



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 028**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01941698 .1**

86 Fecha de presentación : **30.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1305635**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2003**

54 Título: **Métodos para la identificación de compuestos que modulan al RAGE.**

30 Prioridad: **30.05.2000 US 207342 P**
05.03.2001 US 799152

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Trans Tech Pharma, Inc.**
Suite 110, 4170 Mendenhall Oaks Parkway
High Point, North Carolina 27265, US

72 Inventor/es: **Shahbaz, Manouchehr**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 271 028 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

Métodos para la identificación de compuestos que modulan al RAGE.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con la regulación del Receptor para Productos Finales con Glicación Avanzada (RAGE). Más particularmente, la presente invención describe métodos para la identificación rápida de alto rendimiento de los moduladores del RAGE.

10 **Antecedentes de la invención**

La incubación de proteínas o de lípidos con azúcares de tipo aldosa resulta en la glicación no enzimática y en la oxidación de grupos amino sobre proteínas para formar aductos de Amadori. Con el tiempo, los aductos experimentan reordenamientos adicionales, deshidrataciones, y entrelazamiento con otras proteínas para formar complejos conocidos como Productos Finales con Glicosilación Avanzada (AGE). Los factores que promueven la formación de AGE incluyen la renovación demorada de la proteína (por ejemplo, como en la amiloidosis), acumulación de macromoléculas que tienen un alto contenido de lisina, y altos niveles de glucosa en sangre (por ejemplo, como en la diabetes) (Hori y colaboradores, *J. Biol. Chem.* **270**:25752-761, (1995)). Los AGE han sido implicados en una variedad de desordenes que incluyen complicaciones asociadas con la diabetes y el envejecimiento normal.

Los AGE exhiben un enlazamiento saturable y específico con los receptores de la superficie de la célula sobre monocitos, macrófagos, células endoteliales de la microvasculatura, células de músculo liso, células mesengiales, y neuronas. El Receptor para Productos Finales con Glicación Avanzada (RAGE) es un miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas de las moléculas de la superficie de la célula. El dominio extracelular (N-terminal) de RAGE incluye tres regiones del tipo de las inmunoglobulinas: el dominio del tipo que V (variable) seguido por dos dominios del tipo C (constante) (Neeper y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **267**:14998-15004 (1992); Schmidt y colaboradores, *Circ. (Suppl.)* 96#194 (1997)). Un dominio único de expansión transmembrana y una cola citosólica corta altamente cargada siguen al dominio extracelular. El dominio extracelular N-terminal se puede aislar por medio de proteólisis del RAGE para generar un RAGE soluble (sRAGE) que consta de los dominios V y C.

El RAGE se expresa en la mayoría de los tejidos, y en particular, se encuentra en neuronas corticales durante la embriogénesis (Hori y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **270**:25752-761 (1995)). También se encuentran niveles mayores de RAGE en tejidos de envejecimiento (Schleicherer y colaboradores, *J. Clin. Invest.*, **99** (3): 457-468 (1997)), y en la retina diabética, en la vasculatura y el riñón (Schmidt y colaboradores, *Nature Med.*, **1**:1002-1004 (1995)). La activación de RAGE en diferentes tejidos y órganos conduce a una variedad de consecuencias patofisiológicas. RAGE ha sido implicado en una variedad de condiciones que incluyen: inflamación aguda y crónica (Hofmann y colaboradores, *Cell* **97**:889-901 (1999)), el desarrollo de complicaciones diabéticas tardías tales como una permeabilidad vascular mayor (Wautier y colaboradores, *J. Clin. Invest.*, **97**:238-243 (1995), nefropatía (Teillet y colaboradores, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**:1488-1497 (2000), aterosclerosis (Vlassara y colaboradores, *The Finnish Medical Society DUODECIM, Ann. Med.*, **28**:419-426 (1996), y retinopatía (Hammes y colaboradores, *Diabetología*, **42**:603-607 (1999)). RAGE también ha estado implicado en la enfermedad de Alzheimer (Yan y colaboradores, *Nature*, **382**:685-691 (1996)); disfunción eréctil; y en invasión tumoral y metástasis (Taguchi y colaboradores, *Nature*, **405**:354-357 (2000)).

Además de los AGE, otros compuesto se pueden unir a, y modular al RAGE. En el desarrollo normal, RAGE interactúa con anfoterina, un polipéptido que media la excrecencia de neurita en neuronas embrionarias cultivadas (Hori y colaboradores, 1995). El RAGE también ha mostrado que interactúa con ligandos como la cangranulina y el β -amiloide (Yan y colaboradores, *Nature*, **389**:589-595, (1997); Yan y colaboradores, *Nature*, **382**:685-691 (1996); Yan y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**:5296-5301 (1997)).

WO 99/18987 revela un péptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de un dominio V de un Receptor para un producto final con glicación avanzada. También revela la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen cantidades terapéuticamente efectivas del péptido. El documento también revela un método para inhibir la interacción de un péptido β -amiloide con un receptor para un producto final con glicación avanzada.

WO 00/20458 revela un método para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la interacción de un péptido con un receptor para un producto final con glicación avanzada. Este método determina el grado de inhibición por medio de la comparación de la cantidad de péptido enlazado al RAGE o al fragmento del mismo con la cantidad determinada cuando el péptido se mezcla con el RAGE o un fragmento del mismo en ausencia del compuesto. El documento también revela que el péptido debe ser inactivado por medio de derivatización química antes del análisis. El documento provee un método para inhibir la interacción de un producto final con glicación avanzada con un receptor para productos finales con glicación avanzada por medio de la administración a un individuo de una cantidad farmacéuticamente aceptable del compuesto identificado.

WO 97/39121 provee polipéptidos sustancialmente puros o aislados que se relacionan con, y/o se derivan de polipéptidos humanos del RAGE. Estos péptidos se pueden caracterizar también por medio de su habilidad ya sea para imitar o para inhibir la interacción entre los productos finales de glicación avanzada y sus receptores. El documento

revela también composiciones farmacéuticas que contienen un polipéptido RAGE humano soluble. El documento también revela un método de purificación de un AGE a partir de una mezcla de proteínas y un método de evaluación selectiva para analizar un compuesto para determinar si dicho compuesto es un agonista de un antagonista de una interacción AGE/RAGE.

5

El enlazamiento de ligandos tales como los AGE, S100/calgranulina, β -amiloide, CML (N^c-Carboximetil lisina), y anfoterina al RAGE ha mostrado que modifica la expresión de una variedad de genes. Por ejemplo, en muchos tipos de células la interacción entre el RAGE y sus ligandos genera estrés oxidativo, que resulta por lo tanto en la activación del factor de transcripción NF- κ B sensible a los radicales libres, y la activación de los genes regulados por NF- κ B, tales como las citoquinas EL-1 β , TNF- α y similares. Además, se ha mostrado que diferentes otras rutas reguladoras, tales como aquellas que involucran p21ras, quinasas MAP, ERK1 y BRK2, se ha mostrado que son activadas por el enlazamiento de los AGE y otros ligandos a RAGE. En realidad, la transcripción del RAGE por si mismo está regulada al menos en parte por NF- κ B. Por lo tanto, una espiral ascendente y a menudo perjudicial s alimentada por medio de un bucle de retroalimentación positiva iniciado por medio del enlazamiento de un ligando. El enlazamiento antagonizante de ligandos fisiológicos al RAGE, por lo tanto, es un objetivo lógico para reducir la expresión de los cambios patofisiológicos originados por concentraciones efectivas de los AGE y de otros ligandos para el RAGE.

10

15

Por lo tanto existe una necesidad por los métodos para descubrir compuestos que modulen el enlazamiento de ligandos fisiológicos al receptor RAGE. El método debe comprender un ensayo que sea sensible y sin embargo altamente específico. Preferiblemente, el método debe utilizar RAGE, o el mismo sitio de enlazamiento de RAGE, permitiendo por lo tanto el desarrollo de los moduladores que varían en estructura y efecto fisiológico. Idealmente, el método debe prestarse en si mismo para técnicas automatizadas de alto rendimiento adecuadas para la evaluación selectiva a gran escala de múltiples compuestos.

20

25 Resumen

La presente invención se relaciona con el uso de un ensayo de alto rendimiento para el descubrimiento del compuesto que modula al RAGE. En un aspecto, la presente invención comprende un método para la detección de los moduladores del RAGE que incluye: (a) la adsorción de un ligando del RAGE sobre una superficie sólida; (b) la adición de un compuesto de interés y de una proteína que contiene al RAGE que comprende a la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del mismo al ligando preadsorbido; (c) la adición de un anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína del RAGE o a un fragmento de la misma; (d) la determinación de la cantidad de proteína del RAGE o de un fragmento de la misma enlazada al ligando por medio de la medición de la cantidad de anticuerpo y anti-RAGE enlazados a la superficie sólida; y (e) la comparación de la cantidad de proteína del RAGE o de un fragmento de la misma enlazada al ligando en presencia de diferentes cantidades del compuesto de interés.

30

35

En otro aspecto, la presente invención comprende un método para la detección de moduladores del RAGE que incluye: (a) la adsorción de un ligando RAGE sobre una superficie sólida; (b) la adición de un compuesto de interés y de una proteína que contiene al RAGE que comprende a la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del mismo al ligando preadsorbido; (c) la adición de un anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína del RAGE o a un fragmento de la misma y un segundo anticuerpo que se enlaza al anticuerpo anti-RAGE; (d) la medición del anticuerpo secundario enlazado al anticuerpo y anti-RAGE; y (e) la comparación de la cantidad del RAGE enlazada al ligando en presencia de diferentes cantidades del compuesto de interés.

40

45 En otro aspecto, la invención incluye compuestos identificados por medio de los métodos de la invención.

En aún otro aspecto, la invención incluye un kit para la detección de los moduladores del RAGE que comprende: (a) una superficie sólida que contiene un ligando para el RAGE; (b) una solución empacada en forma separada que contiene una proteína que comprende un RAGE que incluye una SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma; (c) un sistema de detección que contiene al menos un agente que se enlaza específicamente a la proteína del RAGE o a un fragmento de la misma; (d) reactivos empacados en forma separada para el sistema de detección; y (e) instrucciones para su uso.

50

Lo anterior se enfoca en las características más importantes de la invención con el propósito de que la descripción detallada que sigue a continuación pueda ser entendida mejor y con el propósito de que la presente contribución al estado del arte se pueda apreciar mejor. Existen, desde luego, características adicionales de la invención que serán descritas aquí más adelante y que constituirán el objeto de las reivindicaciones incluidas aquí. Se entiende que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción y en los dibujos. La invención es capaz de otras modalidades y de ser practicada o llevada a cabo en diferentes formas.

55

60

A partir del resumen anterior, es claro que el objeto de la presente invención es la de proveer un método rápido de alto rendimiento para la detección de los moduladores del RAGE. Estos, junto con otros objetivos de la presente invención, con las diferentes características de novedad que caracterizan a la invención, son señaladas en forma particular en las reivindicaciones anexas y que forma parte de este documento.

65

Breve descripción de los dibujos

Las diferentes características, aspectos y ventajas de la presente invención se harán más claras con referencia a la siguiente descripción, a las reivindicaciones anexas, y a los dibujos acompañantes.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de una modalidad del método de la presente invención.

La Figura 2 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende: (A) la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos para el RAGE humano como el reportado en la base de datos del GenBank/EMBL, número de acceso m91211; (B) SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos de sRAGE humano; (C) SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos del dominio V de RAGE humano; y (D) SEQ ID NO: 4, el fragmento N-terminal del dominio V de RAGE humano.

La Figura 3 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la optimización de la concentración de S-100b en donde sRAGE estaba presente en una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ mg/ml, el anticuerpo policlonal para sRAGE estaba presente en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y las incubaciones nocturnas se hicieron utilizando S-100b en concentraciones en el rango aproximadamente entre 2 ng/pozo y 4 mg/pozo.

La Figura 4 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la optimización de la concentración de sRAGE en donde se utilizaron 500 ng/pozo de S-100b para recubrir los pozos, y el anticuerpo policlonal para sRAGE estaba presente en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y la concentración de sRAGE estaba en el rango aproximadamente entre 2 a 10 nM.

La Figura 5 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la optimización de la concentración del anticuerpo donde sRAGE estaba presente en una concentración de $1,0 \times 10^4$ mg/ml, las incubaciones fueron hechas utilizando S-100b a razón de 50, 500, 1.000 y 2.000 ng/pozo como se indicó, y la concentración de anticuerpo monoclonal estaba en el rango entre 5×10^{-6} y 0,054 mg/ml.

