

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 792**

51 Int. Cl.:

A61K 38/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2018** **PCT/US2018/049884**
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2019** **WO19051182**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2018** **E 18855099 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3678739**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA) y otros trastornos neurodegenerativos asociados con depósitos de amiloide aberrantes**

30 Prioridad:

07.09.2017 US 201762555496 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.08.2024

73 Titular/es:

**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**HAKONARSON, HAKON;
GUTIERREZ-UZQUIZA, ALVARO y
MARCH, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 977 792 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 métodos para el tratamiento de la angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA) y otros trastornos neurodegenerativos asociados con depósitos de amiloide aberrantes

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la angiopatía, incluyendo más particularmente la angiopatía amiloide cerebral y los trastornos neurodegenerativos, asociados con la formación de fibrillas patógenas. Más específicamente, la invención se refiere al tratamiento y manejo de enfermedades asociadas con la formación aberrante de fibrillas, particularmente angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA, por sus siglas en inglés).

Antecedentes de la invención

A lo largo de la memoria descriptiva se citan varias publicaciones y documentos de patente para describir el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

La angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA) es una enfermedad de herencia dominante causada por una variante de leucina 68 a glutamina de la cistatina C humana (hCC; L68Q-hCC).¹ La HCCAA se clasifica como una angiopatía amiloide cerebral (CAA, por sus siglas en inglés), un grupo de enfermedades en las que se forman depósitos de amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos del sistema nervioso central (SNC). Aunque la HCCAA se clasifica correctamente como un trastorno CAA debido a su fuerte presentación cerebral, el depósito de hCC es sistémico y también se encuentra en otros órganos internos. La mayoría de los portadores de la mutación padecen microinfartos y hemorragias cerebrales a los veinte años, lo que provoca parálisis, demencia y muerte en adultos jóvenes, con una esperanza de vida promedio de 30 años.²⁻⁶ Los estudios *post mortem* en seres humanos muestran que la hCC se deposita en todas las áreas del cerebro, tanto la sustancia gris como la blanca, sobre todo en las arterias y arteriolas.

La cistatina C humana, un inhibidor de cisteína proteasa que pertenece a la superfamilia de las cistatinas, es una cistatina secretora de tipo 2, expresada en todas las células humanas nucleadas y que se encuentra en todos los tejidos y fluidos corporales y en concentraciones particularmente altas en el líquido cefalorraquídeo.^{2, 7-9} La hCC inhibe cisteína proteasas como la papaína y la leguminosa mediante su interacción a través de múltiples motivos de unión resultantes del pliegue característico de hCC.⁹⁻¹¹ Su conformación normal está compuesta por un polipéptido que se pliega en una lámina β de cinco cadenas, que se envuelve parcialmente alrededor de una hélice α central. El segmento en el extremo N y dos bucles en horquilla forman el borde de la proteína, que se une al sitio activo de las cisteína proteasas y bloquea su actividad proteolítica.¹²⁻¹⁴ La mutación de la leucina 68 en ácido glutámico desestabiliza el empaquetamiento entre las láminas beta y la hélice alfa, lo que permite que la molécula se abra. Dos de estas moléculas abiertas de hCC pueden interactuar entre sí, interactuando la hélice de cada molécula con la lámina beta de la otra; se dice que el dímero resultante es el producto del intercambio de dominios.¹⁵⁻¹⁷ De manera adicional, mediante un proceso llamado intercambio de dominios propagados, se pueden construir largas cadenas de moléculas, en las que el dominio libre de cada molécula interactúa con un nuevo monómero de hCC.¹⁸ La agregación de proteínas conduce a la formación de agregados fibrilares patógenos altamente ordenados, llamados fibrillas de amiloide^{19, 20}, que están implicados no sólo en la HCCAA sino también en una amplia variedad de enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Huntington y otras CAA.²⁰

Se ha demostrado que el grado de maduración de amiloide observado en los depósitos de cistatina C varía entre los tejidos (es decir, una maduración menos prominente en la piel que en el cerebro).²¹ Aunque los depósitos en la piel no están compuestos de fibras de amiloide, los estudios cuantitativos sobre la deposición de hCC en la piel de portadores mutantes mostró que los portadores sintomáticos tenían niveles significativamente más altos de inmunorreactividad de hCC en su piel que los portadores asintomáticos. El hecho de que la cantidad de depósito de hCC en la piel se asociara con la progresión de la enfermedad en el SNC muestra que las biopsias de piel podrían usarse para evaluar la progresión de la enfermedad y, por lo tanto, podrían ser útiles en la evaluación de intervenciones terapéuticas.²²

Los oligómeros proteicos de diferentes proteínas amiloidogénicas patógenas preceden a la etapa de formación de fibrillas en la HCCAA y otras enfermedades, aunque para la HCCAA no está claro si dichos oligómeros conducen directamente a fibrillas patógenas, o si el ensamblaje de fibrillas se produce más rápidamente a partir de monómeros.²³ Los fármacos reductores la agregación de proteínas productoras de amiloide tienen el potencial de reducir la formación de oligómeros tóxicos que se sabe que se producen en varios tipos de amiloidosis.^{24, 25} Investigaciones anteriores han sugerido que prevenir el intercambio de dominios de hCC podría usarse para el tratamiento de HCCAA;²⁴ Nilsson *et al.* desarrollaron variantes de WT hCC y L68Q-hCC con enlaces disulfuro de estabilización intracatenaria que evitan el intercambio de dominios que podría formar dímeros o fibrillas amiloide.²⁶ Estos resultados sugieren que el conocimiento del mecanismo molecular que causa la transición de proteínas fisiológicamente normales y solubles a tóxicos oligómeros y fibrillas insolubles es esencial para el desarrollo de estrategias de tratamiento.

Östner *et al.* han intentado previamente prevenir la polimerización de monómeros de hCC, o alterar o eliminar especies multiméricas, a través de diversos enfoques.²⁴ Como se ha mencionado, se han usado monómeros de hCC modificados y estabilizados para demostrar que prevenir el intercambio de dominios previene las agregaciones. Los anticuerpos pueden generarse específicamente contra la forma dimérica de hCC con intercambio de dominio; esos anticuerpos fueron capaces de eliminar específicamente los dímeros de hCC, y no los monómeros, del plasma del paciente mediante cromatografía de exclusión por tamaño.²⁷ Se ha llevado a cabo una detección de compuestos de alto rendimiento usando la US Drug Collection (compuesta por 1040 compuestos aprobados por la FDA; (que se encuentra en la web msdiscovery.com/usdrug.html) en un esfuerzo por encontrar moléculas que prevengan la dimerización.²⁴ Aunque prometedor, este enfoque requirió grandes cantidades de proteína hCC purificada producida en bacterias, y los compuestos que se identificaron como inhibidores de la formación de dímeros se usaron en su mayor parte en concentraciones demasiado altas para ser considerados terapéuticos en un organismo.

Claramente, existe la necesidad de métodos y composiciones mejorados para tratar la HCCAA.

15 Sumario de la invención

En el presente documento se divulga un método para tratar la enfermedad por depósitos de amiloide que comprende suministrar una cantidad eficaz de al menos un antioxidante a un paciente, alterando dicho antioxidante dicho depósito de amiloide, aliviando así los síntomas de la enfermedad. Las enfermedades por depósitos de amiloide incluyen, incluyen, por ejemplo, angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Huntington y otras formas de angiopatías amiloides cerebrales tales como la forma holandesa de la enfermedad. La enfermedad amiloide puede ser HCCAA causada por cistatina C mutada. La cistatina C mutada puede comprender una cistatina C L68Q. Los antioxidantes preferidos para su uso en el método divulgado anteriormente incluyen, sin limitación, glutatión, N-acetilcisteína o un derivado de los mismos. Los derivados pueden seleccionarse de NAC-amida, NAC-éster etílico y sal de N-acetilcisteína carboxilato de mercaptida de cinc.

La invención proporciona un derivado funcional de N-acetilcisteína para su uso en un método para el tratamiento de la angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA) en un sujeto humano que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración al sujeto de una cantidad eficaz de dicho derivado funcional en un portador farmacéuticamente aceptable, siendo la administración eficaz para reducir los agregados de proteína amiloide-cistatina, aliviando así los síntomas de la HCCAA. El derivado de NAC se selecciona de NAC-amida, NAC-éster etílico y sal de N-acetilcisteína carboxilato de mercaptida de cinc. Opcionalmente, el método puede implicar realizar una biopsia de piel en dicho sujeto después del tratamiento para evaluar la reducción de los agregados de proteína amiloide-cistatina en la piel o medir el monómero, dímero u oligómero de cistatina C en suero o plasma o la cantidad de monómero excretado en la orina. Las referencias a uno o más métodos para el tratamiento de la presente invención deben interpretarse como referencias a los derivados funcionales de NAC para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano de acuerdo con la reivindicación 1. En determinadas realizaciones, el método puede implicar administración de agentes adicionales que alivian los síntomas de depósitos de amiloide. Estos incluyen, sin limitación, uno o más ionóforos, uno o más agentes antiinflamatorios y una o más proteasas. En otras realizaciones, se administra ARNip dirigido a secuencias codificantes de cistatina C para bloquear selectivamente el alelo mutado.

En el presente documento se divulga un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo asociado con agregados de proteínas de fibrilación patógenas en un sujeto humano que lo necesita. Un método ilustrativo que comprende la administración de una cantidad eficaz de N-acetilcisteína o un derivado funcional de la misma en un portador farmacéuticamente aceptable al sujeto en donde la administración es eficaz para reducir dichos agregados de fibrillas proteicas, aliviando así los síntomas del trastorno neurodegenerativo. El trastorno puede seleccionarse de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Huntington y otras formas de angiopatía amiloide cerebral (CAA), tal como la forma holandesa.

En determinadas realizaciones, los métodos para el tratamiento comprenden controlar los niveles de depósitos de amiloide en dicho paciente.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para identificar agentes terapéuticos que reducen la formación de agregados de proteína amiloide-cistatina, como se establece en la reivindicación 6. Un método ilustrativo comprende proporcionar células que expresan un ácido nucleico que codifica una proteína hCC mutante, causando dicho mutante la formación de agregados de proteínas amiloide-cistatina; y proporcionar células que expresan una proteína hCC que carece de la mutación hCC. Ambas poblaciones de células se ponen en contacto con un agente de prueba y se evalúan para determinar si el agente reduce la formación de agregados de proteína amiloide-cistatina de las células que expresan el mutante en relación con aquellas que expresan la proteína de tipo natural, identificando así agentes que reducen la agregación de proteína amiloide-cistatina. Los agentes así identificados deberían tener eficacia para el tratamiento de HCCAA u otros trastornos asociados con la formación aberrante de fibrillas.

En el presente documento se divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un agente que actúa como antioxidante y/o agente reductor para el tratamiento de la enfermedad por depósitos de amiloide en un portador farmacéuticamente aceptable. Las enfermedades a tratar con la composición incluyen, por ejemplo,

HCCAA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Huntington y otras CAA. El agente puede ser glutatión, N-acetilcisteína o un derivado de los mismos. Preferentemente, el agente es un derivado y se selecciona de NAC-amida, NAC-éster etílico y sal de N-acetilcisteína carboxilato de mercaptida de cinc. Las composiciones divulgadas en el presente documento también pueden comprender uno o más

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: Las células HEK-293T genomanipuladas producen y secretan niveles detectables de hCC (WT o L68Q) capaces de oligomerizarse en condiciones no reductoras. Figura 1A. Representación esquemática de las proteínas hCC mutantes WT y L68Q. La línea discontinua representa el péptido señal en el extremo N sujeto a proteólisis. El rectángulo de color rojo representa la etiqueta Myc añadida al extremo C. Figura 1B. (panel izquierdo) Los lisados de células HEK-293T que expresan de manera estable hCC WT o L68Q mutante o sobrenadantes (panel derecho) se mezclaron con SDS al 2 % con o sin los agentes reductores DTT o β -mercaptoetanol cuando estuviera indicado. Las muestras se sometieron a electroforesis y los niveles de CST3 se examinaron mediante el procedimiento de transferencia de Western usando un anticuerpo anti cistatina C. Figura 1B: La incubación con glutatión altera la di/oligomerización de cistatina C en extractos celulares y sobrenadantes (réplica biológica). Figura 1C. Réplicas biológicas relacionadas con los experimentos que se muestran en la figura 2 donde se incubaron sobrenadantes y extractos celulares en presencia de glutatión durante 1 h a 37 °C con las concentraciones indicadas. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C WB.

Figura 2A: La incubación con glutatión altera la di/oligomerización de cistatina C en extractos celulares y sobrenadantes. Los sobrenadantes y los extractos celulares se incubaron en presencia de glutatión en las concentraciones indicadas durante 1 h a 37 °C. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteína se detectaron mediante transferencia de Western para la cistatina C. (N = 3; * significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (HMW); + significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (monómero)). Figura 2B: El glutatión y la N-acetilcisteína alteran la oligomerización de la cistatina C L68Q secretada (réplicas biológicas). Réplicas biológicas relacionadas con los experimentos mostrados en la figura 3 donde se incubaron los sobrenadantes en presencia de glutatión o NAC durante 1 h a 37 °C con las concentraciones indicadas. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C WB.

Figura 3A: El glutatión y la N-acetilcisteína alteran la oligomerización de la cistatina C L68Q secretada. Los sobrenadantes se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de glutatión o NAC durante 1 h a 37 °C. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteína se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C. El histograma representa la cuantificación por densitometría de las bandas de transferencia de Western para la fracción de alto peso molecular (HMW) con respecto a la muestra no tratada o monómero (Mono) con respecto a la muestra tratada con DTT. No se detectó fracción de HMW en sobrenadantes de células HEK-293T que expresan de manera estable hCC WT. (* significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (HMW); + significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (monómero)). Figura 3B: La N-acetilcisteína altera la oligomerización de la cistatina C L68Q secretada (réplicas biológicas). Réplicas biológicas relacionadas con los experimentos mostrados en la figura 4 donde se incubaron células 293T que expresaban cistatina C WT o L68Q con las cantidades indicadas de compuesto durante 24, 48 o 72 h. Se eliminaron pequeñas cantidades de sobrenadante de las células y se analizaron mediante transferencia de Western en los tiempos indicados. En los días 2 y 3, sólo se analizaron los sobrenadantes de L68Q. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C WB.

Figura 4: NAC altera la oligomerización de hCC L68Q secretada. Se incubaron células 293T que expresaban cistatina C WT o L68Q con medios que contenían la cantidad indicada de GSH o NAC durante 24, 48 o 72 h. Se eliminaron pequeñas cantidades de sobrenadante de las células y se analizaron mediante transferencia de Western en los tiempos indicados. En los días 2 y 3, sólo se analizaron los sobrenadantes de las células que expresaban la variante hCC L68Q. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C. El histograma representa la cuantificación por densitometría de las bandas de transferencia de Western para la fracción de alto peso molecular (HMW) con respecto a la muestra no tratada o monómero (Mono) con respecto a la muestra tratada con DTT. (* significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (HMW); + significativo a P < 0,05 con respecto a sin tratar (monómero)).

