, pero no se limita a: la PZP purificada o recombinante (UniProt P20742-PZP humana), un agonista de la PZP, un agonista del receptor de la PZP, un mimético de la PZP, una célula que expresa la PZP recombinante o cualquier fragmento activo de la misma, un ácido nucleico recombinante que codifica la PZP o cualquier fragmento activo de la misma, un vector que comprende ácidos nucleicos que codifican la PZP o cualquier fragmento activo de la misma. Tal como se utiliza aquí, un "vector" es un constructo de ácido nucleico recombinante, como un plásmido, genoma de fago, genoma de virus, cósmido o cromosoma artificial, al que se puede unir otro segmento de ADN.

Preferentemente, una composición de la invención es una composición farmacéutica que comprende PZP humana recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones y procedimientos que no forman parte de la invención para disminuir los niveles de PZP en un sujeto incluyen la administración de un agente que disminuye el nivel o la actividad de PZP en un sujeto que lo necesita. Los ejemplos de agentes que disminuyen el nivel de actividad de la PZP incluyen terapias de moléculas pequeñas dirigidas a la PZP que se identifican mediante procedimientos conocidos de cribado de fármacos. Otros agentes anti-PZP incluyen composiciones que comprenden compuestos oligoméricos antisentido o ARNi, en particular oligonucleótidos (por ejemplo, los identificados en los procedimientos de cribado de fármacos descritos anteriormente), para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican PZP, modulando en última

instancia la cantidad de PZP expresada. También pueden utilizarse anticuerpos dirigidos contra la PZP o cualquier fragmento activo de la misma para reducir los niveles de PZP en un sujeto.

Aquí descrito pero no parte de la invención es el uso de cualquier manipulación genética para el uso en la modulación de la expresión de PZP ya sea para aumentar o disminuir los niveles de expresión de PZP en un sujeto. Ejemplos de manipulación genética incluyen, pero no se limitan a, anulación de genes (por ejemplo, la eliminación del gen PZP del cromosoma utilizando, por ejemplo, la recombinación), la expresión de constructos antisentido con o sin promotores inducibles, y similares. La administración del constructo de ácido nucleico a las células *in vitro* o *in vivo* puede realizarse mediante cualquier procedimiento adecuado. Un procedimiento adecuado es aquel que introduce el constructo de ácido nucleico en la célula de forma que se produzca el evento deseado (por ejemplo, la expresión de un constructo antisentido o la expresión de un promotor para potenciar la expresión de PZP). La terapia genética también puede utilizarse para administrar siARN u otras moléculas interferentes que se expresen *in vivo* (por ejemplo, tras la estimulación por un promotor inducible).

Preferentemente, los agentes de la invención que aumentan o disminuyen los niveles de PZP en un sujeto pueden diseñarse de manera que atraviesen más fácilmente la barrera hematoencefálica (BBB). Uno de estos sistemas es el descrito por Pardridge, Expert Opin. Drug Deliv. (2015) 12(2):207-222 utilizando caballos de Troya moleculares BBB para administrar fármacos biológicos a través de la BBB. Por ejemplo, un caballo de Troya de la BBB puede ser un péptido endógeno o un anticuerpo monoclonal peptidomimético (Mab) que atraviesa la BBB mediante el transporte en un sistema de transporte endógeno mediado por receptor (RMT). En Dietz y Bohr, Mol. Cell. Neurosci. (2004) 27(2):85-131.

También se contemplan otros moduladores útiles para abrir la BBB, desde sustancias químicas y biológicas hasta estímulos físicos como ultrasonidos focalizados de alta frecuencia y campos electromagnéticos, por su impacto en la BBB para ayudar a las composiciones de la invención a llegar al cerebro, cuando sea necesario. Tales estímulos/agentes incluyen, pero no se limitan a, ciclodextrina, poloxámeros, péptidos de penetración celular como MAP, Transportan, SBP, FBP, SynB1, SynB3, pAntp⁴³⁻⁶⁸, TAT⁴⁸⁻⁶⁰, virus, Cereport (RMP-7), ultrasonidos físicos, microondas, campos electromagnéticos, nanotransportadores, nanotransportadores PEGilados,

Se proporcionan aquí, pero no forman parte de la invención, procedimientos para identificar un agente terapéutico para tratar o mejorar la ID. Por ejemplo, un modelo animal, tal como una anulación del gen PZP, es útil para cribar e identificar agentes terapéuticos útiles para tratar la ID. Los ratones con anulación de PZP, por ejemplo, son conocidos y están disponibles, por ejemplo en la Iniciativa Trans-NIH Mouse NIH-1149. El modelo animal puede ponerse en contacto, por ejemplo, con uno o más agentes terapéuticos de prueba para determinar si el contacto con el agente terapéutico de prueba alivia o mejora al menos un síntoma de ID.

