

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 815 699**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2016** **PCT/DE2016/000089**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16150415**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2016** **E 16716456 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 3271374**

54 Título: **Péptidos que se unen de forma específica a especies A-beta para la terapia y/o el diagnóstico de la demencia de Alzheimer**

30 Prioridad:

20.03.2015 DE 102015003676

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

30.03.2021

73 Titular/es:

**PRIAVOID GMBH (100.0%)
Theodor-Heuss-Str. 179
52428 Jülich, DE**

72 Inventor/es:

**WILLBOLD, DIETER;
KUTZSCHE, JANINE y
KLEIN, ANTONIA, NICOLE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 815 699 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

Péptidos que se unen de forma específica a especies A-beta para la terapia y/o el diagnóstico de la demencia de Alzheimer

5

La invención se refiere a péptidos que se unen de forma específica a especies A-beta para la terapia y/o el diagnóstico de la demencia de Alzheimer.

Estado de la técnica

10

Hasta la fecha, no hay ningún medicamento aprobado para el tratamiento causal de la demencia de Alzheimer (DA). Típicamente, se encuentran en los cerebros post-mortem de los pacientes con DA los depósitos del denominado péptido beta-amiloide (A β) en placas. Por lo tanto, se consideran diferentes formas del péptido A-beta (también denominado A β), como, por ejemplo, las fibrillas, responsables de la aparición y progresión de la demencia de

15

Alzheimer. Desde hace algunos años, se consideran sobre todo los pequeños oligómeros A β libremente difusibles responsables del desarrollo y la progresión de la DA.

20 Los monómeros A β se forman constantemente en el cuerpo humano y probablemente no son tóxicos por sí mismos.

Se especula si los monómeros A β , dependiendo de su concentración, que en última instancia resulta de las velocidades de formación y degradación en el cuerpo, se acumulan de forma aleatoria y, por lo tanto, es más probable que formen espontáneamente oligómeros A β con la edad. Una vez formados, los oligómeros A β podrían multiplicarse

25

a través de un mecanismo similar al que se da en los priones y finalmente conducir a la enfermedad. Sobre la base de estas consideraciones, el objetivo de un tratamiento causal debería ser destruir por completo los oligómeros A β tóxicos y/o prevenir su reproducción de tipo priónico.

30 Sin embargo, no existe ningún fármaco causalmente eficaz para el tratamiento de la demencia de Alzheimer. Los medicamentos según el estado de la técnica que se utilizan son, en el mejor de los casos, capaces de aliviar algunos síntomas, pero no pueden ralentizar la progresión de la enfermedad, y mucho menos detenerla.

Hay una serie de sustancias que pueden lograr cierto éxito en la prevención (no necesariamente el tratamiento) de la

35

Una diferencia importante entre prevención y tratamiento radica en la siguiente consideración: Para prevenir la formación de los primeros oligómeros A β , pueden ser suficientes ligandos A β incluso menos afines y eficaces. Dado que la formación de un oligómero A β a partir de varios monómeros A β es una reacción de muy alto orden, es altamente dependiente de la concentración de monómero A β . Incluso una pequeña reducción en la concentración de monómero A β activo puede prevenir así la formación de los primeros oligómeros A β . Esta es la situación en el caso de la prevención. Sin embargo, si ya se han formado oligómeros A β , estos pueden multiplicarse de manera similar a los priones, lo que no es una reacción de alto orden y, por lo tanto, apenas depende de la concentración de monómero A β . Esta es la situación en el caso de la terapia. Por tanto, si ya han surgido oligómeros A β , el objetivo del tratamiento

40

45

debe ser abordarlos con sustancias que tengan la mayor afinidad posible por los oligómeros A β . La constante de disociación correspondiente debería estar en el intervalo de pM o incluso inferior. Actualmente existen algunas sustancias que reducen la concentración de monómeros A β de diversas maneras, p. ej., mediante moduladores de gamma secretasa, ligandos que se unen a A β , etc. Esto es obviamente suficiente para tener

50

un efecto preventivo en experimentos con animales, donde los animales generalmente son tratados antes de que la enfermedad se desarrolle por completo. En estudios clínicos (fases II y III) en humanos, en ese caso solo se puede tratar a personas claramente diagnosticadas con demencia de Alzheimer, pero hasta ahora todas estas sustancias han fallado, posiblemente porque en ese caso

55

una reducción leve o moderada de la concentración de monómeros A β ya no es suficiente para prevenir la formación de cantidades cada vez mayores de oligómeros A β . Sin embargo, aún no se dispone de posibilidades de diagnosticar la demencia de Alzheimer antes del inicio de los síntomas. La demencia de Alzheimer se reconoce hoy en día principalmente mediante pruebas neuropsicológicas de

60

la persona que ya padece síntomas de demencia. Además, se pueden excluir otras enfermedades (trauma) mediante varios procedimientos de examen.

Sin embargo, se sabe que los oligómeros A β y las subsiguientes fibrillas y placas pueden desarrollarse en el cerebro de los pacientes hasta 20 años antes de la aparición de los síntomas, y pueden causar un daño irreversible. Las sondas moleculares que se inyectan por vía intravenosa en el paciente y que se unen a los oligómeros A β y las placas después de atravesar la barrera hematoencefálica pueden visualizarse mediante procedimientos de obtención de imágenes y, por tanto, permiten un diagnóstico precoz de la DA.

El documento WO 02/081505 A2 se refiere a un péptido que se une al péptido β -amiloides con una alta afinidad de unión. El documento WO 2013/150126 A2 se refiere a un procedimiento para tratar sangre, productos sanguíneos y órganos para prevenir la transmisión de la enfermedad de Alzheimer. El documento WO 2015/043566 A1 se refiere a péptidos que se unen a beta amiloide cíclicos y su uso. Schumacher T N y col. ("Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display", Science, vol. 271, 29 de marzo de 1996, páginas 1854-1857) describen ligandos de D-péptidos con resistencia a la degradación proteolítica.

Un péptido D-enantiomérico con el nombre "D3" se conoce a partir del documento EP 1 379 546 B1. El péptido se identificó mediante una selección de presentación en fagos de imagen especular contra A β (1-42) predominantemente monomérico, con el objetivo de estabilizarlo mediante la unión y evitar su conversión en agregados de A β tóxicos. Según el estado actual de los conocimientos, D3 convierte preferentemente los oligómeros A β particularmente tóxicos en agregados amorfos no tóxicos, no amiloidogénicos y ThT negativos. En el modelo animal, incluso la administración oral de D3 con el agua potable asegura que los ratones DA transgénicos tratados contengan significativamente menos placas y tengan capacidades cognitivas significativamente mejoradas.

Se conocen otros péptidos derivados de D3 a partir de la publicación WO 2014/041115 A2.

La desventaja de las sustancias que se unen a oligómeros A β existentes es que no tienen suficiente afinidad para evitar que los oligómeros A β se multipliquen.

Como desventaja, hasta la fecha, no existen sondas para el procedimiento de obtención de imágenes in vivo que se unan a oligómeros A β con una alta afinidad y los hagan visibles. Dado que los oligómeros A β desempeñan un papel tan importante y temprano en la historia de la enfermedad, esto es precisamente lo conveniente.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar péptidos para

A) La terapia causal de la enfermedad de Alzheimer mediante prevención de la formación de oligómeros o agregados amiloides β (A β) tóxicos o detoxificación los mismos.

B) El diagnóstico de la demencia de Alzheimer al utilizar los D-péptidos como sonda para la obtención de imágenes in vivo.

El objeto también era proporcionar nuevos péptidos, preferentemente derivados del D-péptido D-enantiomérico D3, que tuvieran propiedades más eficaces en comparación con D3. Entre sus propiedades figuran la afinidad y la especificidad de unión hacia especies A-beta, la inhibición de la formación de fibrillas A-beta, la inhibición de la citotoxicidad A-beta, la eliminación o detoxificación de oligómeros, fibrillas y otros agregados A-beta, la conversión de fibrillas, protofibrillas u oligómeros A-beta en especies no tóxicas y no amiloidogénicas.

A continuación, los términos "A-beta", "beta amiloide", " β - amiloide" y "A β " se utilizan como sinónimos entre sí.

Solución del objeto

El objeto de la invención se consigue mediante los péptidos según la reivindicación 1, el kit y la composición según las reivindicaciones principales y los usos según las reivindicaciones secundarias. Las configuraciones ventajosas para ello resultan de las reivindicaciones que se refieren a las mismas.

Descripción de la invención

Este objeto se resuelve mediante péptidos que se unen de forma específica a especies beta amiloides para la terapia de la demencia de Alzheimer. La especificidad, a menudo también llamada selectividad, significa que el ligando o péptido según la invención puede unirse a diferentes especies A-beta, por ejemplo, monómero A-beta u oligómero A-beta o fibrillas A-beta. A cada pareja de unión (por ejemplo, ligando a monómero A-beta y ligando a oligómero A-beta y ligando a fibrillas A-beta) se le asigna una constante de disociación (K_D) o una constante de asociación, asumiendo un modelo de unión 1:1 ($K_A = 1/K_D$). Cuanto mayor sea el valor de K_A , mayor será la afinidad del enlace

correspondiente.