Figura 5. La reducción de la actividad de GSH o NAC es fundamental para romper los oligómeros en monómeros de la cistatina C L68Q secretada. Los sobrenadantes se incubaron en presencia de glutatión oxidado (GSSG) o reducido (GSH), NAC o su análogo inactivo (NAS) durante 1 h a 37 °C con las concentraciones indicadas. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C.

Figura 6. La NAC-amida y el NAC-éster etílico alteran la oligomerización de la cistatina C L68 intracelular y secretada. Los sobrenadantes y los extractos celulares se incubaron en presencia de NAC, NAC-amida y NAC-éster metílico durante 1 h a 37 °C con las concentraciones indicadas. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante el anticuerpo anti cistatina C.

Figura 7. Los complejos de alto peso molecular de Cyst-C L68Q se pueden detectar en ratones transgénicos. La incubación breve de NAC altera la oligomerización de Cyst-C L68Q en extractos de sangre y cerebro. Se incubaron extractos de plasma o cerebro en presencia de NAC durante 1 h a 37 °C con las concentraciones indicadas. Las muestras se mezclaron con SDS al 2 % sin agentes reductores antes de la electroforesis, y los niveles de proteínas se detectaron mediante anticuerpo anti cistatina C biotinilado seguido de estreptavidina-HRP.

Figura 8: Efectos de la terapia con NAC en pacientes con HCCAA. La inmunotinción con cistatina C (tinción de color pardo) se realizó en 3 biopsias de piel separadas obtenidas de la misma ubicación de la espalda, de dos miembros de una familia HCCAA que son portadores de la variante hCC L68Q, usando un anticuerpo de conejo anti cistatina C humana. Las biopsias en cada panel izquierdo (biopsia de piel 1 en la figura 8A y la figura 8B) se obtuvieron cuando la familia participó en la investigación durante 2 años antes del inicio de este trabajo. Las biopsias en los paneles de la figura central (biopsia de piel 2 en la figura 8A y la figura 8B) se obtuvieron aproximadamente 18 meses después. Las biopsias en los paneles de la derecha (biopsias de piel n.º 3 en la figura 8A y la figura 8B) de ambos sujetos muestran depósito del complejo de proteína cistatina C después de 6 meses de terapia con NAC. Se observó una marcada reducción en el probando (panel A) y en el progenitor (panel B) después de 6 meses de terapia con NAC. Panel A: Inmunotinción con cistatina C de biopsias de piel del probando. Panel B: Inmunotinción con cistatina C de biopsias de piel del progenitor. Figura 8C. Los monómeros de Cyst-C son detectables a niveles reducidos en la sangre de sujetos portadores de la mutación L68Q. Parece que hay complejos de alto peso molecular presentes en un portador que no está tomando NAC.

Descripción detallada de la invención

Para crear un sistema en el que ensayar la capacidad de un compuesto para afectar a la multimerización de hCC y al mismo tiempo obtener una idea de su toxicidad, se crean líneas celulares que expresan altas cantidades de hCC de tipo natural o mutante. Las líneas celulares y las hCC monoméricas y multiméricas que crean se caracterizaron y se emplearon en experimentos para interferir de forma no tóxica con la agregación de la proteína mutante. De manera adicional, se realizó un estudio de biomarcadores usando NAC para tratar sujetos humanos con HCCAA.

Este sistema facilita la evaluación de la capacidad de una molécula para interferir con la agregación de hCC mutante al mismo tiempo que proporciona información sobre la toxicidad para células u organismos. Se generaron clones de células 293T que sobreexpresan hCC de tipo natural o mutante. Estas células producen y secretan niveles detectables de hCC. De manera importante, se han establecido condiciones que permiten la detección de complejos de alto peso molecular que se forman tanto en lisados como en sobrenadantes de células que expresan hCC mutante que están ausentes en células que expresan cantidades comparables de la proteína de tipo natural. Se pueden detectar los complejos de alto peso molecular de hCC mutante mediante transferencia de Western en condiciones no reductoras. De manera interesante, una breve incubación del lisado o del sobrenadante con uno de dos agentes reductores, ya sea glutatión reducido (GSH) o N-acetilcisteína (NAC), rompe los oligómeros del mutante en monómeros. De manera adicional, el tratamiento de células que expresan hCC L68Q con NAC o GSH reduce la oligomerización de hCC L68Q secretada a las 24, 48 y 72 h. Posteriormente, los pacientes con HCCAA fueron tratados con NAC durante seis meses. Como biomarcador de respuesta, se obtuvieron biopsias de piel para determinar si la tinción para complejos de cistatina C amiloide se redujo en la piel después del tratamiento. El probando, que estaba tomando la dosis más alta y había estado tomando NAC durante 9 meses para tratar los tapones mucosos en sus pulmones y previamente había sufrido 3 accidentes cerebrovasculares importantes durante un período de 9 meses antes de comenzar con NAC, tuvo una reducción de aproximadamente el 75 % en la tinción de amiloide en la piel y no ha tenido ningún acontecimiento durante los 18 meses de terapia con NAC.

En resumen, este estudio proporciona un nuevo modelo celular para ensayar nuevas terapias para el tratamiento de HCCAA y proporciona evidencia clara de que la hCC mutante es un objetivo farmacológico para agentes reductores como NAC. Lo más importante es que los datos implican a NAC como una terapia potencialmente útil para tratar esta devastadora enfermedad según los resultados de los biomarcadores de la piel de tres pacientes con HCCAA.

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar a comprender la materia objeto considerado como la invención.

En esta invención, "un" o "una" significa "al menos uno/a" o "uno/a o más", etc., a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. En el caso de una reivindicación dependiente múltiple, sin embargo, el uso del término "o" se refiere a más de una reivindicación anterior únicamente como alternativa.

Como se usa en el presente documento, "cistatina C humana (hCC)" se refiere a una proteína que funciona como inhibidor de cisteína proteasa que pertenece a la superfamilia de las cistatinas. hCC es una cistatina secretora de tipo

2 y se expresa en todas las células humanas nucleadas. L68Q-hcc se refiere a una hCC mutada en donde una variante de glutamina se sustituye por una leucina en la posición 68.

El término "agente" y la expresión "compuesto de prueba" se usan indistintamente en el presente documento y representan un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente de mamífero). Las macromoléculas biológicas incluyen ARNip, ARNhc, oligonucleótidos no codificantes, péptidos, complejos péptido/ADN y cualquier molécula a base de ácido nucleico que muestre la capacidad de modular la actividad de la hCC. Los agentes de ejemplo incluyen agentes reductores tales como NAC y derivados de la misma usados solos y en combinación. Otros agentes útiles incluyen, sin limitación, glutatión, monensina, papaína, cathepsina B y falcipaina. La actividad biológica de tales agentes se puede evaluar en los ensayos de cribado que se describen a continuación.

"Tratamiento", como se usa en el presente documento, abarca cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad en un mamífero, incluido un ser humano, e incluye inhibir la enfermedad o la progresión de la enfermedad, inhibir o retrasar la enfermedad o su progresión, detener su desarrollo, aliviar parcial o completamente la enfermedad, prevenir la aparición de la enfermedad o prevenir la reaparición de los síntomas de la enfermedad. Los tratamientos de ejemplo incluyen la administración de al menos un derivado de NAC en dosis eficaces.

Los términos "inhibición" o "inhibir" se refieren a una disminución o cese de cualquier acontecimiento (tal como formación de fibrillas) o a una disminución o cese de cualquier característica fenotípica o a la disminución o cese en la incidencia, el grado o la probabilidad de esa característica. "Reducir" o "inhibir" es disminuir, reducir o detener una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia. No es necesario que la inhibición o reducción sea completa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una disminución general del 20 % o más. En otra realización, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una disminución general del 50 % o más. En otra realización más, "reducir" o "inhibir" se refiere a la capacidad de provocar una disminución general del 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o más.

El término "inhibidor" se refiere a un agente que ralentiza o previene una reacción química, vía de señalización u otro proceso particular, o que reduce la actividad de un reactivo, catalizador o enzima particular.

Los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente para referirse a un mamífero, incluido un ser humano.

La N-acetilcisteína (NAC)" es un derivado de cisteína que actúa para reducir los enlaces disulfuro asociados con la formación de fibrillas presente en trastornos neurodegenerativos tales como HCCAA y la enfermedad de Alzheimer. Si bien en el presente documento se ilustran NAC y derivados de éster, se conocen en la técnica otros derivados de NAC y se describen en los siguientes documentos de patente; US3242052, US3591686, US3647834, US3749770, US4016287, US4132803, US4276284, US4331648, US4708965, US4711780, US4721705, US4724239, US4827016, US4859653, US4868114, US4876283, DE150694C, EP0219455A2, EP0269017A2, EP0280606A1, EP0304017A2 y EP0339508A1.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o una "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula de ADN o ARN, ya sea monocatenaria o bicatenaria y, si es monocatenaria, la molécula de su secuencia complementaria en forma lineal o circular. Al analizar las moléculas de ácido nucleico, en el presente documento puede describirse una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

Con referencia a los ácidos nucleicos, a veces se usa la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, cuando se aplica al ADN, se refiere a una molécula de ADN que está separada de secuencias con las que está inmediatamente contigua en el genoma de origen natural del organismo en el que se originó. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector viral, o integrada en el ADN genómico de una célula u organismo hospedador procariótico o eucariota.

Cuando se aplica a ARN, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se ha definido anteriormente. Como alternativa, el término puede referirse a una molécula de ARN que se ha separado suficientemente de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un ácido nucleico aislado (ya sea ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Un "replicón" es cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, cósmido, bácmido, fago o virus, que sea capaz de replicarse en gran medida bajo su propio control. Un replicón puede ser ARN o ADN y puede ser monocatenario o bicatenario.

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, bácmido, fago o virus, al que se puede unir otra secuencia

o elemento genético (ya sea ADN o ARN) para provocar la replicación de la secuencia o elemento unido. Los vectores ilustrativos incluyen, sin limitación, vectores basados en adenovirus, vectores víricos adenoasociados y vectores retrovíricos.

5 Un "operón de expresión" se refiere a un segmento de ácido nucleico que puede poseer secuencias de control de la transcripción y la traducción, tales como promotores, potenciadores, señales de inicio de la traducción (por ejemplo, codones ATG o AUG), señales de poliadenilación, terminadores y similares, y que facilitan la expresión de una secuencia codificante de polipéptido en una célula u organismo hospedador.

10 En el presente documento se usa a veces la expresión "proteína aislada" o "proteína aislada y purificada". Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida por expresión de una molécula de ácido nucleico aislada. Como alternativa, este término puede referirse a una proteína que se ha separado suficientemente de otras proteínas con las que estaría asociada de manera natural, para existir en forma "sustancialmente pura". "Aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieran con la actividad fundamental, y que puedan estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta, la adición de estabilizadores, o la combinación en, por ejemplo, preparaciones inmunogénicas o preparaciones farmacéuticamente aceptables.

20 La expresión "sustancialmente puro" se refiere a una preparación que comprende al menos el 50-60 % en peso de un material determinado (por ejemplo, ácido nucleico, oligonucleótido, proteína, etc.). Más preferentemente, la preparación comprende al menos el 75 % en peso, y mucho más preferentemente el 90-95 % en peso del compuesto dado. La pureza se mide mediante métodos apropiados para el compuesto dado (por ejemplo, métodos cromatográficos, electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, análisis por HPLC y similares).

25 El término "etiqueta", la expresión "secuencia de etiqueta" o "etiqueta de proteína" se refiere a un resto químico, ya sea un nucleótido, oligonucleótido, polinucleótido o un aminoácido, péptido o proteína u otro agente químico, que cuando se añade a otra secuencia, proporciona utilidad adicional o confiere propiedades útiles, particularmente en la detección o aislamiento, a esa secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, se puede añadir una secuencia de ácido nucleico de homopolímero o una secuencia de ácido nucleico complementaria a un oligonucleótido de captura a una secuencia de cebador o sonda para facilitar el aislamiento posterior de un producto de extensión o producto hibridado. En el caso de etiquetas de proteínas, pueden añadirse residuos de histidina (por ejemplo, de 4 a 8 residuos de histidina consecutivos) al extremo amino o carboxi de una proteína para facilitar el aislamiento de proteínas mediante cromatografía de metales quelantes. Como alternativa, pueden añadirse secuencias de aminoácidos, péptidos, proteínas o compañeros de fusión que representan epítomos o determinantes de unión reactivos con moléculas de anticuerpo específicas u otras moléculas (por ejemplo, epítomo bandera, epítomo c-myc, epítomo transmembrana de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza A, proteína A, dominio de unión a celulosa, proteína de unión a calmodulina, proteína de unión a maltosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa y similares) pueden añadirse a las proteínas para facilitar el aislamiento de proteínas mediante procedimientos tales como cromatografía de afinidad o inmovinoafinidad. Los restos de etiquetas químicas incluyen moléculas tales como biotina, que se puede añadir a ácidos nucleicos o proteínas y facilita el aislamiento o la detección mediante interacción con reactivos de avidina y similares. El experto capacitado conoce y puede imaginar numerosos restos de etiquetas diferentes, y se contempla que estén dentro del alcance de esta definición.

45 Como se usan en el presente documento, los términos "indicador", "sistema indicador", "gen indicador", o "producto del gen indicador" significarán un sistema genético operativo en el que un ácido nucleico comprende un gen que codifica un producto que cuando se expresa produce una señal indicadora que es fácilmente medible, por ejemplo, mediante ensayo biológico, inmunoensayo, radioinmunoensayo o mediante métodos colorimétricos, fluorogénicos, quimioluminiscentes u otros. El ácido nucleico puede ser ARN o ADN, lineal o circular, monocatenario o bicatenario, de polaridad no codificante o codificante, y está unido operativamente a los elementos de control necesarios para la expresión del producto del gen indicador. Los elementos de control requeridos variarán de acuerdo con la naturaleza del sistema indicador y si el gen indicador está en forma de ADN o ARN, pero pueden incluir, pero sin limitación, elementos tales como promotores, potenciadores, secuencias de control de la traducción, señales de adición de poli A, señales de terminación de la transcripción y similares.

55 Los términos "transformar", "transfectar", "transducir" se referirán a cualquier método o medio por el cual un ácido nucleico se introduce en una célula u organismo hospedador y pueden usarse indistintamente para transmitir el mismo significado. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, transfección, electroporación, microinyección, fusión de PEG y similares.

60 El ácido nucleico introducido puede o no estar integrado (unido covalentemente) en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor. En células bacterianas, de levadura, vegetales y de mamífero, por ejemplo, el ácido nucleico introducido puede mantenerse como un elemento episomal o replicón independiente tal como un plásmido. Como alternativa, el ácido nucleico introducido puede integrarse en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor y mantenerse de forma estable en esa célula u organismo y a continuación transmitirse adicionalmente o heredarse por células de la progenie u organismos de la célula u organismo receptor. De otras maneras, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula receptora o en el organismo hospedador solo de forma transitoria.

Un "clon" o "población de células clonales" es una población de células procedentes de una única célula o ancestro común por mitosis.

- 5 Una "línea celular" es un clon de una célula primaria o población de células que tiene capacidad de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Métodos y usos para tratar la HCCAA y otros trastornos neurodegenerativos

- 10 La invención proporciona un derivado funcional de NAC para su uso en un método para el tratamiento de HCCAA, como se establece en la reivindicación 1. El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, incluye cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para una enfermedad o trastorno en un sujeto, e incluye inhibir la enfermedad, detener su desarrollo, aliviar los síntomas de la enfermedad o prevenir la aparición o reaparición de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad.