Asimismo, pueden desarrollarse modelos animales que sobreexpresen la PZP. El contacto de una muestra de ensayo con dichos ratones para determinar si la expresión y la actividad de la PZP vuelven a niveles comparativamente normales indica un agente de ensayo para disminuir la expresión de PZP en un sujeto y/o capaz de mejorar los síntomas de ID en un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser tópica (incluida la oftálmica y a las membranas mucosas, incluida la administración vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluido por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, dispersantes o aglutinantes.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitados a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionables y semisólidos autoemulsionables.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica.

Dichas técnicas incluyen la etapa de asociación de los principios activos con el (los) portador(es) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

5 Las composiciones de la presente invención pueden formularse en cualquiera de las muchas formas de dosificación posibles, tales como, pero no limitadas a, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, como por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión
10 también puede contener estabilizantes.

Los niveles de dosificación reales de los agentes farmacéuticos aquí descritos pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores, como la actividad del compuesto concreto, la vía de administración, el tiempo de administración,
15 la tasa de excreción del compuesto concreto empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Un médico puede determinar y prescribir la cantidad eficaz del agente farmacéutico necesaria. Por ejemplo, el médico podría comenzar con dosis de los compuestos descritos en el presente documento a niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En consecuencia, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un individuo, preferentemente un humano, que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacéutico según se divulga en el presente documento. Preferentemente, el agente se administra por vía intracerebral o en la médula espinal del individuo.
20

25 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y no deben interpretarse como limitativos de la invención reivindicada en modo alguno.

Ejemplo 1-Estudio para examinar un vínculo proteínico entre dos causas distintas de discapacidad intelectual

30 El presente estudio se inició con una familia de gemelos con retrasos en el desarrollo. Al gemelo B se le diagnosticó el síndrome X frágil a los 3 años. El síndrome del cromosoma X frágil es conocido como la causa más frecuente de ID hereditaria. Es una enfermedad genética causada por la hipermetilación de la región promotora del gen FMR1 y provoca la pérdida de FMRP - (fragile X mental retardation protein) (Hagerman, R.J. et al. Pediatrics 2009; 123;378 DOI: 10.1542/peds.2008-0317). Se observa aproximadamente en uno de cada 4.000 (M) a 6.000 nacidos vivos.

35 El gemelo A, también varón, tenía un deterioro cognitivo significativo, aunque no se le diagnosticó hasta los 14 años. Su diagnóstico fue una microdelección 17 Q 21.31. Esto se descubrió en 2009 mediante un análisis de micromatrices. Se determinó que su microdelección sólo afectaba al gen de la proteína tau asociada a los microtubulares (MAPT). Esta microdelección fue descrita por primera vez por Koolen et al. en 2006 (Koolen, D. et al. Nature Genetics Volumen 38/Número 9/Septiembre de 2006). Este síndrome de delección puede estar asociado a varios genes, pero el más común es una delección de MAPT y tiene una prevalencia estimada de uno de cada 16.000 (10,11).

40 Se sabía que el segundo niño (gemelo A) tenía una cantidad normal de FMRP. La divergencia en los genotipos de mutación de los dos hermanos que conducen a un fenotipo común de ID es desconcertante.

45 La rareza de ambas enfermedades se combinan para que la probabilidad de que ambos padezcan la misma deficiencia proteica se estime entre uno de cada 64-96 millones. El objetivo del presente estudio era evaluar las diferencias en los perfiles proteicos de los dos hermanos, los padres y un joven de la misma edad, tanto normal como con X frágil, utilizando la espectrometría de masas como plataforma analítica. Elegimos este motivo porque ofrecía la posibilidad de delinear un gran número de proteínas en plasma junto con su abundancia relativa entre sujetos.