La especificidad del ligando hacia el cebo en comparación con el competidor se expresa mediante un mayor cociente posible de las afinidades hacia el monómero A-beta y hacia el oligómero A-beta o las fibrillas A-beta.

5

Según la invención, para determinar la especificidad, se forman cocientes de los valores de K_A del ligando al monómero A-beta y al oligómero A-beta (o fibrillas A-beta). Cuanto mayor sea el cociente, mayor será la especificidad.

En el sentido según la invención, se habla de especificidad relativa cuando el cociente de los valores de K_A del ligando hacia la especie A y el ligando hacia la especie B es al menos mayor que 1, preferentemente mayor que 1,2, o 1,5, preferentemente mayor que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, particularmente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, particularmente 100, donde como especie A y especie B, pueden asumirse las diversas especies de monómero, oligómero y fibrillas A-beta.

La especificidad o selectividad no debe confundirse con la afinidad que resulta de la fuerza de unión de los ligandos a una de las especies. Si diferentes ligandos compiten por la misma molécula diana, el menos específico o selectivo puede tener la mayor afinidad de unión. Según la invención, debe determinarse ese ligando que se une de forma particularmente específica a una especie tal como monómero u oligómero o fibrillas. Las biomoléculas deben ser adecuadas como agentes terapéuticos y medicamentos. Los ligandos o péptidos así obtenidos tienen las propiedades deseadas y consiguen el objeto de la invención.

En particular, lo consiguen péptidos como ligandos que contienen una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor K_d de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprtrlhthmr, donde el péptido consiste sustancialmente en D-aminoácidos, el objeto de la invención.

Este objeto también se consigue mediante polímeros que contienen una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor K_d de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprtrlhthmr, donde el péptido consiste sustancialmente en D-aminoácidos.

35

Los péptidos que contienen una de las secuencias mencionadas se unen de forma específica al monómero beta amiloide.

La unión específica al monómero A-beta también significa que el cociente de las señales de unión del monómero de ligando a oligómero de ligando y/o monómero de ligando a fibrillas de ligando es mayor que 1, p. ej., 1,8 y puede asumir un valor de hasta 100, donde puede adoptarse cualquier valor intermedio, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, en particular 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, en particular 100.

45

La unión específica al monómero A-beta significa que el cociente de las señales de unión del monómero de ligando a oligómero de ligando y monómero de ligando a fibrillas de ligando es mayor que 1, p. ej., 1,2 y puede asumir un valor de hasta 100, donde puede adoptarse cualquier valor intermedio, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, en particular 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, en particular 100.

50

El redondeo habitual de números impares en la práctica científica conduce a los números mencionados anteriormente.

55

Como punto de partida sirven, por ejemplo, péptidos obtenidos mediante experimentos de microarrays de péptidos. Estos pueden derivarse del péptido "D3" conocido.

Para la identificación de péptidos que se unen de forma específica al monómero beta amiloide o de forma específica a oligómeros beta amiloides y para determinar la especificidad de unión de péptidos en el sentido de la presente invención, se puede proceder como sigue. Los microarrays de péptidos con varios péptidos inmovilizados en una superficie, p. ej., derivados de D3 se incuban cada uno con diferentes especies de A-beta (por ejemplo, monómeros,

60

oligómeros y fibrillas) que se marcan con un colorante fluorescente. Como control, se incubaba un microarray de péptidos solo con el colorante fluorescente. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, se puede realizar la incubación de los microarrays de péptidos al menos 3 veces por especie. La unión de la A-beta marcada con fluorescencia con los péptidos inmovilizados se detecta mediante el colorante fluorescente. Cuanto más A-beta se une al péptido, mayor es la señal de fluorescencia. Las señales de fluorescencia medidas de las reproducciones se normalizan y la señal se resta del control. Esto evita que se produzca la unión del A-beta marcado con fluorescencia a través del colorante. A continuación, se promedian las señales de unión de una especie A-beta a un péptido. Para determinar la especificidad de unión, se forma el cociente de la especie a la que se pretende que el péptido se una de forma específica a otra especie.

10

Ejemplo: Especificidad de unión del péptido X a los monómeros A-beta = señal de unión del péptido X a los monómeros/señal de unión del péptido X a los oligómeros (o fibrillas). De manera análoga, se determinan los péptidos que se unen de forma específica a los oligómeros A-beta.

15 Los fragmentos y las partes de los péptidos según la invención muestran un efecto similar o idéntico al de los péptidos según la invención.

En una variante de la invención, se identifican y utilizan tales péptidos que se unen a un monómero A-beta y/o a oligómeros A-beta y/o a fibrillas del péptido A-beta con una K_D de un máximo de 500 μM , preferentemente 250, 100, 50 μM , con especial preferencia 25, 10, 6 μM , en particular 4, 2, 1 o sub- μM .

20

Los péptidos según SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos consisten sustancialmente, preferentemente en al menos un 60 %, 75 %, 80 %, con particular preferencia un 85 %, 90 %, 95 %, en particular en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % en D-aminoácidos.

25

Un polímero en el sentido de la invención se forma a partir de 2 o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más monómeros o unidades de monómeros seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos, fragmentos o partes que por sí mismos ya se unen a monómeros A-beta u oligómeros A-beta o fibrillas A-beta.

30

Según la invención, los polímeros se construyen a partir de monómeros idénticos o de una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 monómeros distintos de los mencionados anteriormente, como los llamados polímeros combinados.

35

Los monómeros también pueden ser parcialmente idénticos. El número de monómeros idénticos en los polímeros combinados se puede seleccionar libremente.

Como alternativa, los polímeros combinados contienen al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos y al menos un péptido que se une a monómeros A-beta o a oligómeros A-beta o fibrillas A-beta y que es diferente de los monómeros seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos, como un monómero adicional.

45

Los polímeros se pueden producir, por ejemplo, mediante síntesis química o síntesis de péptidos.

En una realización de la invención, los monómeros están unidos covalentemente entre sí. En otra realización de la invención, los monómeros no están unidos covalentemente entre sí.

50

Para los fines de la invención, está presente una conexión o enlace covalente de las unidades de monómero si los péptidos están unidos linealmente entre sí cabeza a cabeza, cola a cola o cabeza a cabeza, sin el uso de enlaces o grupos de enlaces en el medio.

55 Un enlace no covalente en el sentido de la invención está presente si los monómeros están unidos entre sí a través de biotina y estreptavidina, en particular tetrámero de estreptavidina.

En una variante de la presente invención, los monómeros pueden estar unidos linealmente entre sí, en particular como se describió anteriormente. En otra variante, los monómeros están unidos entre sí para formar el polímero según la invención.

60

Según la invención, un polímero ramificado puede ser un dendrímero en el que los monómeros están unidos entre sí

de forma covalente o no covalente.

Alternativamente, los monómeros también se pueden unir a una molécula de plataforma (como PEG o azúcar) y así formar un polímero ramificado.

5 Alternativamente, son posibles combinaciones de estas opciones.

Los polímeros contruidos según la invención a partir de péptidos según la invención, que a su vez se unen al monómero A-beta o al oligómero A-beta o a las fibrillas A-beta, muestran ventajosamente efectos sinérgicos con respecto a su selectividad y afinidad por los monómeros A-beta hacia péptidos individuales. En otras palabras: Los polímeros según la invención son superiores a los péptidos individuales a partir de los cuales se construyen. Los efectos sinérgicos en el sentido de la presente invención son efectos que muestran una mayor selectividad y/o especificidad y/o afinidad con respecto al monómero A-beta o el oligómero A-beta o las fibrillas A-beta, en particular el valor K_D relativo a la unión al monómero A-beta u oligómero A-beta o fibrillas A-beta en comparación con las unidades peptídicas individuales.

En otra configuración particularmente ventajosa de la invención, los polímeros y en particular los dímeros en los experimentos con modelos animales (in vitro o in vivo) actúan ventajosamente de forma más eficiente que las unidades peptídicas individuales.

20 En una variante de la invención, se utilizan aquellos péptidos o polímeros que se unen a un monómero A-beta u oligómero A-beta o fibrillas A-beta con una constante de disociación (valor K_D) de como máximo 500 μM , preferentemente 250, 100, 50 μM , con particular preferencia 25, 10, 1 μM , con particular preferencia con una constante de disociación (valor K_D) de como máximo 500 nM, 250, 100, 50, con particular preferencia 25, 10, 1 nM, 500 pM, 100, 25 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 pM hasta sub-pM, donde se puede asumir cualquier valor intermedio.

En una configuración de la invención, la afinidad se define mediante la constante de disociación (valor K_D). La constante de disociación (valor K_D) del péptido según la invención se reduce en una configuración de la invención. Esto da como resultado una mayor afinidad de la unión y una mayor eficacia de la degradación y/o la prevención de la formación de oligómeros beta amiloides tóxicos. Esto se aplica en particular, pero no exclusivamente, a un valor K_D más bajo en el sitio de alta afinidad del monómero A-beta o del oligómero A-beta.

Los fragmentos y las partes muestran un efecto similar o idéntico al de los péptidos según la invención.