- 15 En algunas realizaciones, los métodos para el tratamiento comprenden identificar o diagnosticar que un sujeto tiene una alteración genética en hCC causante de la HCCAA, y administrar un derivado funcional de NAC al sujeto identificado o diagnosticado. En otros métodos divulgados en el presente documento, el sujeto puede tener una enfermedad diferente asociada con la formación patológica de fibrillas, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de
20 Alzheimer.

- La dosis o dosis de tratamiento total (cuando se van a modular dos o más dianas) se pueden administrar a un sujeto como una dosis única o se pueden administrar usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran dosis múltiples/separadas durante un período de tiempo más prolongado, por ejemplo, durante el período
25 de un día para permitir la administración de una dosis diaria o durante un período de tiempo más largo para administrar una dosis durante un período de tiempo deseado. Un experto en la técnica sabría que la cantidad de agente terapéutico necesaria para obtener una dosis eficaz en un sujeto depende de muchos factores, incluyendo la edad, el peso y el estado general del sujeto, así como la vía de administración y el número de tratamientos a administrar. En vista de estos factores, el experto ajustaría la dosis particular para obtener una dosis eficaz para tratar a un individuo que tenga
30 HCCAA.

- La dosis eficaz de uno o más agentes terapéuticos dependerá del modo de administración y del peso del individuo que se está tratando. Las dosis descritas en el presente documento son generalmente las de un adulto promedio, pero pueden ajustarse para el tratamiento de niños. La dosis generalmente variará de aproximadamente 0,001 mg a
35 aproximadamente 1000 mg.

- En un individuo que padece una forma más grave de la enfermedad, la administración de agentes terapéuticos puede ser particularmente útil cuando se administran en combinación, por ejemplo, con un agente convencional para tratar tal enfermedad. El experto en la técnica administraría uno o más agentes terapéuticos, solos o en combinación, y
40 controlaría la eficacia de dicho tratamiento usando métodos de rutina tales como determinación de la función neurológica o pulmonar, ensayos radiológicos o inmunológicos o, cuando esté indicado, métodos histopatológicos.

- La administración de la preparación farmacéutica es preferentemente en una "cantidad eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio al individuo. Esta cantidad previene, alivia, disminuye o reduce de otro modo la gravedad de los síntomas de la HCCAA en un paciente. El tratamiento de pacientes con HCCAA con una cantidad eficaz de un derivado funcional de NAC puede producir mejoras en la función neurológica, la función respiratoria, la reducción gradual del uso de medicamentos concomitantes o una mayor supervivencia.

- La preparación farmacéutica se formula en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de la preparación farmacéutica apropiada para el paciente sometido a tratamiento. Cada dosis debe contener una cantidad de principio activo calculada para producir el efecto deseado en asociación con el portador farmacéutico seleccionado. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para determinar la unidad de dosificación apropiada.

- 55 Las unidades de dosificación pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente en función del peso del paciente. Las concentraciones apropiadas para el alivio de una condición patológica particular pueden determinarse mediante cálculos de la curva de concentración de dosis, como se conoce en la técnica.

- 60 Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos para el tratamiento de la presente invención pueden administrarse sistémicamente en formulaciones parenterales, orales sólidas y líquidas, por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, sublingual, tópica, intraperitoneal, nasal, percutánea, respiratoria, oftálmica, supositorio, aerosol, tópica u otras vías de administración conocidas. Además de los derivados de NAC usados para tratar una HCCAA de acuerdo con la reivindicación 1, las composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes para potenciar y facilitar la administración de fármacos. Por lo tanto, tales composiciones pueden contener opcionalmente otros componentes, tales como adyuvantes, por ejemplo,

suspensiones acuosas de hidróxidos de aluminio y magnesio, y/u otros portadores farmacéuticamente aceptables, tales como una solución salina. También pueden usarse otras formulaciones posibles, tales como nanopartículas, liposomas, eritrocitos resellados y sistemas de base inmunológica para suministrar/administrar el agente apropiado a un paciente de acuerdo con los métodos de tratamiento de la presente invención. El uso de nanopartículas para suministrar dichos agentes, así como portadores peptídicos permeables a la membrana celular que se pueden usar, se describen en Crombez *et al.*, Biochemical Society Transactions v35:p44 (2007).

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes antiinflamatorios para administración conjunta para aliviar aún más los síntomas de la enfermedad amiloide. Estos incluyen, sin limitación, corticoesteroides, aspirina, celecoxib, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, salsalato, sulindaco, tolmetina, antagonista del receptor de interleucina (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, receptores de citocinas para IL-1, factor de necrosis tumoral alfa, IL-18 y derivados y biosimilares de los mismos.

Los siguientes materiales y métodos se proporcionan para facilitar la práctica de la presente invención.

Células y construcciones de expresión de hCC WT frente a la variante L68Q

Se obtuvieron células 293 (HEK-293T) de riñón embrionario humano de la ATCC (Manassas, Virginia) y se cultivaron a 37 °C en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 %. Se obtuvo un plásmido que contenía un ADNc de CST3 de Dharmacon (Lafayette, CO). La secuencia codificante de longitud completa se amplificó con una etiqueta Myc en el extremo C mediante PCR usando el cebador directo GATCGAATTGCCACCATGGCCGGGCCCTGCGCG (SEQ ID NO: 1) y el cebador inverso TCGCGGCCGCTACAGATCCTCTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGCGTCCTGACAGGT GGATTTCG (SEQ ID NO: 2) y se ligó en los sitios *EcoRI* y *NotI* de pBABE-CMV-Puro.⁵⁸ La mutación L68Q se introdujo mediante mutagénesis de sitio dirigido QuikChange (Agilent, Santa Clara, CA) usando cebadores: GTGAACACTTCTTGGACGTCGAGCAGGGCCGAACACGTGTACC (SEQ ID NO: 3) y GGTACACGTGGTTCGGCCCTGCTCGACGTCCAAGAAGTAGTTCAC (SEQ ID NO: 4). Todas las secuencias se confirmaron mediante secuenciación de Sanger. Se transfectaron construcciones mutantes y de tipo natural en células HEK-293T usando Eugene HD (Promega, Madison, WI), con 3 µg de ADN y 9 µl del reactivo de transfección, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la transfección, las células se incubaron con medio nuevo que contenía puomicina (1 µg/ml) durante 3 semanas. Después de la selección, se generaron clones estables de cada transfectante mediante dilución limitante. Los clones se examinaron mediante transferencia de Western usando el anticuerpo anti hCistatina C MAB1196 (R&D, Mineápolis, MN).

Transferencia de Western

Las células HEK-293T que expresaban hCC WT o la variante L68Q se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada con hielo y se lisaron en hielo usando un tampón de lisis celular recién preparado enfriado con hielo que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, β-glicerofosfato 50 mM, glicerol al 10 % (p/v), NP-40 al 1 % (p/v), EDTA 1 mM, NaVO₄ 2 mM y un cóctel inhibidor de proteínas completo, sin EDTA (Roche Applied Science, Mannheim Alemania) a 20 µl por ml de tampón de lisis. Después de aclarar los lisados celulares mediante centrifugación (10 minutos, 21.000 x g, 4 °C), los sobrenadantes se recogieron y se usaron para la transferencia de Western. Se añadió tampón de muestra que contenía SDS, glicerol, Tris-HCl a pH 6,8 y azul de bromofenol a cada muestra hasta las siguientes concentraciones finales: SDS al 2 %, glicerol al 10 %, Tris-HCl 50 mM, azul de bromofenol al 0,02 %. En las muestras que se redujeron, se añadió DTT (concentración final de 50 mM) o β-mercaptoetanol (concentración final del 5 %). Se cargaron volúmenes equivalentes de muestras de lisado o sobrenadante en geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA) sin calentar/hervir. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, Billerica, MA), se transfirieron con anti hCistatina C y se revelaron mediante quimioluminiscencia mejorada (ECL; Thermo Fisher Scientific). Se escanearon películas ECL y se determinaron las densidades de las bandas usando las características de análisis de gel de Fiji.⁵⁹

Tratamientos farmacológicos

Se sembraron células HEK-293T en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 2 días, momento en el que se añadió glutatión reducido (GSH) (Sigma, St. Louis, MO) o N-acetilcisteína (NAC) (Sigma) a las concentraciones indicadas. Las células se incubaron con los compuestos durante 72 horas y se eliminaron muestras de 100 µl de sobrenadantes a las 24, 48 y 72 horas. Los sobrenadantes se aclararon mediante centrifugación (10 minutos, 21.000 x g, 4 °C). Se añadió tampón de muestra que contenía SDS, glicerol, Tris-HCl a pH 6,8 y azul de bromofenol a cada muestra hasta las siguientes concentraciones finales: SDS al 2 %, glicerol al 10 %, Tris-HCl 50 mM, azul de bromofenol al 0,02 %. Cuando se indicó, las células se lavaron con PBS y se lisaron, y los niveles de cistatina C se determinaron mediante análisis de transferencia de Western.

Análisis estadístico

Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los datos. Se usaron pruebas de la prueba de la T unilateral

para determinar el nivel de significación con respecto a las muestras no tratadas, considerándose $p < 0,05$ estadísticamente significativo.

Tratamiento de pacientes con HCCAA con NAC

Se tomaron tres biopsias de piel de 4 mm de la espalda de cada uno de los tres individuos estudiados. Las biopsias de piel se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina. Se cortaron en secciones de 3 μ m para determinar la inmunohistoquímica y se inmunotifieron con anticuerpo policlonal de cistatina C de conejo (Sigma, HPA013143) usando el sistema de detección EnVision como se ha descrito previamente.²² La inmunorreactividad de hCC en las biopsias de piel de los portadores se cuantificó mediante análisis de imágenes semiautomático usando el software ImageJ como se ha descrito previamente.²² Se capturaron imágenes de campo brillante de cada sección de los portadores usando un objetivo x20/0,3NA. Las imágenes en color RGB de las secciones se importaron a ImageJ. En cada imagen, se definió una región de interés (ROI) rectangular de 2000 x 2000 píxeles. El procesamiento posterior que arrojó el % de cobertura de área de la inmunorreactividad de hCC dentro de cada ROI se realizó como se ha descrito previamente.²² La primera biopsia fue una biopsia histórica tomada aproximadamente 2 años antes del comienzo del estudio, durante el cual el probando había experimentado más de 9 meses de terapia con NAC (400 mg 4 veces al día) para tratar la obstrucción de moco en los pulmones después de su tercer accidente cerebrovascular. La segunda biopsia se tomó inmediatamente antes del inicio del tratamiento con NAC en toda la familia (600 mg de NAC 3 veces al día durante 6 meses). La tercera biopsia se tomó después de 6 meses de terapia con 600 mg 3 veces al día de NAC.

El probando recibió 400 mg de NAC 4 veces al día durante 9 meses seguido de 600 mg 3 veces al día durante 6 meses. El padre recibió sólo el tratamiento de 600 mg 3 veces al día durante 6 meses. El probando nunca olvidó una dosis; los padres omitieron la dosis media 2-3 veces por semana.

Aprobación del estudio

Todos los permisos necesarios para el uso de biopsias de piel de portadores de L68Q-CST3, y los registros asociados con las muestras, así como la información médica, se obtuvieron del National Bioethics Committee de Islandia, números de referencia 04-046-S2 y 15-060-S1. Ambos miembros de la familia firmaron el consentimiento informado. La terapia con NAC se prescribió clínica y casualmente como terapia mucolítica para tratar la atelectasia pulmonar en el probando. El otro miembro de la familia tomó NAC como complemento dietético (es decir, compró NAC en línea a través de Amazon).

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar determinadas realizaciones de la invención. No se pretende limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLO I

Como se ha analizado anteriormente, la HCCAA es una enfermedad de herencia dominante causada por una variante de leucina 68 a glutamina de la cistatina C humana (hCC; L68Q-hCC) (referencia). La mayoría de los portadores de la mutación padecen microinfartos y hemorragias cerebrales a los veinte años, lo que provoca parálisis, demencia y muerte en adultos jóvenes, con una esperanza de vida media de 30 años (1-5). Los estudios *post mortem* en seres humanos muestran que la hCC se depositó en todas las áreas del cerebro, tanto la sustancia gris como la blanca, sobre todo en las arterias y arteriolas. Estos depósitos están compuestos por fibras de amiloide, que consisten en hCC; esto se puede demostrar mediante la tinción del tejido *post mortem* con tinción roja Congo, que hace que las estructuras amiloides muestren birrefringencia bajo luz polarizada (6).

Para crear un sistema en el que ensayar la capacidad de un compuesto para afectar a la multimerización de hCC y al mismo tiempo obtener una idea de su toxicidad, se crean líneas celulares que expresan altas cantidades de hCC de tipo natural o mutante. Este ejemplo describe nuestra caracterización de las líneas celulares y las hCC monoméricas y multiméricas que crean, intenta interferir de forma no tóxica con la agregación de la proteína mutante, así como un estudio piloto de biomarcadores que usa NAC para tratar sujetos humanos con HCCAA.

Las células HEK-293T genomanipuladas producen y secretan hCC (wt o L68Q) capaz de oligomerizarse en condiciones no reductoras.

Para identificar agentes terapéuticos capaces de detener la producción de oligómeros y fibrillas de hCC L68Q, se generaron células HEK-293T genomanipuladas con la expresión de hCC de tipo natural (WT) o mutante L68Q. La proteína se marcó en el extremo C con una etiqueta myc; se eligió el etiquetado en el extremo C para evitar cualquier interferencia con la escisión del péptido señal o la secreción de la proteína producida que pueda ser resultado del etiquetado en el extremo N. Después de la integración estable de estas construcciones en las células HEK-293T, se controlaron los niveles secretados e intracelulares en estado estacionario de hCC WT y la variante L68Q. El análisis de hCC se desarrolló mediante un sistema de electroforesis en gel SDS-PAGE que permite la formación y detección de oligómeros de bajo y alto peso molecular (LMW y HMW). Como se muestra en la figura 1A, las células producen y secretan niveles detectables de ambos, hCC WT o la variante L68Q, capaces de oligomerizarse en condiciones no

reductoras (carriles n.º 1 y 3). Las células que expresan WT y L68Q contienen niveles similares de proteína hCC en los lisados, lo que indica niveles de expresión similares. Sin embargo, los sobrenadantes condicionados de las células que expresan L68Q contienen mucha menos proteína hCC que los sobrenadantes de las células que expresan WT. Esto indica que la proteína variante L68Q no se secreta en las células con tanta eficacia como la WT, lo que coincide con informes anteriores (17, 18). Mientras que la hCC WT intracelular existe predominantemente como monómero, con un pequeño porcentaje de dímero (99 y 1 %, respectivamente), se encontró que la variante intracelular L68Q de hCC forma un monómero, un dímero pero también especies LMW y HMW como se esperaba debido a su mayor propensión a formar oligómeros (19). De manera interesante, la forma secretada de hCC WT se comporta de manera similar a la fracción intracelular, y se encuentra principalmente como un monómero. En comparación, la hCC L68Q secretada se encuentra sólo como HMW. Cabe destacar que la oligomerización de ambas proteínas, WT y la variante L68Q, queda completamente abolida en presencia de agentes reductores DTT o b-mercaptoetanol; ambos son agentes reductores fuertes que provocan la reducción de un enlace disulfuro típico.

Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar el nivel de proteína hCC en células 293T no transfectadas o que expresan WT y L68Q. La proteína hCC se expresó principalmente en el citoplasma. Muestra una distribución subcelular consistente con la localización informada previamente en endosomas tardíos/prelisosomas, así como en el compartimento de Golgi/RE/endosómico temprano, este último en gran concordancia con las características típicas de una proteína secretora (20).

La incubación con glutatión altera la di/oligomerización de hCC en extractos celulares y sobrenadantes

El agotamiento de LMW y HMW en presencia de DTT o β -mercaptoetanol resalta la importancia de los enlaces disulfuro para el proceso de dimerización/oligomerización; por lo tanto, se plantea la hipótesis de que el tratamiento con otros agentes reductores alterará la dimerización. Se caracteriza ampliamente el efecto de los agentes reductores sobre los niveles de dimerización/oligomerización de los niveles secretados e intracelulares de hCC WT y la variante L68Q. Los sobrenadantes y extractos celulares se trataron con diferentes concentraciones de GSH a 37 °C durante 15 min. Particularmente, como muestra la figura 2A, los tratamientos con 3 o 10 mM de GSH redujeron gravemente la cantidad de dímero y/u oligómero de HMW observado tanto en la fracción secretada como en la intracelular de hCC WT o la variante L68Q. La cuantificación de estos resultados por densitometría muestra que 3 mM de GSH mostraron una inhibición de ≈ 90 % del HMW en la fracción secretada y una inhibición de ≈ 50 % en la fracción intracelular de la variante L68Q hCC (figura 2A y figura 1B).

La incubación con NAC o glutatión altera la dimerización de la hCC L68Q secretada

El par de glutatión oxidado/reducido es fundamental para luchar contra el estrés oxidativo y, como se muestra en la figura 2, puede alterar eficazmente los dímeros y oligómeros HMW de hCC. Por consiguiente, se analizó si otro agente reductor, el complemento dietético NAC de uso común (con efectos antioxidantes similares a GSH) afectaría la oligomerización/dimerización de la hCC secretada. Los sobrenadantes se trataron con diferentes concentraciones de GSH y NAC a 37 °C durante 60 min. Como muestra la figura 3A, los tratamientos con 3 o 10 mM de glutatión o NAC reducen gravemente los niveles de oligomerización/dimerización de la variante hCC L68Q secretada *in vitro*. La cuantificación mostró una ablación casi completa de HMW con una concentración de 3 mM de GSH o NAC (figura 3A y figura 2B). Este resultado demuestra claramente que GSH o NAC son capaces de disminuir los niveles de oligomerización de la versión patógena de hCC L68Q y pueden usarse potencialmente para el tratamiento de pacientes con HCCAA.

La presencia de GSH o NAC reduce la oligomerización de la cistatina C L68Q secretada a las 24, 48 y 72 h

Para investigar si el efecto de NAC o GSH reduce la oligomerización de hCC L68Q secretada en un sistema celular que refleja más la biología *in vivo*, se trataron células que expresaban hCC WT o L68Q con ambos agentes. Las células se sembraron en placas y se les permitió secretar hCC durante 48 horas, momento en el que se añadieron a los cultivos concentraciones crecientes de GSH o NAC. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia de agentes reductores, y las muestras de los sobrenadantes se retiraron después de 24, 48 y 72 horas. El estado de oligomerización de hCC se determinó mediante transferencia de Western en cada punto temporal. Las células fueron viables durante la duración del experimento en presencia de todas las concentraciones (hasta 10 mM) de ambos agentes reductores. La proliferación de las células se vio ligeramente afectada con la concentración más alta de 10 mM (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 4 (y la figura 3B), el tratamiento de células con 10 mM de GSH o NAC eliminó completamente la presencia de HMW y LMW a las 24 h y 48 h, y una reducción apreciable pero incompleta de HMW y LMW persistió a las 72 h. Los tratamientos con dosis más bajas de NAC o GSH solo fueron incompletamente eficaces a las 24 y 48 h y no se detectó ningún efecto significativo después de 72 h.

Está claro que el tratamiento con agentes reductores tales como NAC o glutatión reducido de sobrenadantes o extractos celulares de líneas celulares genomanipuladas para sobreexpresar la versión mutante de cistatina C humana (Cyst-C) reduce la formación de complejos de alto peso molecular de Cyst-t mutante L68Q. Para determinar si los efectos de la NAC y el GSH se deben a su capacidad como agentes reductores o a algunas otras propiedades de los compuestos, los sobrenadantes y los extractos celulares se trataron con compuestos estructuralmente similares a NAC y GSH que carecen de actividad reductora. Como se muestra en la figura 5, el tratamiento con n-acetil-serina

(NAS), donde el grupo sulfhidrilo reductor en NAC se reemplaza por un grupo hidroxilo, o con la forma oxidada de glutatión (GSSH), no afecta a los complejos de alto peso molecular de L68Q Cyst-C, mientras que se observó una reducción significativa con ambos agentes reductores. La actividad reductora de NAC o GSH es necesaria para los efectos sobre la oligomerización de Cyst-C.

Se han generado múltiples derivados de NAC que exhiben actividad reductora y biodisponibilidad mejoradas, así como la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica. Se han ensayado dos derivados de NAC con este sistema de cultivo celular. Como se muestra en la figura 6, tanto un derivado de amida como de éster metílico de NAC conservan la capacidad de alterar complejos de alto peso molecular de L68Q Cyst-C, cuando se tratan *in vitro* sobrenadantes o extractos celulares. Estos datos también indican que ambos derivados pueden ser ligeramente más potentes en su capacidad para alterar la oligomerización, ya que se observó una pérdida de señal de alto peso molecular con 1 mM de los derivados equivalente a la observada con 10 mM de NAC.

Se han generado resultados adicionales a partir de ratones transgénicos que se obtuvieron de nuestro colaborador Eufat Levy en la Universidad de Nueva York. Estos ratones han sido transformados con un ADN genómico humano que contiene la secuencia codificante de Cyst-C, pero carece de porciones no codificantes del gen que puedan afectar a los niveles de expresión. Los ratones no muestran un fenotipo comparable al de HCCAA. Sin embargo, como se muestra en la figura 7, se ha podido mostrar la presencia de complejos de Cyst-C de alto peso molecular tanto en el cerebro como en la sangre de animales transgénicos. Las transferencias Western de extractos tisulares de ratón no son tan limpias como las transferencias del sistema celular, ya que el anticuerpo que se usa para la detección se generó en un ratón. A pesar de esta complicación, la comparación de los ratones transgénicos (números 6028 y 6019) con el animal C57Bl6 no transgénico muestra una señal considerable causada por la Cyst-C humana transgénica. Aunque se observan varias bandas no específicas de alto peso molecular en las muestras no transgénicas, se observa una "mancha" clara de alto peso molecular en los animales transgénicos, consistente con lo que se observa en el sobrenadante del sistema de cultivo celular. El tratamiento con NAC reduce esta mancha y provoca la aparición de monómero, demostrando que la NAC es capaz de reducir la oligomerización en muestras biológicas.

Efectos de la terapia con NAC en pacientes con HCCAA

Hay varios cientos de pacientes en Islandia que padecen HCCAA (es decir, que padecen accidentes cerebrovasculares importantes cuando tienen poco más de 20 años) y todos ellos son el resultado de una mutación fundadora de principios del siglo XVI. Se han realizado RNAseq en 30 sujetos de 3 familias multiplex y se ha demostrado que los genes implicados en la enfermedad coronaria, el accidente cerebrovascular y la aterosclerosis están regulados positivamente en los portadores de mutaciones de cistatina C. Como no hay terapia disponible para estos pacientes, una intervención que tiene el potencial de retrasar o revertir el proceso de la enfermedad sería fácilmente aprobado por la Agencia de Medicamentos de Islandia. La dimerización de la fibra de amiloide es una etapa crítica en el proceso de deposición de amiloide en arterias cerebrales de tamaño pequeño y mediano. En ensayos basados en células, se ha demostrado que tanto las proteínas de tipo natural como las mutadas se expresan y que la expresión de la proteína mutada se dimeriza, un proceso que puede inhibirse. Por lo tanto, se anticiparía que los fármacos que bloquean la dimerización de las fibras de amiloide serían eficaces para prevenir el depósito de amiloide y detener la progresión del proceso de la enfermedad, presentando así una terapia eficaz.

La figura 8A demuestra los cambios en la tinción de la biopsia 1 obtenida en los 3 individuos, hace 2 años, la biopsia 2 obtenida hace 6 meses, y la biopsia 3 obtenida hace 2 semanas después de 6 meses de terapia con NAC. Entonces, en general, el fármaco reduce la intensidad del biomarcador (agregado de proteína amiloide-cistatina) en la piel, lo que sugiere que la precipitación de amiloide en otros órganos también se reduce como se ha demostrado previamente (21).

Basándose en los resultados de tinción que miden los agregados del complejo de proteína amiloide-cistatina en la piel, se hizo evidente que la probando que tenía un nivel muy alto de tinción de amiloide-cistatina en la primera biopsia de piel no había progresado de ninguna manera significativa (medido por la intensidad de la tinción) entre las biopsias de piel n.º 1 y n.º 2, mientras que su padre y su hermano mayor (ambos también son portadores del mutante L68Q) mostraron una progresión significativa en la intensidad de la tinción, lo que refleja un aumento de la precipitación del complejo de amiloide en la piel con el tiempo en ausencia de terapia con NAC. Cabe destacar que la probando estuvo tomando el medicamento NAC durante aproximadamente 9 meses para tratar sus pulmones. Había interrumpido la terapia sólo unos meses antes de la segunda biopsia. La segunda biopsia se realizó primero como punto de referencia para servir como biomarcador de respuesta a la terapia con NAC posterior.

Las tres biopsias de cada individuo se tificaron todas juntas al mismo tiempo, para una comparación legítima. La probando principal (accidente cerebrovascular 3 veces en 9 meses) cumplió al 100 % la terapia con NAC de 600 mg 3 veces al día y demostró una reducción muy visible en la tinción de amiloide en comparación con su biopsia de piel original, lo que representó una reducción del 75 % al de los 6 meses de terapia prospectiva (figura 8A). La reducción de la tinción de su padre ascendió al 50 % y la reducción de la tinción de la biopsia de su hermana fue menos obvia ya que ella había tomado dosis más bajas de NAC como se indica en las secciones de material y métodos.

Finalmente, se adquirieron muestras de sangre de 7 miembros de una familia islandesa que se sabe que son

portadores de la mutación L68Q. Cinco de los miembros de la familia tenían un estado de mutación conocido (3 portadores de L68Q, 2 de tipo natural), y el ADN de todos los individuos se secuenció por Sanger para confirmar los estados conocidos y determinar el estado de los individuos no examinados previamente, uno de los cuales se encontró que portaba la mutación. El estado de la mutación y la relación con el probando de esta familia se muestran en la figura 8B. La transferencia de Western de plasma en condiciones reductoras mostró una reducción de la cantidad de Cyst-C total en portadores adultos de la mutación L68Q (probando, hermano, padre). El niño portador no mostró una reducción en la cantidad de proteínas, lo que indica posibles efectos relacionados con la edad (tampoco en ninguna terapia). La transferencia de muestras no reducidas mostró la detección de complejos de alto peso molecular en el niño portador. En otros sujetos, la interpretación de estos resultados se complica por el hecho de que todos los portadores adultos de la mutación toman NAC con regularidad. Es posible que los oligómeros sean detectables en portadores adultos de L68Q que no toman NAC.

Se ha propuesto que ambos derivados de NAC tienen una mayor permeabilidad de la membrana, debido a la sustitución de un grupo hidroxilo con sustituyentes menos polares. El aumento de la permeabilidad de la membrana a menudo se correlaciona con un mejor cruce de la barrera hematoencefálica. Para acceder a la permeabilidad de la membrana de los compuestos derivados, se trataron células vivas con NAC o los derivados. Si los compuestos cruzan la membrana celular, se espera ver impactos de los derivados en la acumulación de oligómeros intracelulares de L68Q Cyst-C. Como se muestra en la figura 6, los compuestos redujeron la cantidad de Cyst-C de alto peso molecular en los sobrenadantes. Es probable que los efectos menores sobre el material intracelular se deban a una cuestión de tiempo. Las células producen continuamente L68Q Cyst-C en niveles sobreexpresados, y cualquier compuesto que ingrese a las células puede consumirse rápidamente, lo que tiene un efecto más temprano que se pierde con el cultivo continuo.

Análisis

La identificación de agentes con la capacidad de reducir la dimerización de hCC y la formación de fibrillas de amiloide es la clave para el desarrollo de fármacos para el tratamiento y/o prevención de la formación de amiloide y la hemorragia cerebral letal asociada con la HCCAA. La variante hCC es responsable de la HCCAA y no existe ningún tratamiento disponible para evitar la muerte prematura por hemorragia cerebral. Aquí, primero se crean células que producen y secretan niveles detectables de hCC (wt o L68Q) capaces de oligomerizarse en condiciones no reductoras, y a continuación se muestra que una incubación corta con GSH o NAC rompe los oligómeros en monómeros de hCC L68Q tanto intracelular como secretada. Se muestra que el tratamiento con NAC o GSH reduce la oligomerización de la hCC L68Q secretada a las 24, 48 y 72 h y que el tratamiento con NAC en pacientes humanos no solo previene la precipitación continua de amiloide en la piel, sino que también reduce significativamente el amiloide previamente precipitado, observándose una reducción de más del 75 % después de 6 meses de tratamiento oral con dosis bien toleradas y sin acontecimientos adversos.

El sistema celular desarrollado se construyó para identificar agentes que pudieran reducir la dimerización de hCC y la formación de fibrillas de amiloide *"in vivo"* tanto de la cistatina C wt como de la variante L68Q. Se habían desarrollado sistemas anteriores para el estudio de la dimerización de hCC, sin embargo, la mayoría de ellos se realizaron principalmente con cistatina C de tipo natural, ya que es extremadamente difícil producir cantidades suficientes de cistatina C monomérica L68Q (14). Las células HEK-293T genomanipuladas con la expresión de hCC wt y L68Q marcadas en el extremo C proporcionan un modelo superior para estudiar y caracterizar el impacto de las moléculas pequeñas en los niveles tanto secretados como intracelulares de hCC wt y L68Q. Es importante resaltar que el estudio y caracterización de agentes que reducen la oligomerización se debe realizar en ambas fracciones porque el comportamiento es diferente; en particular, en la variante L68Q-hCC. Esta variante se encontró principalmente como oligómeros de LMW en la fracción intracelular, pero forma principalmente HMW en el compartimento extracelular. Esto puede deberse a que el proceso de secreción induce la oligomerización de la variante L68Q o a que las condiciones ambientales del compartimento extracelular promueven la oligomerización de esta variante o a que la oligomerización prolonga la semivida de la proteína.