Procedimientos

50 **Preparación de la muestra.** Las muestras se recogieron en tubos Vacutainer con tapón morado de K₂EDTA (BD Sciences) y se almacenaron en hielo húmedo para su transporte al centro de pruebas. Una vez recibidas, las muestras se centrifugaron a 3300 x g a 4°C durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadado de plasma para el análisis. Se agotaron 10µL de plasma utilizando el Sistema de Remoción de Afinidad Múltiple (MARS) específico para 14 proteínas plasmáticas humanas abundantes (Agilent Technologies). La muestra se procesó siguiendo el protocolo del proveedor. El plasma agotado resultante se cuantificó mediante fluorometría Qubit (Life Technologies).

55 **SDS-PAGE y digestión.** se separaron 20µg de plasma agotado utilizando un mini-gel NuPage con gradiente Bis-Tris del 4-12% (Life Technologies) utilizando el sistema tampón MOPS. El gel se tiñó con coomassie y cada carril se dividió en cuarenta segmentos de igual tamaño. Cada segmento de gel se redujo con ditioneitol, se alquiló con yodoacetamida

y se sometió a digestión en gel con tripsina durante 4 h (Promega, Madison, WI) utilizando una estación de digestión ProGest (Digilab, Inc., Marlborough, MA). Los péptidos se acidificaron al 0,1% de ácido fórmico y se analizaron directamente sin procesamiento posterior.

5 Espectrometría de masas. Los péptidos se analizaron mediante nano LC/MS/MS con un sistema HPLC NanoAcquity (Waters, Milford, MA) conectado a un espectrómetro de masas en tándem Orbitrap Velos Pro (ThermoFisher, San Jose, CA) equipado con una fuente de nanopulverización. Los péptidos se cargaron en una columna de atrapamiento y se eluyeron en una columna analítica de 15 cm x 75 µm de diámetro interno a 350 nL/min; ambas columnas se empaquetaron con resina Jupiter Proteo C12 de 4 µm (Phenomenex, Torrance, CA). Se empleó un gradiente de 30 minutos para cada segmento. El espectrómetro de masas funcionó en modo dependiente de los datos, con MS realizada en el Orbitrap a 60.000 FWHM de resolución y MS/MS realizada en el Velos. Se seleccionaron para MS/MS los quince iones más abundantes de cada barrido MS completo. Se utilizaron valores objetivo de AGC de 1e6 y 1e5 para MS y MS/MS, respectivamente. Se empleó una energía de colisión normalizada (ECN) de 35. Los ajustes dinámicos de exclusión garantizaron que cada ion se seleccionara una sola vez y se excluyera durante 30 segundos a partir de ese momento.

15 Análisis de datos. Los datos se buscaron en la base de datos combinada de proteínas humanas Swissprot, directa e inversa, utilizando una copia almacenada localmente del motor de búsqueda Mascot v2.4.1 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) a través de Mascot Daemon v2.4. Las listas de picos se generaron con Proteome Discoverer (ThermoFisher). La base de datos se completó con proteínas de fondo comunes. Los parámetros de búsqueda fueron: tolerancia de masa del precursor 10 ppm, tolerancia de masa del ion producto 0,6 Da, 2 escisiones perdidas permitidas, sólo péptidos totalmente tripticos, modificación fija de carbamidometilcisteína, modificaciones variables de metionina oxidada, acetilación N-terminal de proteínas, ácido piroglutámico en glutamina N-terminal. Los archivos de resultados de búsqueda Mascot (DAT) se analizaron con el software Scaffold v4.3.0 (Proteome Software, Portland, OR) para crear una lista no redundante por muestra. Los criterios para aceptar la identificación de una proteína se determinaron calculando las tasas de falsos descubrimientos (FDR) a partir de la base de datos concatenada directa/inversa. Se fijó un FDR del 1% a nivel de proteína y péptido. Se requería un mínimo de dos péptidos únicos por proteína. Para cada proteína se obtuvo el número de recuentos espectrales (SpC), que se convirtieron en factores de abundancia espectral (SAF) dividiéndolos por el MW de la proteína en kDa y normalizándolos posteriormente con la suma de todos los SAF por muestra para obtener el factor de abundancia espectral normalizado (NSAF). (12) Los valores NSAF pueden utilizarse para aproximar la abundancia relativa de proteínas dentro de una muestra dada, y la abundancia relativa de una proteína dada entre muestras. Las diferencias de proteínas entre las cinco muestras se determinaron basándose en los siguientes criterios: se detectó una proteína como diferencia binaria y había al menos 5 SpC en cada una de las muestras únicas o se detectó una proteína con un cambio de 4 veces (hacia arriba o hacia abajo) o mayor basado en la división de los valores medios de NSAF, y había al menos 5 SpC en cada una de las muestras superiores.