35 Los monómeros y polímeros se denominan a continuación péptidos según la invención.

En una configuración de la invención, los péptidos según la invención están provistos de un grupo amida de ácido en el extremo C-terminal libre. Los péptidos según la invención, por ejemplo, los péptidos según SEQ ID NO: 1-11 están amidadas en la posición 12 del extremo C-terminal libre. Los dímeros de este se amidan en la posición 24 en el extremo C libre y así sucesivamente.

Los péptidos según la invención, en particular los péptidos según SEQ ID NO: 1-11 en una configuración adicional de la invención, están covalentemente unidos entre sí en el extremo C-terminal libre con el extremo N-terminal libre y están, por tanto, presentes en una forma correspondientemente ciclada. El cierre del anillo también tiene el efecto ventajoso de que el grupo carboxilo ya no está presente en el extremo C libre.

El péptido según la invención presenta ventajosamente una secuencia de aminoácidos en la que se produce la ciclación de la molécula lineal, p. ej., mediante unión covalente del primer al último aminoácido, p. ej., a través de una reacción de condensación. Por supuesto, hay otras formas de ciclación, p. ej., uniendo otros aminoácidos. La unión del segundo aminoácido con el último aminoácido se menciona solo a modo de ejemplo. Cualquier otra unión posible es igualmente concebible.

En caso de que el primer y el último aminoácido del péptido estén unidos, se propicia de forma ventajosa que no haya extremos abiertos en la cadena peptídica (secuencia de aminoácidos).

55 Esta medida también tiene el efecto de que todos los péptidos con secuencias de aminoácidos lineales que, después de la ciclación, dan como resultado la misma secuencia de aminoácidos indistinguible, son idénticos en este sentido.

Ejemplo: La secuencia lineal de aminoácidos del péptido D3 conocido es rprtrlhthmr. El péptido ciclado correspondiente "cD3", unido por un enlace amida entre el grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal, ya no se puede distinguir de los péptidos ciclados prtrlhthmr, rtrlhthmrp, trlhthmrpr, rlhthmrprt, lhthmrprtr, hthmrprtrl, thmrprtrlh, hmrprtrlh, rnrprtrlh, rnrprtrlhth, rnrprtrlhth, o rnrprtrlhth. El cD3 también puede derivarse de cada una de estas

secuencias.

Además, los efectos de una mayor afinidad, especificidad y eficacia reivindicados según la invención se producen frente a un péptido de unión, preferentemente incluso frente a cualquier péptido de unión lineal, del que se pueda derivar un péptido ciclado o modificado de otra manera.

La fabricación de péptidos ciclados también es estado de la técnica y se puede llevar a cabo, por ejemplo, según el procedimiento descrito en el documento DE 102005049537 A1.

10 La ciclación a través del primer y último aminoácido del péptido tiene el efecto ventajoso de que ya no hay extremos "abiertos" de la cadena del péptido, que a menudo son puntos de ataque para las actividades de degradación de péptidos en células, animales o seres humanos, p. ej., por aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

Mediante péptidos ciclados según la invención, tales como, p.ej., ANK6 según SEQ ID NO: 1, también se logra de forma ventajosa que estos péptidos o polímeros ciclados según la invención puedan no degradarse fácilmente como efecto secundario, aunque este efecto no es decisivo. Además, como se ha mostrado, también solo se aplica al caso de una ciclación de cabeza a cola o de cola a cabeza, en la que ambos extremos del péptido lineal se unen entre sí.

"Secuencias homólogas" u "homólogos" en el sentido de la invención significa que una secuencia de aminoácidos presenta una identidad con una de las secuencias de aminoácidos de monómeros anteriormente mencionadas de al menos un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 %. En lugar del término "identidad", se usan los términos "homólogo" u "homología" como sinónimos en esta descripción. La identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se calcula por comparación utilizando el programa BESTFIT basado en el algoritmo de Smith, T.F. y Waterman, M.S. (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)) con los siguientes parámetros para los aminoácidos: Gap creation penalty: 8 y Gap extension penalty: 2; y el siguiente parámetro para los ácidos nucleicos: Gap creation penalty: 50 y Gap extension penalty: 3. Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos se define por la identidad de la secuencia de ácido nucleico/secuencia de polipéptidos en toda la longitud de la secuencia, según se calcula por comparación utilizando el programa GAP basado en el algoritmo de Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48: 443-453) con los siguientes parámetros para los aminoácidos: Gap creation penalty: 8 y Gap extension penalty: 2; y los siguientes parámetros para los ácidos nucleicos: Gap creation penalty: 50 y Gap extension penalty: 3.

Para los fines de la presente invención, dos secuencias de aminoácidos son idénticas si tienen la misma secuencia de aminoácidos.

En una variante, los homólogos se refieren las secuencias retro-inversas correspondientes de los monómeros mencionados anteriormente. Según la invención, el término "secuencia retro-inversa" denota una secuencia de aminoácidos que está compuesta de aminoácidos en forma enantiomérica (inversa: la quiralidad del átomo de alfa-C está invertida) y en la que también se ha invertido el orden de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos original (retro = hacia atrás).

En otra variante, los péptidos según la invención se unen a partes del péptido β -amiloide.

En una variante adicional, los péptidos según la invención tienen secuencias que difieren de las secuencias especificadas en hasta tres aminoácidos

Además, las secuencias que contienen las secuencias mencionadas anteriormente también se usan como péptidos.

En otra variante, los D-péptidos presentan fragmentos de las secuencias mencionadas o presentan secuencias homólogas a las secuencias mencionadas anteriormente.

Según la invención, es un péptido para uso en medicina, preferentemente para el tratamiento o diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.

El péptido consiste sustancialmente en D-aminoácidos.

Para los fines de la presente invención, el término "esencialmente a partir de D-aminoácidos" significa que los monómeros a usar según la invención están al menos en un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, preferentemente en un 75 %, 80 %, con particular preferencia en un 85 %, 90 %, 95 %, en particular en un 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % formados por D-aminoácidos.

En una realización de la presente invención, los péptidos según la invención son derivados del D-péptido D-

enantiomérico D3. Los derivados en el sentido de la invención son secuencias peptídicas derivadas de D3 que se logran mediante uno de los siguientes tres procedimientos:

- 5 a) Cambio del orden y/o el número de unidades de aminoácidos en D3. Solo se usan los aminoácidos que están presentes en la secuencia D3.
- b) Supresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 aminoácidos de la secuencia D3.
- 10 c) Intercambio de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos con otros aminoácidos, preferiblemente D-enantiómeros.

10 En una variante adicional, es un péptido según la invención para inhibir la formación de fibrillas de péptidos beta amiloides. Los péptidos y/o polímeros según la invención desintoxican los oligómeros o polímeros A β formados a partir de ellos, así como las fibrillas, uniéndolos, por ejemplo, a monómeros A-beta y convirtiéndolos así en compuestos no tóxicos. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un procedimiento in vitro para la destoxificación de los oligómeros A β , así como de los polímeros o fibrillas formados a partir de los mismos.

En una realización, la invención también se refiere a péptidos según la invención que están unidos a una sustancia adicional.

20 En el contexto de la invención, el enlace es un enlace químico como se define en Römpf Chemie Lexikon, 9. Auflage, Band 1, Seite 650 ff, Georg Thieme Verlag Stuttgart, preferiblemente un enlace de valencia principal, en particular un enlace covalente.

25 En una variante, las sustancias son medicamentos o principios activos, definidos de conformidad con la Ley de medicamentos §2 o §4 (19), a partir de septiembre de 2012. En una alternativa, los principios activos son sustancias terapéuticamente activas que se usan como principios activos. Se prefieren los antiinflamatorios.

En otra variante, las sustancias son compuestos que potencian la acción de los péptidos.

30 En una alternativa, tales compuestos son aminopirazol y/o derivados del aminopirazol. Los derivados de aminopirazol en el sentido de la invención son ácido 3-aminopirazol-5-carboxílico o ácido 3-nitropirazol-5-carboxílico y todos los descendientes en los que el grupo CH heterocíclico ha sido reemplazado por -CR- o -N- u -O- o -S-, y todos los dímeros peptídicos, trímeros o tetrameros derivados de los mismos, preferentemente trímeros de aminopirazol.

35 En una alternativa adicional, estos son compuestos que mejoran la solubilidad de los péptidos y/o el paso a través de la barrera hematoencefálica.

En una alternativa, los péptidos según la invención tienen cualquier combinación de al menos dos o más características de las variantes, diseños y/o alternativas descritas anteriormente.

40 En el contexto de la invención también se reconoció que los péptidos amidados y/o ciclados se unen en comparación con los péptidos de unión lineales en los que el C-terminal libre, es decir, el grupo carboxilo C-terminal, no está modificado y, por lo tanto, lleva una carga negativa, con una mayor afinidad al monómero Abeta. Esto significa que el valor de K_o de los péptidos modificados es más bajo que el de los péptidos lineales en los que el C-terminal libre, es decir, el grupo carboxilo C-terminal, no está modificado y, por tanto, lleva una carga negativa.