La cistatina C L68Q es altamente amiloidogénica y los sujetos que portan la mutación correspondiente padecen amiloidosis cerebral masiva que conduce a hemorragia cerebral y muerte en la vida adulta temprana (16). Otras enfermedades amiloides tales como Alzheimer, Parkinson y EH tienen orígenes amiloides similares y también son causadas por la acumulación de proteínas mal plegadas. Este efecto de amplio espectro del estrés proteotóxico ha dado lugar al término "proteinopatías" para las enfermedades neurodegenerativas. De manera interesante, el riesgo de contraer cualquiera de estas enfermedades neurodegenerativas aumenta drásticamente con la edad (22), probablemente, como consecuencia de un aumento en el estrés por el mal plegamiento de las proteínas, una actividad reducida del proteasoma y una disminución de las defensas antioxidantes que conducen a una acumulación extracelular de proteínas mal plegadas (22). Las vías del proteasoma y de autofagia-lisosomal son las vías principales para la eliminación de la agregación intracelular. Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos correspondientes que operan extracelularmente y sobre estrategias eficaces para retrasar o prevenir la neurodegeneración resultante de estas enfermedades en seres humanos (23).

El glutatión (GSH) se sintetiza en el citosol a partir de los aminoácidos precursores glutamato, cisteína y glicina y se considera el principal antioxidante endógeno de la célula. Está presente en la célula en diferentes concentraciones,

que pueden llegar hasta 10 mM, dependiendo del compartimento subcelular, estando presente en concentraciones altas en el citosol y muy bajas en el interior del RE (24). Los enlaces disulfuro de proteínas rara vez se forman en el citosol debido a las altas concentraciones de GSH, por el contrario, el lumen del retículo endoplásmico (RE) y el compartimento extracelular contienen una concentración relativamente mayor de glutatión oxidado (GSSG) (25). Esta distribución diferencial de GSH permite la formación de enlaces disulfuro nativos en el RE a través de un proceso complejo que implica no solo la formación de enlaces disulfuro, sino también la isomerización de enlaces disulfuro no nativos. Estos estudios de inmunofluorescencia e informes anteriores indican que la hCC se localiza en los endosomas tardíos/prelisosomas, así como en el compartimento de Golgi/RE/endosómico temprano (20). Esta localización es acorde con las características típicas de una proteína secretora y es consistente con la hipótesis de que L68Q hCC polimeriza en estos compartimentos donde se reduce la exposición al GSH, aumentando así la agregación, explicando así los agregados liberados en el compartimento extracelular.

En condiciones normales, los niveles de GSH están regulados por dos mecanismos principales: controlando las tasas de su síntesis y de su exportación desde las células; sin embargo, los niveles de GSH también están influenciados por agentes o condiciones que alteran el estado redox del tiol que conducen a la formación de conjugados o complejos de glutatión S, y/o que alteran la distribución de GSH entre diversos orgánulos intracelulares. Además, los niveles de GSH se ven afectados por el estado nutricional y los niveles hormonales/de estrés, presentan variaciones diurnas y de desarrollo, y se ven afectados por determinados estados fisiológicos, incluidos el embarazo y el ejercicio (26-33). Los niveles fisiológicos de GSH en sangre deben proporcionar un ambiente antioxidante apropiado que evite la acumulación extracelular de proteínas, sin embargo, la presencia de mutaciones como hCC L68Q o deficiencias en los niveles de GSH, como consecuencia del estado nutricional o la edad, podrían conducir a una acumulación no deseada de proteínas mal plegadas (3). Además, se sabe que la deficiencia de GSH, o una disminución en la relación GSH/disulfuro de glutatión (GSSG), se manifiesta en gran medida a través de una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, y se cree que el daño resultante está implicado en enfermedades tales como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, y está fuertemente asociada con otras patologías relacionadas con la edad (34, 35). Los resultados mostrados en este trabajo indican que la NAC puede representar un enfoque terapéutico interesante para enfermedades amiloides tales como la HCCAA, mediante la reducción de la acumulación de proteínas amiloides.

La acetilcisteína es un derivado de N-acetilo sintético del aminoácido endógeno L-cisteína, un precursor de la enzima antioxidante glutatión. Tanto el GSH como la NAC ya se han aprobado para su uso en seres humanos y se han administrado en dosis altas durante largos períodos sin efectos secundarios adversos. Funcionan como eliminador directo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como fuente de grupos SH, estimulando la síntesis de GSH y aumentando la presencia de 1) grupos SH no proteicos y 2) proteicos. La acetilcisteína, además, también regenera las reservas hepáticas de GSH. Estos efectos confieren a la NAC la capacidad de reducir los enlaces disulfuro y son la razón por la cual la NAC se usa ampliamente para reducir la viscosidad y elasticidad del moco, entre otros usos. Nuestros datos muestran que el tratamiento con antioxidantes tales como GSH y NAC (y también DTT o beta-MetOH) suprime la oligomerización de hCC. Este efecto indica que la formación de enlaces disulfuro es esencial para el proceso de oligomerización. Los enlaces disulfuro no parecen estar directamente implicados en el proceso de dimerización (16), sin embargo, la presencia de dos enlaces disulfuro en la cistatina C humana (como en todas las cistatinas tipo 2) y la preservación de los mismos en la estructura dimerica indica su función clave en el proceso de dimerización (16). Se postula que los enlaces disulfuro intramoleculares son esenciales para el correcto plegamiento del monómero hCC y para el intercambio de "subdominios" tridimensionales entre las dos subunidades del dímero y su deterioro anula la oligomerización.

Nuestros datos muestran que el tratamiento con NAC aumentará la producción de GSH y ambos antioxidantes reducirán la oligomerización de la hCC secretada, reduciendo la formación de amiloide en el cerebro de personas con HCCAA. El tratamiento con GSH puede ser eficaz, sin embargo, su baja biodisponibilidad limita su potencial como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes con HCCAA. La NAC parece el candidato perfecto debido a su función en la restauración de los niveles de GSH, sus propiedades antioxidantes y su capacidad para romper los enlaces disulfuro revisados en (36). Además, la complementación con NAC mejoró significativamente la vasodilatación coronaria y periférica (37). Específicamente para los trastornos cerebrales, la NAC se ha administrado con cierta eficacia en pacientes con enfermedad de Alzheimer (38), y nuestros datos muestran que puede ser una buena alternativa para la HCCAA.

Las membranas celulares, junto con la barrera hematoencefálica, presentan una permeabilidad reducida a la NAC, por lo que el tratamiento con NAC extracelular no parece afectar al estado de dimerización de los niveles intracelulares de L68Q hCC (datos no mostrados). Por consiguiente, para los efectos de los derivados de NAC, incluyendo, sin limitación, se administran preferentemente éster etílico de N-acetilcisteína (NACET) o éster metílico de N-acetilcisteína. Estos novedosos derivados de cisteína de membrana permeable a células lipófilas deberían proporcionar buenos candidatos para el uso oral como un productor de H₂S en el tratamiento de enfermedades amiloides como HCCAA (39).

La reducción observada en la tinción de amiloide en las biopsias de piel con el tratamiento con NAC es muy alentadora e indica que esta terapia tendrá eficacia en el tratamiento de pacientes con HCCAA. Como el amiloide precipita en todos los órganos, no hay razón para creer que haya una precipitación y acumulación continua de amiloide en el cerebro, cuando se observa una reducción en la piel. Lo más probable es que se produzca una reducción similar en

otros órganos del cuerpo, incluidos los vasos cerebrales y el cerebro. No se han producido nuevos eventos en ninguno de los 3 individuos, todos los cuales han continuado la terapia y el probando se encuentra ahora aproximadamente dos años después de su tercer y último accidente cerebrovascular.

5 Cabe destacar que un número significativo de pacientes con HCCAA en Islandia nunca han experimentado un accidente cerebrovascular clínico y sólo presentan demencia a una edad temprana. Como el proceso patológico de precipitación de amiloide es comparable en pacientes con HCCAA al de la enfermedad de Alzheimer, bloquear la capacidad de las fibras de amiloide para dimerizarse y polimerizarse (que se ve reforzada por los casos de mutación fundadora de cistatina C L68Q), podría ayudar a los pacientes de Alzheimer con la demencia asociada a amiloide. Por lo tanto, la terapia con NAC o compuestos similares a NAC podrían ser beneficiosos para la enfermedad de Alzheimer.

La analogía aquí es la hipercolesterolemia familiar combinada (FCH, por sus siglas en inglés), ya que las estatinas se desarrollaron para tratar esta afección familiar (los pacientes con FCH desarrollan accidente cerebrovascular e infarto de miocardio a los 20 años); posteriormente se hizo evidente que el colesterol elevado era perjudicial y un importante factor de riesgo de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular, y que los pacientes con factores de riesgo CV se beneficiaban del tratamiento con estatinas. La HCCAA es una precipitación de amiloide mejorada que se produce en las primeras etapas de la vida y conduce a eventos catastróficos a 20 años y demencia temprana. Este proceso es algo comparable, pero tiene lugar más lentamente, en la enfermedad de Alzheimer, por lo que la demencia típicamente no se presenta hasta mediados o finales de los 60 o 70 años, mientras que el tratamiento sería el mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Palsdottir, A. *et al.* Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet* 2, 603-604 (1988).
2. Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. & Grubb, A. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* 261, 11282-11289 (1986).
3. Snorraddottir, A.O. *et al.* Deposition of collagen IV and aggrecan in leptomeningeal arteries of hereditary brain haemorrhage with amyloidosis. *Brain Res* 1535, 106-114 (2013).
4. Palsdottir, A. *et al.* A drastic reduction in the life span of cystatin C L68Q carriers due to life-style changes during the last two centuries. *PLoS Genet* 4, e1000099 (2008).
5. Gudmundsson, G., Hallgrimsson, J., Jonasson, T.A. & Bjarnason, O. Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis. *Brain* 95, 387-404 (1972).
6. Osk Snorraddottir, A. *et al.* Parenchymal cystatin C focal deposits and glial scar formation around brain arteries in Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy. *Brain Res* 1622, 149-162 (2015).
7. Abrahamson, M., Grubb, A., Olafsson, I. & Lundwall, A. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 216, 229-233 (1987).
8. Grubb, A. & Lofberg, H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3024-3027 (1982).
9. Grubb, A.O. Cystatin C—properties and use as diagnostic marker. *Adv Clin Chem* 35, 63-99 (2000).
10. Henskens, Y.M. *et al.* Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. *J Periodontol* 67, 205-212 (1996).
11. Turk, V. & Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285, 213-219 (1991).
12. Bode, W. *et al.* The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *FMBO J* 7, 2593-2599 (1988).
13. Orlikowska, M., Jankowska, E., Kolodziejczyk, R., Jaskolski, M. & Szymanska, A. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. *J Struct Biol* 173, 406-413 (2011).
14. Kolodziejczyk, R. *et al.* Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J* 277, 1726-1737 (2010).
15. Janowski, R. *et al.* Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol* 8, 316-320 (2001).
16. Janowski, R., Abrahamson, M., Grubb, A. & Jaskolski, M. Domain swapping in N-truncated human cystatin C. *J Mol Biol* 341, 151-160 (2004).
17. Janowski, R., Kozak, M., Abrahamson, M., Grubb, A. & Jaskolski, M. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular beta-sheets. *Proteins* 61, 570-578 (2005).
18. Wahlbom, M. *et al.* Fibrillogenic oligomers of human cystatin C are formed by propagated domain swapping. *J Biol Chem* 282, 18318-18326 (2007).
19. Tsiolaki, P.L., Louros, N.N., Hamodrakas, S.J. & Iconomidou, V.A. Exploring the 'aggregation-prone' core of human Cystatin C: A structural study. *J Struct Biol* 191, 272-280 (2015).
20. Sipe, J.D. *et al.* Amyloid fibril protein nomenclature: 2012 recommendations from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid* 19, 167-170 (2012).
21. Palsdottir, A., Snorraddottir, A.O. & Thorsteinsson, L. Hereditary cystatin C amyloid angiopathy: genetic, clinical, and pathological aspects. *Brain Pathol* 16, 55-59 (2006).
22. Snorraddottir, A.O. *et al.* Pathological changes in basement membranes and dermal connective tissue of skin from patients with hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Lab Invest* 97, 383-394 (2017).
23. Perlenfein, T.J., Mehlhoff, J.D. & Murphy, R.M. Insights into the mechanism of cystatin C oligomer and amyloid formation and its interaction with beta-amyloid. *J Biol Chem* 292, 11485-11498 (2017).

24. Östner, G. *et al.* High throughput testing of drug library substances and monoclonal antibodies for capacity to reduce formation of cystatin C dimers to identify candidates for treatment of hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 71, 676-682 (2011).
25. Chen, J., Armstrong, A.H., Koehler, A.N. & Hecht, M.H. Small molecule microarrays enable the discovery of compounds that bind the Alzheimer's Abeta peptide and reduce its cytotoxicity. *J Am Chem Soc* 132, 17015-17022 (2010).
26. Nilsson, M. *et al.* Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *J Biol Chem* 279 (2004).
27. Östner, G. *et al.* Stabilization, Characterization, and Selective Removal of Cystatin C Amyloid Oligomers. *Journal of Biological Chemistry* 288, 16438-16450 (2013).
28. Pollak, J., Szymanska, A., Lindstrom, V. & Grubb, A. Production of Cystatin C Wild Type and Stabilized Mutants. *Elifcc* 20, 166-170 (2010).
29. Bjarnadottir, M. *et al.* Intracellular accumulation of the amyloidogenic L68Q variant of human cystatin C in NIH/3T3 cells. *Mol Pathol* 51, 317-326 (1998).
30. Benedikz, E. *et al.* Cellular processing of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *Amyloid* 6, 172-182 (1999).
31. Thorsteinsson, L. *et al.* On the role of monocytes/macrophages in the pathogenesis of central nervous system lesions in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *J Neurol Sci* 108, 121-128 (1992).
32. Wei, L. *et al.* Instability of the amyloidogenic cystatin C variant of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, Icelandic type. *J Biol Chem* 273, 11806-11814 (1998).
33. Merz, G. S. *et al.* Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells. *J Cell Physiol* 173, 423-432 (1997).
34. Xu, Y., Lindemann, P., Vega-Ramos, J., Zhang, J.G. & Villadangos, J.A. Developmental regulation of synthesis and dimerization of the amyloidogenic protease inhibitor cystatin C in the hematopoietic system. *J Biol Chem* 289, 9730-9740 (2014).
35. Benedikz, E., Blondal, H. & Gudmundsson, G. Skin deposits in hereditary cystatin C amyloidosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417, 325-331 (1990).
36. Unnithan, A.S., Choi, H.J., Titler, A.M., Posimo, J.M. & Leak, R.K. Rescue from a two hit, high-throughput model of neurodegeneration with N-acetyl cysteine. *Neurochem Int* 61, 356-368 (2012).
37. Yerbury, J.J., Stewart, E.M., Wyatt, A.R. & Wilson, M.R. Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep* 6, 1131-1136 (2005).
38. Lai, A.Y. & McLaurin, J. Clearance of amyloid-beta peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. *Future Neurol* 7, 165-176 (2012).
39. Go, Y.M. & Jones, D.P. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1273-1290 (2008).
40. Hwang, C., Sinskey, A.J. & Lodish, H.F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502 (1992).
41. Lautwein, A. *et al.* Inflammatory stimuli recruit cathepsin activity to late endosomal compartments in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 32, 3348-3357 (2002).
42. DeLeve, L.D. & Kaplowitz, N. Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* 10, 251-266 (1990).
43. Hahn, R., Wendel, A. & Flohe, L. The fate of extracellular glutathione in the rat. *Biochim Biophys Acta* 539, 324-337 (1978).
44. Isaacs, J.T. & Binkley, F. Cyclic AMP-dependent control of the rat hepatic glutathione disulfide-sulfhydryl ratio. *Biochim Biophys Acta* 498, 29-38 (1977).
45. Kemp, M., Go, Y.M. & Jones, D.P. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free radical biology & medicine* 44, 921-937 (2008).
46. Lauterburg, B.H., Smith, C.V., Hughes, H. & Mitchell, J.R. Biliary excretion of glutathione and glutathione disulfide in the rat. Regulation and response to oxidative stress. *J Clin Invest* 73, 124-133 (1984).
47. Meister, A. & Tate, S.S. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 45, 559-604 (1976).
48. Meister, A. & Anderson, M.E. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760 (1983).
49. Uhlig, S. & Wendel, A. The physiological consequences of glutathione variations. *Life Sci* 51, 1083-1094 (1992).
50. Ballatori, N. *et al.* Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 390, 191-214 (2009).
51. Samiec, P.S. *et al.* Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free radical biology & medicine* 24, 699-704 (1998).
52. Atkuri, K.R., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A. & Herzenberg, L.A. N-Acetylcysteine—a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 7, 355-359 (2007).
53. Aitio, M.L. N-acetylcysteine – passe-partout or much ado about nothing? *Br J Clin Pharmacol* 61, 5-15 (2006).
54. Bavarsad Shahripour, R., Harrigan, M.R. & Alexandrov, A.V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav* 4, 108-122 (2014).
55. Andrews, N.P., Prasad, A. & Quyyumi, A.A. N-acetylcysteine improves coronary and peripheral vascular function. *J Am Coll Cardiol* 37, 117-123 (2001).
56. Adair, J.C., Knoefel, J.E. & Morgan, N. Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's

disease. *Neurology* 57, 1515-1517 (2001).