La Figura 6 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la optimización de la tolerancia de DMSO donde se utilizaron 500 ng/pozo de S-100b para recubrir los pozos, y estaba presente anticuerpo monoclonal o policlonal para sRAGE en concentraciones de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml respectivamente, y la concentración de sRAGE era de $2,2 \times 10^{-4}$ mg/ml.

La Figura 7 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la variación de la OD de la muestra para 88 muestras como una función de la posición individual del pozo, donde la OD promedio consta de 0,705, la desviación estándar (SD) es 0,054, y el grado de certidumbre (CV) del 95% es 7,73%.

La Figura 8 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende una curva de saturación para el enlazamiento de sRAGE a S-100b, donde se utilizaron 50 ng/ml de S-100b para recubrir los pozos, estaba presente anticuerpo monoclonal para sRAGE en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y el rango de concentración de sRAGE estaba aproximadamente entre 0,5 y 9 nM.

La Figura 9 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende una curva de saturación para el enlazamiento de sRAGE a S-100b, donde se utilizaron 100 ng/ml de S-100b para recubrir los pozos, estaba presente anticuerpo monoclonal para sRAGE en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y el rango de concentración de sRAGE estaba aproximadamente entre 0,3 y 10 nM.

La Figura 10 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende una curva de saturación para el enlazamiento de sRAGE a S-100b, donde se utilizaron 500 ng/ml de S-100b para recubrir los pozos, y estaba presente anticuerpo monoclonal para sRAGE en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y el rango de concentración de sRAGE estaba aproximadamente entre 24 y 470 nM.

La Figura 11 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende una curva de saturación para el enlazamiento de sRAGE a S-100b, donde se utilizaron 100 ng/ml de S-100b para recubrir los pozos, estaba presente anticuerpo monoclonal para sRAGE en una concentración de $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml, y el rango de concentración de sRAGE estaba aproximadamente entre 5 y 76 nM.

La Figura 12 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la inhibición del enlazamiento de sRAGE por medio del Compuesto 1.

La Figura 13 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende la estructura del Compuesto 1.

La Figura 14 muestra un aspecto de una modalidad de la presente invención que comprende una inhibición de la activación de sRAGE del factor de transcripción NF- κ B por medio del Compuesto 1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con el uso de un ensayo de alto rendimiento para el descubrimiento de compuestos que modulan al RAGE. El método mide el enlazamiento de ligandos a RAGE, o de fragmentos de RAGE, bajo condiciones en las cuales se mantienen la integridad fisiológica y estructural del receptor. Aquellos compuestos que se enlazan se evalúan por la actividad fisiológica.

En un aspecto, la presente invención comprende un método para la detección de moduladores del RAGE que comprende: (a) la adsorción de un ligando del RAGE sobre una superficie sólida; (b) la adición de un compuesto de interés y de una proteína que contiene al RAGE que comprende a la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del mismo al ligando preadsorbido; (c) la adición de un anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína del RAGE o a un fragmento de la misma; (d) la determinación de la cantidad de proteína del RAGE o de un fragmento de la misma enlazada al ligando por medio de la medición de la cantidad de anticuerpo y anti-RAGE enlazados a la superficie sólida; y (e) la comparación de la cantidad de proteína del RAGE o de un fragmento de la misma enlazada al ligando en presencia de diferentes cantidades del compuesto de interés.

En una modalidad, el fragmento de RAGE es la porción extracelular soluble de RAGE (sRAGE), como la definida por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En otra modalidad, el fragmento de RAGE es el dominio V de RAGE, como se lo define por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En aún otra modalidad, el fragmento de RAGE es un fragmento del dominio V de RAGE, como se lo define por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. Preferiblemente, el método comprende medir la habilidad del compuesto de interés para modular la habilidad de RAGE, o de una proteína sustancialmente homóloga a él, para activar procesos celulares. Más preferiblemente, los agonistas comprenden la estimulación de los procesos celulares activados por RAGE y los antagonistas comprenden la inhibición de los procesos celulares activados por RAGE. Aún más preferiblemente, el proceso celular comprende la activación de la transcripción génica por NF- κ B.

En una modalidad, el anticuerpo para RAGE contiene un anticuerpo monoclonal. En una modalidad, el anticuerpo para RAGE contiene anticuerpo policlonal.

Preferiblemente, el método comprende además la adición de un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo anti-RAGE. Más preferiblemente, al anticuerpo anti-RAGE y al anticuerpo secundario se les permite formar un complejo antes de ser añadidos. Preferiblemente también, el método comprende además un ensayo colorimétrico para el anticuerpo secundario.

En una modalidad, la superficie sólida comprende un vaso de reacción. En otra modalidad, la superficie sólida comprende una varilla de medición.

Preferiblemente, el ligando incluye un producto final con glicación avanzada, o una fracción del mismo. Preferiblemente también, el ligando comprende AGE modificado con carboximetil-lisina. Preferiblemente también, el ligando comprende β -amiloide. Preferiblemente también, el ligando comprende calgranulina. Preferiblemente también, el ligando comprende S-100b. Preferiblemente también, el ligando comprende anfoterina.

Preferiblemente, el compuesto de interés contiene un péptido. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene una imitación de péptido. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene un compuesto orgánico. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene un compuesto inorgánico. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene un lípido. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene un carbohidrato. Preferiblemente también, el compuesto de interés contiene un ácido nucleico.

La invención se relaciona con el uso de un ensayo de enlazamiento fisiológicamente relevante para descubrir compuestos identificados que modulan al RAGE. En un aspecto, la invención incluye compuestos identificados por medio de un método que tiene etapas que comprenden: (a) adsorber un ligando sobre una superficie sólida; (b) añadir un compuesto de interés y una proteína que comprende al RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma del ligando preadsorbido; (c) añadir un anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína de RAGE o a un fragmento de la misma; (d) determinar la cantidad de proteína de RAGE o un fragmento de la misma enlazada al ligando por medio de la medición de la cantidad de anticuerpo anti-RAGE enlazada a la superficie sólida; y (e) comparar la cantidad de proteína de RAGE o un fragmento de la misma enlazada al ligando en presencia de cantidades variables del compuesto de interés.

En una modalidad, el fragmento de RAGE es la porción extracelular soluble de RAGE (sRAGE), como se la define por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En otra modalidad, el fragmento de RAGE es el dominio V de RAGE, como se lo define por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En aún otra modalidad, el fragmento de RAGE es un fragmento del dominio V de RAGE, como se lo define por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella.

Preferiblemente, el método para identificación de los compuestos comprende además la medición de la habilidad del compuesto de interés para modular la habilidad de RAGE que comprende la SEQ ID NO: 1 o una proteína subs-

tancialmente homóloga a ella, para activar procesos celulares. Preferiblemente, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar síntomas de diabetes y síntomas de complicaciones diabéticas tardías. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar amiloidosis. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar la enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar cáncer. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar inflamación. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar una falla renal. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar nefritis por lupus sistémico o nefritis por lupus inflamatorio. Preferiblemente también, el compuesto identificado por medio de los métodos de la invención es usado para tratar disfunción eréctil.

El método de la invención suministra un protocolo flexible que se adapta a una variedad de reactivos sin reducción en la confiabilidad o en la precisión. Por lo tanto, se pueden utilizar una variedad de reactivos en desarrollo o preparaciones de anticuerpos. En un aspecto, la presente invención comprende un método para la detección de los moduladores de RAGE que comprende: (a) adsorber un ligando de RAGE sobre una superficie sólida; (b) añadir un compuesto de interés y una proteína que comprende al RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma del ligando preadsorbido; (c) añadir un anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína de RAGE o a un fragmento de la misma y un anticuerpo secundario que se enlaza al anticuerpo anti-RAGE; (d) medir el anticuerpo secundario enlazado al anticuerpo anti-RAGE; y (e) comparar la cantidad de RAGE o un fragmento del mismo enlazado al ligando en presencia de cantidades variables del compuesto de interés.

En una modalidad, el fragmento de RAGE es la porción extracelular soluble de RAGE (sRAGE), como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En otra modalidad, el fragmento de RAGE es el dominio V de RAGE, como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En aún otra modalidad, el fragmento de RAGE es un fragmento del dominio V de RAGE, como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella.

Preferiblemente, el método comprende medir la habilidad del compuesto de interés para modular la habilidad de RAGE, o proteína sustancialmente homóloga a ella, para activar procesos celulares. Más preferiblemente, los agonistas comprenden la estimulación de los procesos celulares activados por RAGE y los antagonistas comprenden la inhibición de los procesos celulares activados por RAGE. Aún más preferiblemente, los procesos celulares comprenden la activación de la transcripción génica por NF- κ B.

Preferiblemente, el método comprende además un ensayo colorimétrico para anticuerpo secundario. En una modalidad, al anticuerpo anti-RAGE y al anticuerpo secundario se les permite formar un complejo antes de ser añadidos al vaso de reacción que contiene RAGE, manteniendo así al dominio de enlazamiento de RAGE en un estado no enlazado al anticuerpo (esto es, no perturbado). En una modalidad, la superficie sólida comprende un vaso de reacción. En una modalidad, la superficie sólida comprende una varilla de medición.

En aún otro aspecto, la invención comprende un kit para la detección de los moduladores de RAGE que contiene: (a) una superficie sólida que comprende un ligando de RAGE; (b) una solución empacada por aparte que comprende una proteína que incluye RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma; (c) un sistema de detección que contiene al menos un agente que se enlaza específicamente al RAGE, o a un fragmento del mismo; (d) un sistema de detección que contiene al menos un agente que específicamente se enlaza al RAGE, o a un fragmento del mismo; (e) reactivos colorimétricos empacados separadamente para el sistema de detección; y (d) instrucciones para el uso. En una modalidad, el kit contiene un anticuerpo empacado en forma separada que se enlaza a RAGE, o a un fragmento del mismo. En una modalidad, el fragmento de RAGE es la porción extracelular soluble de RAGE (sRAGE), como la definida por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga a ella. En una modalidad, el fragmento de RAGE es el dominio V de RAGE, como se lo define por medio por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencias sustancialmente homóloga a ella. En aún otra modalidad, el fragmento de RAGE es un fragmento del dominio V de RAGE, como se define por medio de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, o de una secuencia sustancialmente homóloga a ella.

La presente invención comprende un método para la detección de moduladores de RAGE que utilizan un ligando y RAGE, o un fragmento de RAGE, que no han sido químicamente modificados. Por lo tanto, el método de la presente invención es capaz de medir el enlazamiento de ligandos y la modificación de tal enlazamiento, con especificidad fisiológica. El método es más confiable que los sistemas de ensayo que utilizan parejas radiomarcadas de enlazamiento y el altamente sensible debido al uso de un sistema de desarrollo acoplado a una enzima. Además, el ensayo emplea reactivos no tóxicos que no representan una amenaza para el personal de laboratorio o para el medio ambiente.

Por lo tanto, en un aspecto la invención comprende el uso de ensayos tipo ELISA como método para la detección de moduladores de RAGE. En una modalidad, y en relación ahora con la Figura 1, a un ligando de RAGE, tal como S-100b, se le permite ser adsorbido por los pozos de una placa de microtitulación. Los pozos son lavados luego utilizando suero fisiológico amortiguado para remover al ligando no enlazado, y los sitios que contienen sitios no específicos de enlazamiento de proteína se bloquean utilizando amortiguador de bloqueo que contiene albúmina de suero de bovino (BSA) u otra proteína no relacionada para el enlazamiento de RAGE. Se remueve entonces el amortiguador de bloqueo,

por ejemplo por medio de aspiración, y se lavan los pozos varias veces para remover las trazas del amortiguador de bloqueo. Se añade a cada pozo una solución que incluye al compuesto de interés (esto es, un modulador putativo de RAGE) y RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma. Por ejemplo, en una modalidad, el fragmento de RAGE utilizado es sRAGE (Taguchi y colaboradores, *Nature*, **405**:354-360 (1996)). La mezcla se incuba bajo condiciones que permitan el enlazamiento fisiológico de la proteína de RAGE (por ejemplo, sRAGE) al ligando inmovilizado en cada pozo.