En otra realización preferida de la invención, la afinidad de la unión de los péptidos modificados según la invención sin carga negativa en el extremo C se incrementa en comparación con los péptidos lineales con carga negativa en el extremo C pero por lo demás con la misma secuencia de aminoácidos en un 1 %, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, particularmente en un 10 %, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, particularmente en un 100 %, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, particularmente en un 200 %, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, particularmente en un 300 %, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314,

315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, particularmente en un 400 %, 401, 5 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, de forma ventajosa incluso en un 500 %, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 10 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, de forma particularmente ventajosa en un 600 %, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 15 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, de forma particularmente ventajosa en un 700 %, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 20 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, también de forma particularmente ventajosa en un 800 %, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 25 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, también de forma particularmente ventajosa en un 900 %, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 30 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, o incluso en un 1000 %, o incluso en un 10 000 % o incluso hasta en un 100 000 % o 1 000 000 %, donde puede asumirse cualquier valor intermedio. Esto se aplica en particular a la mayor afinidad por el sitio de alta afinidad del monómero A-beta o 35 del oligómero A-beta.

Esto se indica mediante un valor K_D convenientemente reducido. El valor de K_D como medida de la afinidad de la unión de un péptido modificado, en particular ciclado, al monómero beta amiloide o al oligómero A beta, en comparación con un péptido de unión lineal con carga negativa en el extremo C libre, es rebajado en un 1 %, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, en 40 particular en un 10 %, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, en particular en un 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5 %, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 hasta en un 99,99 o incluso en un 99,999 %, donde puede asumirse cualquier valor intermedio.

45 Estos valores K_D más bajos se refieren de forma ventajosa particularmente, pero no exclusivamente, al sitio de alta afinidad del monómero A-beta o del oligómero A-beta.

Los péptidos modificados se pueden utilizar, por tanto, de forma más eficaz como sondas para fines de diagnóstico 50 que los péptidos de unión lineales con una carga negativa en el extremo C-terminal libre, en particular también de forma más eficaz que sus homólogos peptídicos lineales con una secuencia de aminoácidos idéntica.

En particular, sin embargo, también se pueden usar más eficazmente como agentes terapéuticos que los péptidos de unión lineales con una carga negativa en el extremo C-terminal libre, en particular más eficazmente que sus homólogos 55 peptídicos lineales con una secuencia de aminoácidos idéntica.

En el contexto de la invención, se reconoció además que dichos péptidos modificados en comparación con péptidos con una carga negativa en el extremo C-terminal libre, pero en particular en comparación con sus homólogos peptídicos con una secuencia de aminoácidos idéntica, además también previenen con una mayor efectividad o 60 eficacia la formación de oligómeros beta amiloides particularmente tóxicos o propician su destrucción y/o destoxificación. Esta eficacia se aumenta en particular en un 1 %, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, en particular en un 10 %, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,

43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,9, de forma particularmente ventajosa incluso en un 100 %.

- 5 En una realización particularmente preferida de la invención, los efectos de la mayor afinidad por el monómero A-beta o el oligómero A-beta o las fibrillas A-beta y la eficacia simultánea asociada de la eliminación, la destoxificación de los oligómeros A-beta (o la formación) también se producen in vitro y/o in vivo.

La invención también se refiere a un péptido según la invención para unirse a péptidos A β agregados.

10

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para producir el péptido según la invención mediante síntesis de péptidos, como es conocido por el experto en la materia, por ejemplo, procedimientos de síntesis orgánica para cualquier compuesto de bajo peso molecular y/o mutagénesis y producción recombinante.

- 15 La invención también se refiere a una composición que contiene los péptidos según la invención, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende los péptidos según la invención, en particular para prevenir oligómeros A β tóxicos, o para destruir polímeros o fibrillas formadas a partir de los mismos.

20

La «composición» según la invención puede ser, p. ej., una vacuna, un medicamento (p. ej., en forma de comprimido), una solución inyectable, un alimento o suplemento alimenticio, que contiene los péptidos según la invención en una formulación que se preparará en base al conocimiento especializado.

- 25 La presente invención también se refiere a un KIT que contiene los péptidos según la invención.

En dicho kit, los péptidos pueden estar empaquetados en contenedores en su caso con/en tampones o soluciones. Todos los componentes del kit pueden envasarse en el mismo envase o por separado. El kit también puede contener instrucciones para su uso. Dicho kit puede, por ejemplo, contener los péptidos según la invención en una ampolla para

- 30 inyección con un tapón y/o tabique. También puede contener una jeringa desechable, por ejemplo.

Otro objeto de la presente invención es el uso in vitro del péptido según la invención como una sonda para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de monómeros beta amiloides, oligómeros beta amiloides o fibrillas A-beta.

35

La presente invención también se refiere a una sonda que contiene los péptidos según la invención para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de monómeros beta amiloides u oligómeros beta amiloides.

Tales sondas son de gran importancia porque permiten el diagnóstico precoz de la demencia de Alzheimer. Con un

- 40 diagnóstico temprano, la enfermedad se puede contrarrestar en una etapa muy temprana.

Dichas sondas moleculares contienen los polímeros según la invención y opcionalmente colorantes, colorantes fluorescentes, isótopos radiactivos (PET, etc.), gadolinio (MRI), así como sustancias alternativas adecuadas para obtener imágenes de las sondas y pueden, p. ej., inyectarse por vía intravenosa al paciente. Después de pasar a

- 45 través de la barrera hematoencefálica, las sondas pueden unirse a monómeros A-beta, oligómeros A-beta, y/o placas. Los oligómeros y/o placas A β marcadas de esta manera pueden hacerse visibles mediante procedimientos de formación de imágenes tales como, p. ej., SPECT, TEP, TAC, RMN, espectroscopía de RM de protones.

Además, la invención también se refiere al uso in vitro del péptido para prevenir los oligómeros beta amiloides y/o los

- 50 agregados de péptidos beta amiloides y/o las fibrillas beta amiloides.

El péptido según la invención también se usa para la destoxificación de oligómeros y/o agregados beta amiloides tóxicos. En particular, se usa para unirse a los oligómeros y/o agregados beta amiloides y, por lo tanto, para formar agregados amorfos no tóxicos.

55

Se ha reconocido que, si los oligómeros A β ya están presentes, el objetivo del tratamiento debe ser abordarlos con sustancias que tengan la mayor afinidad posible por el monómero A-beta. De hecho, la afinidad por el monómero A-beta no puede ser suficientemente alta y la constante de disociación correspondiente del péptido según la invención está entonces en el intervalo sub- μ M o el intervalo pM o incluso inferior.

60

Se reconoció en el contexto de la invención que los monómeros A-beta, como componentes básicos de los oligómeros A-beta, se forman constantemente en el cuerpo humano y presumiblemente no son tóxicos per se. Incluso existe la

posibilidad de que los monómeros tengan una función positiva. Los monómeros A-beta pueden acumularse de forma aleatoria según su concentración. La concentración depende de su velocidad de formación y descomposición en el cuerpo. Si la concentración de monómeros A-beta en el cuerpo aumenta con la edad, el ensamblaje espontáneo de los monómeros en oligómeros A-beta es cada vez más probable. Los oligómeros A β resultantes podrían multiplicarse de manera análoga a los priones y finalmente conducir a la enfermedad de Alzheimer.

Una diferencia importante entre la prevención y el tratamiento o incluso la cura de la demencia de Alzheimer radica en el hecho de que la prevención posiblemente ya pueda lograrse evitando la formación de los primeros oligómeros A β . Para ello son suficientes unos pocos ligandos A-beta de alta afinidad, que al mismo tiempo son poco afines y selectivos (o específicos) con respecto a los oligómeros A-beta.

Estos requisitos con respecto al diagnóstico (sondas) y la terapia de la demencia de Alzheimer se cumplen con la provisión de los péptidos según la invención. Los péptidos según la invención se unen a los monómeros A-beta o a los oligómeros A-beta con una constante de disociación correspondientemente baja para fines de diagnóstico y/o terapia. Otro objeto es el uso de los péptidos según la invención como agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

Una unión particularmente fuerte de los péptidos según la invención a las moléculas objetivo se produce por una alta especificidad y/o afinidad por la molécula objetivo de los péptidos según la invención. Los complejos formados tienen una constante de disociación (valor K_D) baja.

Mediante la prueba de tioflavina T fue posible demostrar que los péptidos según la invención inhiben de manera muy eficiente la formación de fibrillas de péptidos A-beta.

Otro objeto es el uso de los péptidos según la invención en un procedimiento para el tratamiento (*in vitro*, *ex vivo*) de sangre, productos sanguíneos y/u órganos, caracterizado porque se toman sangre, productos sanguíneos y/u órganos del cuerpo humano o animal y los oligómeros A(amiloides) β se eliminan y/o destoxifican.

En el sentido de la invención, el término afinidad de unión es una medida de la fuerza de unión entre las parejas de unión en las interacciones proteína-ligando y la especificidad de unión frente al monómero A-beta indica que solo hay unión al monómero A-beta y ninguna o solo una unión débil a otras especies A-beta. El cociente de la señal de unión de los monómeros A-beta a los oligómeros A-beta o los monómeros A-beta a las fibrillas A-beta o el equivalente para los oligómeros A-beta se da como valor específico. Unión específica significa que el cociente es superior a 1.

De manera similar, la especificidad de unión al oligómero A-beta significa que solo hay unión a los oligómeros A-beta y no hay unión, o solo unión débil, a otras especies A-beta. Como valor específico para los monómeros A-beta, se indica el cociente de la señal de unión de los oligómeros A-beta con el monómero A-beta o de los oligómeros A-beta con las fibrillas A-beta o su equivalente. Unión específica significa a su vez que el cociente es superior a 1.

