



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 708**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06736552 .8**  
96 Fecha de presentación : **01.03.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1917017**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica con pirimetamina y análogos.**

30 Prioridad: **04.03.2005 US 658505 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.06.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.06.2010**

73 Titular/es: **Alsgen, Inc.**  
**11 Deer Park Drive, Suite 123**  
**Monmouth Junction, New Jersey 08852, US**

72 Inventor/es: **Scott, Sean y**  
**Benjamin, Daniel**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 340 708 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**

Tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica con pirimetamina y análogos.

**5 Antecedentes de la invención**

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es la enfermedad progresiva de las neuronas motoras más habitualmente diagnosticada. La enfermedad se caracteriza por degeneración de neuronas motoras en la corteza, tronco encefálico y médula espinal (Principles of Internal Medicine, 1991 McGraw-Hill, Inc., New York; Tandan *et al.* (1985) Ann. Neurol., 18:271-280, 419-431). La causa de la enfermedad es desconocida, y la ELA sólo se puede diagnosticar cuando el paciente comienza a experimentar debilidad asimétrica de las extremidades y fatiga, fasciculación localizada en las extremidades superiores, y/o espasticidad en las piernas, que tipifica el comienzo. Hay un componente genético para al menos algunas incidencias de ELA.

En casi todos los casos, la ELA esporádica y la ELA familiar (ELAF) dominante autosómica son clínicamente similares (Mulder *et al.* (1986) Neurology, 36:511-517). Se ha demostrado que en algunos árboles genealógicos de ELAF, pero no en todos, la enfermedad está ligada a un defecto genético en el cromosoma 21q (Siddique *et al.*, (1991) New Engl. J. Med., 324:1381-1384).

En particular, parece que las mutaciones en el gen de SOD-1 que está localizado en el cromosoma 21q están asociadas con la forma familiar de ELA. Los efectos perjudiciales de diversas mutaciones en SOD-1 están mediados muy probablemente a través de una ganancia de función tóxica, en lugar de una pérdida de actividad de SOD-1 (Al-Chalabi Y Leigh, (2000) Curr. Opin. Neurol., 13, 397-405; Alisky *et al.* (2000) Hum. Gene Ther., 11, 2315-2329). Aunque la toxicidad no está clara, existen pruebas que sugieren que la eliminación de la propia proteína mejorará la toxicidad.

Existe la necesidad de desarrollar terapias que puedan alterar el curso de enfermedades neurodegenerativas o prolongar el tiempo de supervivencia de pacientes con tales enfermedades. En particular, existe la necesidad de reducir la proteína SOD-1 producida en el cerebro y en la médula espinal de los pacientes con ELA. La prevención de la formación de la proteína SOD-1 de tipo salvaje o mutante puede detener la progresión de la enfermedad, y puede permitir la mejora de los síntomas de ELA.

El documento EP 1.473.289 describe análogos de pirimetamina para tratar la enfermedad de Alzheimer.

**35 Sumario de la invención**

Se describen usos para interferir con la síntesis proteica en el cerebro, médula espinal, meninges y células musculares, administrando una pirimetamina o un análogo funcional de la misma. En particular, se describe una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso en la disminución de la expresión del gen de SOD-1.

El uso de la invención se puede usar para reducir o inhibir la expresión de una proteína asociada con esclerosis lateral amiotrófica mediada por SOD-1, que es SOD-1. El uso de pirimetamina o un análogo funcional de la misma inhibe la transcripción de ARNm de SOD-1 o la estabilidad del transcrito. Las disminuciones en ARNm de SOD-1 pueden conducir entonces a niveles reducidos de proteína SOD-1, que reduce su acumulación en la célula y mejora la enfermedad. La expresión y acumulación de SOD-1 mutante es un mecanismo patofisiológico ampliamente aceptado que subyace a ELA familiar, y también puede desempeñar un papel en la forma esporádica de la enfermedad.

En consecuencia, la invención se refiere al uso de una pirimetamina o análogo funcional de la misma para la fabricación de un medicamento para prevenir el desarrollo de síntomas, o mejorar los síntomas o progresión de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mediada por SOD-1. La célula que es la diana de dicho uso puede ser una célula neuronal, o cualquier célula en la médula espinal, el tejido meníngeo, o una célula muscular, por ejemplo en un sujeto con ELA (por ejemplo, ELA familiar). Los ejemplos de células incluyen, pero no se limitan a, neuronas, interneuronas, gliocitos, microgliocitos, células musculares, células implicadas en la respuesta inmunitaria.

La invención se refiere además a una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso en un método para prevenir el desarrollo de síntomas, o mejorar los síntomas o progresión de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mediada por SOD-1.

En una realización, se usa pirimetamina o análogos funcionales de la misma. En otra realización, se usa pirimetamina con al menos una modificación en el anillo bencénico. Todavía en otra realización, se usa pirimetamina con al menos una modificación en el anillo de pirimidina.

La inhibición de la transcripción del gen comprende monitorizar midiendo los niveles de expresión de la proteína SOD-1. Como alternativa, la inhibición de la transcripción del gen comprende monitorizar los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína SOD-1, por ejemplo monitorizando los niveles de ácido ribonucleico o de ácido desoxirribonucleico.

La mejora de los síntomas se puede monitorizar midiendo la prolongación de la supervivencia del individuo, por ejemplo monitorizando una puntuación neurológica del individuo. Como alternativa, la mejora se puede determinar monitorizando los niveles de expresión de la proteína SOD-1 o los niveles de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína SOD-1.

## Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra la reducción de la expresión de la proteína SOD-1 por pirimetamina.

La Fig. 2 es una gráfica de barras que muestra la expresión reducida de ARNm de SOD-1 con pirimetamina y noretindrona.

La Fig. 3 es un esquema que muestra análogos funcionales de pirimetamina representativos de la invención.

La Fig. 4 es una gráfica de barras que muestra la expresión reducida de ARNm para alfa-sinucleína en células HeLa tras el tratamiento con pirimetamina y noretindrona.

La Fig. 5 es una gráfica de barras que muestra la reducción de la expresión de la proteína SOD-1 en ratones SOD-93A machos y hembras con tratamiento crónico con pirimetamina (TX).

La Fig. 6 es una gráfica de barras que muestra la disminución en la expresión de alfa-sinucleína en linfocitos de ratón con tratamiento crónico con pirimetamina.

La Fig. 7 es una gráfica de barras que muestra la expresión disminuida de SOD-1 espinal en ratones SOD-93A tras la administración oral de pirimetamina.

La Fig. 8 es una gráfica de barras que muestra una disminución en los niveles de SOD-1 de linfocitos en un paciente con ELA familiar después de 30 días de administración oral de pirimetamina.

## Descripción detallada

La práctica de la presente invención emplea, excepto que se indique de otro modo, métodos convencionales de microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican de forma más completa en la bibliografía. (*Véanse, por ejemplo*, Sambrook, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Edición Actual); DNA Cloning: A Practical Approach, Vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Edición Actual); Nucleic Acid Hybridization (B. Names & S. Higgins, eds., Edición Actual); Transcription and Translation (B. Names & S. Higgins, eds., Edición Actual); CRC Handbook of Parvoviruses, vol. I & II (P. Tijessen, ed.); Fundamental Virology, 2ª Edición, Vol. I & II (B. N. Fields y D. M. Knipe, eds.)).

De forma que la invención se entienda más claramente, se definen los siguientes términos:

La expresión “trastorno neurodegenerativo” o “enfermedad neurodegenerativa” se usa de forma intercambiable aquí, y se refiere a una alteración o ausencia de una función neurológica normal, o a la presencia de una función neurológica anormal en un individuo, o grupo de individuos. Por ejemplo, los trastornos neurológicos pueden ser el resultado de enfermedad, lesión, y/o envejecimiento. Como se usa aquí, trastorno neurodegenerativo también incluye una degeneración que provoca anomalía morfológica y/o funcional de una célula neuronal o una población de células neuronales. Los ejemplos no limitantes de anomalías morfológicas y funcionales incluyen deterioro físico y/o muerte de células neuronales, patrones anormales de crecimiento de células neuronales, anomalías en la conexión física entre células neuronales, sub- o sobreproducción de una sustancia o sustancias, *por ejemplo*, un neurotransmisor, por células neuronales, fracaso de las células neuronales a la hora de producir una sustancia o sustancias que producen normalmente, la producción de sustancias, *por ejemplo*, neurotransmisores, y/o la transmisión de impulsos eléctricos en patrones anormales o en tiempos anormales. La neurodegeneración se puede producir en cualquier área del cerebro de un individuo, y se observa con muchos trastornos, incluyendo, *por ejemplo*, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad asociada con priones (CJD), atrofia muscular espinal, ataxia cerebelosa espinal, y lesión de la médula espinal.

Las expresiones “agente farmacológico” y “agente farmacológico que modula un receptor nuclear”, como se usan aquí, están destinadas a ser usadas de forma intercambiable, y estas expresiones se refieren al compuesto, o compuestos, que interfieren selectivamente con la síntesis proteica en una célula neuronal de la médula espinal, meníngea, o de los músculos. En particular, interfieren con la síntesis proteica de una proteína SOD-1.

Los términos “modular” o “que modula” o “modulado”, como se usan de forma intercambiable aquí, también se refieren a un cambio en la actividad de SOD-1, o la expresión, es decir, un aumento o disminución en la actividad de SOD-1, o expresión, de forma que la modulación produce un efecto terapéutico en un individuo, o grupo de individuos. Un efecto terapéutico es aquel que da como resultado una mejora en los síntomas, o progresión de ELA. El cambio en la actividad se puede medir por medidas cuantitativas o cualitativas del nivel de proteína SOD-1, *por ejemplo* mediante análisis de transferencia Western. El ensayo cuantitativo se puede usar para medir la disminución o aumento

de los niveles de proteína SOD-1 en presencia de un agente farmacológico, tal como pirimetamina y sus análogos. Un agente farmacológico adecuado puede ser aquel que disminuya la expresión de SOD-1 en alrededor de 5 por ciento a alrededor de 50 por ciento, en comparación con un control. El cambio en la expresión también se puede medir por medidas cuantitativas o cualitativas del nivel de ácido nucleico asociado con SOD-1, por ejemplo midiendo el nivel de expresión de ARN o ADN.