Preferiblemente, durante la reacción de enlazamiento de sRAGE al ligando inmovilizado, se permite que se forme en un vaso de reacción separado un complejo que contiene: (a) anticuerpo anti-RAGE (anti-RAGE); (b) IgG biotinilado anti-ratón de cabra (B-anti-IgG), y (c) fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina (S-AP). Después de un tiempo adecuado para el enlazamiento de sRAGE al ligando inmovilizado, se lavan los pozos de reacción para remover las trazas de sRAGE no enlazado y al compuesto de interés, y al complejo anti-RAGE:B-anti-IgG:S-AP añadido a cada pozo. La adición del complejo permite la inmovilización de la enzima fosfatasa alcalina a través de la interacción del complejo con sRAGE inmovilizado en el pozo (Figura 1). Por medio de la adición del complejo inmune separadamente, se le permite al sRAGE enlazarse al ligando y al compuesto de interés (esto es, al modulador putativo) sin interferencia debida al enlazamiento del anticuerpo. La cantidad de fosfatasa alcalina, y por lo tanto la cantidad de sRAGE inmovilizado, se puede detectar entonces utilizando un ensayo colorimétrico para la conversión de para-nitrofenil fosfato (pNPP) a para-nitrofenol (pNP).

Como se lo utiliza aquí, RAGE abarca a un péptido que tiene la secuencia completa de aminoácidos de RAGE como la mostrada en la Figura 2A (SEQ ID NO: 1) o una porción de aquella secuencia de aminoácidos (Neeper y colaboradores, (1992)). El dominio de enlazamiento de RAGE comprende a la región de la proteína que es capaz de enlazar ligandos con especificidad fisiológica. Un fragmento de RAGE es de al menos 5 aminoácidos de longitud, pero más preferiblemente superior a 30 aminoácidos de longitud, pero es sustancialmente menor a la secuencia completa de aminoácidos. Por lo tanto, en otra modalidad, el fragmento de RAGE contiene sRAGE (SEQ ID NO: 2; Figura 2B), en donde sRAGE es la proteína de RAGE libre de la membrana celular (Park y colaboradores, *Nature Med.*, **4**:1025-1031 (1998)). En otra modalidad, el RAGE o el fragmento del mismo comprende al dominio V (SEQ ID NO: 3; Figura 2C) (Neeper y colaboradores, (1992); Schmidt y colaboradores, (1997)), o un fragmento del mismo (SEQ ID NO: 4; Figura 2D). En aún otra modalidad, el RAGE o un fragmento del mismo es un péptido sintético.

Los términos “sustancialmente homólogo” cuando se refieren a polipéptidos se refieren al menos a dos secuencias de aminoácidos que cuando se alinean en forma óptima, son al menos 75% homólogas, preferiblemente aproximadamente al menos 85% homólogas, más preferiblemente aproximadamente al menos 90% homólogas, y aún más preferiblemente 95% homólogas. La alineación óptima de secuencias para alinear una comparación puede ser realizada utilizando los algoritmos estándar en el arte (por ejemplo, Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* **2**:482 (1981); Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* **48**:443 (1970); Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **85**:2444 (1988)) o por medio de versiones computarizadas de estos algoritmos (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI).

Preferiblemente, la concentración del ligando utilizado para recubrir a la superficie sólida (esto es, pozos de reacción) permite cualquier antagonismo de enlazamiento del ligando inmovilizado para detectar a sRAGE. Por ejemplo, con referencia ahora a la Figura 3, donde sRAGE contiene 0,1 $\mu\text{g/ml}$, y el anticuerpo anti-RAGE contiene 3,0 $\mu\text{g/ml}$, se observa casi la máxima señal con 500 ng de S-100b, y las concentraciones de ligando entre 10 y 50 ng/pozo incluyen un incremento lineal en el enlazamiento de sRAGE.

Preferiblemente también, y con relación ahora a la Figura 4, el ensayo se diseña para permitir la selección de una cantidad de sRAGE que comprende una región lineal de enlazamiento de sRAGE y al ligando inmovilizado. Por ejemplo, si se emplea una concentración muy baja de sRAGE, la detección del enlazamiento será difícil debido a lo bajo de la señal. Si se utiliza un exceso de sRAGE, sin embargo, la habilidad del compuesto de interés para competir con el ligando inmovilizado se disminuirá debido al exceso de enlazamiento de RAGE tanto al ligando como al compuesto que está siendo analizado.

Preferiblemente también, el ensayo se diseña para permitir la optimización del anticuerpo anti-RAGE. Por lo tanto, en una modalidad, y con referencia ahora a la Figura 5, se puede determinar la concentración de la cantidad de anticuerpo utilizada para permitir una señal máxima, pero no tan alta como para incluir niveles altos de enlazamiento de fondo. Más preferiblemente, la cantidad de anticuerpo que permite una señal máxima contiene un rango similar de anticuerpo a pesar de la concentración del ligando inmovilizado.

Preferiblemente también, se optimiza el ensayo para ser independiente de los solventes requeridos para disolver a los compuestos que están siendo analizados. En una modalidad, y con referencia a la Figura 6, para concentraciones de dimetil sulfóxido (DMSO) del 2%, que es la concentración de DMSO generalmente empleada en el ensayo para la disolución de compuestos orgánicos de interés, el ensayo provee una señal máxima. Aún a concentraciones tan altas como 10% de DMSO, el ensayo provee casi una señal máxima.

Por lo tanto, el ensayo permite la optimización de cada componente, de tal manera que la variación en los resultados del ensayo resulta debida a factores ambientales y se minimiza la variación experimental. Preferiblemente, una vez optimizada para un ligando específico, la concentración de sRAGE, y la concentración de anticuerpo anti-sRAGE, el ensayo proveerá un evaluación confiable de la afinidad de enlazamiento de la muestra haciendo caso omiso del

compuesto competidor específico (esto es, el modulador putativo) que está siendo analizado. Preferiblemente también, el ensayo incluye un ensayo de alto rendimiento que es preciso y reproducible. Con referencia ahora a la Figura 7, en una modalidad el ensayo incluye una variación de menos del 10%.

5 Sin estar atado a ninguna teoría en particular, una premisa del ensayo es que el enlazamiento de sRAGE al ligando inmovilizado en el ensayo reflejará bien la naturaleza del enlazamiento de RAGE al ligando *in vivo*. Por lo tanto, n una modalidad, el ligando inmovilizado se enlazará a RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1, o a un fragmento del mismo, de una forma específica y saturable. Por ejemplo, y con referencia ahora a las Figuras 8-11, sRAGE en concentraciones en el rango aproximadamente entre 0,3 y 480 nM se enlaza en una forma saturable al ligando S-100b inmovilizado
10 en un pozo de microtitulación. Además, un análisis de los datos por medio de la transformación de Scatchard muestra tanto a los sitios de alta como de baja afinidad con constantes de disociación (Kd) similares a la Kd para RAGE anteriormente reportado (Hofmann y colaboradores, *Cell*, **97**:889-901 (1999); Hori y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **270**:25752-25761 (1995)).

15 Preferiblemente, el ensayo de la presente invención es capaz de detectar compuestos que antagonicen tanto a los sitios de enlazamiento de baja afinidad como a los de alta afinidad. Con referencia ahora a las Figuras 8 y 9, utilizando sRAGE en concentraciones en el rango entre 0,3 y 10 nM, se detecta un sitio de enlazamiento de alta afinidad que contiene un Kd aproximadamente de 2-6 nM. También, con referencia ahora a las Figuras 10 y 11, utilizando sRAGE en concentraciones en el rango entre 24 y 480 nM, y 5 a 80 nM respectivamente, se detecta un sitio de enlazamiento
20 de baja afinidad que contiene un Kd aproximadamente de 60 nM.

En una modalidad, el anticuerpo anti-RAGE es policlonal. Los anticuerpos policlonales son una población heterogénea de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con el antígeno de interés. Adyuvantes tales como el adyuvante de Freund (completo e incompleto), péptidos, emulsiones en aceite, lisolecitina,
25 polioles, polianiones y similares, pueden ser utilizados para incrementar la respuesta inmunológica. Por lo tanto, en una modalidad, se prepara un anticuerpo policlonal para sRAGE por medio de la inyección de sRAGE suplementado con un adyuvante en conejos, utilizando métodos conocidos en el arte (por ejemplo, Schmidt y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **267**:14987-14997 (1992)).

30 Los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un antígeno particular, y se obtienen generalmente por medio de cualquier técnica que provea la producción de anticuerpo por medio de líneas celulares continuas en cultivo (ver por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.873.313). Por ejemplo, en una modalidad se utiliza la proteína de RAGE para la producción de anticuerpos monoclonales utilizando métodos conocidos en el arte (Zymed Laboratorios, San Francisco, CA).

35 Nuevamente sin estar atado a ninguna teoría en particular, una premisa del ensayo es que uno de los componentes en el sistema de detección está marcado. Se contempla que el sistema de detección pueda utilizar reactivos que puedan ser observados visualmente, y que son definidos por lo tanto como "colorimétricos". Por ejemplo, en una modalidad, se utiliza un complejo anticuerpo anti-RAGE:IgG anti-humano biotinilado de cabra:fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina para detectar sRAGE enlazado al ligando. La enzima fosfatasa alcalina cataliza la conversión de para-nitrofenil fosfato amarillo pálido (pNPP) al producto color rosa para-nitrofenol. Está, sin embargo, dentro del alcance de la presente invención utilizar variaciones del sistema de detección que son conocidas por aquellos en el arte. Por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo secundario que se enlaza al anticuerpo anti-RAGE está marcado con estreptavidina y luego detectado con fosfatasa alcalina biotinilada. Otras fracciones para marcación incluyen fluoresceína,
40 digoxigenina, sal de 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato (6)] diamonio y similares. En otra modalidad, se emplea peroxidasa de rábano marcada con estreptavidina como sistema de detección. Alternativamente, en otra modalidad, se puede utilizar un tercer anticuerpo que contiene IgG biotinilado anticabra para detectar IgG no biotinilado antirratón. En aún otra modalidad, el anticuerpo anti-RAGE por si mismo puede ser biotinilado, y detectado utilizando fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina.

50 El ensayo puede ser llevado a cabo con el ligando inmovilizado a la superficie de un vaso de reacción o a otra superficie sólida. Por ejemplo, en una modalidad, el ligando se inmoviliza en un pozo de microtitulación. En otra modalidad, el ligando se inmoviliza sobre una varilla de medición. En este formato, el ensayo se puede realizar transfiriendo a la varilla de medición que contiene un ligando inmovilizado primero a una solución que contiene sRAGE y un compuesto de prueba (o muestra biológica), y luego a un reactivo para detectar el enlazamiento de sRAGE a la varilla de medición (por ejemplo, un complejo anticuerpo anti-sRAGE:IgG biotinilada:fosfatasa alcalina marcada con estreptavidina). Una reducción en la señal sobre la varilla de medición comparada con la de un control conocido indicaría que la muestra contiene un compuesto que se puede enlazar a RAGE. En una modalidad, el ensayo puede detectar una mayor cantidad de ligandos de RAGE en una muestra biológica. Preferiblemente, tales ligandos incluyen a los AGE, anfoterina (Hori y colaboradores, 1995), y β -amiloide (Yan y colaboradores, *Nature* **389**:589-595, (1997); Yan y colaboradores, *Nature* **382**:685-691 (1996); Yan y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**:5296-5301 (1997)). En otra modalidad, el ligando se inmoviliza sobre cuentas, una membrana de nylon, o cualquier otro soporte sólido.

65 Los métodos de la invención proveen ensayos de enlazamiento para identificar compuestos que interactúen con RAGE bajo condiciones fisiológicas de enlazamiento. En este sentido, las condiciones fisiológicas de enlazamiento comprenden aquellas condiciones que resultan en afinidades de enlazamiento similares a aquellas observadas *in vivo*. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención comprende a los compuestos identificados por medio de los métodos

de la invención. Los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención pueden contener varios tipos químicos diferentes. Por ejemplo, en una modalidad el compuesto es un péptido. En otra modalidad, el compuesto es una imitación de péptido. En otra modalidad, el compuesto es una molécula orgánica. En otra modalidad, el compuesto es una molécula inorgánica. En algunos casos, el compuesto de interés se puede derivatizar para incrementar la vida media.

Los compuestos de la presente invención pueden ser una imitación de péptido que es al menos parcialmente no natural. Preferiblemente el compuesto de interés puede ser modificado para incrementar la estabilidad, eficacia, potencia y biodisponibilidad. El compuesto puede ser preparado en forma sintética. El compuesto puede incluir aminoácidos L, D, o no naturales, aminoácidos alfa disustituidos, N-alquil aminoácidos, o ácido láctico. En una modalidad, el compuesto contiene una imitación de péptido que tiene una columna vertebral de péptido o un aminoácido reemplazado con una imitación adecuada.

Por ejemplo, como se muestra en la Figura 12, el Compuesto 1, cuya estructura se muestra en la Figura 13, inhibe el enlazamiento de sRAGE a S-100b con $IC_{50} = 1,8 \pm 0,2 \mu M$, en donde IC_{50} se define como la concentración del agente (esto es, el Compuesto 1) que comprende un 50% de inhibición del enlazamiento de sRAGE.