Si los oligómeros A-beta ya están presentes, el objetivo del tratamiento debería ser abordarlos con sustancias que tengan la mayor afinidad y especificidad posibles por los monómeros A-beta con el fin de eliminar los oligómeros A-beta. Esto se consigue con los péptidos según la invención.

Optimizando el péptido D3 ya conocido, el mecanismo de acción debería permanecer similar o idéntico, pero las sustancias deberían tener propiedades más eficaces. Las propiedades son entre otras afinidad y especificidad de unión para monómeros y oligómeros A-beta, inhibición de la formación de fibrillas A-beta, inhibición de la citotoxicidad A-beta, precipitación de oligómeros A-beta, conversión de fibrillas A-beta en especies no amiloidogénicas no tóxicas.

La optimización se logró reemplazando 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido D3 original y una delección.

D3 se optimizó con la ayuda de microarrays de péptidos. En una primera etapa, cada aminoácido del péptido 12-mer fue reemplazado por 19 aminoácidos naturales y 13 aminoácidos adicionales en la forma D-enantiomérica. En una segunda etapa, se combinaron los intercambios más prometedores. Se intercambiaron 4, 5, 6 o 7 aminoácidos de los péptidos D3 originales. Además, se eliminó 1 aminoácido. Dado que la unión de los péptidos debe dirigirse específicamente contra una especie A-beta (monómeros, oligómeros o fibrillas), se trataron los microarrays con las diferentes especies y se excluyó una unión de otras especies que pudieran estar presentes en la mezcla de incubación.

Se encontraron 11 péptidos que se unen de forma específica y con alta afinidad al monómero A-beta. Estos son los péptidos denominados como ANK1-7 y ANK 15-18 según SEQ ID NO: 1-11. Con alta afinidad significa con valores K_D de 2 a 10 veces más bajos que D3.

D3 (Estado de la técnica):

a) "ANK1" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rprrlhthnr
b) "ANK2" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhinr
c) "ANK3" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrir06yhinr
d) "ANK4" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrir06yhwyr
e) "ANK5" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
f) "ANK6" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
g) "ANK7" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
h) "ANK15" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
i) "ANK16" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
j) "ANK17" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr
k) "ANK18" (extremo N-terminal libre, extremo C-terminal amidado):	rkrirlyhwnr

con

02: 4-Fluoro-fenilalanina (D)

06: Fenilglicina (D)

07: D-Homoarginina

10 Todos los péptidos se usan según la invención también como péptidos dobles y/o en forma ciclizada. Esto permite aumentar aún más la eficacia de los péptidos.

Los péptidos ANK1-7 y ANK15-18 pueden usarse como medicamento contra la demencia de Alzheimer al unirse al monómero A-beta. Los péptidos específicos de los oligómeros pueden utilizarse además como sondas para el diagnóstico debido a su unión específica a los oligómeros A-beta.

Ejemplos de realización:

La invención se explica con más detalle a continuación sobre la base de ejemplos de realización y las figuras adjuntas, sin que la invención esté limitada por ello.

Muestran:

Figura 1: a) Señales de unión de los péptidos según la invención a monómeros A-beta, oligómeros A-beta y fibrillas A-beta.

b) Especificidad de unión de los péptidos según la invención.

Figura 2: Reducción de oligómeros beta amiloides mediante los péptidos según la invención.

Figura 3: a) Ensayo de THT de péptidos según la invención,
b) Ensayo de THT analizada con fluorescencia de THT relacionada con el beta amiloide en el punto de saturación.

Figura 4: a) Ensayo MTT en células SH-SY5 sin incubación con A-beta.

b) Ensayo MTT en células SH-SY5 con incubación con A-beta.

Para el microarray de péptidos con derivados de D3 se enlazó el mismo covalentemente a través del extremo C-terminal en portaobjetos de vidrio tal como se muestra a continuación.

- 1ª generación: D3 con respectivamente 1 reemplazo por 19 aminoácidos naturales y 13 aminoácidos no naturales
- 2ª generación: Se combinaron los reemplazos, que dan lugar a una unión más eficaz de los péptidos al A-beta.

- Pretratamiento de los portaobjetos de péptidos del microarray:

- Sumergir 3 veces brevemente en etanol (96 %) y lavar a continuación con H₂O (30 min) ◦ centrifugar brevemente para secar

5 - Preparación de monómeros y oligómeros:

- Cromatografía de exclusión por tamaño según Johansson y col. 2006 (Johansson, A.-S. y col. Physiochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A β 1-42Arctic and A β 1-42wt. FEBS Journal 273, 2618-2630 (2006)).

10 ◦ Los oligómeros fueron fraccionados a 8-9 ml, los monómeros a 16-17 ml.

- Preparación de fibrillas:

- Incubar A-beta durante 3 días, centrifugar, descartar el sobrenadante y resuspender en el buffer (repetir 3 veces)

15 - Realización del microarray de péptidos:

- Incubar con monómeros, oligómeros, fibrillas FITC-A-Beta, y FITC durante 1 h a temperatura ambiente.
- Lavado: TBS-T 3x breve (solo se cambió el tampón TBS-T), 3x 10 min en un tubo Falcon, 3x H₂O, 3x 10 min
- Secado por centrifugación

20

- La unión de A-Beta marcado con fluorescencia con los péptidos inmovilizados es detectada por el colorante fluorescente con el lector de microarray FLA800 de Fuji Film. Cuanto más A-beta se una al péptido, mayor es la señal de fluorescencia.

25

- Modo de soporte: Portaobjetos
- Resolución: 10 μ m
- Modo de escaneo: Alta Sensibilidad (lento): Barrido de píxeles a 200 mm/s
- Laser: 473 nm
- Filtro: 530 DF 20

30

- Tubo fotomultiplicador (PMT) HV (%): 100
- Las imágenes se guardaron como archivos .tif

El análisis de las señales de fluorescencia se realiza con el software AIDA Metrix de Raytest:

Definición de rejilla 1 ^{er} nivel	
Filas	1
Columnas	1
2 ^o nivel	
Filas	12
Columnas	4
Espaciado X	0
Espaciado Y	0
3 ^{er} nivel	
Filas	9
Columnas	9
Diámetro	80 μ m
Definición del fondo	
Anillos de puntos locales	
Puntos inflados	150 μ m
Anchura del anillo	30 μ m
Por área	promedio

Definición de rejilla 1 ^{er} nivel	
Alineación predeterminada (Parámetro)	
Diámetro	100 %
Mobilidad	Restringida
	Alinear rejilla, alinear puntos
Alineación predeterminada (Procedimiento)	
Desviación Bkg	
Umbral	2.0*StdDev

Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, se realiza la incubación de los microarrays de péptidos al menos 3 veces por especie.

- 5 Las señales de fluorescencia medidas de las reproducciones se normalizan con una normalización basada en la mediana y el control se restó de la señal. Con esto se evitó que se produjera la unión del A-beta marcado con fluorescencia a través del colorante.

Las señales de unión de una especie A-beta a un péptido se promediaron.

10

Para determinar la especificidad de unión, se forma el cociente de la especie a la que se pretende que el péptido se una de forma específica a otra especie.

Ejemplo: Especificidad de unión del péptido X a los monómeros Abeta = señal de unión del péptido X a los monómeros/señal de unión del péptido X a los oligómeros.

15

Los péptidos ANK1-7 y ANK 15-18 según la invención dan lugar a una inhibición de la fibrilación A-beta, inhibición de la toxicidad celular de A-beta, eliminación de los oligómeros A-beta y la conversión de las fibrillas A-beta en especies no tóxicas y no amiloides. La afinidad y especificidad de unión a los monómeros A-beta están dadas.

20

La afinidad de la unión es una medida de la fuerza de unión entre las parejas de la unión en las interacciones proteína-ligando y la especificidad de la unión indica que una unión solo está presente en los monómeros A-beta y ninguna o solo una unión débil en otras especies A-beta. Como valor específico para los monómeros A-beta, se indica aquí el cociente de la señal de unión de los monómeros A-beta con oligómeros A-beta o de los monómeros A-beta con las fibrillas A-beta o su equivalente. Unión específica significa que el cociente es superior a 1.

25

En detalle, se determinaron los siguientes datos:

	Señal de unión a los monómeros A-beta	Señal de unión a los oligómeros A-beta	Señal de unión a fibrillas A-beta	Especificidad de unión monómero a oligómero	Especificidad de unión monómero a fibrillas
ANK1	6.6	1.9	1.3	3.5	5.1
ANK2	5.6	1.6	0.8	3.4	7.1
ANK3	3.6	0.6	0.2	6.5	21.9
ANK4	4.4	1.3	1.0	3.3	4.3
ANK5	4.3	0.7	2.0	5.9	2.2
ANK6	4.9	1.2	2.5	4.1	1.9
ANK7	2.1	0.3	0.3	6.4	6.8
ANK15	1.3	0.6	0.1	2.2	12.2
ANK16	11.9	1.4	1.5	8.6	8.1
ANK17	4.7	1.0	1.9	4.8	2.5

ANK18	1.2	0.2	0.1	7.0	9.4
D3	0.5	0.6	0.8	0.8	0.6

La Figura 1a muestra las señales de unión para ANK1-ANK7 y ANK15-18 comparadas con D3 en monómeros, oligómeros y fibrillas A-beta. Los péptidos se unen a los monómeros A-beta de manera mucho más eficiente que a los oligómeros A-beta y a las fibrillas A-beta, lo que se indica por una diferencia significativa en la señal de unión. Por 5 diferencia clara se entiende al menos una diferencia de 1,5 rfu entre la señal de unión de los monómeros A-beta y los oligómeros A-beta y/o las fibrillas A-beta.