El efecto de la modulación de SOD-1 en un individuo, o grupo de individuos, también se puede investigar examinando la supervivencia del individuo, o grupo de individuos. Por ejemplo, midiendo el cambio en la supervivencia, o la prolongación de la supervivencia en uno o más modelos de animales para una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo ELA. El cambio en la supervivencia puede ser debido a la administración de agente farmacológico, que es pirimetamina o un análogo funcional, que se administra a un modelo murino de ELA. El efecto del agente farmacológico se puede determinar basándose en el incremento en días de supervivencia de un grupo de ensayo de ratones con ELA, en comparación con un grupo de control de ratones con ELA a los que se les administró un agente de control o ningún agente. En una realización, el agente farmacológico, que es pirimetamina o un análogo funcional, incrementa el porcentaje de efecto sobre la supervivencia del individuo, o una población de individuos (por ejemplo, una población de machos, o una población de hembras) en al menos 2% a alrededor de 100%. Preferiblemente, el porcentaje de efecto sobre la supervivencia del individuo, o una población de individuos, es al menos 5% a alrededor de 50%, al menos 10% a alrededor de 25%. Incluso más preferiblemente, el porcentaje de efecto sobre la supervivencia del individuo, o una población de individuos, es al menos 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44%, 46%, 48% y 50%. El efecto de la modulación de SOD-1 también se puede determinar examinando la puntuación neurológica de un individuo, o grupo de individuos, por ejemplo evaluando la mejora en el movimiento muscular, o examinando el alivio o mejora de los síntomas de la enfermedad. En una realización preferida, la puntuación neurológica de un individuo, o grupo de individuos, es significativamente diferente de la de los individuos del control no tratados, con un nivel de significancia entre  $p < 0,05$  y  $p < 0,0001$ , según se determina usando procedimientos de análisis estadístico estándar.

Las expresiones también se pueden usar para referirse a un cambio en el receptor nuclear al interactuar con un agente farmacológico, es decir, un cambio en la actividad del receptor nuclear, estructura, o la expresión de un receptor nuclear, o una subunidad del receptor nuclear, es decir, un incremento o disminución en la actividad, o expresión, del receptor nuclear, de forma que la modulación produce un efecto terapéutico en un individuo, o grupo de individuos.

El término “inhibir” o “que inhibe”, como se usa aquí, se refiere a una reducción medible de la expresión de un gen diana o una proteína diana, por ejemplo SOD-1. El término también se refiere a una reducción medible en la actividad de una proteína diana. Preferiblemente, una reducción en la expresión es al menos alrededor de 10%. Más preferiblemente, la reducción de expresión es alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, e incluso más preferiblemente alrededor de 100%.

La proteína SOD-1 puede ser una proteína SOD-1 de tipo salvaje o una proteína SOD-1 mutante, y puede derivar de un gen de SOD-1 de tipo salvaje o un gen de SOD-1 con al menos una mutación.

El término “individuo”, como se usa aquí, se refiere a cualquier organismo vivo en el que se provoca una respuesta inmunitaria. El término individuo incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otros monos y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no representa ninguna edad o sexo particular. De este modo, se pretende cubrir los individuos adultos y neonatos, así como fetos, ya sean machos o hembras.

Como se usa aquí, grupos “alquilo” incluyen hidrocarburos saturados que tienen uno o más átomos de carbono, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (*por ejemplo*, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo cíclicos (o grupos “cicloalquilo” o “alicíclicos” o “carbocíclicos”) (*por ejemplo*, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, etc.). Excepto que se especifique de otro modo, el término alquilo incluye tanto “alquilos no sustituidos” como “alquilos sustituidos”, refiriéndose estos últimos a grupos alquilo que tienen sustituyentes que sustituyen uno o más hidrógenos en uno o más carbonos de la cadena principal hidrocarbonada.

La expresión “grupo alcoxi”, como se usa aquí, significa un grupo alquilo que tiene un átomo de oxígeno unido a él. Los grupos alcoxi representativos incluyen grupos que tienen 1-10 átomos de carbono, preferiblemente 1-6 átomos de carbono, *por ejemplo*, metoxi, etoxi, propoxi, *terc*-butoxi, y similares. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, *iso*-propoxi, butoxi, pentoxi.

La expresión “grupo aromático” o “grupo arilo” incluye hidrocarburos cíclicos insaturados y aromáticos así como heterociclos insaturados y aromáticos que contienen uno o más anillos. Los grupos arilo también pueden estar condensados o formando puentes con anillos alicíclicos o heterocíclicos que no son aromáticos, para formar un policiclo (*por ejemplo*, tetralina). Los grupos arilo también se pueden condensar o formar puentes con anillos alicíclicos o heterocíclicos que no son aromáticos, para formar un policiclo (*por ejemplo*, tetralina).

Un grupo “aralquilo” es un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (*por ejemplo*, fenilmetilo (*es decir*, bencilo)). Un resto “alquilarilo” es un grupo arilo sustituido con un grupo alquilo (*por ejemplo*, *p*-metilfenilo (*es decir*, *p*-tolilo)). Un grupo “alcoxifenilo” (o grupo “alquiloxifenilo”) es un grupo fenilo sustituido con un grupo alcoxi (*por ejemplo*, *p*-metoxifenilo). Un grupo “arilalcoxi” es un grupo alcoxi sustituido con un grupo fenilo (*por ejemplo*, benciloxi). Un grupo “ariloxialquilo” es un grupo alquilo sustituido con un grupo oxiarilo (*por ejemplo*, fenilmetiléter (*es decir*, fenoximetilo)). Un grupo “ariloxifenilo” es un grupo fenilo sustituido con un grupo fenoxi (*por ejemplo*, éter bifenílico (*es decir*, fenoxifenilo)). Un grupo “fenoxi” es un átomo de oxígeno unido a un grupo fenilo.

La expresión “grupo heteroarilo” incluye grupos cíclicos insaturados y aromáticos en los que uno o más de los átomos de carbono en el anillo es un elemento distinto de carbono, por ejemplo nitrógeno, azufre u oxígeno.

La expresión “grupo heterocíclico” incluye estructuras anulares cerradas análogas a grupos carbocíclicos, en las que uno o más de los átomos de carbono en el anillo es un elemento distinto del carbono, por ejemplo nitrógeno, azufre u oxígeno. Los grupos heterocíclicos pueden ser saturados o insaturados. Adicionalmente, los grupos heterocíclicos (tales como pirrolilo, piridilo, isoquinolilo, quinolilo, purinilo, y furilo) pueden tener un carácter aromático, en cuyo caso se pueden denominar como grupos “heteroarilo” o “heteroaromático”.

Un grupo “heteroarilalquilo” es un grupo alquilo sustituido con un grupo heteroarilo (*por ejemplo*, 4-metilpiridina).

Un grupo “heteroarilalcoxi” es un grupo alcoxi sustituido con un grupo heteroarilo (*por ejemplo*, 4-metoxipiridina).

### I. Enfermedades neurodegenerativas

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también denominada enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad neurodegenerativa mortal que afecta a las neuronas motoras en la corteza, tronco encefálico y médula espinal (Hirano, (1996) *Neurology*, 47 (4 Supl. 2): S63-6). El comienzo de ELA se produce en la cuarta o quinta década de vida (la edad media de comienzo es 57 años), y es mortal en dos a cinco años después del diagnóstico (Williams, *et al.* (1991) *Mayo Clin. Proc.*, 66: 54-82). La ELA afecta a aproximadamente 30.000 norteamericanos, con casi 8.000 muertes comunicadas en los Estados Unidos cada año. Los pacientes con ELA pierden progresivamente toda función motora - son incapaces de andar, hablar o respirar por sí mismos.

El fallo principal de ELA es la pérdida de neuronas motoras de la médula espinal, lo que provoca que los músculos bajo su control se debiliten y se consuman, conduciendo a parálisis. La ELA tiene una forma tanto familiar (5-10%) como esporádica, y ahora las formas familiares se están ligando a varios loci genéticos distintos (Deng, *et al.* (1995) *Hum. Mol. Genet.*, 4: 1113-16; Siddique, *et al.* (1995) *Clin. Neurosci.*, 3: 338-47; Siddique, *et al.*, (1997) *J. Neural Transm. Supl.*, 49: 219-33; Ben Hamida, *et al.* (1990) *Brain*, 113: 347-63; Yang, *et al.* (2001) *Nat. Genet.* 29: 160-65; Hadano, *et al.* (2001) *Nat. Genet.* 29: 166-73). Alrededor de 15-20% de los casos familiares son debidos a mutaciones en el gen que codifica Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (SOD1) (Siddique, *et al.* (1991) *N. Engl. J. Med.*, 324: 1381-84; Rosen, *et al.* (1993) *Nature*, 362: 59-62).

Aunque la etiología de la enfermedad es desconocida, una teoría es que la muerte de las células neuronales en ELA es el resultado de la sobreexcitación de células neuronales debido a un exceso de glutamato extracelular. El glutamato es un neurotransmisor que es liberado por neuronas glutaminérgicas, y es captado en gliocitos en los que se convierte en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa, la glutamina vuelve a entrar entonces en las neuronas y es hidrolizada por glutaminasa para formar glutamato, reponiendo así la reserva de neurotransmisor. En una médula espinal y tronco encefálico normales, el nivel de glutamato extracelular se mantiene a niveles micromolares bajos en el fluido extracelular, debido a que los gliocitos, que funcionan en parte para sostener las neuronas, usan la proteína transportadora de aminoácidos excitadores tipo 2 (EAAT2) para absorber inmediatamente el glutamato. Una deficiencia en la proteína EAAT2 normal en pacientes con ELA se identificó como importante en la patología de la enfermedad (*véase, por ejemplo*, Meyer *et al.* (1998) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 65: 594-596; Aoki *et al.* (1998) *Ann. Neurol.* 43: 645-653; Bristol *et al.* (1996) *Ann Neurol.* 39: 676-679). Una explicación para los niveles reducidos de EAAT2 es que EAAT2 se empalma aberrantemente (Lin *et al.* (1998) *Neuron*, 20: 589-602). El empalme aberrante produce una variante de empalme con una supresión de 45 a 107 aminoácidos localizados en la región C terminal de la proteína EAAT2 (Meyer *et al.* (1998) *Neurosci Lett.* 241: 68-70). Debido a la falta o al defecto de EAAT2, el glutamato extracelular se acumula, provocando que las neuronas se disparen continuamente. La acumulación de glutamato tiene un efecto tóxico sobre las células neuronales, debido a que el disparo continuo de las neuronas conduce a la muerte celular prematura.

Aunque se sabe mucho sobre la patología de ELA, poco se sabe sobre la patogénesis de la forma esporádica ni sobre las propiedades causales de la proteína SOD mutante en ELA familiar (Bruijn, *et al.* (1996) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 22: 373-87; Bruijn, *et al.* (1998) *Science* 281: 1851-54). Se han especulado muchos modelos, incluyendo toxicidad por glutamato, hipoxia, estrés oxidativo, agregados proteicos, disfunción de neurofilamentos y mitocondrial (Cleveland, *et al.* (1995) *Nature* 378: 342-43; Cleveland, *et al.* *Neurology*, 47(4 Supl. 2): S54-61, discusión S61-2 (1996); Cleveland, (1999) *Neuron*, 24: 515-20; Cleveland, *et al.* (2001) *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 806-19; Couillard-Despres, *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9626-30; Mitsumoto, (1997) *Ann. Pharmacother.*, 31: 779-81; Skene, *et al.* (2001) *Nat. Genet.* 28: 107-8; Williamson, *et al.* (2000) *Science*, 288: 399).