35 Se utilizó un enfoque GeLCMS(13) en el que se aisló plasma de cada sujeto, se agotó, se cuantificó y se electroforizaron cargas equivalentes mediante SDS PAGE para separar el contenido proteico en función del peso molecular. Debido al intervalo dinámico del contenido proteínico del plasma y el suero, en el que la albúmina representa más del 80-90% del proteoma, la depleción del plasma es un paso necesario para identificar proteínas de nivel inferior mediante espectrometría de masas.

40 **Resultados.** se identificaron 921 proteínas en total en los 6 sujetos de ensayo. Se aplicó el factor de abundancia espectral normalizado (NSAF), que normaliza los recuentos espectrales al peso molecular de la proteína para reducir el sesgo debido a las contribuciones peptídicas de las proteínas de mayor tamaño. De las 921 proteínas observadas, 13 presentaban cambios significativos entre los sujetos. El análisis de la prueba T dio como resultado 5 de las proteínas con cambios más significativos en términos de abundancia relativa, con valores p que oscilaban entre 0,0047 y 0,0122.

45 El cambio más significativo se observó en una proteína, la PZP. Por lo tanto, esto puede mostrar un vínculo entre causas aparentemente dispares de ID. Puede existir una relación entre la ausencia o la deficiencia relativa de PZP y la ID. Esto puede tener un efecto profundo en la formación de sinapsis.

Ejemplo 2- Estudios en sujetos adicionales.

Procedimientos.

Preparación del plasma

50 La sangre total de pacientes con síndrome X frágil y normales se recibió en hielo húmedo de un colaborador de la Universidad Rush en tubos con EDTA. La sangre se centrifugó a 4C a su llegada a 1500 x g, se retiró el sobrenadante y se repitió la centrifugación. Los sobrenadantes de plasma se congelaron a -80C antes del análisis.

Agotamiento

55 Se agotaron las 14 proteínas plasmáticas más abundantes de 10µL de cada muestra de plasma utilizando una columna de afinidad MARS-14 (Agilent). Esto se considera la mejor práctica para reducir la interferencia del intervalo dinámico de proteínas que se muestra en el plasma y el suero. Las muestras de flujo se intercambiaron con tampón en dl de H2O y se cuantificaron mediante fluorometría Qubit (Life Technologies).

Electroforesis en gel

5 Se cargaron 20ug de la muestra agotada en un gel Novex (Life Technologies) 4-12% bis tris gradiente SDS PAGE y se corrió en toda su longitud. Cada carril se dividió manualmente en 40 segmentos, cada uno de los cuales representaba una fracción de la población de proteínas plasmáticas. Los segmentos se redujeron robóticamente en DTT y se alquilaron en yodoacetamida antes de la digestión con tripsina de grado de secuenciación (Promega Corporation). De cada segmento se tomaron eluyentes peptídicos pasivos para el análisis por MS.

Espectrometría de masas (MS)

10 Los digeridos en gel se analizaron por nano LC/MS/MS con un sistema HPLC Waters NanoAcquity conectado a un ThermoFisher Orbitrap Velos Pro. Los péptidos se cargaron en una columna de atrapamiento y se eluyeron en una columna analítica de 75 µm a 350 nL/min; ambas columnas se empaquetaron con resina Jupiter Proteo (Phenomenex). El espectrómetro de masas funcionó en modo dependiente de datos, con MS realizada en el Orbitrap a 60.000 FWHM de resolución y MS/MS realizada en el LTQ. Los quince iones más abundantes se seleccionaron para MS/MS.

Tratamiento de datos

Los datos se buscaron utilizando una copia local de Mascot con los siguientes parámetros:

15 Enzima: Tripsina
 Base de datos: Swissprot Human (concatenado directo e inverso más contaminantes comunes)
 Modificación fija: Carbamidometilo (C)
 Modificaciones variables: Oxidación (M), Acetil (Proteína N-term), Desamidación (NQ), Pyro-Glu (N-term Q)
 Valores de masa: Monoisotópico
 20 Tolerancia de masa peptídica: 10 ppm
 Tolerancia de masas de fragmentos: 0.6 Da
 Máximas escisiones perdidas: 2
 Los archivos Mascot DAT se analizaron en el software Scaffold para su validación, filtrado y para crear una lista no redundante por muestra. Los datos se filtraron utilizando un 1% de FDR de proteínas y péptidos y requiriendo al menos dos péptidos únicos por proteína.
 25

Resultados

30 La Tabla 1 muestra un resumen de los diversos genotipos de la muestra y los resultados de detección de PZP en ambos estudios. La métrica para la detección fue el recuento espectral en el que se observan varios péptidos de PZP, así como diferentes moléculas de los mismos péptidos de PZP. Cuando se analizan muestras equivalentes, se trata de un procedimiento cómodo y sin etiquetas para detectar diferencias en el contenido proteínico de una muestra.