En una modalidad, los compuestos identificados por medio del ensayo de enlazamiento se prueban además por tener la habilidad de modular una actividad biológica de RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma. Por ejemplo, los compuestos pueden ser analizados por su habilidad para modular los incrementos inducidos por RAGE en la expresión génica. Por lo tanto, en una modalidad y con referencia ahora a la Figura 14, los compuestos identificados por medio de los análisis de enlazamiento son utilizados para modular la activación por medio de RAGE de la transcripción de un gen reportero mediada por NF- κ B. Preferiblemente, los compuestos que modulan el enlazamiento del ligando a RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma, serán identificados como moduladores de los efectos de RAGE sobre otros procesos celulares.

En una modalidad, la invención comprende el tratamiento de una enfermedad humana por medio de compuestos identificados por los métodos de la invención. Preferiblemente, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención se utilizan para tratar la diabetes. Se ha mostrado que la glicosilación no enzimática de macromoléculas que resulta en última instancia en la formación de productos finales con glicosilación avanzada (los AGE) se mejora en los sitios de inflamación, en falla renal, en la presencia de hiperglicemia y de otras condiciones asociadas con estrés oxidante sistémico o local (Dyer y colaboradores, *J. Clin. Invest.*, **91**:2463-2469 (1993); Reddy y colaboradores, *Biochem.*, **34**:10872-10878 (1995); Dyer y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **266**:11654-11660 (1991); Degenhardt y colaboradores, *Cell Mol. Biol.*, **44**:1139-1145 (1998)). La acumulación de los AGE en la vasculatura puede ocurrir focalmente, como en la unión amiloide compuesta de AGE- β_2 -microglobulina encontrada en pacientes con amiloidosis relacionada con diálisis (Miyata y colaboradores, *J. Clin. Invest.*, **92**:1243-1252 (1993); Miyata y colaboradores, *J. Clin. Invest.*, **98**:1088-1094 (1996)), o generalmente, como lo ejemplifican la vasculatura y los tejidos de pacientes con diabetes (Schmidt y colaboradores, *Nature Med.*, **1**:1002-1004 (1995)). La acumulación progresiva de los AGE con el tiempo en pacientes con diabetes sugiere que los mecanismos endógenos de aclaración no son capaces de funcionar efectivamente en sitios de deposición de AGE. Tales AGE acumulados tienen la capacidad de alterar las propiedades celulares por medio de un cierto número de mecanismos. Aunque RAGE se expresa a bajos niveles en tejidos normales y vasculatura, en un ambiente en donde se acumulan los ligandos del receptor, se ha mostrado que RAGE llega a favorecer la expresión (Li y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **272**:16498-16506 (1997); Li y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **273**:30870-30878 (1998); Tanaka y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **275**:25781-25790 (2000)). La expresión de RAGE se incrementa en el endotelio, en las células de músculo liso y en la infiltración de fagocitos mononucleares en vasculatura diabética. También, los estudios en cultivo celular han demostrado que la interacción AGE RAGE causó cambios en las propiedades importantes en homeostasis vascular.

Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar aterosclerosis. Por lo tanto, se ha mostrado que la enfermedad cardíaca isquémica es particularmente alta en pacientes con diabetes (Robertson, y colaboradores, *Lab Invest.*, **18**:538-551 (1968); Kannel y colaboradores, *J. Am. Med. Assoc.*, **241**:2035-2038 (1979); Kannel y colaboradores, *Diab. Care*, **2**:120-126 (1979)). Además, estudios han mostrado que la aterosclerosis en pacientes con diabetes es más acelerada y extensiva que en pacientes que no sufren de diabetes (ver por ejemplo, Waller y colaboradores, *Am. J. Med.*, **69**:498-506 (1980); Crall y colaboradores, *Am. J. Med.*, **64**:221-230 (1978); Hamby y colaboradores, *Chest*, **2**:251-257 (1976); y Pyorala y colaboradores, *Diab. Metab. Rev.*, **3**:463-524 (1978)). Aunque las razones para aterosclerosis acelerada en el establecimiento de la diabetes son muchas, se ha mostrado que la reducción de los AGE puede reducir la formación de placa.

Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar amiloidosis y la enfermedad de Alzheimer. Se ha mostrado que RAGE se enlaza al material fibrilar en lámina β haciendo caso omiso de la composición de las subunidades (péptido amiloide β , amilina, amiloide A sérico, péptido derivado del prión) (Yan y colaboradores, *Nature*, **382**:685-691 (1996); Yan y colaboradores, *Nat. Med.*, **6**:643-651 (2000)). Además, la deposición de amiloide ha mostrado que resulta en una expresión mejorada de RAGE. Por ejemplo, en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD), la expresión de RAGE se incrementa en las neuronas y en la glía (Yan, y colaboradores, *Nature* **382**:685-691 (1996)). Las consecuencias de la interacción del péptido β -amiloide (A β) con RAGE parecen ser muy diferentes sobre neuronas *versus* la microglía. Mientras que la microglía se activa como consecuencia de la interacción A β -RAGE, como se refleja por medio de la mayor motilidad y expresión de las citoquinas, la activación neuronal temprana mediada por RAGE es supercedida por la citotoxicidad

momentos después. Se muestra evidencia adicional del papel de RAGE en las interacciones celulares de A β por medio de la inhibición de la vasoconstricción cerebral inducida por A β y la transferencia del péptido a través de la barrera hematoencefálica hacia el parénquima cerebral cuando el receptor fue bloqueado (Kumar y colaboradores, *Neurosci. Program*, p141-#275.19 (2000)). Se ha mostrado que la inhibición de la interacción RAGE-amiloide desminuye la expresión de RAGE celular y los marcadores de estrés celular (así como la activación de NF-kB), y que disminuye la deposición de amiloide (Yan y colaboradores, *Nat. Med.*, **6**:643-651 (2000)) sugiriendo un papel para la interacción RAGE-amiloide tanto en la perturbación de las propiedades celulares en un ambiente enriquecido por amiloide (aún en etapas tempranas) así como en la acumulación de amiloide.

Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar cáncer. Por ejemplo, la anfoterina es una proteína de enlazamiento al ADN cromosomal sin histona del grupo I de alta movilidad (Rauvala y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **262**:16625-16635 (1987); Parkikinen y colaboradores, *J. Biol. Chem.* **268**:19726-19738 (1993)) que se ha mostrado que interactúa con RAGE. Se ha mostrado que la anfoterina promueve la excreción de neurita, así como sirviendo como superficie para el montaje de complejos de proteasa en el sistema fibrinolítico (también conocido por contribuir a la movilidad de la célula). Además, el efecto inhibitor del crecimiento tumoral local del RAGE bloqueador ha sido observado en un modelo de tumor primario (glioma C6), en el modelo de metástasis de pulmón de Lewis (Taguchi y colaboradores, *Nature* **405**:354-360 (2000)), y en los papilomas que surgen espontáneamente en ratones que expresan al transgén v-Haras (Leder y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**:9178-9182 (1990)).

Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar inflamación. Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar fallas renales. Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son utilizados para tratar nefritis por lupus sistémico o nefritis por lupus inflamatorio. Por ejemplo, se ha mostrado que S100/calgranulinas incluyen a una familia de polipéptidos para enlazamiento de calcio estrechamente relacionadas caracterizadas por medio de dos regiones manuales EF enlazadas por medio de un péptido de conexión (Schafer y colaboradores, *TIBS*, **21**:134-140 (1996); Zimmer y colaboradores, *Brain Res. Bull.*, **37**:417-429 (1995); Rammes y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **272**:9496-9502 (1997); Lugering y colaboradores, *Eur. J. Clin. Invest.*, **25**:659-664 (1995)). Aunque ellas carecen de péptidos de señal, se sabe desde hace tiempo que S 100/calgranulinas ganan acceso al espacio extracelular, especialmente en los sitios de respuestas inmune/inflamatoria crónicas, como en la fibrosis cística y la artritis reumatoide. RAGE es un receptor para muchos miembros de la familia de S100/calgranulina, mediando sus efectos proinflamatorios sobre células tales como linfocitos y fagocitos mononucleares. También, los estudios sobre la respuesta de hipersensibilidad del tipo retrasado, en modelos de colitis en ratones nulos en IL-10, artritis inducida por colágeno, y de encefalitis autoinmune experimental sugiere que la interacción ligando-RAGE (presumiblemente con S-100/calgranulinas) tiene un papel próximo en la cascada inflamatoria.

Preferiblemente también, los compuestos identificados por medio de los métodos de la invención son usados para tratar la disfunción eréctil. Relajación de las células de músculo liso en las arteriolas y senos cavernosos resulta en un mayor flujo de sangre dentro del pene, elevando la presión del cuerpo cavernoso para culminar en erección del pene. El óxido nítrico se considera el principal estimulador de la relajación cavernosa del músculo liso (Wingard y colaboradores, *Nature Medicine*, Enero; **7**(1):119-122 (2001)). La activación de RAGE produce oxidantes (Yan y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **269**:9889-9887, 1994) a través de una enzima del tipo NADH oxidasa, suprimiendo por lo tanto la circulación del óxido nítrico. Potencialmente por la inhibición de la activación de las rutas de señalización de RAGE por medio de la disminución de la producción intracelular de los AGE, se atenuará la generación de oxidantes. Los bloqueadores de RAGE pueden promover y facilitar la erección del pene por medio del bloqueo del acceso de los ligandos a RAGE. La ruta de la quinasa Ro para sensibilización del calcio puede jugar un papel sinérgico en la vasoconstricción cavernosa para mantener la flacidez del pene. El antagonismo de de la quinasa Ro resulta en una presión mayor en el cuerpo cavernoso, iniciando la respuesta eréctil independientemente del óxido nítrico (Wingard y colaboradores, 2001). Uno de los mecanismos de señalización activado por RAGE involucra a miembros de la familia de la quinasa Ro tales como a cdc42 y a rac (Huttunen y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **274**:19919-24 (1999)). Por lo tanto, la inhibición de la activación de las quinazas Ro a través de la supresión de las rutas de señalamiento de RAGE, mejorarán y estimularán la erección del pene independientemente del óxido nítrico.

En un aspecto, la presente invención también provee un método para la inhibición de la interacción de un AGE con RAGE en un individuo, que comprende la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto identificado por medio de los métodos de la invención. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que es capaz de prevenir la interacción de AGE/RAGE en un individuo. Por lo tanto, la cantidad variará con el individuo que está siendo tratado. La administración del compuesto puede ser por horas, diariamente, semanalmente, mensualmente, anualmente o un evento único. Preferiblemente, la cantidad efectiva del compuesto contiene aproximadamente desde 1 ng/kg de peso corporal aproximadamente hasta 100 mg/kg de peso corporal. Más preferiblemente, la cantidad efectiva del compuesto contiene aproximadamente desde 1 μ g/kg de peso corporal aproximadamente hasta 50 mg/kg de peso corporal. Aún más preferiblemente, la cantidad efectiva del compuesto contiene aproximadamente desde 10 μ g/kg de peso corporal aproximadamente hasta 10 mg/kg de peso corporal. La cantidad real efectiva se establecerá por medio de los ensayos de dosis/respuesta utilizando métodos estándar en el arte (Johnson y colaboradores, *Diabetes*. **42**: 1179, (1993)). Por lo tanto, como es conocido por aquellos capacitados en el arte, la cantidad efectiva dependerá de la biodisponibilidad, bioactividad, y biodegradabilidad del compuesto.

En una modalidad, el individuo es un animal. En una modalidad, el individuo es un humano. En una modalidad, el individuo sufre de una enfermedad relacionada con AGE, amiloidosis, falla renal, envejecimiento, o inflamación. En otra modalidad, el sujeto comprende a un individuo con enfermedad de Alzheimer. En una modalidad alternativa, el sujeto comprende a un individuo con cáncer. En aún otra modalidad, el sujeto comprende a un individuo con eritematosis por lupus sistémico, o nefritis por lupus inflamatorio.