Actualmente no hay cura para ELA, ni hay ninguna terapia que haya demostrado ser eficaz para prevenir o invertir el curso de la enfermedad. Recientemente la Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado varios fármacos. Hasta la fecha, los intentos para tratar ELA han implicado tratar la degeneración neuronal con alcoholes grasos de cadena larga que tienen efectos citoprotectores (*véase*, patente U.S. n° 5.135.956); o con una sal de ácido pirúvico (*véase* patente U.S. n° 5.395.822); y usar una glutamina sintetasa para bloquear la cascada del glutamato (*véase* patente U.S. 5.906.976). Por ejemplo, los Estados Unidos han aprobado Riluzole<sup>TM</sup>, un inhibidor de la liberación de glutamato, para el tratamiento de ELA, y parece que prolonga la vida de al menos algunos pacientes con ELA. Sin embargo, algunos informes han indicado que, incluso aunque la terapia con Riluzole<sup>TM</sup> puede prolongar el tiempo de supervivencia, no parece proporcionar una mejora en la fuerza muscular de los pacientes. Por lo tanto, el efecto de Riluzole<sup>TM</sup> es limitado por cuanto la terapia no modifica la calidad de vida para el paciente (Borras-Blasco *et al.* (1998) *Rev. Neurol.*, 27: 1021-1027).

## II. SOD y mutaciones de SOD

La invención tiene el efecto de disminuir la proteína SOD-1 (por ejemplo, proteína SOD-1 mutante) en células, reduciendo o eliminando la expresión de la proteína con una pirimetamina y sus análogos funcionales. El gen de SOD-1 está localizado en el cromosoma 21q22.1. Las secuencias de SOD-1 según se describen en la publicación PCT WO 94/19493 son secuencias oligonucleotídicas que codifican SOD-1, y generalmente se reivindica el uso de un homólogo de ADN antisentido de un gen que codifica SOD-1, ya sea en forma mutante o en forma de tipo salvaje, en la preparación de un medicamento para tratar un paciente con una enfermedad. La secuencia de ácidos nucleicos del gen de SOD-1 humana se puede encontrar en el número de acceso de Genbank NM\_000454. La secuencia nucleotídica de SOD-1 humana también se presenta en SEQ ID NO: 1. La secuencia proteica de SOD-1 correspondiente se presenta en SEQ ID NO: 2.

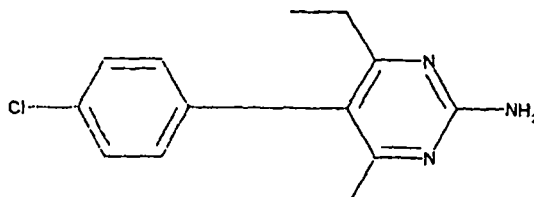
## III. Pirimetamina y sus análogos funcionales

En un aspecto, la invención se refiere al uso de pirimetamina y sus análogos funcionales. La pirimetamina es un fármaco antimalárico, que penetra fácilmente las células en el cuerpo y en el cerebro. La pirimetamina se ha usado para el tratamiento de malaria, toxoplasmosis, y otras varias infecciones microbianas (para un repaso, véase Schweitzer, *et al.* (1990) *FASEB J* 4: 2441-2452). El efecto antimicrobiano de pirimetamina es el resultado de su inhibición de dihidrofolato reductasa (DHFR), y enzimas implicadas en la ruta de la síntesis del folato. El parásito de la malaria sintetiza folato de novo, mientras que el hospedante humano debe obtener folatos preformados y no puede sintetizar folato. La incapacidad del parásito para utilizar folatos exógenos hace a la biosíntesis de folato una buena diana farmacéutica. La DHFR es una enzima ubicua que participa en el reciclaje de folatos, reduciendo el dihidrofolato a tetrahidrofolato. El tetrahidrofolato se oxida entonces nuevamente a dihidrofolato a medida que participa en reacciones biosintéticas (por ejemplo, timidilato sintetasa). La inhibición de DHFR evitará la formación de timidilato y conducirá a una detención de la síntesis de ADN y la muerte subsiguiente del parásito. La pirimetamina es el inhibidor de DHFR más común usado como antimaláricos. Otros inhibidores de DHFR incluyen, pero no se limitan a, sulfadoxina, trimetoprima, sulfadiazina, trimetoprima, y sulfametoxazol.

Mediante el uso de la invención, se reduce la expresión de SOD-1. La pirimetamina es un potente inhibidor de la expresión de SOD-1 en la estirpe celular HeLa y en la estirpe celular Neuro2A de ratón, como se muestra en los Ejemplos. El mecanismo de acción para la reducción de SOD-1 no se conoce en este momento, pero los niveles tanto de la proteína como de ARNm que codifica SOD-1 se reducen de forma dependiente de la dosis. Sin embargo, la pirimetamina no actúa vía la inhibición de dihidrofolato reductasa, debido a que sus efectos no se pudieron prevenir o invertir usando ácido fólico (el producto enzimático de DHFR). Además, el metotrexato, un potente inhibidor de DHFR con una estructura química no relacionada, no redujo la proteína SOD-1 en la célula HeLa. Finalmente, la pirimetamina es un inhibidor muy débil de DHFR humana, con una  $EC_{50} > 70 \mu M$  (Schweitzer *et al.*, (1990) *más arriba*). Se ha dado a conocer que la pirimetamina actúa sobre ADN centromérico y muy probablemente inhibe la transcripción del gen de SOD-1 mediante una acción sobre un factor de transcripción, o menos probablemente mediante una acción directa sobre el propio ADN genómico.

Aunque no se requiere para proporcionar un mecanismo, se cree que, para la inhibición de la expresión de SOD-1, la pirimetamina y sus análogos funcionales actúan putativamente para reducir la expresión de SOD1 humana vía un receptor nuclear todavía no identificado. De forma breve, la pirimetamina se une con afinidad elevada a la proteína del receptor, activándola y provocando que se dimerice con otro receptor activado. Los receptores dimerizados se transportan al núcleo de la célula, o ya están en el núcleo y se unen a 5' del ADN genómico al codón de partida de hSOD1. Los receptores transportados se unen a un tramo de ADN palindrómico en la región promotora del gen de SOD-1, en el que los complejos de receptor-ligando-ADN ejercen impedimento estérico para prevenir el inicio de la transcripción. De este modo, se obtiene menos ARN que codifica SOD1, y consiguientemente se obtiene menos proteína. Las reducciones en la cantidad de proteína SOD1 mutante producida evitarían entonces sus efectos neurotóxicos y mejorarían la progresión de la enfermedad de ELA.

Según la invención, se usa una pirimetamina o un análogo funcional de la misma. El farmacóforo de pirimetamina se muestra en la fórmula I.

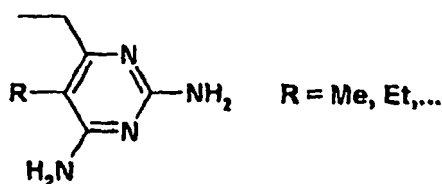


fórmula I

La relación estructura-actividad (SAR) dentro de la serie de compuestos de pirimetamina se puede establecer con un grupo de los 30 compuestos representativos mostrados en la Figura 3. Un estudio sistemático de SAR puede demostrar que estos compuestos actúan mediante una diana celular específica. Algunos de estos compuestos están comercialmente disponibles, mientras que otros se han sintetizado usando métodos estándar de química orgánica. El diseño de los compuestos se basa en la molécula principal pirimetamina, que se puede romper en dos partes estructurales y se puede modificar separadamente. Las dos partes estructurales principales son (1) el anillo bencénico, y (2) el anillo de pirimidina. Se ha diseñado un número de análogos o derivados, como se describe a continuación:

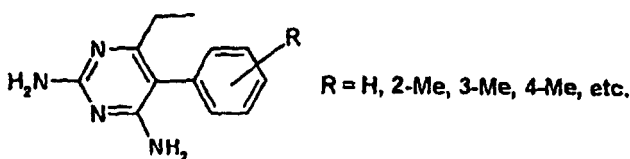
(1) *Modificación y optimización del anillo bencénico*

El anillo bencénico de fórmula I se puede modificar de diferentes maneras. En una realización, sustituyendo R en la fórmula II con un grupo alquilo seleccionado del grupo que consiste en Me, Et, y similares.



fórmula II

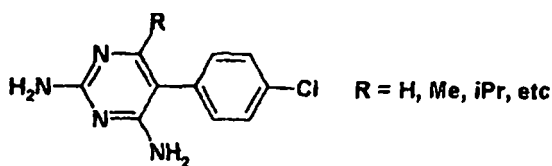
En otra realización, optimizando los sustituyentes en el anillo bencénico con respecto a la posición y la naturaleza de los sustituyentes. Esto se puede llevar a cabo colocando el metilo del anillo bencénico en diversas posiciones, como se muestra en la fórmula III.



fórmula III

(2) *Modificación del anillo de pirimidina*

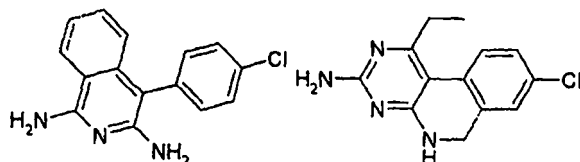
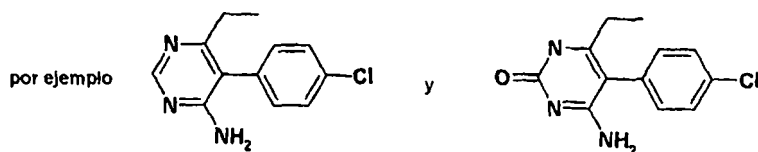
El anillo de pirimidina se puede modificar solo o en combinación con las modificaciones hechas al anillo bencénico. En una realización, el anillo de pirimidina se modifica eliminando o sustituyendo el grupo alquilo R de fórmula V con otros grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en H, Me, isopropilo (iPr), o similar.



fórmula V

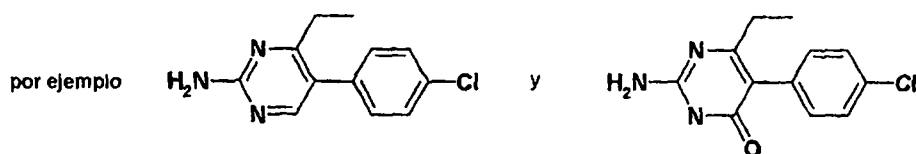
## ES 2 340 708 T3

En otra realización, el grupo amino en para (con respecto al anillo bencénico) se puede eliminar o sustituir por oxígeno como se muestra en la fórmula VI