La Figura 1b muestra la especificidad de unión para ANK1-7 y ANK 15-18. Está claro que, para todos los péptidos según la invención, la especificidad de unión frente al monómero A-beta es superior a 1. En cambio, D3 tiene una 10 especificidad de unión frente al monómero A-beta inferior a 1.

Mediante el procedimiento QIAD para la caracterización cuantitativa de los péptidos y/o proteínas amiloides de una muestra, se pudieron cuantificar las propiedades de las sustancias. A-beta preincubado se coincubó con los péptidos. Mediante una centrifugación con gradiente de densidad se separaron las diferentes especies A-Beta y se cuantificó 15 Abeta en fracciones individuales mediante RP-HPLC. Se analizó la eliminación de los oligómeros A-beta en la fracción 4-6.

Se muestra que especialmente ANK5, ANK6 y ANK7 eliminan los oligómeros A-beta de forma más eficaz que D3, véase la Figura 2. Por una parte, la unión específica a los monómeros puede impedir la formación de oligómeros sin 20 reducir la concentración de monómero A-beta y, por otra parte, los oligómeros A-beta ya formados pueden ser eliminados del equilibrio dinámico de las diferentes especies de agregados mediante el tratamiento con una sustancia activa que establezca el monómero A-beta según el principio de Le Chatelier, provocando así la degradación de oligómeros A-beta a monómeros A-beta.

25 El ensayo de ThT muestra una reducción significativa de las fibrillas A-beta ThT-positivas tras la coincubación con las sustancias probadas (Figuras 3a y 3b). Esto indica que se inhibe la agregación o se forman agregados amorfos.

En concentraciones terapéuticas relevantes, no se pudo detectar una toxicidad significativa de los péptidos del ensayo MTT en células SH-SY5Y, que el experto en la materia conoce (Figura 4). En cambio, se pudo demostrar que la 30 toxicidad provocada por A-beta se reduce por las sustancias ANK4, ANK5, ANK6 y ANK7. Según el estado actual de los conocimientos, el oligómero A-beta es la especie tóxica. Como los péptidos eliminan los oligómeros A-beta, la toxicidad inducida por A-beta también se reduce.

En detalle:

35 La Figura 2 muestra que con una relación entre A-beta y péptidos de 8:1, los péptidos ANK5, ANK6 y ANK7 reducen los oligómeros A-beta de manera significativamente más eficaz que D3. Los otros péptidos muestran una eficacia comparable con D3 a esta concentración. D3 elimina los oligómeros A-beta en un 50 ± 10 %, ANK1 en un 51 ± 6 %, ANK2 en un 54 ± 7 %, ANK3 en un 62 ± 10 %, ANK4 en un 59 ± 16 %, ANK5 en un 72 ± 2 %, ANK6 en un 81 ± 3 % y ANK7 en un 73 ± 1 %.

40 Los péptidos según la invención muestran así una mayor reducción de los oligómeros A-beta en un factor de hasta 1,6 en comparación con D3.

La Figura 3 muestra que ANK1-7 reduce significativamente la formación de fibrillas A-beta ThT-positivas. La 45 fluorescencia ThT se mantiene en el nivel del primer valor de medición durante todo el período de medición (48 h) para los péptidos ANK1, ANK2 y ANK3, pero se observa un ligero aumento para los péptidos ANK4, ANK6 y ANK7 (corresponde al 13-21 % de la fluorescencia de ThT de Abeta después de 48 h) y para ANK5 un aumento a 1029 rfu, que corresponde al 53 % de la fluorescencia de ThT del control A-Beta después de 48 h.

50 La Figura 4a muestra que ANK4, ANK5, ANK6 y ANK7 por sí solos no presentan ningún efecto tóxico en las células. Mediante la coincubación de A-beta con ANK4, ANK5, ANK6 y ANK7 en diferentes concentraciones, se podría lograr una reducción de la toxicidad de A-beta, véase la Figura 4b. Esta reducción es más eficiente con las sustancias ANK4 y ANK6 que con D3. Las significancias se refieren a la concentración respectiva con D3 (*p $\leq 0,05$; ** p $\leq 0,01$; *** p $\leq 0,001$; n. s. no significativo).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Forschungszentrum Juelich GmbH

5 <120> Péptidos que se unen de forma específica a especies A-beta para la terapia y/o el diagnóstico de la demencia de Alzheimer

<130> PT 1.2695 PCT

10 <160> 11

<170> Versión 3.5 de la patente

<210> 1

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> D-péptidos, ANK6

<400> 1

Arg Lys Arg Ile Arg Leu Val Thr Lys Lys Lys Arg
1 5 10

25

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> D-péptidos, ANK7 (con 4-fluoro-fenilalanina (D) en la posición 7 en lugar de fenilalanina)

35 <400> 2

Arg Lys Arg Val Arg Leu Phe Thr His Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 3

40 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> D-péptidos, ANK5

<400> 3

Arg Lys Arg Val Arg Leu Val Tyr His Lys Lys Arg
1 5 10

50

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> D-péptidos, ANK4

<400> 4

Arg Lys Arg Ile Arg Leu Val Tyr His Trp Asn Arg
1 5 10

<210> 5
5 <211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> D-péptidos, ANK1

<400> 5

Arg Lys Arg Ile Arg Leu Val Tyr His Ile Asn Arg
1 5 10

15 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> D-péptidos, ANK2 (con fenilglicina (D) en la posición 7 en lugar de glicina)

<400> 6

25 Arg Lys Arg Ile Arg Leu Gly Tyr His Ile Asn Arg
1 5 10

<210> 7
<211> 12
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> D-péptidos, ANK3 (con fenilglicina (D) en la posición 7 en lugar de glicina)

35 <400> 7

Arg Lys Arg Ile Arg Leu Gly Tyr His Trp Asn Arg
1 5 10

40 <210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> D-péptidos, ANK15 (con fenilglicina (D) en la posición 7 en lugar de glicina)

<400> 8

50 Arg Pro Arg Val Arg Leu Gly Tyr His Trp Asn Arg
1 5 10

<210> 9
<211> 12
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> D-péptidos, ANK16 (con homoarginina (D) en la posición 4 en lugar de arginina)

5 <400> 9

Arg Lys Arg Arg Arg Leu Val Thr Lys Arg Asn Arg
1 5 10

<210> 10

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> D-péptidos, ANK17 (con fenilglicina (D) en la posición 7 en lugar de glicina)

<400> 10

20 Arg Lys Arg Ile Arg Leu Gly Tyr His Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> D-péptidos, ANK18 (con homoarginina (D) en la posición 4 en lugar de arginina)

30

<400> 11

Arg Pro Arg Arg Arg Leu His Thr Lys Lys Lys Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que se une de forma específica a una especie beta amiloide, que consiste esencialmente en D-aminoácidos, que contiene al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO. 10 y/o SEQ ID NO. 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor Kd de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprrlhthrn, así como polímeros de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO. 10 y/o SEQ ID NO. 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor Kd de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprrlhthrn.
2. Péptido según la reivindicación 1 para uso en medicina.
3. Péptido según la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.
4. Péptido según la reivindicación 1 para uso en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en pacientes.
5. Péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 2 a 3 para inhibir la formación de fibrillas A-beta.
6. Péptido para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 2 a 3 para unirse a especies beta amiloides agregadas.
7. KIT que contiene un péptido según la reivindicación 1 o para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
8. Composición que contiene un péptido según la reivindicación 1.
9. Uso de un péptido según la reivindicación 1 in vitro como sonda para la identificación, determinación cuantitativa y/o cualitativa específicas de monómeros beta amiloides, fibrillas beta amiloides y/u oligómeros beta amiloides.
10. Uso de un péptido según la reivindicación 1 in vitro para la prevención de oligómeros beta amiloides y/o agregados de péptido beta amiloides.
11. Uso de un péptido según la reivindicación 1 in vitro para la destoxificación de oligómeros y/o agregados beta amiloides tóxicos.
12. Uso según la reivindicación 11 **caracterizado porque** los oligómeros beta amiloides y/o los agregados con el péptido según la reivindicación 1 forman agregados amorfos no tóxicos.
13. Uso de al menos una secuencia de aminoácidos, que consiste esencialmente en D-aminoácidos, seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO. 10 y/o SEQ ID NO. 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor Kd de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprrlhthrn, así como polímeros de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO. 10, y/o SEQ ID NO. 11 y sus homólogos con una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos un 80 %, donde los homólogos presentan un valor Kd de 2 a 10 veces menor que el péptido con la secuencia de aminoácidos rprrlhthrn, para la unión específica in vitro al monómero A-beta.
14. Péptido según la reivindicación 1 para el uso en la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