En una modalidad, la administración del compuesto comprende una inyección dentro de la lesión, intraperitoneal, intramuscular, o intravenosa. En una modalidad, la administración del compuesto comprende la infusión o el suministro mediado por liposomas. En una modalidad, la administración del compuesto comprende aplicación tópica a la piel, cavidad nasal, membranas orales o tejido ocular.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden a cualquiera de los excipientes estándar farmacéuticamente aceptados conocidos en el arte. En una modalidad, el excipiente contiene un diluyente. En una modalidad, el excipiente contiene un liposoma, una microcápsula, una célula encapsulada en polímero, o un virus. Por ejemplo, en una modalidad, el excipiente farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica en la forma de una solución. En otra modalidad, el excipiente farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en la forma de un polvo o tableta. En una modalidad adicional, el excipiente farmacéutico es un gel o ungüento y la composición está en la forma de un supositorio, crema, o líquido. Por lo tanto, el término excipiente farmacéuticamente aceptable abarca, pero no se limita a, cualquiera de los excipientes estándar farmacéuticamente aceptables, tales como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua o emulsión de triglicéridos, diferentes tipos de agentes de humectación, tabletas, tabletas recubiertas y cápsulas.

Por ejemplo, las tabletas o las cápsulas pueden utilizar agentes de enlazamiento farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa, almidón); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato ácido de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, sílice o talco). Las preparaciones líquidas para administración oral pueden comprender jarabes o suspensiones preparadas por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, grasas hidrogenadas, jarabe de sorbitol), agentes emulsificantes (por ejemplo, lecitina), y preservantes. Las preparaciones pueden contener amortiguador, sales, y agentes saborizantes según sea conveniente. Los ejemplos adecuados de excipientes líquidos incluyen agua, alcoholes, y aceites que contienen aditivos como se describió anteriormente.

Cuando se los administra, los compuestos son a menudo rápidamente eliminados de la circulación. Por lo tanto, en una modalidad, los compuestos se modifican por medio de la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilén glicol (PEG), copolímeros de PEG y polipropilén glicol, polivinilpirrolidona o poliprolina, carboximetil celulosa, dextrano, polivinil alcohol, y similares. Tales modificaciones pueden incrementar también la solubilidad de los compuestos en solución acuosa, y reducir la inmunogenicidad del compuesto. Polímeros tales como PEG pueden estar unidos en forma covalente a uno o más residuos amino reactivos, residuos sulfhidrilo o residuos carboxilo. Se han descrito numerosas formas activadas de PEG, incluidos ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, particularmente aquellos en los cuales los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzeno-3 sulfona por la reacción con grupos amino, maleimido o derivados haloacetilo por reacción con grupos sulfhidrilo, y amino hidrazina o derivados de hidrazida por reacción con grupos carbohidrato.

Ejemplos

Las características y ventajas del concepto inventivo cubiertas por la presente invención se ilustran además en los ejemplos que vienen a continuación.

Ejemplo 1

50 *Protocolo del Ensayo ELISA*

Generalmente, el protocolo para la detección de los moduladores de RAGE es como sigue. El ligando del RAGE (por ejemplo, S-100b, β -amiloide, CML) se diluye hasta 5 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador A (amortiguador de fijación) ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 100 mM, pH 9,8) y se añaden 100 μl a los pozos de la placa de microtitulación y se les permite que se incuben durante la noche a 4°C para permitirle al ligando que se fije a la superficie de los pozos. Los pozos se lavan luego 3 veces con 400 μl /pozo con amortiguador C (amortiguador de lavado) (Imidazol 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), con un remojo durante 5 segundos en amortiguador C entre cada lavado. Se añade luego amortiguador B (amortiguador de bloqueo) (Imidazol 50 mM pH 7,2, BSA al 5%, CaCl_2 5 mM, MgCl_2 5 mM) a los pozos y se les permite incubarse durante 2 horas a 37°C para bloquear a los sitios de enlazamiento de no específicos de la proteína. Se aspira entonces el amortiguador de bloqueo de los pozos, y se lava 3 veces la placa (400 μl /pozo) con amortiguador C, con un remojo durante 5 segundos en amortiguador C entre cada lavada. El compuesto de interés, 25 μl disueltos en DMSO al 2% como FAC (Concentración Final del Ensayo) y sRAGE (75 μl) ($2,2 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC) son añadidos a cada pozo, e incubados durante 1 hora a 37°C. Mientras tanto, se añaden anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal para sRAGE (por ejemplo, $3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC, respectivamente), IgG antirratón biotinilado F(ab')₂ de cabra (por ejemplo, $8,0 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC) (Biosource International, Camarillo, CA (TAGO)), y estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml como FAC) (ZYMED, San Francisco, CA) a 5 ml de amortiguador D (amortiguador complejo) (Imidazol 50 mM, pH 7,2; BSA al 0,2%, CaCl_2 5 mM, MgCl_2 5 mM) en un tubo cónico de 15 ml y se permite incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

ES 2 271 028 T3

Se aspira entonces la solución que contiene sRAGE y al compuesto de interés de cada pozo, y después de 3 lavados con amortiguador para lavado, con un remojo durante 5 segundos entre cada lavado, se añade el complejo anti-sRAGE:IgG:estreptavidina-fosfatasa alcalina a cada pozo (100 μ l de complejo por pozo). Después de 1 hora a temperatura ambiente, se aspira la solución en cada pozo, y se lavan los pozos 3 veces, con 5 segundos de remojo entre cada lavada.

Se añade el sustrato para la fosfatasa alcalina, para-nitrofenil fosfato (pNPP) (1 mg/ml en dietanolamina 1 M, pH 9,8), y se permite el desarrollo de color durante 1 hora en la oscuridad. Después de la adición de 10 μ l de solución de detención por pozo (NaOH 0,5 N; metanol al 50%), se mide el OD₄₀₅.

Ejemplo 2

Optimización de las Condiciones del Ensayo

Los experimentos que detallan la aproximación para la aproximación utilizada para la optimización de las condiciones del ensayo se muestran en las Figuras 3-6. Por ejemplo, se muestra en la Figura 3 un experimento que muestra la optimización del ensayo para diferentes concentraciones de ligando. Por lo tanto, utilizando sRAGE en una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC y anticuerpo policlonal o monoclonal ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC respectivamente), se encontró que la señal máxima (1,06 OD) se logró cuando se utilizó S-100b en una concentración de 500 ng/pozo para recubrimiento, y que las concentraciones de ligando entre 10 a 500 ng/pozo contenían un incremento lineal en el enlazamiento de sRAGE.

Los experimentos que muestran la optimización del ensayo a diferentes concentraciones de sRAGE se muestran en la Figura 4. Utilizando 500 ng/pozo de S-100b para recubrir los pozos, anticuerpo anti-sRAGE policlonal o monoclonal ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC respectivamente), y sRAGE en el rango entre 2 y 10 nM como FAC, se observa una señal máxima aproximadamente con 10 nM de sRAGE (Figura 4).

Los experimentos que muestran la optimización del ensayo para diferentes concentraciones de anticuerpo se muestran en la Figura 5. Se recubrieron los pozos utilizando S-100b ya sea con 50, 500, 1.000 o 2.000 ng/pozo durante la noche como se indicó. Se añadió sRAGE 6 nM y después de 1 hora a 37°C, se añadió anticuerpo policlonal a sRAGE que contiene concentraciones finales en el rango desde $5,0 \times 10^{-2}$ hasta $5,5 \times 10^{-5}$ mg/ml. Se puede observar que hacienda caso omiso de la concentración de ligando usada para recubrir los pozos, se obtuvo una señal máxima con $5,4 \times 10^{-3}$ mg/ml de anticuerpo. Utilizando 500 ng/pozo de S-100b para recubrir los pozos, y sRAGE en $1,0 \times 10^{-4}$ mg/ml, se encontró la máxima señal con $1,4 \times 10^{-2}$ mg/ml de anticuerpo.

Un experimento que muestra la optimización del ensayo para diferentes concentraciones de DMSO se muestra en la Figura 6. Por lo tanto, utilizando sRAGE en una concentración de 6 nM como FAC y anticuerpo policlonal o monoclonal ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC, respectivamente), se encontró que la señal máxima se logró utilizando concentraciones de DMSO entre 0% y 2% como FAC.

Ejemplo 3

Exactitud y Precisión del Ensayo

En el experimento mostrado en la Figura 10, los pozos se recubrieron por medio de incubación con 500 ng/pozo de S-100b durante la noche, y después de lavar, se añadió sRAGE diluido en amortiguador D hasta las concentraciones finales mostradas. Se añadió entonces anticuerpo policlonal anti-sRAGE ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml como FAC), y después de 1 hora a 37°C, se lavaron y se desarrollaron las placas como se describe en el Ejemplo 1. Se encontró que sobre cuatro determinaciones separadas, la precisión del ajuste contenía un R² de 0,9383, con un valor de Kd con un intervalo de confianza del 60 y 95% de 41,2 hasta 78,6.

Se muestra una evaluación de la variabilidad de la señal en la Figura 7. En este experimento, se recubrieron 88 pozos por medio de incubación con 500 ng/pozo de S-100b durante la noche, y después del lavado, se añadió sRAGE diluido in amortiguador D a todos los pozos con una concentración final de $2,2 \times 10^4$ mg/ml. Se añadió luego anticuerpo policlonal anti-sRAGE ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml como FAC), y después de 1 hora a 37°C, se lavaron y se desarrollaron las placas como se describió en el Ejemplo 1. Se observó un OD₄₀₅ promedio de $0,705 \pm 0,054$ y un porcentaje de varianza del coeficiente de 7,7. Los datos indican que la variabilidad de la señal de pozo a pozo es menor al 10%.

Ejemplo 4

Detección de Baja y Alta Afinidad de Enlazamiento de los Ligandos a sRAGE

La utilidad del ensayo para detectar compuestos que antagonicen tanto con dominios de enlazamiento de RAGE de baja como de alta afinidad se muestra en las Figuras 8-11. En estos experimentos, se recubrieron los pozos con cantidades variables de S-100b (50-500 ng/pozo durante la noche) y se añadió sRAGE a cada pozo. La cantidad de sRAGE enlazado al ligando inmunizado se detectó utilizando anticuerpo anti-sRAGE policlonal o monoclonal ($3,0 \times 10^{-3}$ mg/ml y $1,9 \times 10^{-4}$ mg/ml como FAC, respectivamente) y el sistema de desarrollo como el descrito en el Ejemplo 1. Se hizo una linealización de las gráficas por medio de análisis de Scatchard y se determinaron los valores para Kd

y Bmáx. El análisis estadístico de la precisión experimental se determinó por medio de la utilización del programa GraghPad Prism versión 3 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

5 Tanto el enlazamiento de baja como de alta afinidad de sRAGE a S-100b se detectan utilizando el método de análisis de la invención. En los experimentos mostrados en las Figuras 8 y 9, se incubaron las placas durante la noche con S-100b a una concentración de 50 y 100 ng/pozo, respectivamente. Después del lavado, se añadió sRAGE a cada pozo que contenía una concentración final aproximadamente en el rango entre 0,3 hasta 10 nM, y después de 1 hora a 37°C, se midió sRAGE enlazado por medio de la adición de complejo anticuerpo policlonal. Para ambos experimentos, se detecta un componente de enlazamiento de alta afinidad que contenía un Kd aproximadamente de 6 nM (Figura 8) a 2 nM (Figura 9).

15 En los experimentos mostrados en las Figuras 10 y 11, se incubaron las placas durante la noche con S-100b a una concentración de 500 y 100 ng/pozo, respectivamente. Después del lavado, se añadió sRAGE a cada pozo que contenía una concentración final aproximadamente en el rango entre 23 y 470, o 5 y 76 nM, respectivamente, y después de 1 hora a 37°C, se midió el sRAGE enlazado por medio de la adición del complejo anticuerpo policlonal de sRAGE (anti-sRAGE:IgG:estreptavidina-fosfatasa alcalina) y los reactivos de detección. Para ambos experimentos, se detectó un sitio de enlazamiento de baja afinidad, que tiene un Kd aproximadamente de 60 nM.

Ejemplo 5

20 *Inhibición del Enlazamiento de sRAGE por medio de Moduladores*

La interacción de los AGE con RAGE genera estrés oxidativo intracelular (Yan, y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **269**:9889-9897 (1994)) resultando en la activación del factor de transcripción NF-κB sensible a radicales libres y en la activación de los genes regulados por NF-κB (Yan, y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **269**:9889-9897 (1994); Wautier, y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**:7742-7746 (1994)). Ya que la transcripción de RAGE es también regulada por medio de la interacción en dos sitios diferentes de enlazamiento de NF-κB en la secuencia promotora de RAGE (Li, y colaboradores, *J. Biol. Chem.*, **272**:16498-16506 (1997)), se alimenta una espiral nociva ascendente por medio de este bucle de retroalimentación positiva. Se utilizó una célula secundaria con base en el análisis funcional para evaluar a las pequeñas moléculas que modulan el enlazamiento de sRAGE a un ligando inmovilizado. Se introdujo el gen pNF-κB-Luc dentro de una línea celular de glioma C6 que expresa altos niveles de RAGE (ver por ejemplo, Huttunen y colaboradores, *J Biol Chem.*, **274**:19919-24 (1999)) por medio de transfección utilizando técnicas estándar. El pNF-κB-Luc reportero se diseña de tal manera que por activación de NF-κB, se expresa el gen de la luciferasa. Se cuantifica entonces la actividad de la luciferasa por medio de la medición de la luminiscencia con un luminómetro. Generalmente, la expresión del gen de la luciferasa es baja. Sin embargo, por medio de la introducción de un ligando de RAGE, RAGE activa a NF-κB, resultando en un incremento en la expresión de la luciferasa. Por lo tanto, el ensayo mide la habilidad de un compuesto para modular la actividad de la luciferasa inducida por RAGE. Si el modulador contiene a un agonista, el compuesto induce la activación de la transcripción de NF-κB, y se incrementa la actividad de la luciferasa. Si el modulador es un antagonista, el compuesto inhibe la habilidad de los agonistas de RAGE para inducir la activación de la transcripción de NF-κB, y se incrementa la actividad de la luciferasa.