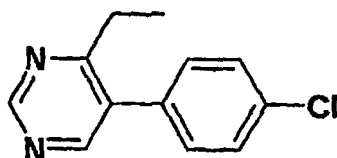
fórmula VI

En otra realización, el grupo amino en orto (con respecto al anillo bencénico) se puede eliminar o sustituir por oxígeno como se muestra en la fórmula VII



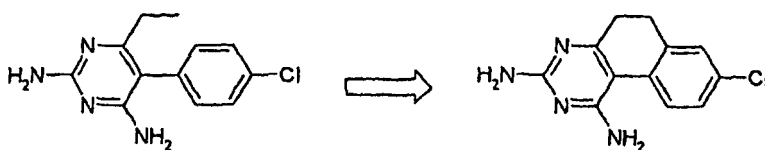
fórmula VII

En otra realización, ambos grupos amina primaria se pueden eliminar de la molécula como se muestra en la fórmula VIII



fórmula VIII

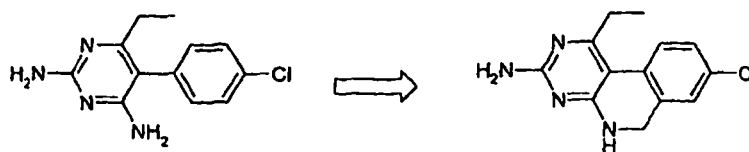
Todos los compuestos contienen las partes farmacofóricas que están presentes en la molécula principal mostrada en la Fórmula I. Estas modificaciones se realizan para retener o mejorar la potencia, actividad oral y la propiedad farmacéutica de la molécula. En otras realizaciones, se sintetizan compuestos completamente nuevos usando química sintética orgánica estándar. Estos nuevos compuestos retienen las partes farmacofóricas originales. También se pueden sintetizar análogos de los nuevos compuestos. En una realización, se puede sintetizar una estructura que elimina la libertad rotacional entre los dos anillos, como se muestra en la fórmula XII



fórmula XII



En otra realización, se puede sintetizar una estructura que ata los dos anillos en el grupo orto-amino, como se muestra en la fórmula XIII.



fórmula XIII

En otras realizaciones, se pueden sintetizar las estructuras mostradas anteriormente y en la Figura 3 y sus análogos.

Algunas de estas estructuras pueden estar comercialmente disponibles a partir de bases de datos químicas globales, tales como Available Chemical Directory. Sin embargo, muchas de las estructuras son nuevas y no están disponibles en las bases de datos. La síntesis de aquellos compuestos que no están comercialmente disponibles se pueden llevar a cabo mediante metodologías sintéticas consolidadas. Hay muchos documentos y patentes de síntesis que describen la síntesis de todos los análogos deseados. (Véase, por ejemplo, documento U.S. 3.940.393; Sardarian, *et al.*, (2003) Org. Biomol. Chem. 21: 960-964; Ross, *et al.*, (1976) J. Med. Chem. 19: 723-725).

#### IV. Modulación de trastornos neurodegenerativos usando agentes farmacológicos

El papel del receptor nuclear en las enfermedades neurodegenerativas tales como ELA, y la modulación de la ruta asociada con el receptor nuclear, puede ser una diana para una investigación clínica en ELA u otra enfermedad neurodegenerativa. Los datos mostrados en la sección de Ejemplos indican que la pirimetamina y sus análogos desempeñan un papel disminuyendo la expresión de SOD-1.

El modelo de ratón G93A de SOD1 (copia elevada) para ELA es un ratón adecuado que posee 23 copias de la mutación de SOD G93A humana, y está dirigido por el promotor endógeno. La supervivencia en el ratón depende de las copias. El G93A de copia elevada tiene una supervivencia media de alrededor de 128 días. Se observan complejos de peso molecular elevado de la proteína SOD mutante en la médula espinal, comenzando alrededor del día 30. En el día 60, se observa astrocitosis reactiva (GFAP reactiva); se observan microglíocitos activados desde el día 90 en adelante. Los estudios de Gurney *et al.* mostraron que, en el día 90, la astrocitosis reactiva pierde significancia estadística, mientras que la activación microglial es significativamente elevada y continúa elevada hasta la etapa final de la enfermedad (véase Gurney, *et al.* (1996) Ann. Neurol., 39: 147-5739).

Muchos fármacos que han mostrado eficacia en este modelo han pasado a ensayos clínicos humanos. La experiencia con riluzol, el único fármaco aprobado en el tratamiento de ELA, indica que el modelo de ELA de ratón es un buen factor pronóstico de la eficacia clínica. Otros fármacos, tales como creatina, celebrex, coenzima Q10 y minociclina, están bajo evaluación clínica basándose en estudios en este modelo.

#### V. Suministro de los agentes farmacológicos moduladores del receptor nuclear

La pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la presente invención se puede incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un individuo. Típicamente, la composición farmacéutica comprende pirimetamina o un análogo funcional de la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como sus combinaciones. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico, en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian el período de caducidad o la eficacia del agente farmacológico.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (*por ejemplo*, disolución inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, pastillas, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y de la aplicación terapéutica. El modo preferido de administración es parenteral (*por ejemplo*, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una realización preferida, el agente farmacológico se administra mediante una inyección intraperitoneal.

Típicamente, las composiciones se preparan como inyectables, ya sea como disoluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar o encapsular en liposomas o micropartículas tales como polilactida, poliglicolida, o copolímero para un efecto adyuvante potenciado (véanse, por ejemplo, Langer, Science 249, 1527 (1990) y Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28, 97-119 (1997)). Los agentes de esta invención también se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o preparación de implante, que se puede formular de tal manera para permitir una liberación prolongada o pulsada del ingrediente activo. La inyección de depósito o preparación de implante puede comprender, por ejemplo, uno o más de los compuestos de pirimetamina o análogos funcionales, o comprender una combinación de diferentes agentes (por ejemplo, pirimetamina y noretindrona).

Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada de fármaco. Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo (*es decir*, el agente farmacológico) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración.

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos liofilizados estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por pulverización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una disolución previamente filtrada de forma estéril del mismo. La fluidez apropiada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede provocar mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo sales de monoestearato y gelatina.

La pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliorotésteres, y poliácido láctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. (*Véase, por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978; Patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.333.051 de Kabanov *et al.*, y 6.387.406 de Kabanov *et al.*).

En ciertas realizaciones, la pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto anterior (y otros ingredientes, si se desea) también se pueden encerrar en una cápsula de gelatina de corteza dura o blanda, se pueden comprimir en comprimidos, o se pueden incorporar directamente en la dieta del individuo. Para la administración terapéutica oral, los compuestos para uso según la invención se pueden incorporar con excipientes y se pueden usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto para uso según la invención mediante administración distinta de la parenteral, puede ser necesario revestir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material que evite su inactivación.

En ciertas realizaciones, la pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención se puede administrar de forma líquida. Dichos compuestos deberían ser solubles en una variedad de disolventes, tales como, por ejemplo, metanol, etanol, e isopropanol. En la técnica se conoce una variedad de métodos para mejorar la solubilidad de un agente farmacológico en agua u otras disoluciones acuosas. Por ejemplo, la patente U.S. n<sup>o</sup> 6.008.192 de Al-Razzak *et al.* enseña un sistema binario hidrófilo que comprende una fase hidrófila y cualquier tensioactivo, o mezcla de tensioactivos, para mejorar la administración de compuestos.

También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos suplementarios. En ciertas realizaciones, la pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención se puede coformular con y/o se puede coadministrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para mejorar la farmacocinética del agente farmacológico. En la técnica se conoce una variedad de métodos para mejorar la farmacocinética del uso de la presente invención (véase, por ejemplo, patente U.S. n<sup>o</sup> 6.037.157 de Norbeck *et al.*).

Se han descrito otros métodos para mejorar la farmacocinética de agentes farmacológicos, por ejemplo en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.342.250 de Masters, 6.333.051 de Kabanov *et al.*, 6.395.300 de Straub *et al.*, 6.387.406 de Kabanov *et al.*, y 6.299.900 de Reed *et al.* Masters describe un dispositivo de suministro de fármacos y un método para la liberación controlada de agentes farmacológicamente activos. El dispositivo de suministro de fármacos descrito por Masters es una película que comprende uno o más materiales poliméricos biodegradables, uno o más disolventes biocompatibles, y uno o más agentes farmacológicamente activos dispersos uniformemente por toda la película. En la patente U.S. n<sup>o</sup> 6.333.051, Kabanov *et al.* describen una red copolimérica que tiene al menos un fragmento de

polímero de poliamina reticulado, al menos un fragmento de polímero soluble en agua no iónico, y al menos un agente biológico adecuado, incluyendo un agente farmacológico. Según las enseñanzas de esta patente, esta red, denominada como red de nanogel, mejora el efecto terapéutico del agente farmacológico disminuyendo los efectos secundarios y aumentando la acción terapéutica. En otra patente, la patente U.S. n° 6.387.406, Kabanov *et al.* también describen otra composición para mejorar el suministro oral de numerosos agentes farmacológicos.

Otros métodos para mejorar el suministro y administración de la pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención incluyen medios para mejorar la capacidad de dichos compuestos para atravesar membranas, y en particular para atravesar la barrera hematoencefálica. En una realización, los compuestos anteriores para uso según la invención se pueden modificar para mejorar su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, y, en una realización alternativa, los compuestos anteriores para uso según la invención se pueden coadministrar con un agente adicional, tal como, por ejemplo, un agente antifúngico, que mejora su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Como alternativa, el suministro preciso de los compuestos anteriores para uso según la invención en sitios específicos del cerebro se puede llevar a cabo usando técnicas de microinyección estereotáctica. Por ejemplo, el individuo que se está tratando se puede colocar dentro de una base de marco estereotáctico (compatible con MRI) y después se le pueden hacer imágenes usando MRI de alta resolución para determinar la posición tridimensional de la región particular a tratar. Las imágenes de MRI se pueden transferir entonces a un ordenador que tiene el software estereotáctico apropiado, y se usa un número de imágenes para determinar un sitio diana y la trayectoria para la microinyección del agente farmacológico. El software traduce la trayectoria en coordenadas tridimensionales que son registradas de forma precisa para el marco estereotáctico. En el caso de suministro intracraneal, se expone el cráneo, se taladrarán orificios de preparación por encima del sitio de entrada, y el aparato estereotáctico se usará para colocar la aguja y asegurar el implante a una profundidad predeterminada. Los compuestos para uso según la invención se pueden suministrar a regiones, tales como las células de la médula espinal, del tallo encefálico, o del cerebro, que estén asociadas con la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, las regiones diana pueden incluir el bulbo raquídeo, la protuberancia, y el mesencéfalo, el cerebelo, el diencéfalo (por ejemplo, tálamo, hipotálamo), telencéfalo (por ejemplo, cuerpo estriado, corteza cerebral, o, dentro de la corteza, los lóbulos occipital, temporal, parietal o frontal), o sus combinaciones.