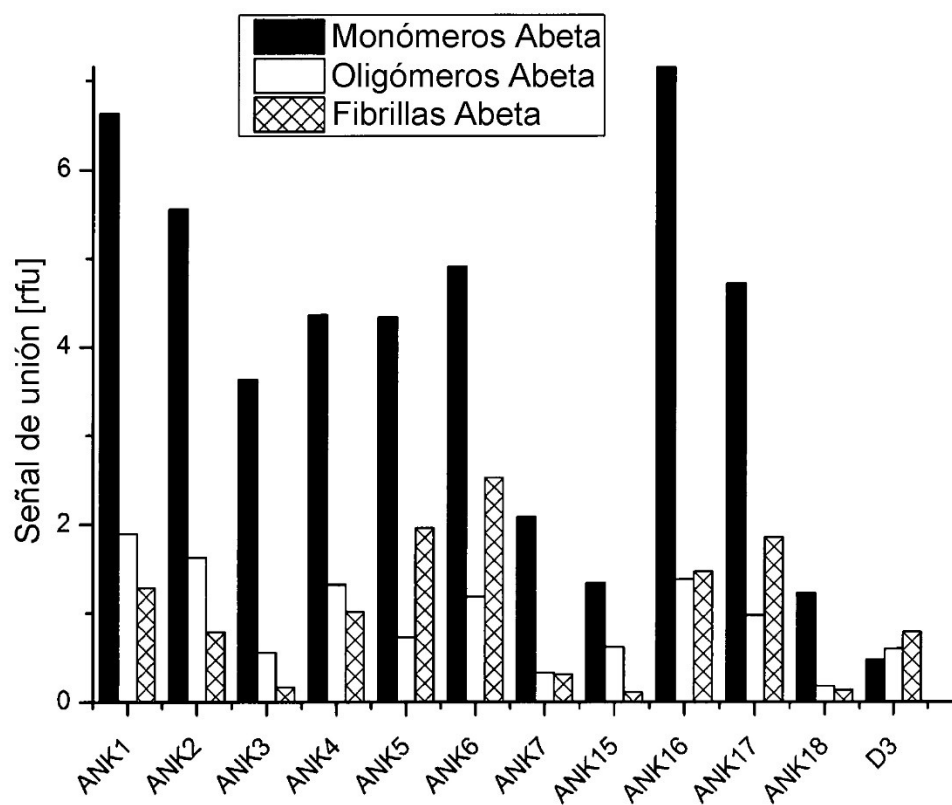


Figura 1a

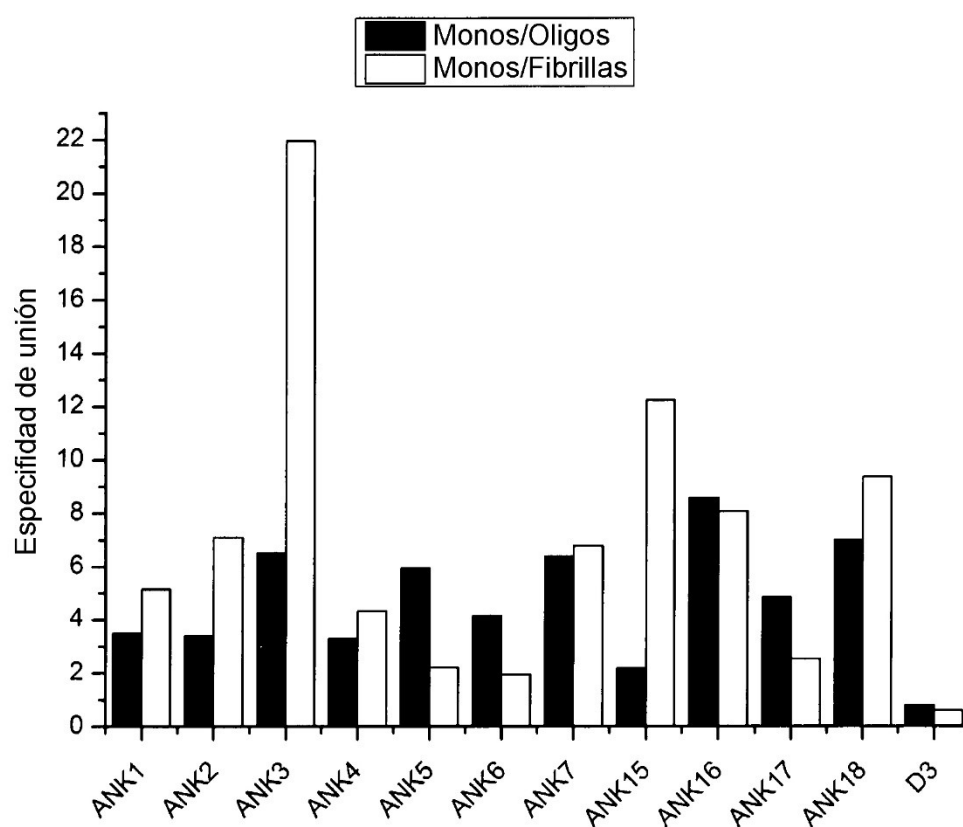


Figura 1b

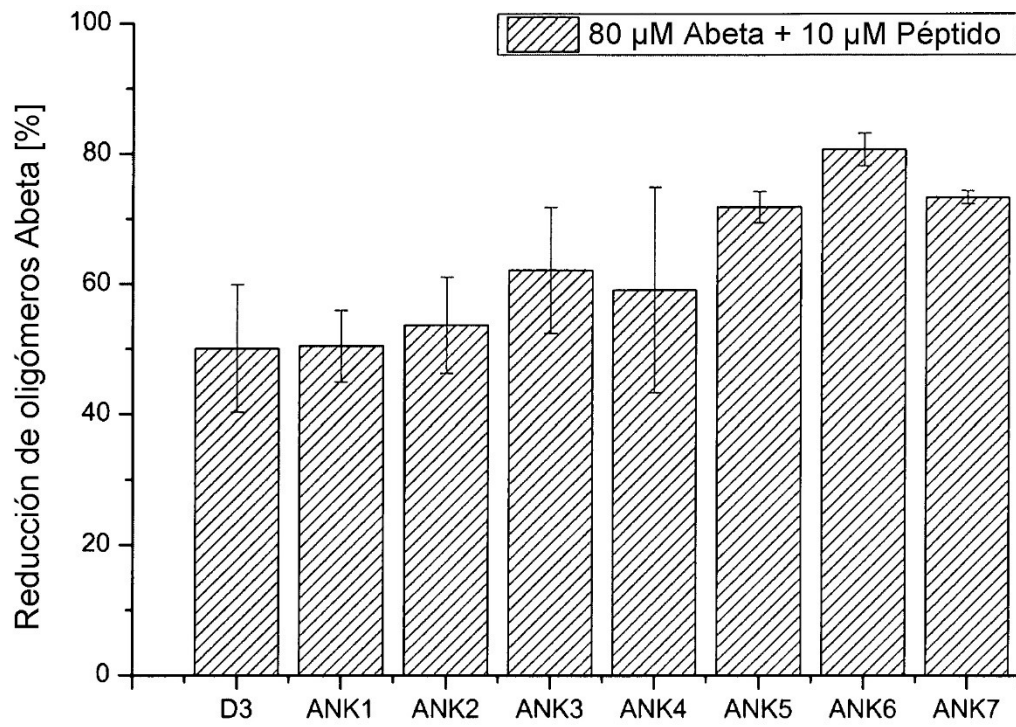


Figura 2

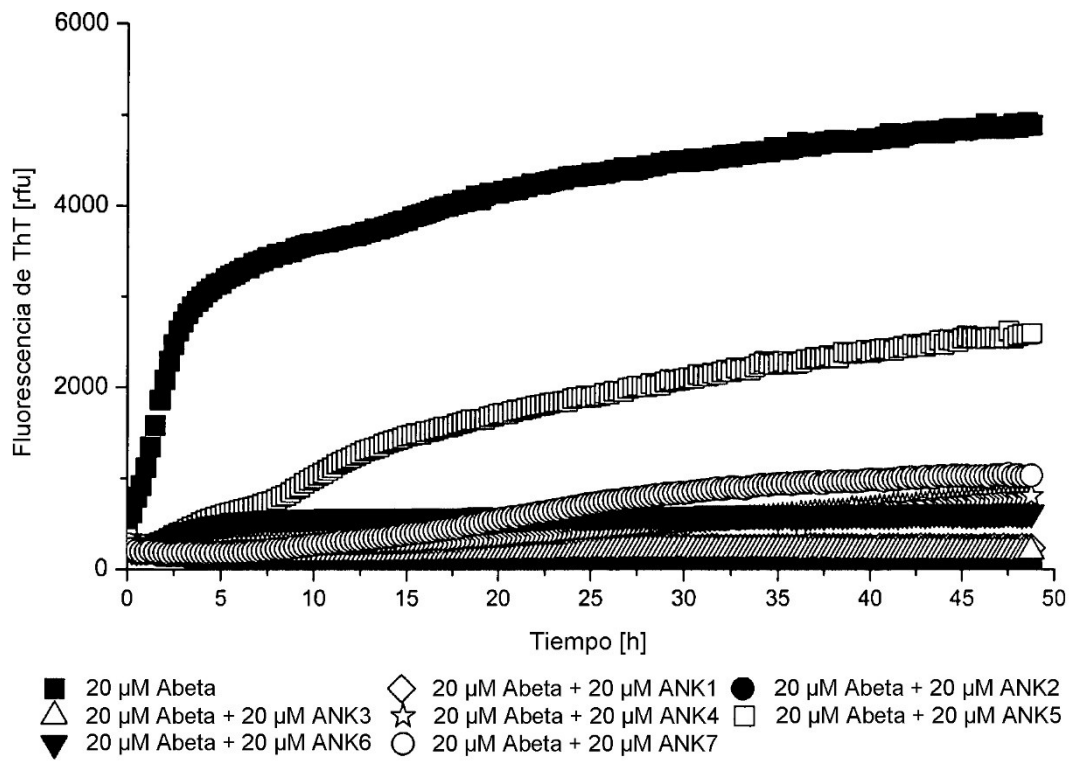