57. Giustarini, D., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Tsikas, D. & Rossi, R. N-Acetylcysteine ethyl ester (NACET): A novel lipophilic cell-permeable cysteine derivative with an unusual pharmacokinetic feature and remarkable antioxidant potential. *Biochemical pharmacology* 84, 1522-1533 (2012).

5 58. Cohen, G.B. *et al.* The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10, 661-671 (1999).

59. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682 (2012).

10 Aunque algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención se han descrito e ilustrado específicamente con anterioridad, no se pretende que dichas realizaciones limiten la invención. Resultará evidente para el experto en la técnica que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones en las mismas sin apartarse del alcance de la presente invención, como se expone en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado funcional de N-acetilcisteína (NAC) para su uso en un método para el tratamiento de la angiopatía amiloide por cistatina C hereditaria (HCCAA) en un sujeto humano que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad eficaz de dicho derivado funcional en un portador farmacéuticamente aceptable, siendo dicha administración eficaz para reducir los agregados de proteína amiloide-cistatina, aliviando así los síntomas de la HCCAA, en donde dicho derivado de NAC se selecciona de NAC-amida, NAC-éster etílico y sal de N-acetilcisteína carboxilato de mercaptida de cinc.
2. El derivado funcional para su uso de la reivindicación 1, comprendiendo el método además realizar una biopsia de piel en dicho sujeto después del tratamiento para evaluar la reducción de los agregados de proteína amiloide-cistatina en la piel.
3. El derivado funcional para su uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el método comprende además la administración de un ionóforo y/o la administración de un agente antiinflamatorio; opcionalmente, en donde dicho agente antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en uno o más de corticosteroides, aspirina, celecoxib, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, salsalato, sulindaco, tolmetina, antagonista del receptor de interleucina (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, receptores de citocinas para IL-1, factor de necrosis tumoral alfa e IL-18.
4. El derivado funcional para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo el método la administración de uno o más de glutatión, ARNip dirigido a secuencias codificantes de cistatina C, monensina, papaína, cathepsina B y falcipaina.
5. El derivado funcional para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método además controlar los niveles de depósitos de amiloide de dicho paciente.
6. Un método para identificar agentes terapéuticos que reducen la formación de agregados de proteína amiloide-cistatina que comprende
 - a) proporcionar células que expresan un ácido nucleico que codifica una proteína hCC mutante, causando dicho mutante la formación de agregados de proteínas amiloide-cistatina;
 - b) proporcionar células que expresan una proteína hCC que carece de la mutación hCC,
 - c) poner en contacto las células de las etapas a) y b) con un agente de prueba y
 - d) analizar si dicho agente reduce la formación de agregados de proteína amiloide-cistatina de las células de la etapa a) con respecto a las de la etapa b), identificando así agentes que reducen la agregación de proteína amiloide-cistatina.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho agente terapéutico tiene eficacia para el tratamiento de HCCAA.
8. El método de la reivindicación 6, en donde dicho agente es NAC o un derivado funcional de la misma.
9. El derivado funcional para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 presente en una composición farmacéutica.
10. El derivado funcional para su uso de la reivindicación 1 a 5 o 9, en donde dicha HCCAA está causada por la cistatina C mutada.
11. El derivado funcional para su uso de la reivindicación 10, en donde dicha cistatina C mutada comprende una cistatina C L68Q.

Fig. 1A

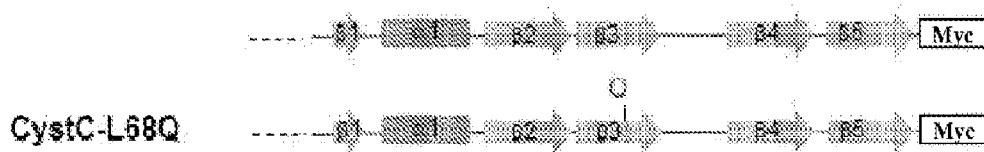


Fig. 1B

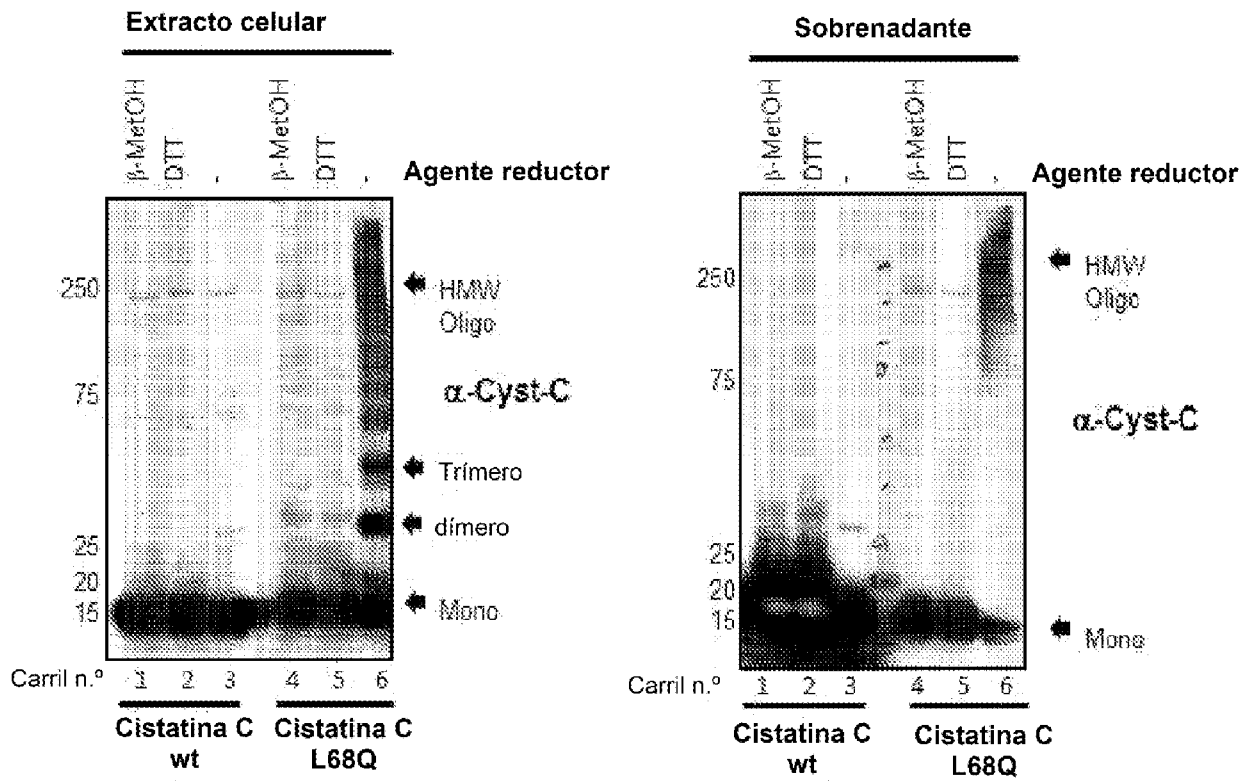


Fig. 1C

(Réplicas biológicas)

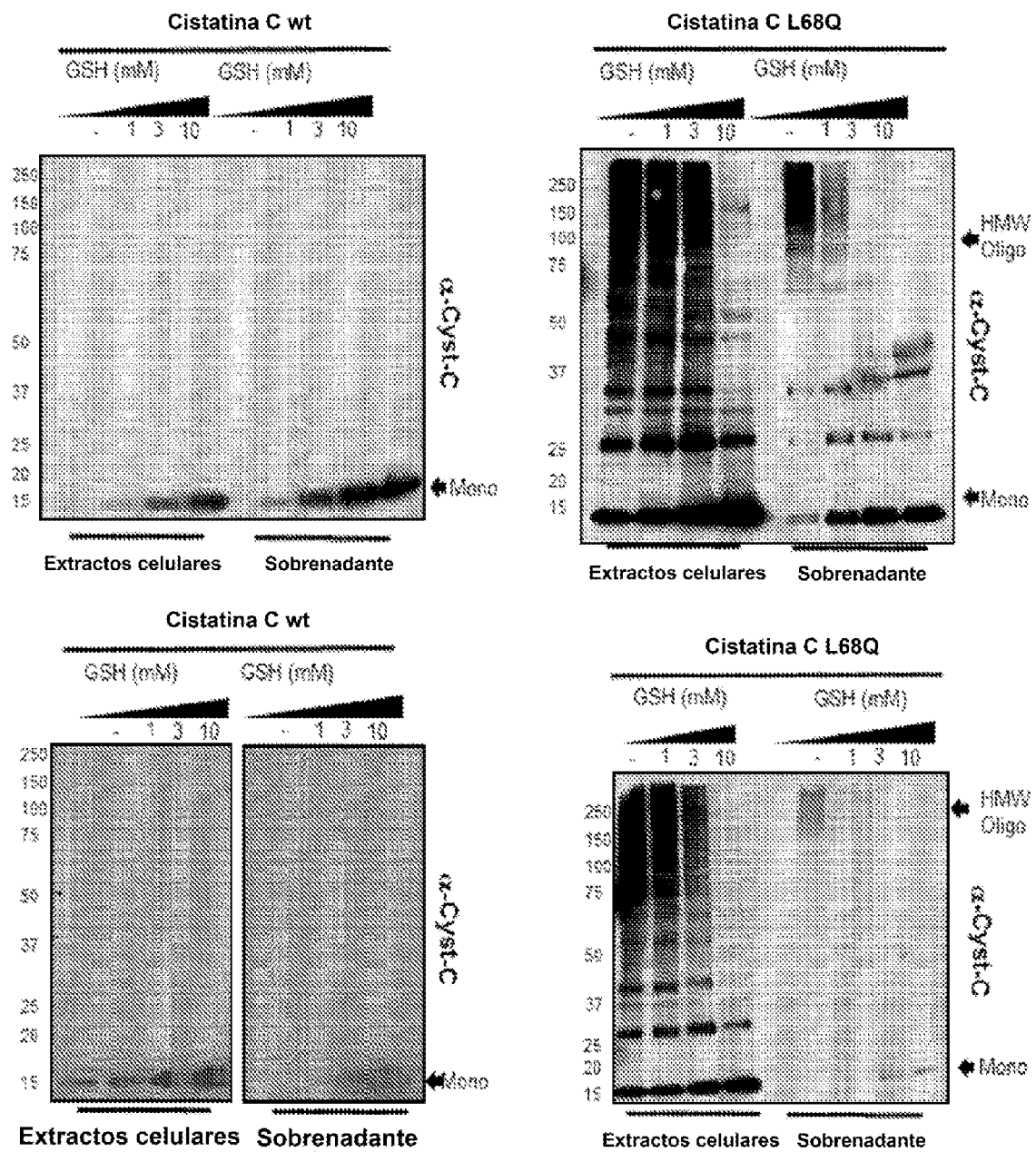


Fig. 2A

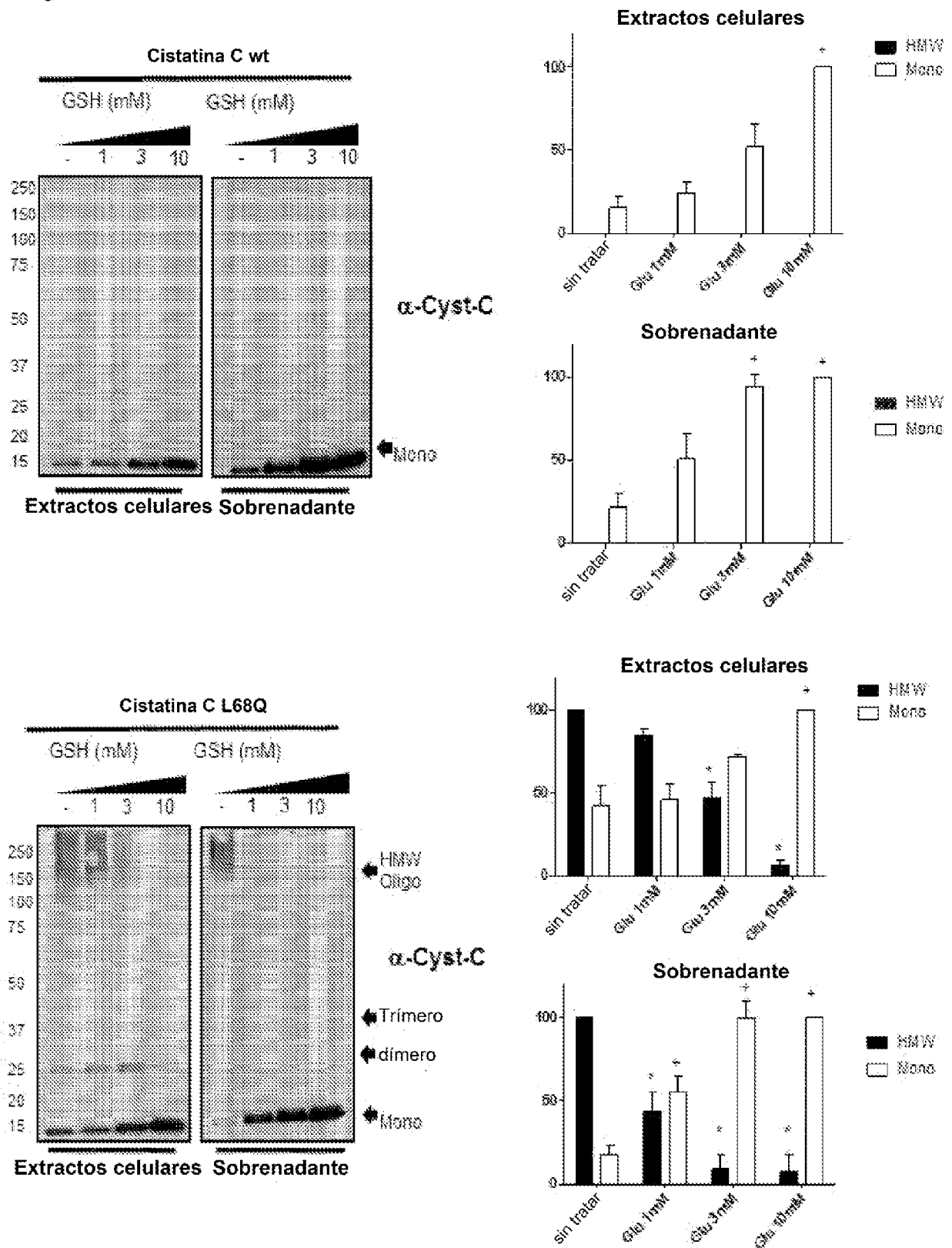


Fig. 2B

(Réplicas biológicas)