Los compuestos para uso según la invención se pueden usar solos o en combinación para tratar trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, dichos compuestos se pueden usar conjuntamente con otros moduladores del receptor nuclear existentes, por ejemplo para producir un efecto aditivo o sinérgico. Igualmente, dichos compuestos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, *por ejemplo* un agente que proporciona un atributo beneficioso a la composición terapéutica, *por ejemplo* un agente que afecta a la viscosidad de la composición. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, *por ejemplo* dos o tres agentes adicionales, si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función pretendida. En algunas realizaciones, la invención incluye una pirimetamina o análogo funcional de la misma para uso según la invención, junto con, por ejemplo, al menos un compuesto relacionado con progesterona, tal como noretindrona, o al menos un compuesto relacionado con estrógeno, tal como estradiol. Para descripciones de estos compuestos y su administración, véanse las Solicitudes en trámite junto con la presente tituladas “Modulation of Neurodegenerative Diseases through the Progesterone Receptor” y “Modulation of Neurodegenerative Diseases through the Estrogen Receptor” presentadas el 1 de marzo de 2006.

Los compuestos para uso según la presente invención se pueden conjugar con sales de ácidos farmacéuticamente aceptables, para facilitar su almacenamiento prolongado y dosificación como disoluciones acuosas. Por ejemplo, la sal puede derivar de un ácido farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, HCl) con o sin el uso de un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua). Tales sales pueden derivar de ácidos inorgánicos u orgánicos, incluyendo por ejemplo ácidos clorhídrico, bromhídrico, acético, cítrico, fumárico, maleico, bencenosulfónico, y ascórbico. Las composiciones farmacéuticas obtenidas mediante la combinación del vehículo y la sal se usarán generalmente en una dosis necesaria para provocar el efecto biológico deseado. Éste incluye su uso en una cantidad terapéuticamente eficaz o en una cantidad menor cuando se usan en combinación con otros agentes biológicamente activos.

Las composiciones farmacéuticas que se refieren al uso de la invención pueden incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” o una “cantidad profilácticamente eficaz” de una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la invención. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos para uso según la invención puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del agente farmacológico para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del agente farmacológico están superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, puesto que una dosis profiláctica se usa en individuos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los regímenes de dosificación dentro del uso de la presente invención se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación para el uso según la invención aquí se refiere a unidades

físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los mamíferos a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación para uso según la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la obtención de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ejemplar, no limitante, para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de, por ejemplo, pirimetamina dentro del uso de la invención es entre 5 mg/día y alrededor de 200 mg/día, administrada a un individuo, o grupo de individuos, preferiblemente alrededor de 10 mg/día a alrededor de 150 mg/día, más preferiblemente alrededor de 5 mg/día a alrededor de 20 mg/día, y lo más preferible alrededor de 3 mg/día a 10 mg/día. Preferiblemente, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de, por ejemplo, pirimetamina dentro del uso de la invención da como resultado una concentración de agente farmacológico en el torrente sanguíneo en el intervalo de una concentración 1 nanomolar (nM) a 100 milimolar (mM). Por ejemplo, un intervalo de concentración de alrededor de 100 nM a alrededor de 10 mM, alrededor de 1 nM a alrededor de 1 mM, alrededor de 1 nM a alrededor de 100 micromolar ( $\mu$ M), alrededor de 1  $\mu$ M a alrededor de 500  $\mu$ M, alrededor de 1  $\mu$ M a alrededor de 200  $\mu$ M, o alrededor de 10  $\mu$ M a alrededor de 50  $\mu$ M. Se ha de observar que los valores de las dosificaciones pueden variar con el tipo y gravedad de la afección a aliviar. Se entenderá además que para cualquier individuo particular, los regímenes de dosificación específicos se deberían de ajustar a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones dentro del uso de la invención, y que los intervalos de dosificación expuestos aquí son solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica del uso de la invención.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Materiales y métodos*

##### 30 (i) Cultivo Celular

Se encontró que la estirpe celular HeLa derivada de carcinoma de cuello uterino humano (ATCC) expresa la proteína SOD-1 y ARNm, y se usó como el sistema modelo para identificar compuestos que inhiben la expresión de SOD-1. De forma breve, las células se mantuvieron en medio esencial mínimo de Dulbecco, con elevado contenido de glucosa, suplementado con glutamina, 4 mM, suero fetal bovino certificado, 10%, y penicilina, estreptomycin, y nistatina (todos de Invitrogen). Las condiciones de incubación fueron 37 grados y 99% de humedad relativa, con CO<sub>2</sub> a 5%. Los cultivos se hicieron pasar cuando alcanzaron una confluencia del 90%. Para los experimentos farmacológicos, las células se colocaron en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo tisular estéril, a una densidad de 3.500 células/pocillo en 150  $\mu$ l de medio.

##### (ii) Fármacos

45 Todos los compuestos se disolvieron en DMSO al 100%, a una concentración madre de 10 mM. Los fármacos se obtuvieron de Microsource Discovery, o de Sigma Aldrich.

##### (iii) Protocolo Experimental

50 Tras colocar en placas y después de 6 horas de adhesión, los fármacos se añadieron al medio en una concentración de 10  $\mu$ M. Después de 72 horas de incubación con los fármacos, las células se fotografiaron a 100X usando un microscopio invertido y una cámara digital, de forma que se pudo evaluar la citotoxicidad. Tras la fotodocumentación, el medio se retiró y las células se lavaron una vez con disolución salina tamponada con fosfato, y después se añadieron 50  $\mu$ l de agua de grado biología molecular que contiene un cóctel de inhibidor de proteasas. Después de 10 minutos de incubación, las placas se colocaron en -80 grados para inducir la lisis completa. Las placas se descongelaron entonces y se transfirieron 25  $\mu$ l de cada pocillo en una placa de ELISA maxsorp revestida con anticuerpo anti-SOD-1 humana, que contenía 75  $\mu$ l de disolución salina tamponada con fosfato. Entonces se añadió al pocillo un segundo par de anticuerpos (un anti-SOD-1 policlonal/anti-conejo de cabra conjugado con HRP), y la incubación se llevó a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, la placa se lavó tres veces (tampón de lavado de KPL Inc.), y se añadió el sustrato de HRP Sure Blue Reserve. Tras una incubación de 5-10 min., la reacción (que se había puesto azul en grados variables) se detuvo mediante adición de un reactivo de parada (KPL). La placa se agitó entonces suavemente durante 5 segundos, y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de placas Tecan. La absorbancia de cada muestra se comparó con una curva estándar de SOD-1 humana recombinante purificada ensayada en la misma placa ELISA, y se estimó la inmunorreactividad de SOD-1 (ng/ml) por comparación con la curva estándar.

(iv) *Ensayo Proteico de Bradford*

Para determinar si los decrecimientos encontrados en el ensayo de SOD-1 fueron simplemente el resultado de efectos citotóxicos del tratamiento farmacéutico, se determinó la proteína total para cada pocillo. Mientras que la incubación de ELISA estaba en desarrollo, se retiraron de cada pocillo 10  $\mu$ l del lisado que queda, y se colocaron en otra placa vacía, y se añadió a la proteína el reactivo de Bradford de BioRad (100  $\mu$ l). Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, la placa se agitó suavemente durante 5 segundos, y la absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de placas Tecan Sunrise. De este modo se determinaron las concentraciones proteicas en cada placa por comparación con patrones proteicos que se experimentaron en la misma placa.

(v) *RT-PCR Cuantitativa*

Células HeLa a 3500 células/pocillo en una placa de 96 pocillos se trataron con un compuesto de la presente invención durante 72 h como antes, y entonces las células se lisaron y el ARN total se extrajo usando el protocolo y reactivos de extracción de ARN de Gentra. El ARN purificado se usó entonces como el molde en una reacción de transcripción inversa usando Superscript III MMLV Transcriptase cebada con oligoDT. Se llevó a cabo una reacción de PCR sobre el ADNc resultante, para amplificar el ADNc correspondiente a SOD-1 humana, la proteína de unión de la caja TATA humana, y la microglobulina beta-2 humana. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en tubos separados durante 20, 25 y 30 ciclos, y después los amplicones se dejaron correr en un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio. La fluorescencia emitida por las bandas teñidas de bromuro de etidio tras la estimulación mediante una fuente de luz UV se capturó usando una cámara digital. Las imágenes digitalizadas se analizaron usando ImageJ (NIH), y las bandas para SOD-1 se compararon con las bandas para la proteína de unión de la caja TATA y la microglobulina beta2 (estos genes de mantenimiento no se vieron afectados por los fármacos) mientras estaban en el intervalo lineal de ciclos, 25 ciclos en estas condiciones, para determinar los incrementos o disminuciones con relación a controles.

(vi) *Experimentos de GeneChip*

Se preparó ARNm celular total a partir de células HeLa con o sin tratamiento usando un minikit de ARN de Qiagen seguido de un minikit de ARNm oligotex. Se sintetizaron ADNc bicatenarios a partir de 2  $\mu$ g de ARNm total usando el Superscript Choice System for cDNA synthesis (Invitrogen) con el cebador T7-(dT)24, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los ADNc se limpiaron mediante extracción con fenol-cloroformo con Phase Lock Gel (PLG), y se concentraron mediante precipitación con etanol. El ARNc marcado con biotina se sintetizó a partir de ADNc mediante transcripción *in vitro* usando el kit Bioarray HighYield RNA transcript Labeling Kit (Affymetrix) siguiendo la recomendación del proveedor. Los productos de la transcripción *in vitro* se limpiaron usando columnas RNeasy spin (Qiagen) y se fragmentaron mediante hidrólisis inducida por metal en tampón de fragmentación (40 mM de Tris-acetato, pH 8,1, 100 mM de KOAc, 30 mM de MgOAc). El ARNc fragmentado se sometió entonces a conjuntos de Affymetrix GeneChip en tampón de hibridación (100 mM de MES, NaCl 1M, 20 mM de EDTA, 0,01% de Tween-20). Las imágenes de GeneChip se analizaron con Affymetrix Microarray Suite V5.0 y Affymetrix Data Mining Tool V3.0. Las intensidades de las señales de todos los conjuntos de sondas se aumentaron en escala hasta un valor diana de 150. Los resultados de Detection Call, Change Call y Signal Log Ratio se obtuvieron aplicando los parámetros por defecto a algoritmos estadísticos para análisis tanto absoluto como de comparación.