Figura 3a

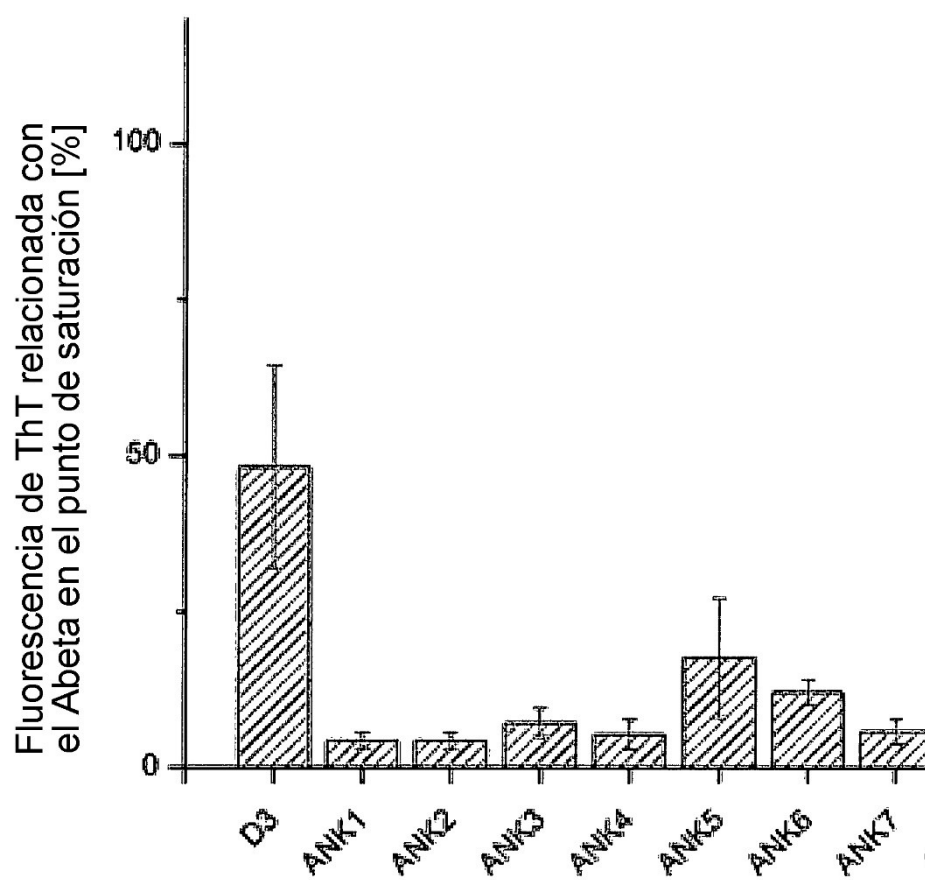


Figura 3b

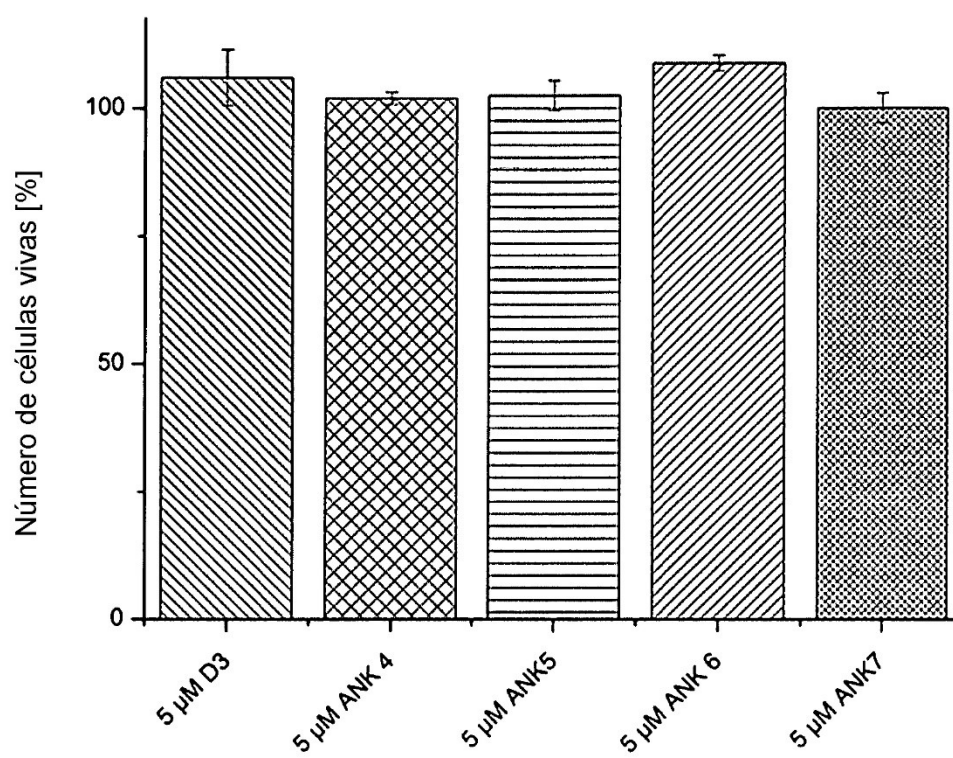


Figura 4a

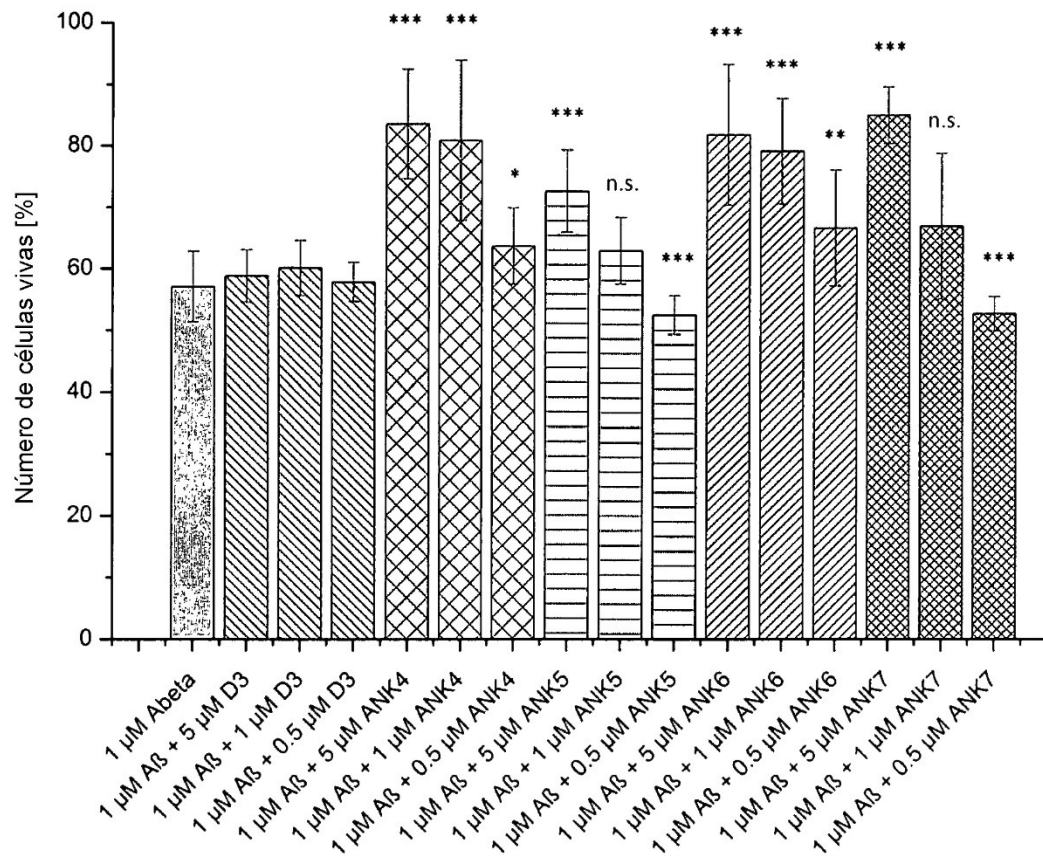


Figura 4b