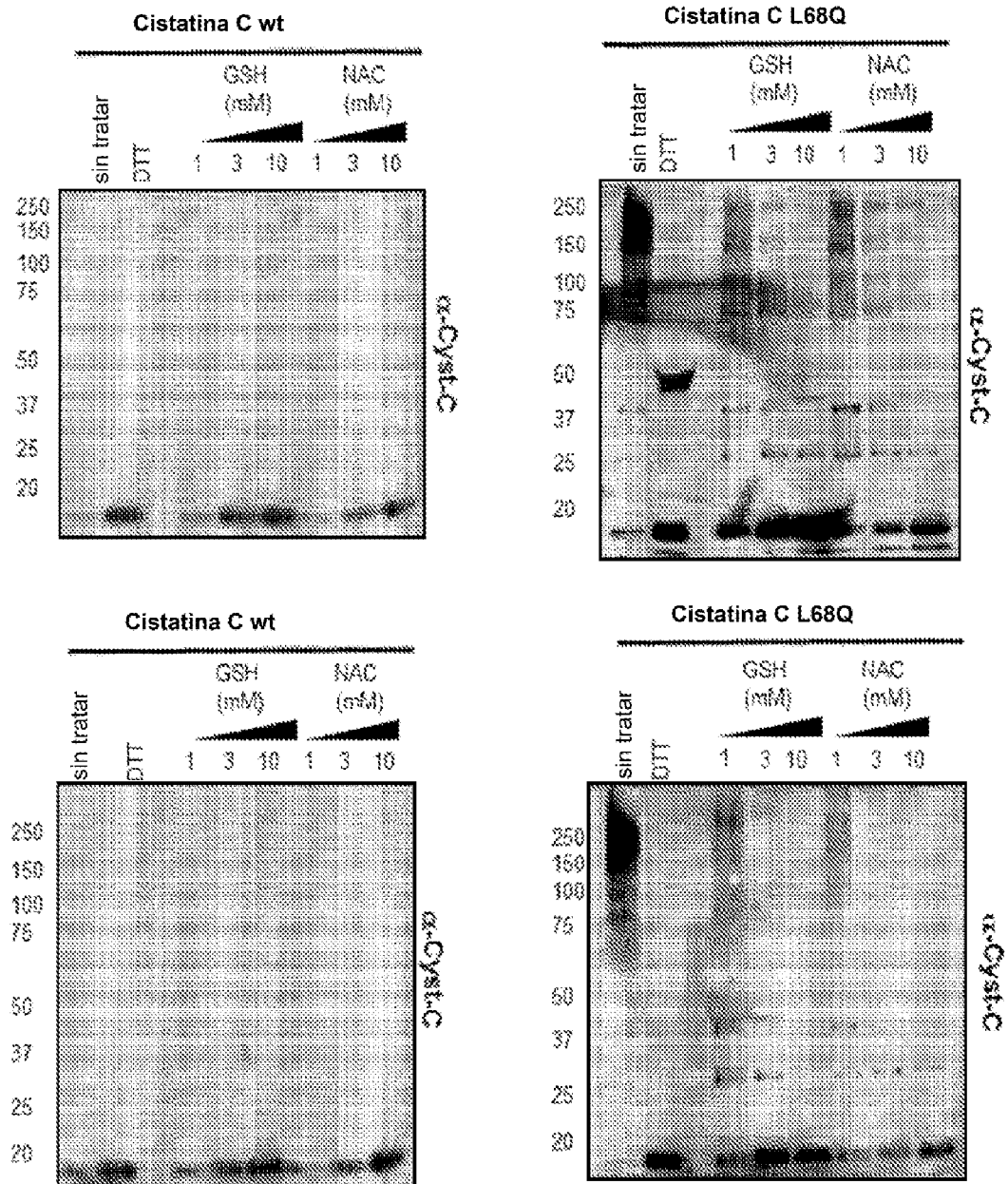


Fig. 3A

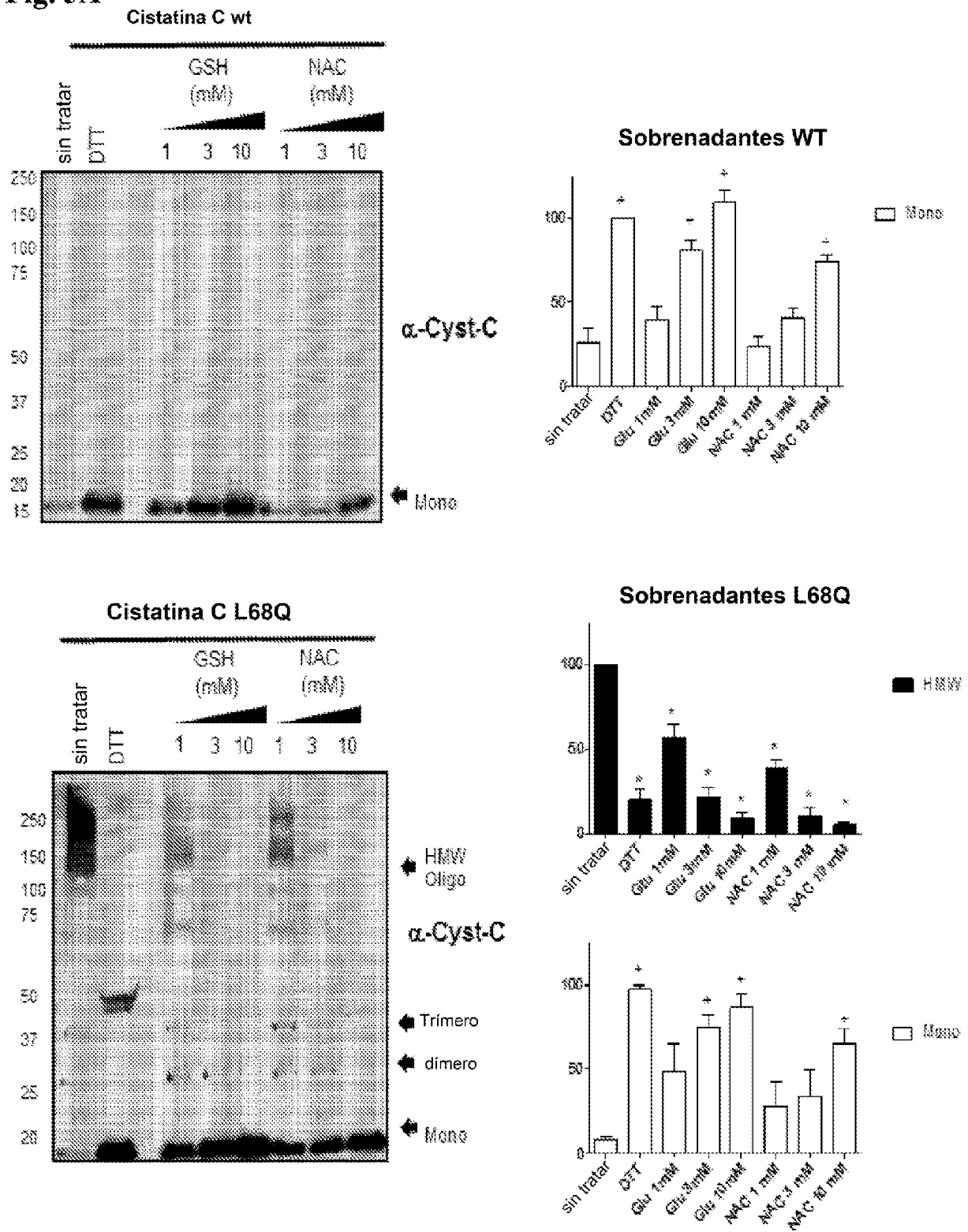


Fig. 3B

(Réplicas biológicas)