TABLA 1

Identificador de plasma	Genotipo	Detección de PZP - Recuentos espectrales	Estudio
16125	Normal	43	Anterior
16644	Normal	48	Anterior
16645	Normal	53	Anterior
18806	Normal	25	Actual
18808†	Normal	41	Actual
18809	Normal	20	Actual
18810	Normal	36	Actual

(continuación)

Identificador de plasma	Genotipo	Detección de PZP - Recuentos espectrales	Estudio
16127	Koolen-deVries	0	Anterior
16126	X frágil	0	Anterior
18119	X frágil	0	Anterior
18120	X frágil	0	Actual
18186	X frágil	0	Actual
18193	X frágil	0	Actual
18200*	X frágil	4	Actual
18201	X frágil	0	Actual
18202	X frágil	0	Actual
24367	Síndrome de Down	150	Actual
24368	Síndrome de Down	>500	Actual
24369	Neimann-Pick Tipo C	0	Actual
24370	Neimann-Pick Tipo C	>500	Actual

*En esta muestra se detectaron niveles bajos de PZP. La muestra se procesó con un protocolo abreviado en el que sólo se extrajo la zona del gel SDS PAGE que contenía PZP y se evaluó la presencia de PZP. Aunque tuvo éxito, este tipo limitado de análisis no fue coherente en las demás muestras normales intentadas. Por lo tanto, sólo se realizaron análisis de 40 fracciones para todas las demás muestras presentadas.

Debate

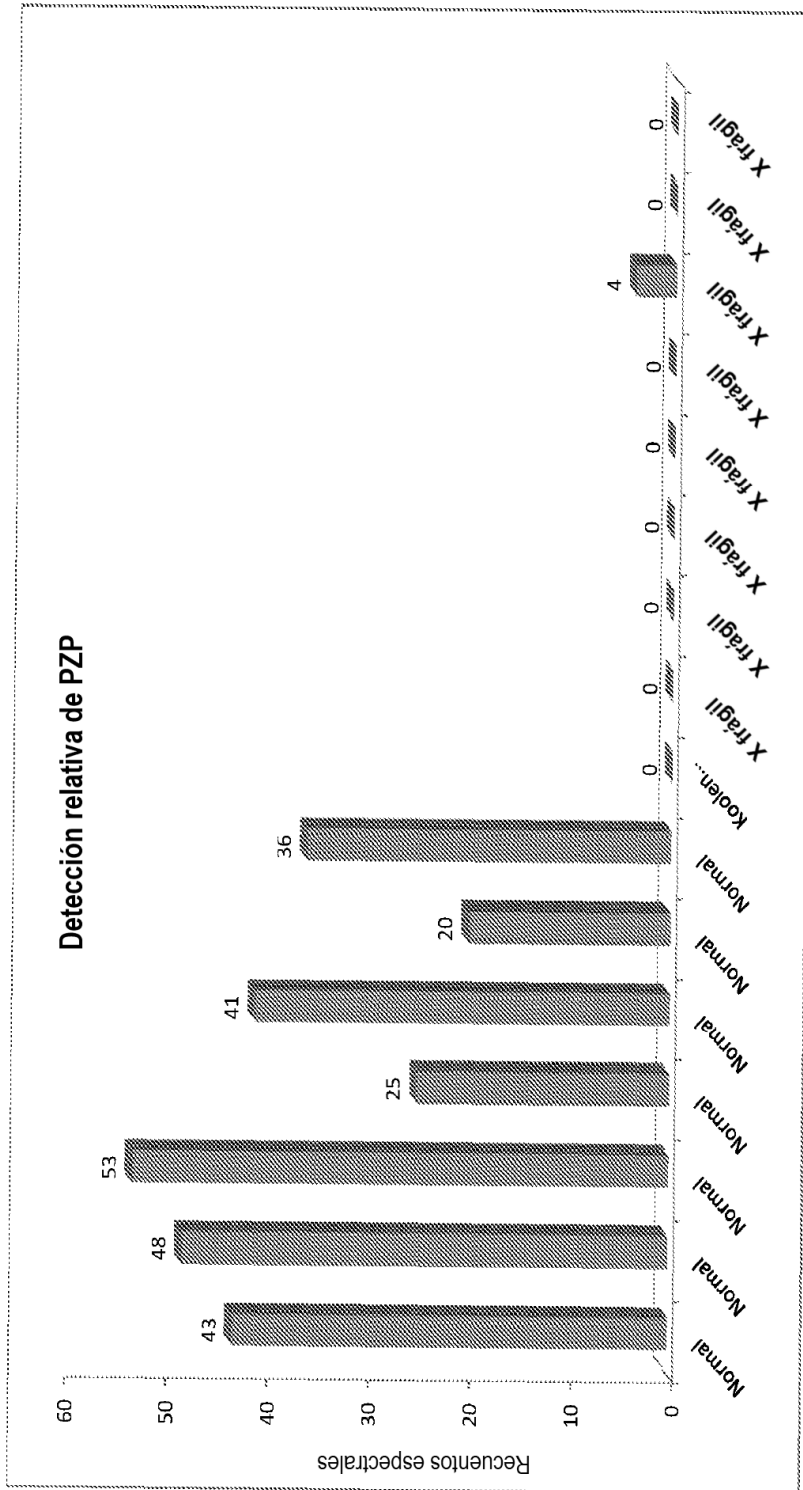
5 Como se muestra en la Figura, la continuación del estudio descrito en el Ejemplo 1, confirma los hallazgos iniciales de que por análisis de MS, la PZP estaba ausente en la mayoría de los sujetos ID y sólo ligeramente detectable en 1 de 8 sujetos ensayados con síndrome de X frágil o Koolen-deVries en contraposición a la detección del 100% de PZP en los sujetos control normales.