(vii) *Transferencia Western*

Los animales se sobredosificaron con pentobarbital sódico (250 mg/kg, i.p.). Se disecaron las médulas espinales y se homogeneizaron en 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM de DTT, 0,1 mg de leupeptina, 1 mM de EDTA, y 1 mM de EGTA. El homogenado se centrifugó entonces a 14.000 x g para peletizar el desecho. La concentración de proteína se midió usando el ensayo de proteína de BCA (Pierce, Rockford, IL). La proteína (25  $\mu$ g) de cada muestra se hizo correr en un gel de Tris-glicina al 4-20% (Invitrogen, San Diego, CA). Después de la transferencia, las membranas se lavaron en PBS, seguido de la incubación toda la noche en tampón de bloqueo (0,2% de I-block (Applied Biosystems, Foster City, CA), PBS, y 0,1% de Tween 20). La membrana se sondó entonces con un anticuerpo anti-SOD1 bovino de conejo policlonal (Sigma) a una dilución de 1:4000. Después de varios lavados, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (1:5000 en tampón de bloqueo), y las señales inmunorreactivas se visualizaron usando un reactivo quimioluminiscente potenciado, CDP Star (Western Star kit; Tropix). Tras la exposición, las películas se barrieron y después se importaron en NIH Image para la cuantificación de la densidad de las bandas.

## Ejemplo 2

*Ensayo de los Efectos de un Agente Antimalárico*

Este ejemplo describe cómo examinar los efectos *in vitro* del fármaco antimalárico, pirimetamina, sobre la actividad de SOD-1. La estirpe celular HeLa derivada de carcinoma de cuello uterino humano (ATCC) se cultivó en medio esencial mínimo de Dulbecco, con concentración elevada de glucosa, suplementado con glutamina, 4 mM, suero fetal bovino certificado, 10%, y penicilina, estreptomycin, y nistatina (todos de Invitrogen). Las condiciones de incubación fueron 37°C y 99% de humedad relativa, con CO<sub>2</sub> a 5%. Los cultivos se hicieron pasar cuando alcanzaron una

confluencia de 90%. Para experimentos farmacológicos, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo tisular estéril, a una densidad de 3.500 células/pocillo en 150  $\mu$ l de medio.

Después de 72 horas de incubación con la pirimetamina, las células se fotografiaron y se procesaron como se describe en el Ejemplo 1 (iii). La proteína total de los lisados se determinó mediante el ensayo de Bradford como se describe en el Ejemplo 1 (iv). Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 1. Estos resultados muestran que la pirimetamina añadida al medio de cultivo de células HeLa 72 horas antes de la cosecha redujo significativamente los niveles de la proteína SOD-1, mientras que los niveles de proteína total no se vieron afectados. Esta reducción estaba relacionada con la dosis, y fue máxima con 10  $\mu$ M, con una IC<sub>50</sub> menor que 3  $\mu$ M. La Figura 2 muestra que tanto noretindrona como pirimetamina (5  $\mu$ M) provocó una disminución relacionada con la dosis en ARNm de hSOD-1 en células HeLa tras el tratamiento de 72 horas.

La alfa-sinucleína ha estado implicada en trastornos neurodegenerativos caracterizados por inclusiones de cuerpos de Lewy, tales como enfermedad de Parkinson (PD) y demencia con cuerpos de Lewy. Las inclusiones similares a cuerpos de Lewy también se han observado en neuronas espinales de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y los informes sugieren posibles anormalidades de alfa-sinucleína en pacientes con ELA. La alfa-sinucleína es una proteína ubicua que comparte homología física y funcional significativa con la proteína chaperona, 14-3-3, y es particularmente abundante en el cerebro (Ostrerova, N. *et al.*, J. Neurosci., 19:5782 (1990)). Un aumento de la velocidad de agregación de alfa-sinucleína puede contribuir a los mecanismos de neurodegeneración en enfermedades con cuerpos de Lewy. Los estudios sobre animales transgénicos también sugieren que la agregación de alfa-sinucleína es dañina para las neuronas. Se dio a conocer que se produjo disfunción dopaminérgica en ratones transgénicos que expresan alfa-sinucleína humana de tipo salvaje (Masliah, E., *et al.*, Science, 287:1265-1269 (2000)), y que la *Drosophila* que sobreexpresa alfa-sinucleína mostró disfunción dopaminérgica y muerte neuronal dopaminérgica asociada con el desarrollo de agregados de alfa-sinucleína (Feany, M B, *et al.*, Nature 404:394-8 (2000)). Las pruebas sugieren que las neuronas con dopamina desarrollan agregados de alfa-sinucleína y se degeneran a medida que estos agregados se desarrollan.

Los resultados del análisis de Genechip mostrados en la Figura 4 ilustran que la pirimetamina (ALG-2001) (3  $\mu$ M) y noretindrona (ALG-3001) (3  $\mu$ M) disminuyeron sustancialmente ARNm para alfa-sinucleína en células HeLa tras 4 días de tratamiento. De este modo, los compuestos de la presente invención pueden ralentizar la neurodegeneración en enfermedades con cuerpos de Lewy. Esto ilustra un papel para los compuestos de la presente invención en la ralentización de la progresión o en la mejora de los efectos de ELA y PD.

### Ejemplo 3

#### *Ensayo de los Efectos de Agentes Farmacológicos In vivo*

##### (a) Modelo murino SOD-93A

Los efectos de los agentes farmacológicos, por ejemplo pirimetamina y sus análogos descritos en el Ejemplo 2, se ensayaron *in vivo* en el modelo murino SOD-93A para ELA, y se midió una reducción en los niveles de SOD-1. La inhibición de la expresión de ARN se monitorizó mediante muestras de sangre aisladas procedentes del modelo de ratón de ELA reconocido en la técnica antes y después de la introducción del compuesto usando técnicas estándar de RT-PCR. La expresión de la proteína SOD-1 se determinó usando técnicas de transferencia Western con un anticuerpo anti-SOD-1 de Sigma.

Como se muestra en las Figuras 5 y 6, el tratamiento crónico con pirimetamina (10 mg/kg ip X 14 días) redujo significativamente ( $P < 0,05$ ,  $n = 7$ ) la proteína SOD-1 y alfa-sinucleína en linfocitos de ratón. Se mostró que los resultados son estadísticamente significativos usando el análisis de la prueba de la t de Student. El control fue vehículo (disolución salina).

La pirimetamina crónica (50 mg/kg/d) redujo significativamente SOD-1 espinal en ratones G93A tras el tratamiento de 14 días, como se muestra en la Figura 7. La pirimetamina se administró oralmente durante 14 días. Las médulas espinales se recogieron y se analizaron mediante análisis de transferencia Western como se describe anteriormente.

##### (b) Paciente humano con ELA familiar

Un paciente con ELA familiar de 38 años de edad, voluntario, mostró una reducción significativa en los niveles de SOD-1 tras el tratamiento oral con pirimetamina (100 mg/d durante 30 días). La Figura 8 muestra los niveles reducidos de SOD1 linfocíticos en el paciente con SOD1 familiar tras la administración del fármaco (después del fármaco), en comparación con antes del tratamiento (antes del fármaco). Se recogieron aproximadamente 5-8 cc de sangre del paciente. Los niveles de SOD-1 se analizaron mediante ELISA y análisis de transferencia Western.

Los efectos *in vivo* también se pueden determinar monitorizando la respiración de un sujeto midiendo la capacidad vital forzada (FVC) usando un espirómetro Renaissance Puritan Bennett. La fuerza inspiratoria máxima (MIF) también se puede medir usando un manómetro de mano.

## Ejemplo 4

### *Puntuación Neurológica*

5 Los efectos de los agentes farmacológicos moduladores del receptor nuclear, que son pirimetamina o un análogo funcional de la misma, también se pueden determinar mediante una puntuación neurológica registrada en una escala de 4 puntos:

10 0 = Reflejo normal en las extremidades posteriores (el animal extenderá sus extremidades posteriores cuando es alzado por su cola).

1 = Reflejo normal (falta de extensión de las extremidades posteriores cuando el animal es alzado por la cola).

15 2 = Reflejo anormal y evidencia visible de parálisis.

3 = Falta de reflejo y parálisis total de las extremidades posteriores.

20 4 = Incapacidad para incorporarse por sí mismos cuando se colocan en los lados en 30 segundos, o se encuentran muertos. Los animales se sacrifican en esta etapa si están vivos.

25 El análisis estadístico sobre la puntuación neurológica, peso corporal y supervivencia se puede llevar a cabo utilizando ANOVA, Kaplan Meier, la prueba de la t, el modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales, los métodos logístico y paramétrico logarítmicos, y los métodos de modelos lineales mixtos. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando procedimientos estándar conocidos en la técnica.

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Uso de una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para la fabricación de un medicamento para prevenir el desarrollo de síntomas, o mejorar los síntomas o progresión de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mediada por SOD-1.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que el análogo funcional es pirimetamina con al menos una modificación en el anillo bencénico.

10 3. El uso de la reivindicación 1, en el que el análogo funcional es pirimetamina con al menos una modificación en el anillo de pirimidina.

15 4. Una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso en un método para prevenir el desarrollo de síntomas, o mejorar los síntomas o progresión de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) mediada por SOD-1.

5. Una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la reivindicación 4, en la que el análogo funcional es pirimetamina con al menos una modificación en el anillo bencénico.

20 6. Una pirimetamina o un análogo funcional de la misma para uso según la reivindicación 1, en la que el análogo funcional es pirimetamina con al menos una modificación en el anillo de pirimidina.