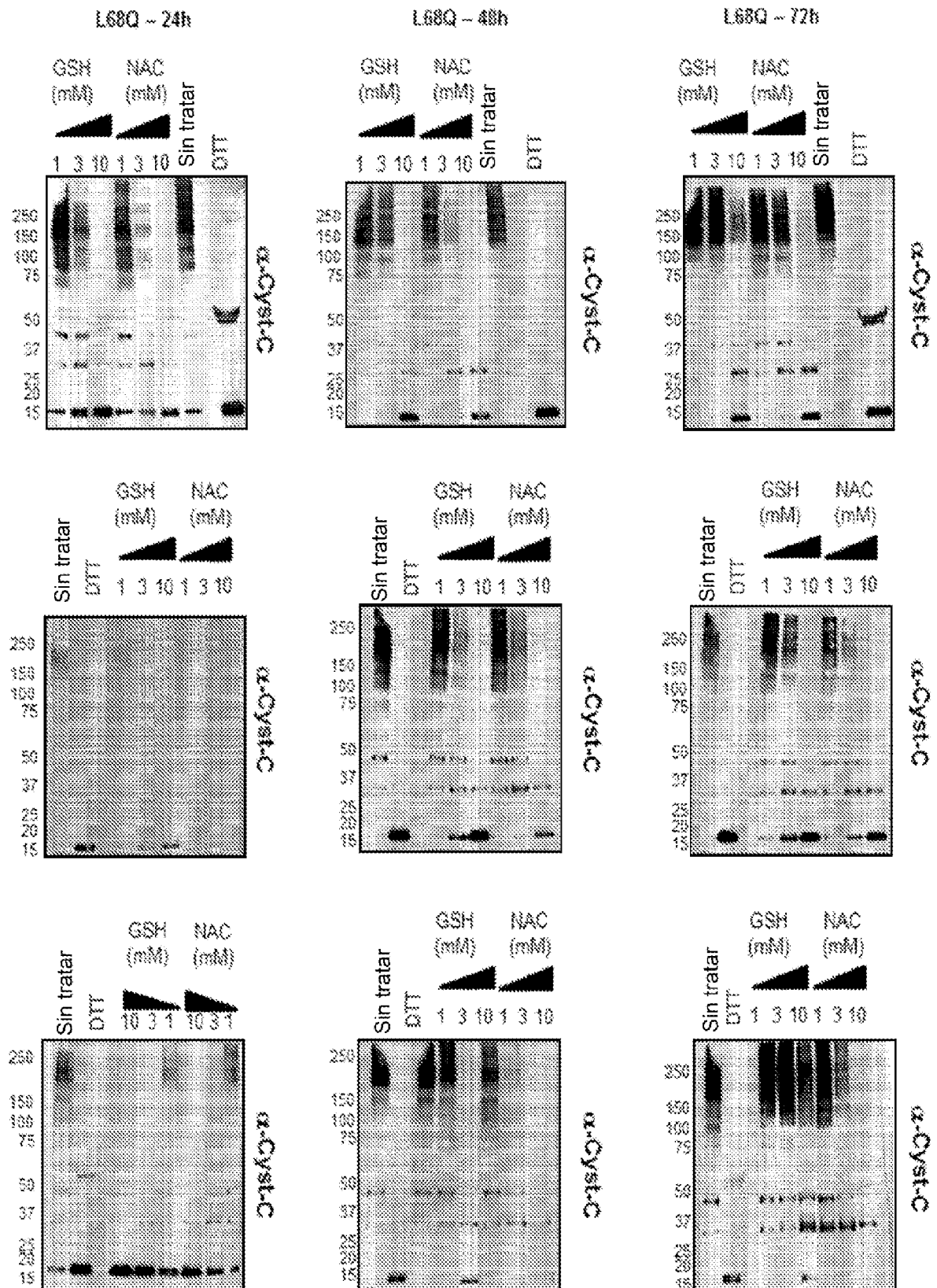


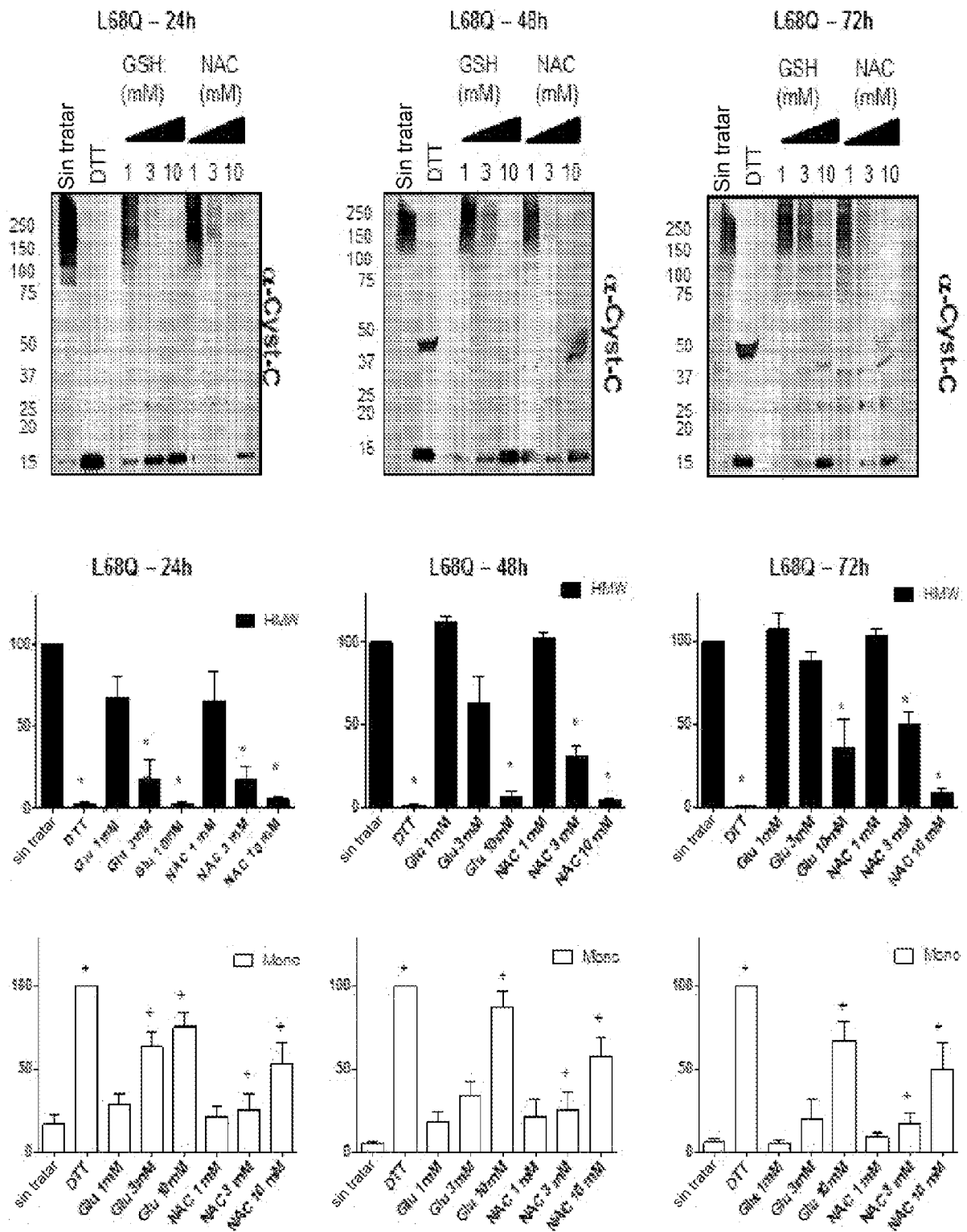
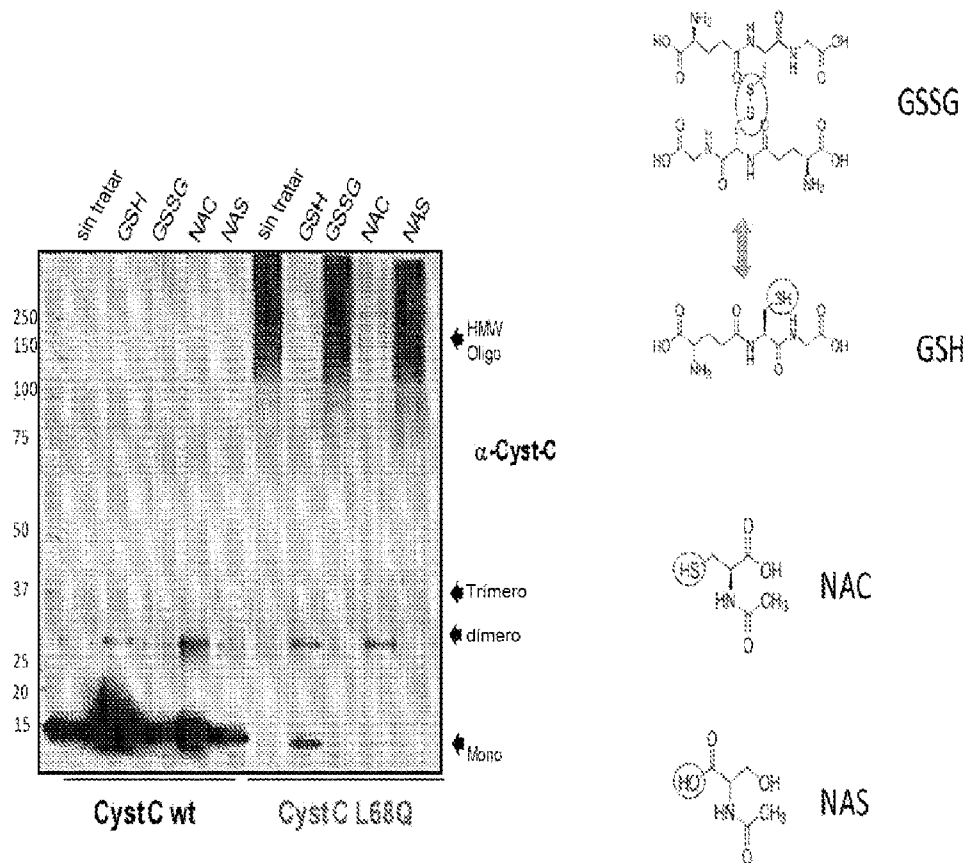
Figura 4

Figura 5

La reducción de la actividad de GSH o NAC es fundamental para romper los oligómeros en monómeros de la cistatina C L68Q secretada



La NAC-amida y el NAC-éster metílico alteran la oligomerización de la cistatina C L68 intracelular y secretada

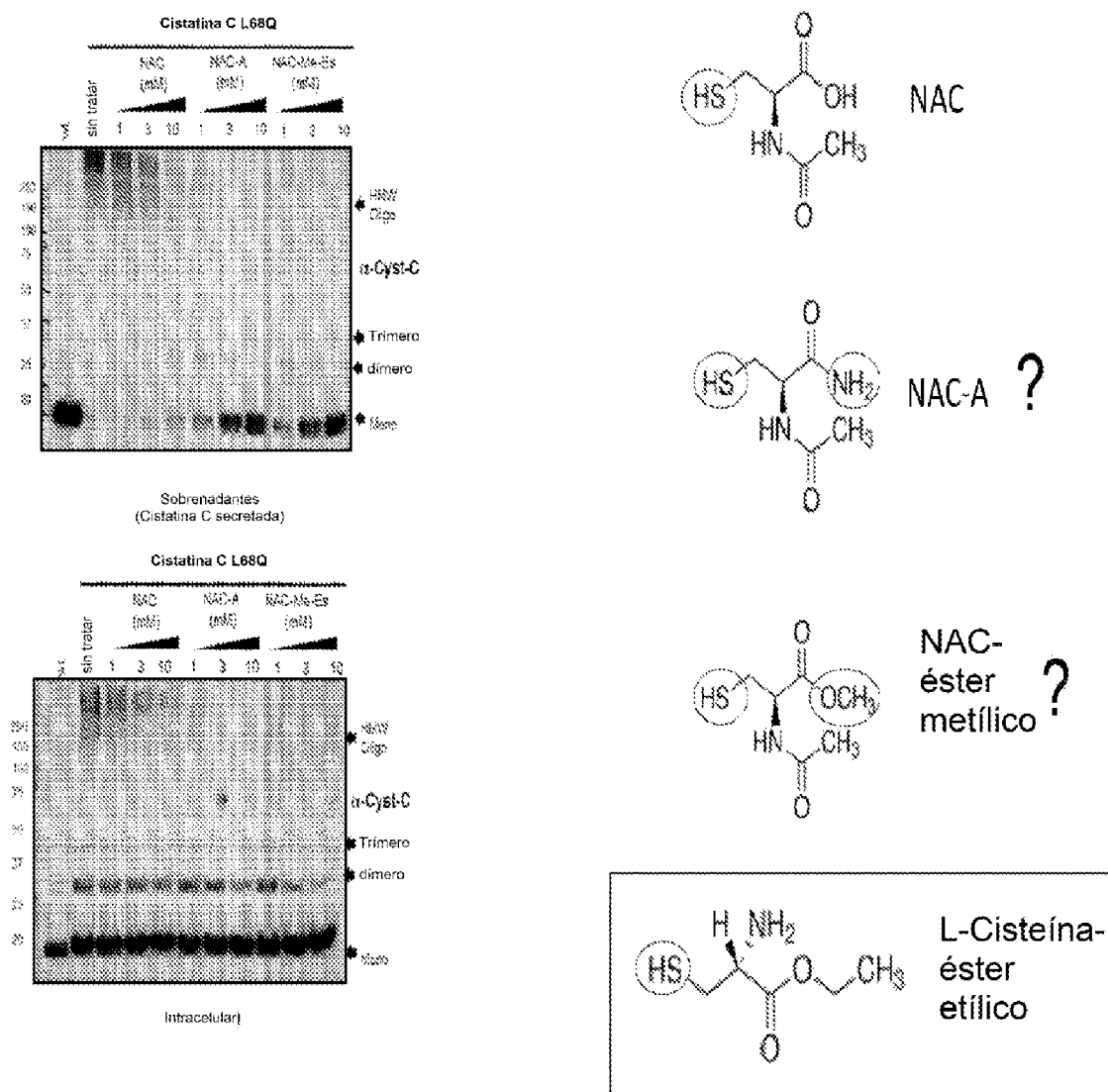


Figura 6

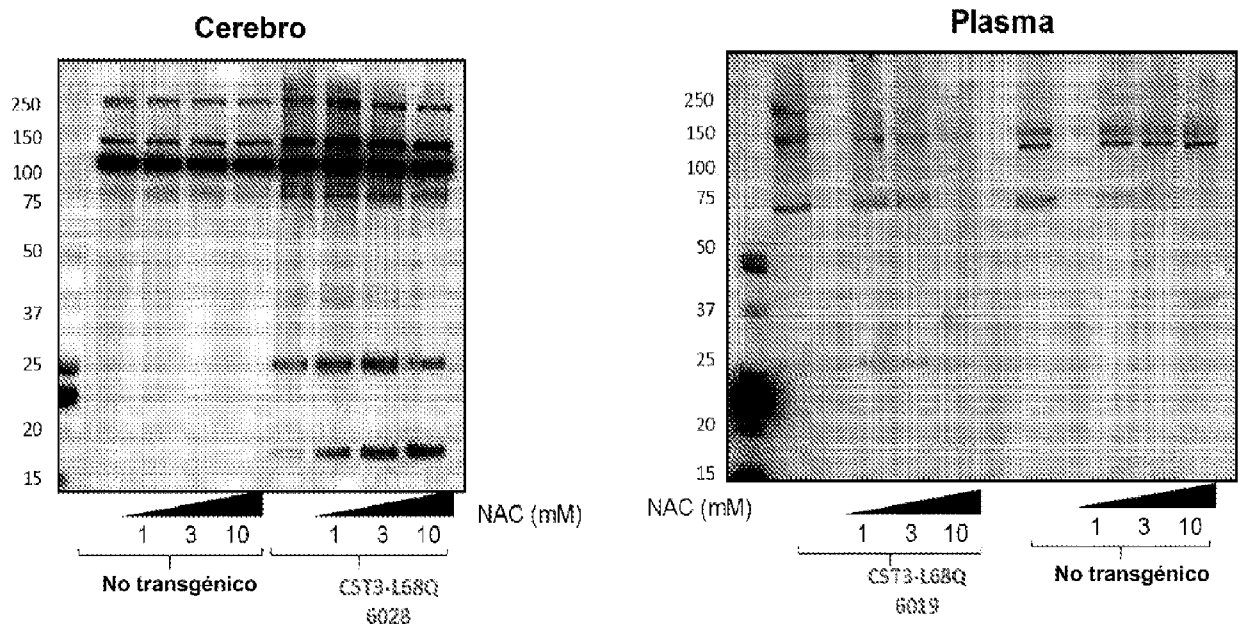


Figura 7

Fig. 8A

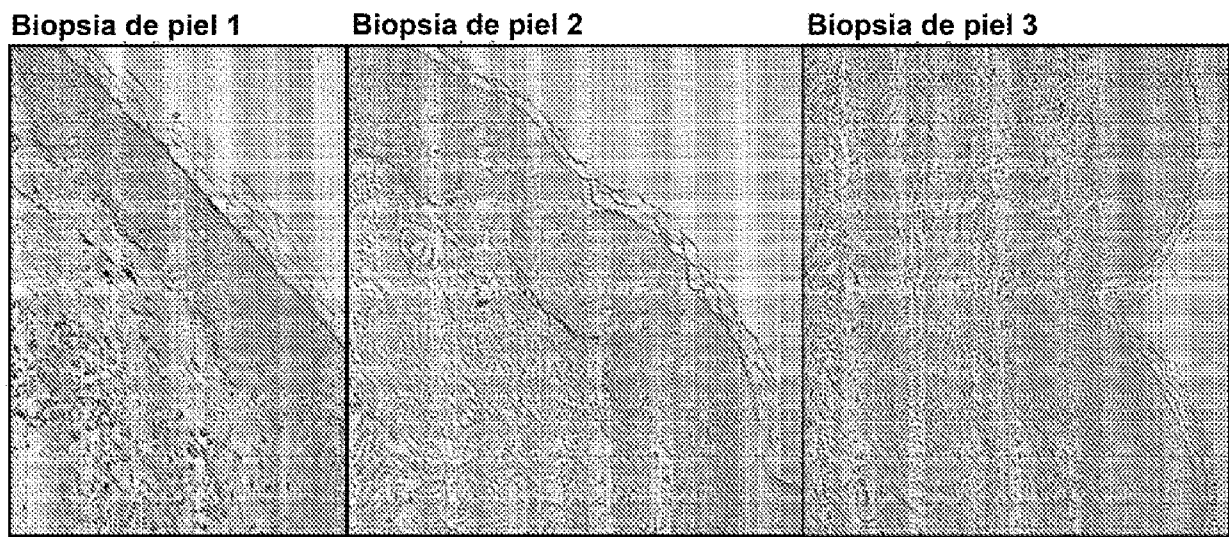


Fig. 8B

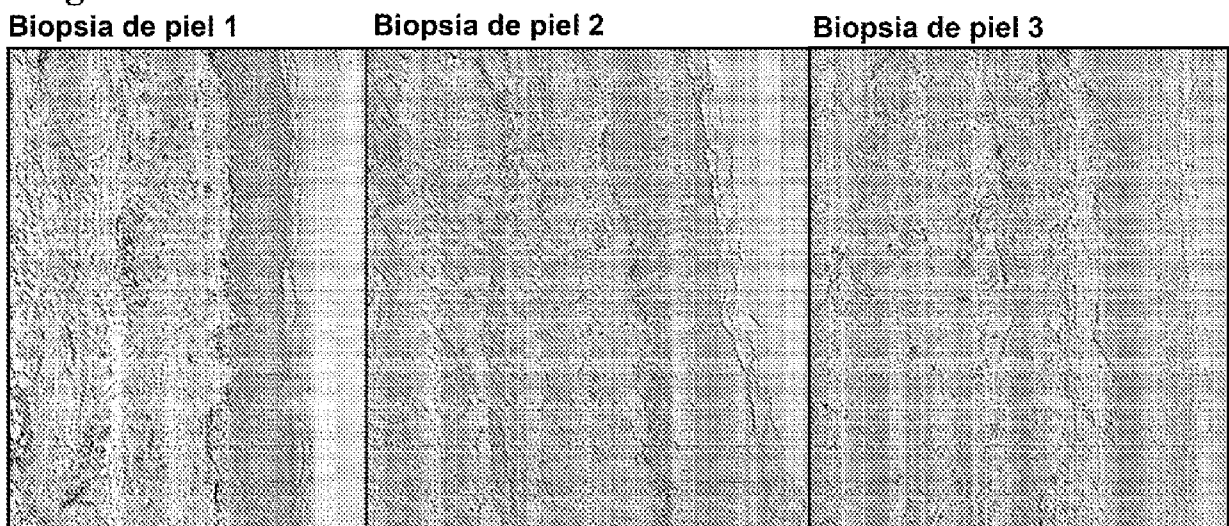


Fig. 8C Los monómeros Cyst-C son detectables a niveles reducidos en sangre de sujetos portadores de la mutación L68Q.
Se detectaron *potencialmente* complejos de alto peso molecular en un portador que no está tomando NAC.