45 En el experimento mostrado en la Figura 14, la inhibición de la interacción de S-100b/RAGE en las células de glioma C6 por medio del Compuesto 1 (Figura 13) tenía un IC₅₀ de 3,3 μM. Por lo tanto, el ensayo basado en las células mostrado en la Figura 14 mostró una buena correlación con el valor de IC₅₀ de enlazamiento por ELISA para la inhibición del enlazamiento de sRAGE por el Compuesto 1 de 1,8 μM (Figura 12).

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección de moduladores de RAGE (Receptor para Productos Finales con Glicación Avanzada) que comprende:
- 10 a) adsorber un ligando de RAGE sobre una superficie sólida;
 - b) adicionar al ligando preadsorbido un compuesto de interés y una proteína que comprende RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma;
 - 15 c) adicionar anticuerpo anti-RAGE que se enlaza a la proteína de RAGE o a un fragmento de la misma;
 - d) determinar la cantidad de proteína de RAGE o un fragmento de la misma enlazada al ligando, por medio de la medición de la cantidad de anticuerpo anti-RAGE enlazado a la superficie sólida; y
 - e) comparar la cantidad de proteína de RAGE o un fragmento de la misma enlazada al ligando en presencia de diferentes cantidades del compuesto de interés.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo para la proteína de RAGE, o un fragmento de la misma, contiene un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
3. El método de la reivindicación 1, en cuya etapa c) incluye la adición de un segundo anticuerpo que reconoce al anticuerpo anti-RAGE y la etapa d) comprende determinar la cantidad de proteína de RAGE o un fragmento de la misma enlazada al ligando por medio de la medición del anticuerpo secundario enlazado al anticuerpo anti-RAGE.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en donde al anticuerpo anti-RAGE y al anticuerpo secundario se les permite que formen un complejo antes de ser añadidos.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en donde el fragmento de RAGE contiene
- sRAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, o el dominio V de RAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, o
- 35 un fragmento el dominio V de RAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma.
- 40 6. El método de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la medición de la habilidad del compuesto de interés para modular la habilidad de RAGE que contiene la SEQ ID NO: 1 o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, para activar procesos celulares.
- 45 7. El método de la reivindicación 5, en donde el proceso celular comprende la activación de la transcripción del gen de NF- κ B.
8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un análisis colorimétrico para el anticuerpo secundario.
- 50 9. El método de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la superficie sólida comprende un pozo de microtitulación o una varilla de medición.
10. El método de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el ligando comprende un producto final con glicación avanzada, o un fragmento del mismo, un AGE modificado con carboximetil-lisina, β -amiloide, calgranulina, S 100b, o anfoterina.
- 55 11. El método de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el compuesto de interés comprende un péptido sintético, una imitación de péptido, un compuesto orgánico, un compuesto inorgánico, un lípido, un carbohidrato, un ácido nucleico.
12. Un kit para la detección de los moduladores de RAGE que comprende:
- 60 a) una superficie sólida que comprende un ligando de RAGE;
 - b) una solución empacada en forma separada que contiene una proteína que incluye RAGE que comprende ala SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma;
 - 65 c) un sistema de detección empacado en forma separada que comprende al menos un agente que se enlaza específicamente a RAGE o a un fragmento del mismo;

ES 2 271 028 T3

d) reactivos empacados en forma separada para el sistema de detección; e

e) instrucciones de uso.

5 13. El kit de la reivindicación 12, en donde el sistema de detección comprende un anticuerpo empacado en forma separada que se enlaza a RAGE, o a un fragmento del mismo.

14. El kit de la reivindicación 12, en donde el fragmento de RAGE comprende

10 sRAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma, o el dominio V de RAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma, o

15 un fragmento el dominio V de RAGE como el definido por medio de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o una secuencia sustancialmente homóloga de la misma.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

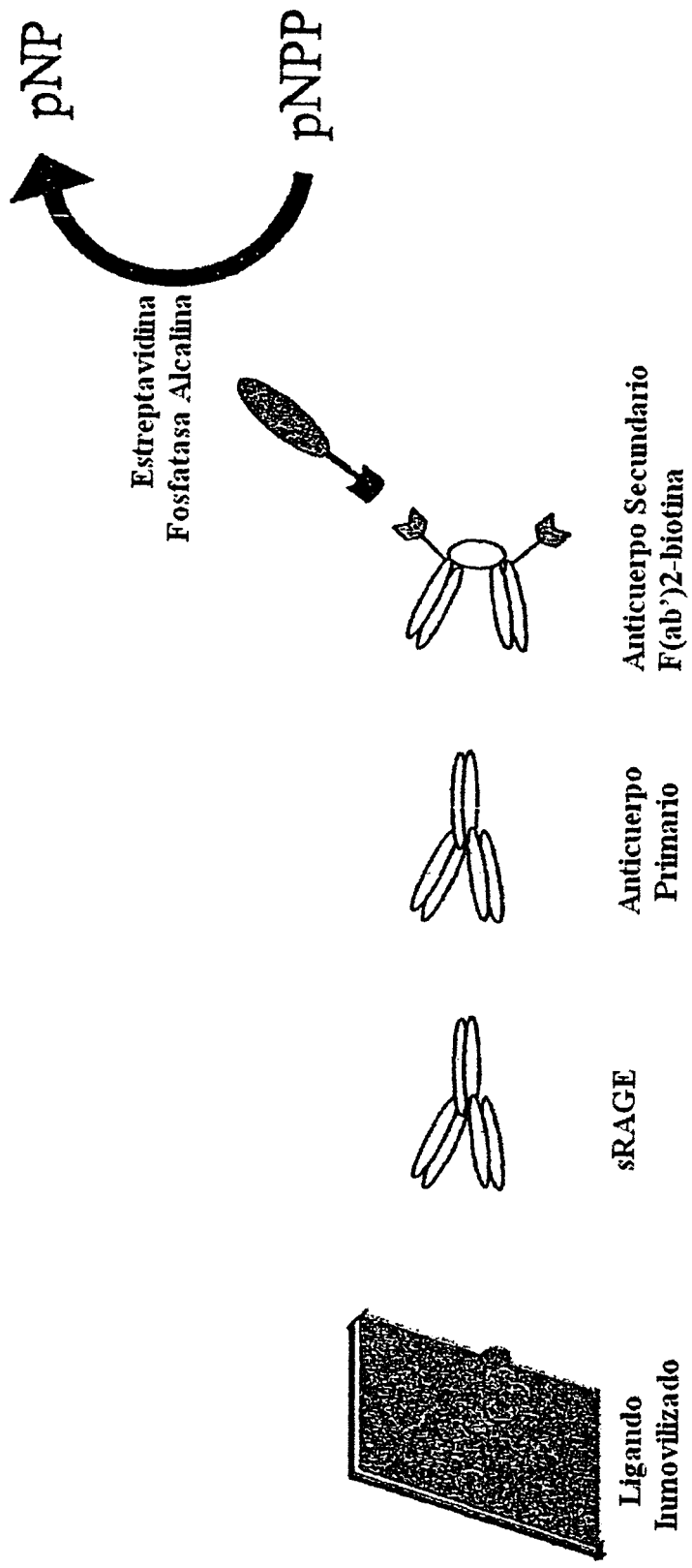


FIG. 1

ES 2 271 028 T3

A.

M91211: SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 1)

GAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVKCKGAPKK
PPQRLEWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPWDSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAM
NRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELTAGVPNKVGTVCVSEGSYPAGTLSWHLD
GKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPEGLFTLQSELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPRHR
ALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGGTVTLTCEVPAQPSPQIHWMKDGV
PLPLPPSPVLILPEIGPQDQGTYSVATHSSHGPPQESRAVSISIIPEGGPTAGSVG
GSGLGTLALALGILGGLGTAALLIGVILWQRRQRRGEERKAPENQEEEEERAELNQSE
EPEAGESSTGGP

B.

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE sRAGE HUMANO (SEQ ID NO: 2)

GAAGTAVGAWVLVLSLWGAVVGAQNITARIGEPLVKCKGAPKKPPQRLEWKLNTGRTEAWKV
LSPQGGGPWDSVARVLPNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMNRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIV
DSASELTAGVPNKVGTVCVSEGSYPAGTLSWHLDGKPLVPNEKGVSVKEQTRRHPEGLFTLQS
ELMVTPARGGDPRTFSCSFSPGLPRHRALRTAPIQPRVWEPVPLEEVQLVVEPEGGAVAPGG
TVTLTCEVPAQPSPQIHWMKDGVPLPLPPSPVLILPEIGPQDQGTYSVATHSSHGPPQESRAVSI
SIIPEGGPTAGSVGGGSLG

FIG. 2

C.

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 3)

AQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWKLNTGRTEAWKVLSPQGGGPWDSVARVL

PNGSLFLPAVGIQDEGIFRCQAMNRNGKETKSNYRVRVYQIPGKPEIVDSASELT

D.

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL FRAGMENTO DEL DOMINIO V DE RAGE HUMANO (SEQ ID NO: 3)