25

30

35

40

45

50

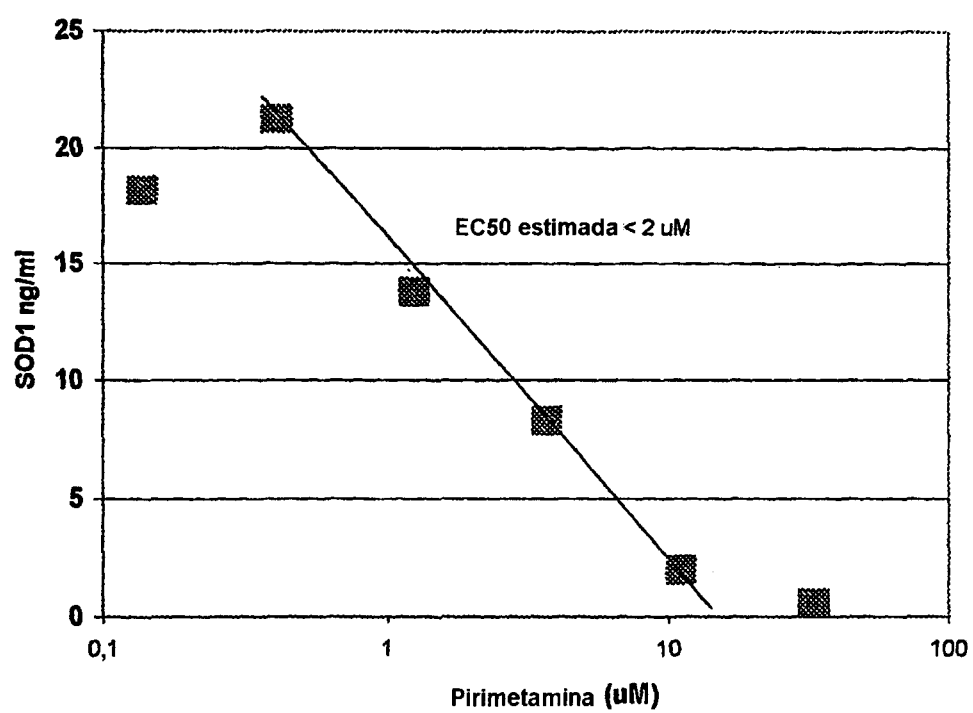
55

60

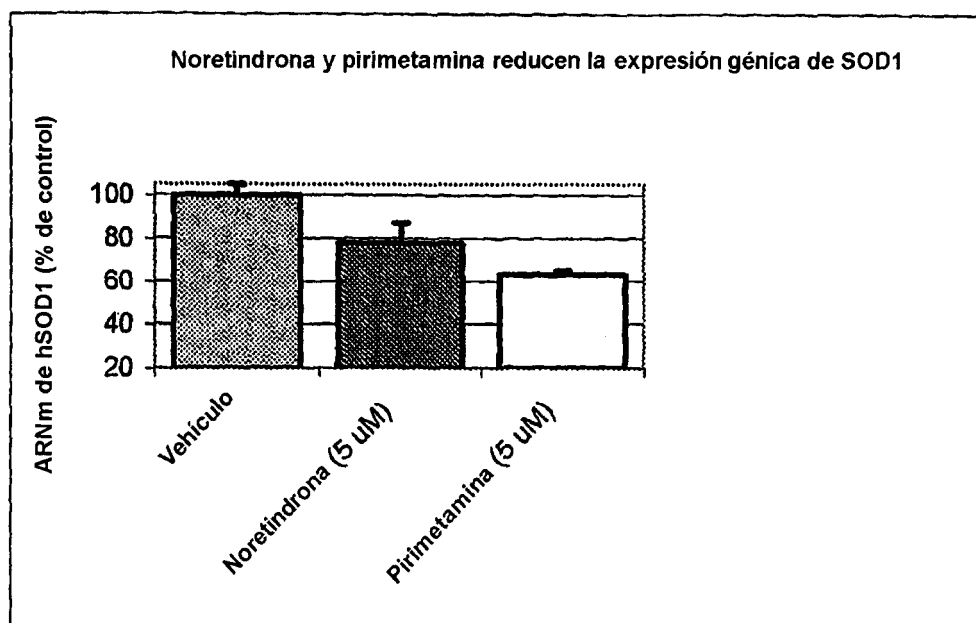
65



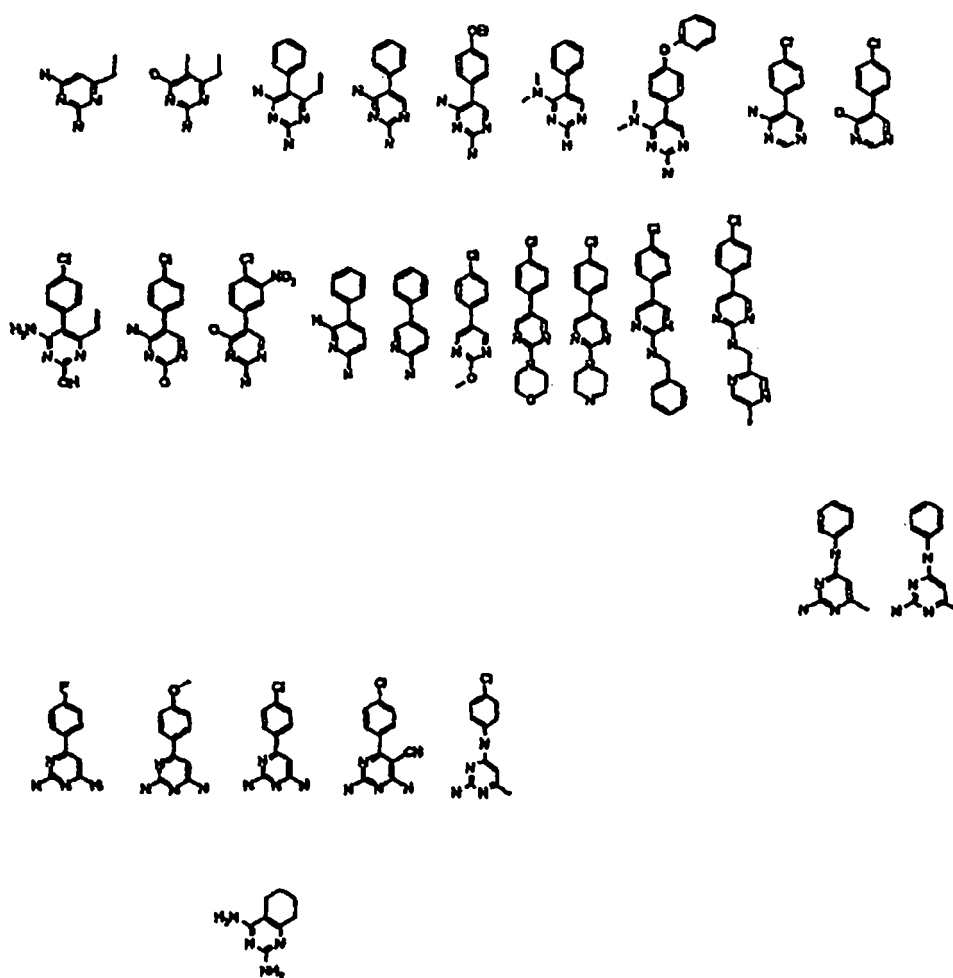
**FIGURA 1**



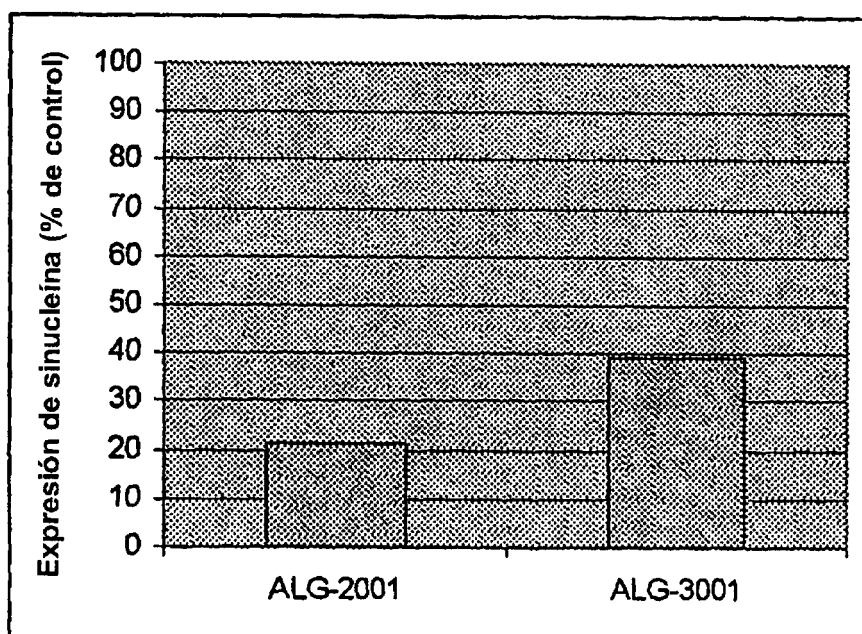
**FIGURA 2**



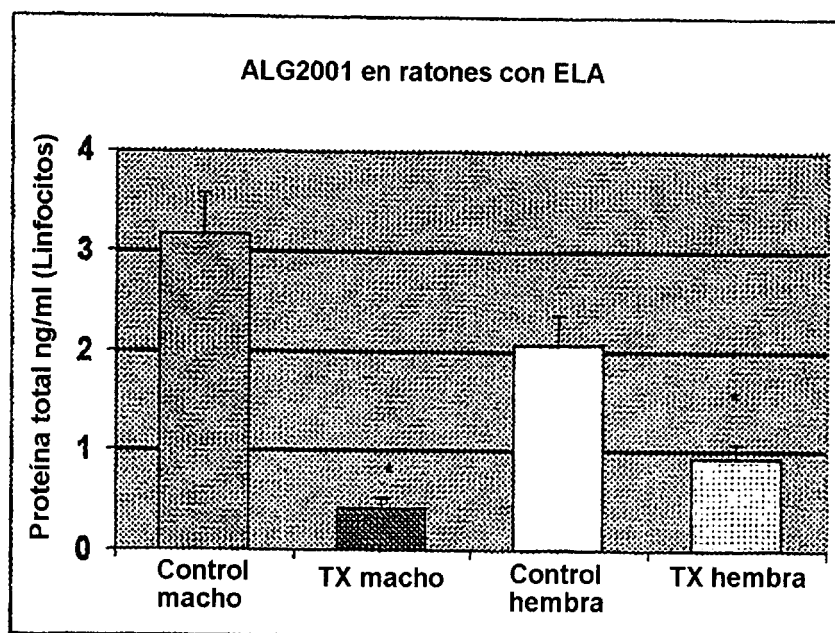
**FIGURA 3**



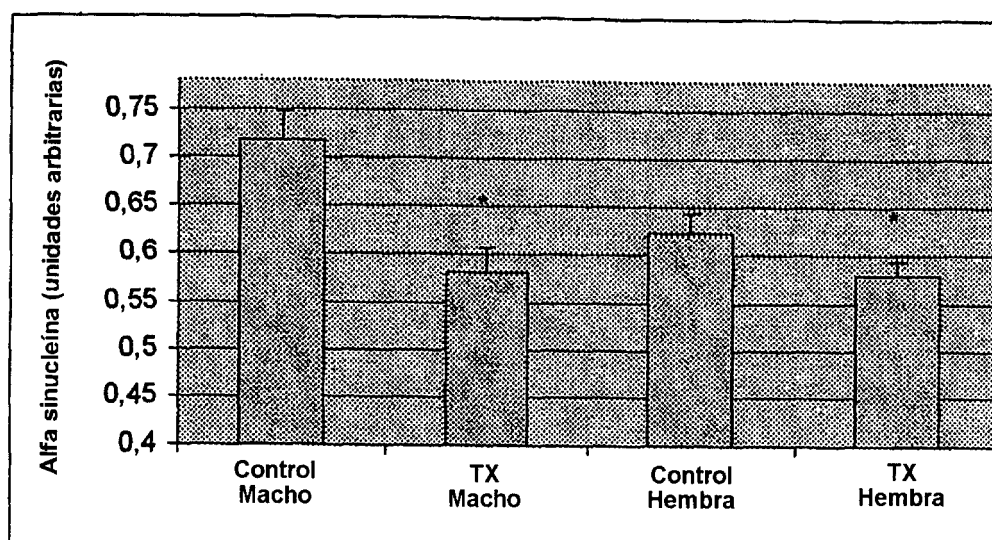
**FIGURA 4**



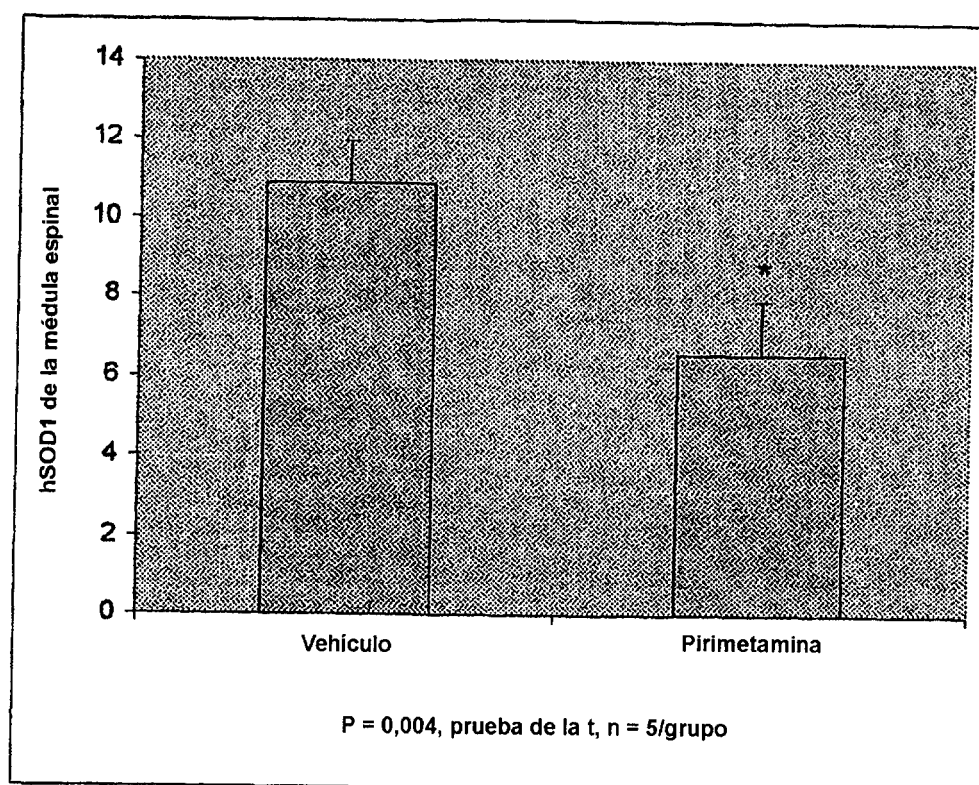
**FIGURA 5**



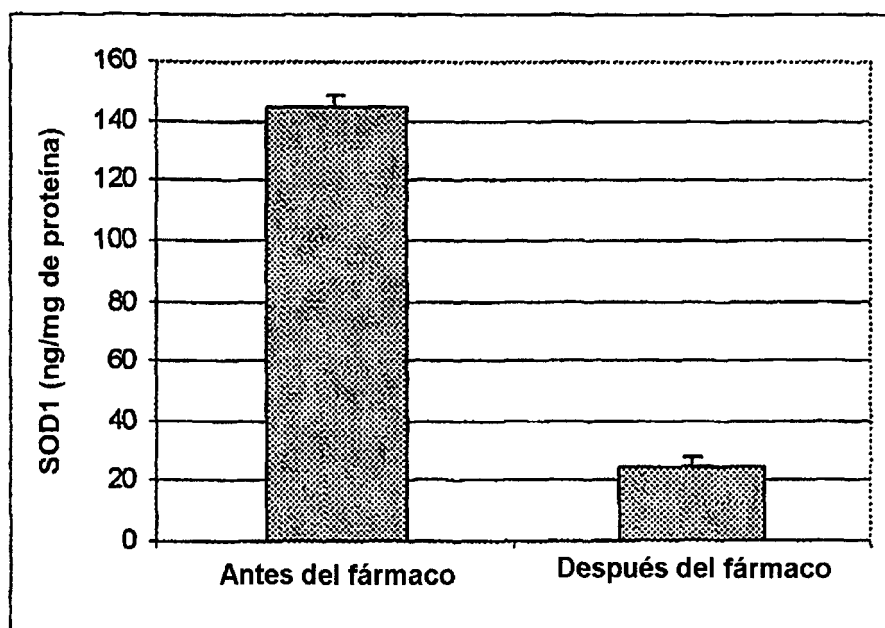
**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



**FIGURA 8**





# ES 2 340 708 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Scott, Sean  
Benjamin, Daniel

<120> Modulación de enfermedades neurodegenerativas

<130> 106792-0009

<140> Todavía no asignado

<141> 01-03-2006

<150> 60/658.505

<151> 04-03-2005

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2288

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

gtaccctggt tacatcattt tgccattttc gcgtactgca accggcgggc caccgccgtga      60
aaagaagggt gttttctcca cagtttcggg gttctggacg tttcccggct gcggggcggg      120
gggagtcctc ggcgcacgcg gccccttggc ccgccccagt cattcccggc cactcgcgac      180
ccgaggctgc cgcagggggc gggctgagcg cgtgcgaggc cattggtttg gggccagagt      240
gggcgaggcg cggaggctct gcctataaag tagtcgcgga gacggggtgc tggtttgctg      300
cgtagtcctc tgcaggctct gggtttcctg tgcagtcctc ggaaccagga cctcggcgct      360
gcctagcgag ttatggcgac gaaggccgtg tgcgtgctga agggcgacgg ccagtgagc      420
ggcatcatca atttcgagca gaaggcaagg gctgggaccg ggaggcttgt gttgcgaggc      480
cgctcccgac ccgctcgtcc ccccgcgacc ctttgcatgg acgggtcgcc cgccagggt      540
agagcagtta agcagcttgc tggaggttca ctggctagaa agtggtcagc ctgggattgc      600
atggacggat ttttccactc ccaagtctgg ctgcttttta cttactgtg aggggtaaag      660
gtaaatacagc tgttttcttt gttcagaaac tctctccaac tttgcacttt tcttaaagga      720
aagtaatgga ccagtgaagg tgtggggaag cattaagga ctgactgaag gcctgcatgg      780
attccatggt catgagtttg gagataatac agcagggtgg tcataattta gctttttttt      840
cttcttctta taaataggct gtaccagtgc aggtcctcac ttaatacctc tatccagaaa      900
acacggtggg ccaaaggatg aagagaggta acaagatgct taactcttgt aatcaatggc      960

```

# ES 2 340 708 T3

5 gatacgtttc tggagttcat atggtatact acttgtaaat atgtgcctaa gataattccg 1020  
 tgtttccccc acctttgctt ttgaacttgc tgactcatgt gaaaccctgc tcccaaattgc 1080  
 10 tggaatgctt ttacttcctg ggcttaaagg aattgacaaa tgggcactta aaacgatttg 1140  
 gttttgtagc atttgattga atatagaact aatacaagt ccaaagggga actaatacag 1200  
 gaaatgttca tgaacagtac tgtcaaccac tagcaaaatc aatcatcatt tgatgctttt 1260  
 catataggca tgttgagac ttgggcaatg tgactgctga caaagatggg gtggccgatg 1320  
 tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca ttgcatcatt ggccgcacac 1380  
 15 tgggtggaag ttttcataaa ggatatgcat aaaacttctt ctaacagtac agtcatgtat 1440  
 ctttcacttt gattgttagt cgcgaaattct aagatccaga taaactgtgt ttctgctttt 1500  
 aaactactaa atattagtat atctctctac taggattaat gttatttttc taatattatg 1560  
 20 aggttcttaa acatcttttg ggtattgttg ggaggaggta gtgattactt gacagcccaa 1620  
 agttatcttc ttaaaatttt ttacaggtcc atgaaaaagc agatgacttg ggcaaagggtg 1680  
 25 gaaatgaaga aagtacaaag acaggaaacg ctggaagtcg tttggcttgt ggtgtaattg 1740  
 ggatcgccca ataaacattc ccttgatgt agtctgaggc cccttaactc atctgttatc 1800  
 ctgctagctg tagaaatgta tcctgataaa cattaaacac tgtaatctta aaagtgtaat 1860  
 30 tgtgtgactt tttcagagtt gctttaaagt acctgtagtg agaaactgat ttatgatcac 1920  
 ttggaagatt tgtatagttt tataaaactc agttaaagt tctgtttcaa tgacctgtat 1980  
 35 tttgccagac ttaaatacaca gatgggtatt aaacttgtca gaatttcttt gtcattcaag 2040  
 cctgtgaata aaaaccctgt atggcactta ttatgaggct attaaaagaa tccaaattca 2100  
 aactaaatta gctctgatac ttatttatat aaacagcttc agtggaacag atttagtaat 2160  
 40 actaacagtg atagcatttt attttgaaag tgttttgaga ccatcaaaat gcatacttta 2220  
 aaacagcagg tcttttagct aaaactaaca caactctgct tagacaaata ggctgtcctt 2280  
 45 tgaagctt 2288

<210> 2  
 50 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 55 <400> 2

60 Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly  
 1 5 10 15

65

# ES 2 340 708 T3

	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Gln	Lys	Glu	Ser	Asn	Gly	Pro	Val	Lys	Val	Trp
			20						25					30		
5	Gly	Ser	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Glu	Gly	Leu	His	Gly	Phe	His	Val	His
			35					40					45			
10	Glu	Phe	Gly	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Cys	Thr	Ser	Ala	Gly	Pro	His	Phe
		50					55					60				
15	Asn	Pro	Leu	Ser	Arg	Lys	His	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	His
	65					70					75					80
20	Val	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Val	Thr	Ala	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Ala	Asp
					85					90					95	
25	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Leu	Ser	Gly	Asp	His	Cys	Ile
				100					105					110		
30	Ile	Gly	Arg	Thr	Leu	Val	Val	His	Glu	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Lys
			115					120					125			
35	Gly	Gly	Asn	Glu	Glu	Ser	Thr	Lys	Thr	Gly	Asn	Ala	Gly	Ser	Arg	Leu
		130					135					140				
40	Ala	Cys	Gly	Val	Ile	Gly	Ile	Ala	Gln							
	145					150										
45																
50																
55																
60																
65																