10 Las muestras de síndrome de Down mostraron niveles de PZP superiores a los normales. Las muestras de Niemann-Pick tipo C se dividieron entre sobreexpresión e subexpresión de PZP. Se cree que esta diferencia se debe a la posibilidad de que diferentes genes fueran responsables de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C resultante representada por cada muestra respectiva.

15 Poulsen y Munck (1987) observaron PZP en un total de 95 sujetos normales usando ELISA. Los intervalos para los machos fueron de 0,02 mg/l-11 mg/l y para las hembras de 0,47mg/l-77 mg/l. Aunque la PZP está ausente por análisis de MS en la mayoría de los sujetos con ID, se cree que todavía puede estar presente algo de PZP, como puede confirmarse por procedimientos de detección más sensibles como ELISA, aunque todavía a niveles mucho más bajos que sus homólogos normales.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende PZP humana recombinante y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un procedimiento de tratamiento de un paciente con síndrome de Koolen-deVries o síndrome de X frágil.
- 5 2. Un procedimiento para evaluar el riesgo de desarrollar, o diagnosticar la presencia de, Discapacidad Intelectual en un paciente humano que comprende los pasos de:
 - 10 analizar una muestra de sangre del paciente para determinar el nivel de PZP en la sangre del paciente; en el que el paciente tiene una discapacidad intelectual o corre el riesgo de desarrollar una discapacidad intelectual si el nivel de PZP presente en la sangre del paciente es superior o inferior a los niveles normales de PZP; en el que la discapacidad intelectual es el síndrome de Koolen-deVries, el síndrome X frágil, el síndrome de Down o la enfermedad de Niemann Pick.
3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que el ensayo de la muestra comprende un inmunoensayo, opcionalmente en el que el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en: inmunoprecipitación; transferencia Western; ELISA; inmunohistoquímica; inmunocitoquímica; citometría de flujo; e inmuno-PCR.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ensayo de la muestra comprende la secuenciación de proteínas por espectrometría de masas o degradación de Edman, o en el que el ensayo de la muestra comprende la detección indirecta de los niveles de PZP mediante la medición de los niveles de los ácidos nucleicos correspondientes.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el paciente corre el riesgo de desarrollar una discapacidad intelectual si el nivel de PZP presente en la sangre del paciente es inferior a los niveles normales de PZP.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la discapacidad intelectual es el síndrome de X frágil.
7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la discapacidad intelectual es el síndrome de Koolen-deVries.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la discapacidad intelectual es la enfermedad de Niemann Pick.
- 25 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que la discapacidad intelectual es el síndrome de Down.



LA FIGURA