AQNITARIGEPLVLKCKGAPKKPPQRLEWK

FIG. 2A

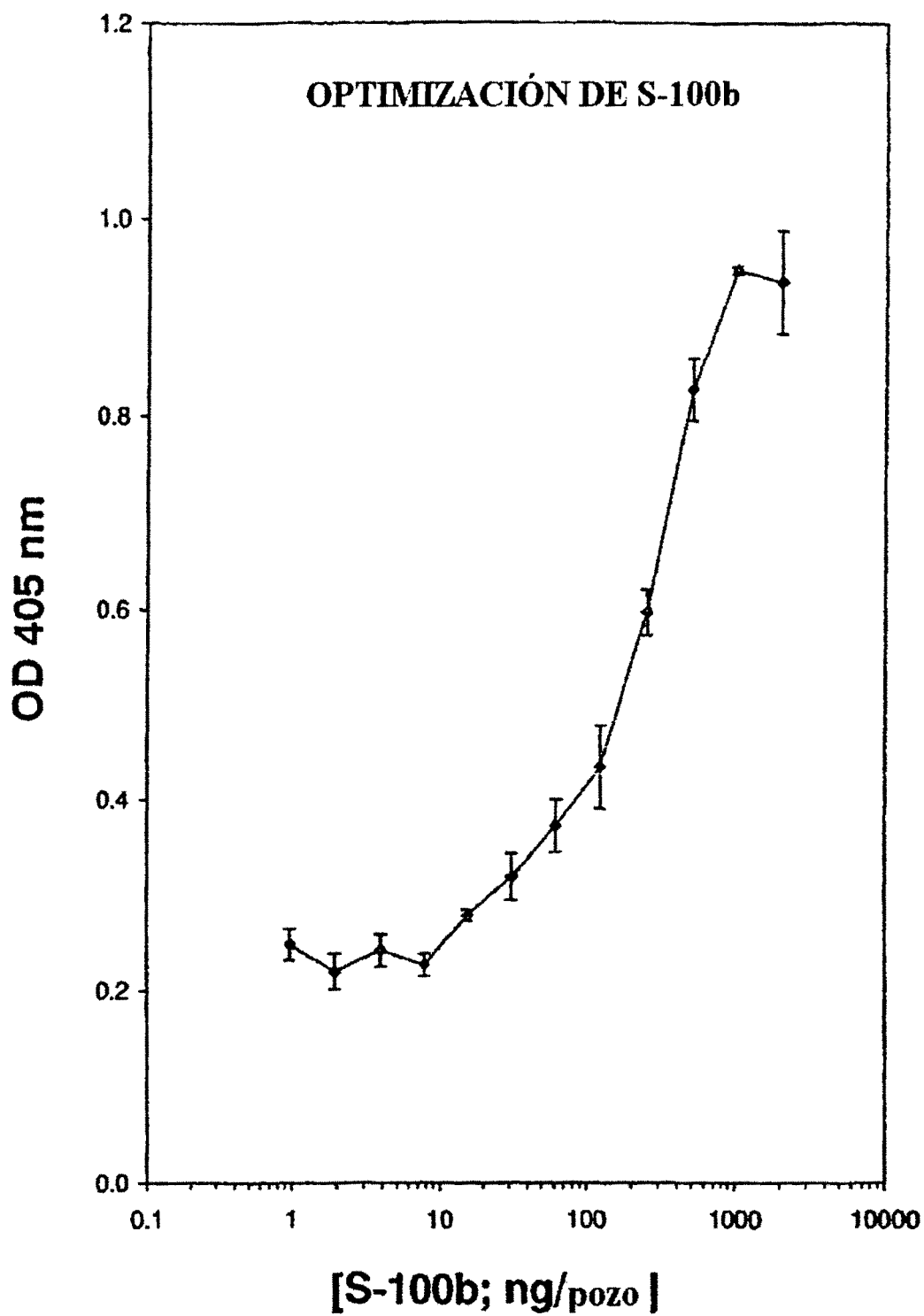


FIG. 3

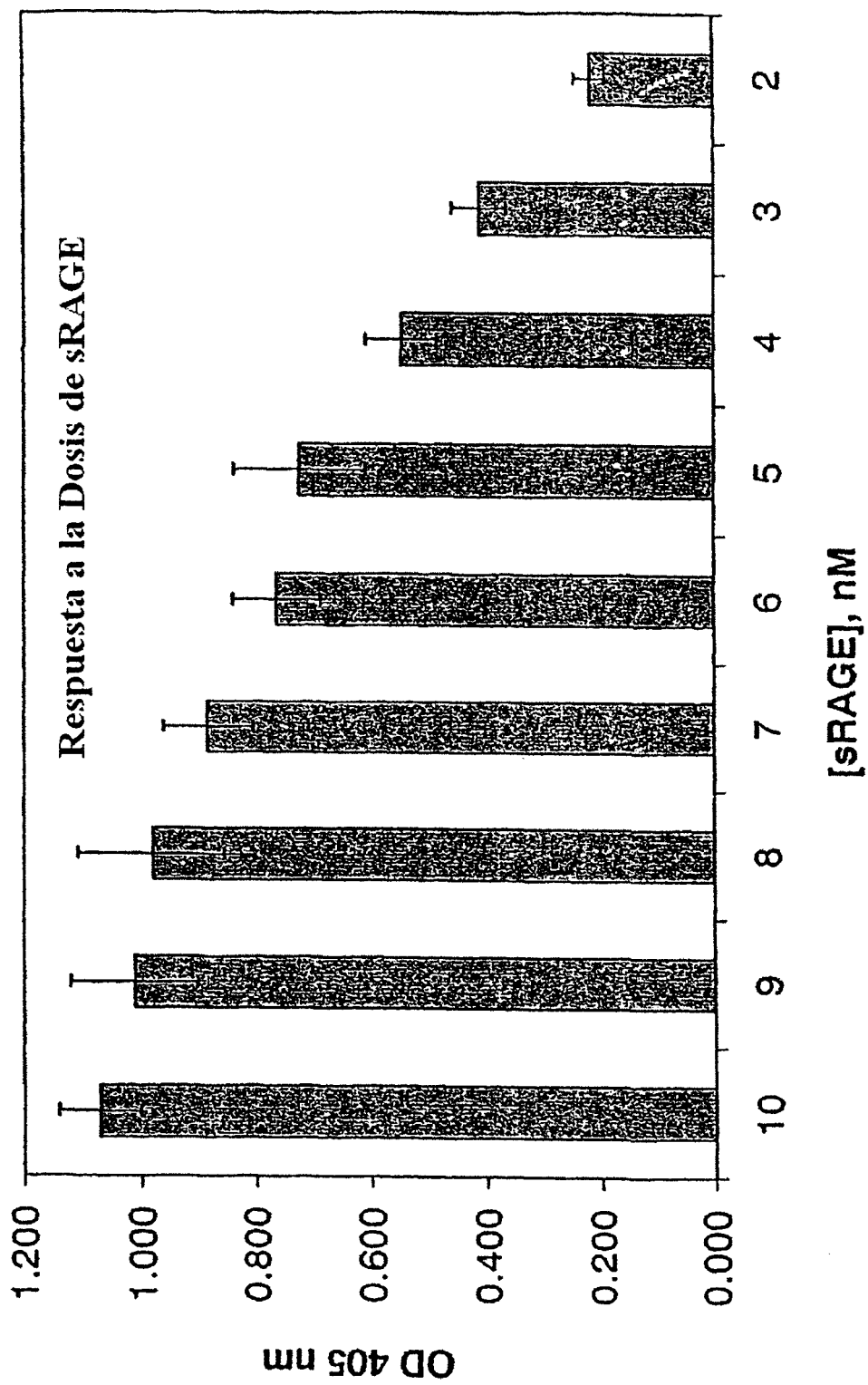


FIG. 4

Optimización de Ab

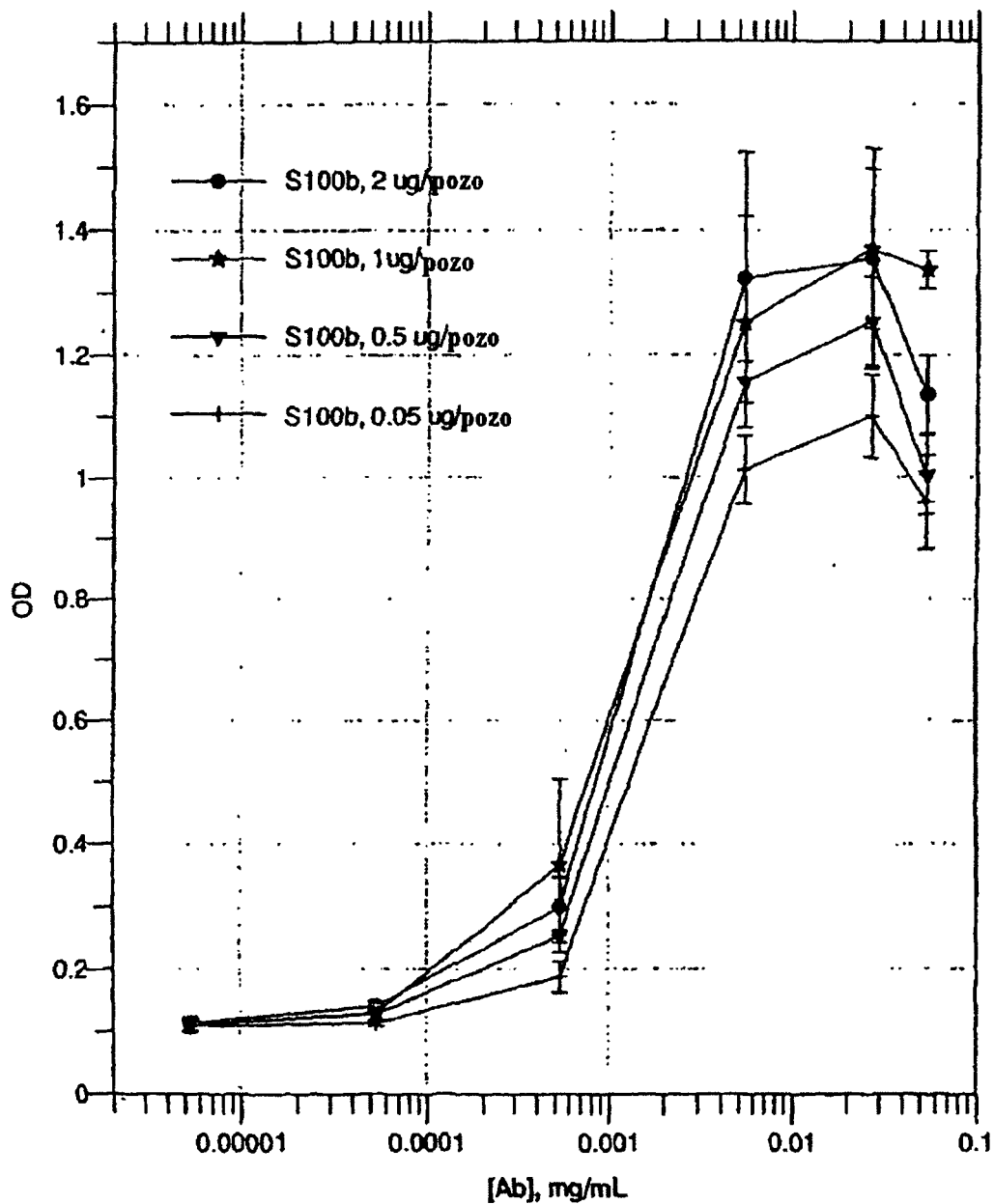


FIG. 5

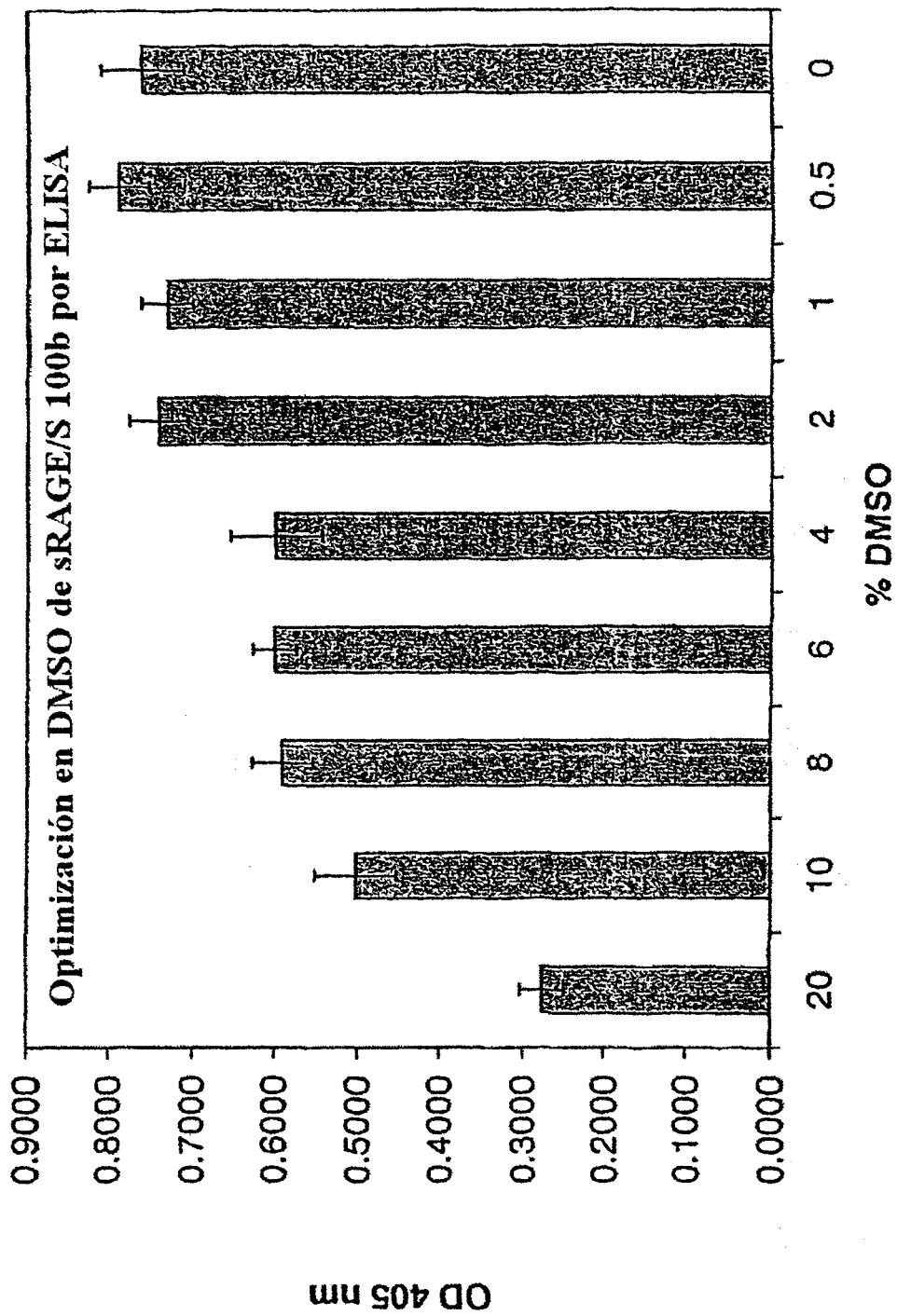
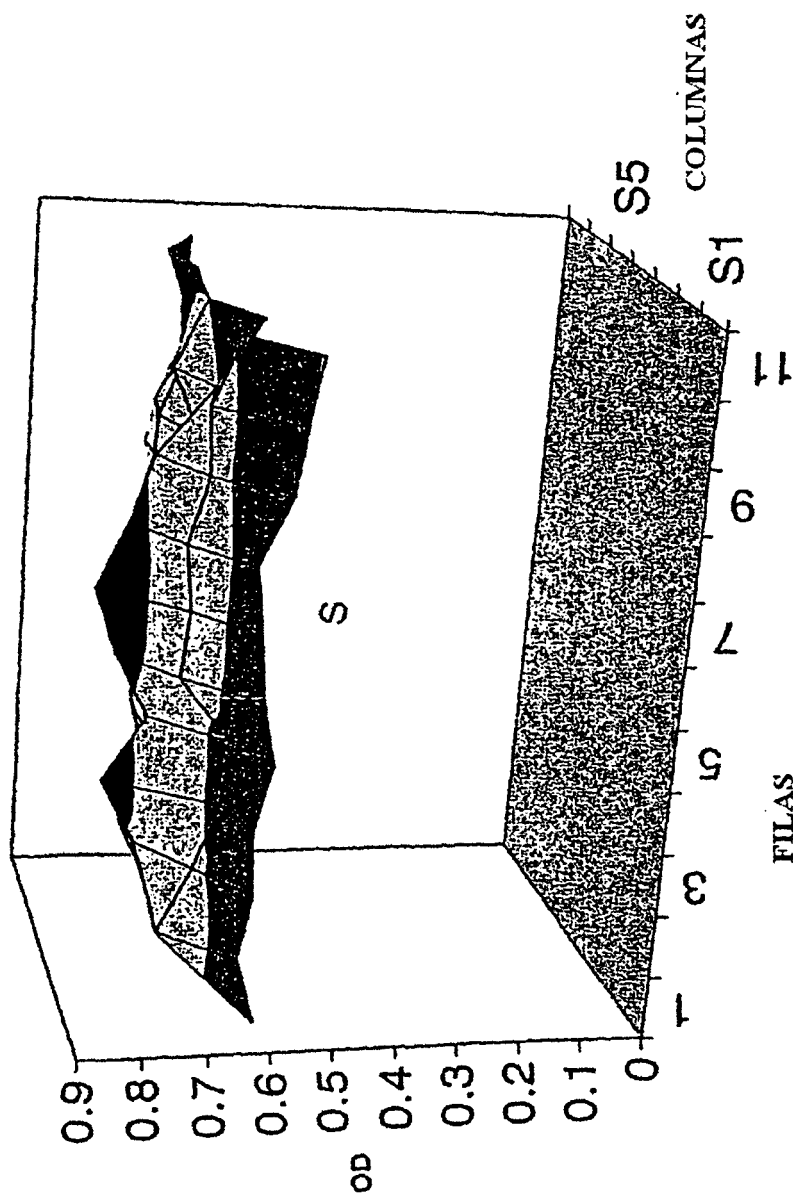


FIG. 6

Variabilidad de la Señal de sRAGE/S100b por ELISA
OD Promedio = 0,705, Desviación Estándar = 0,054



FILAS FIG. 7

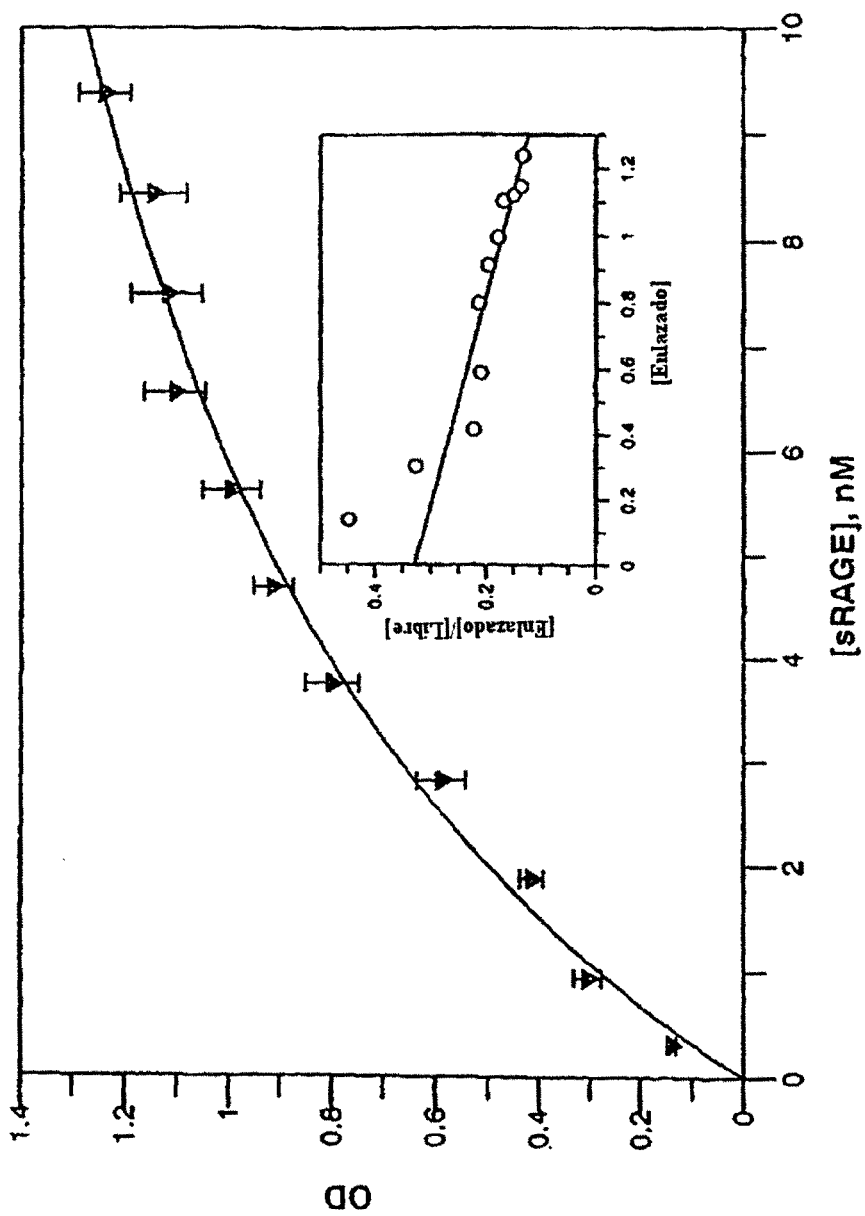


FIG. 8

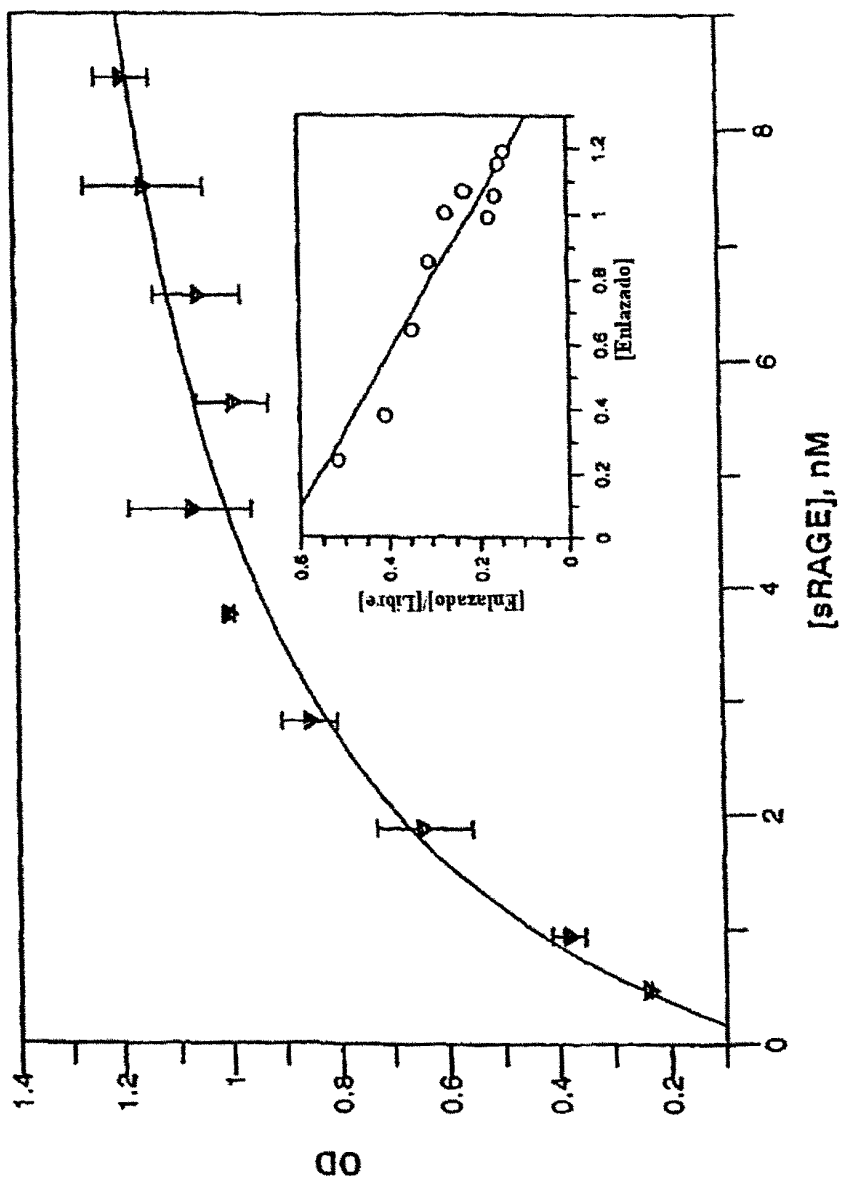


FIG. 9

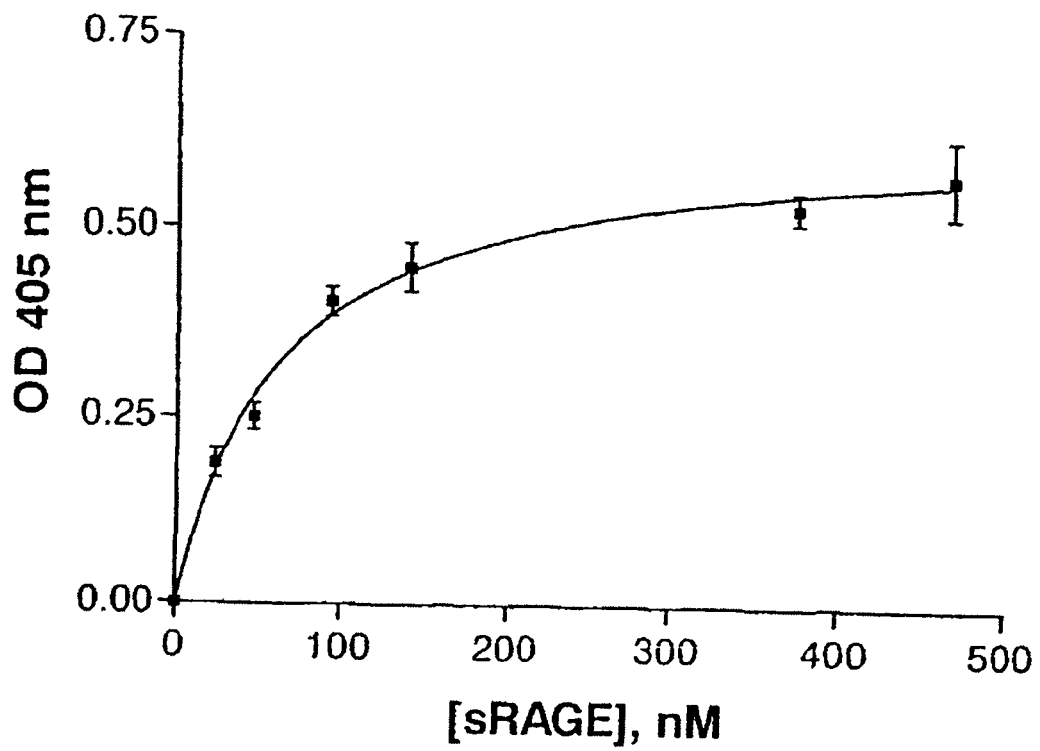


FIG. 10

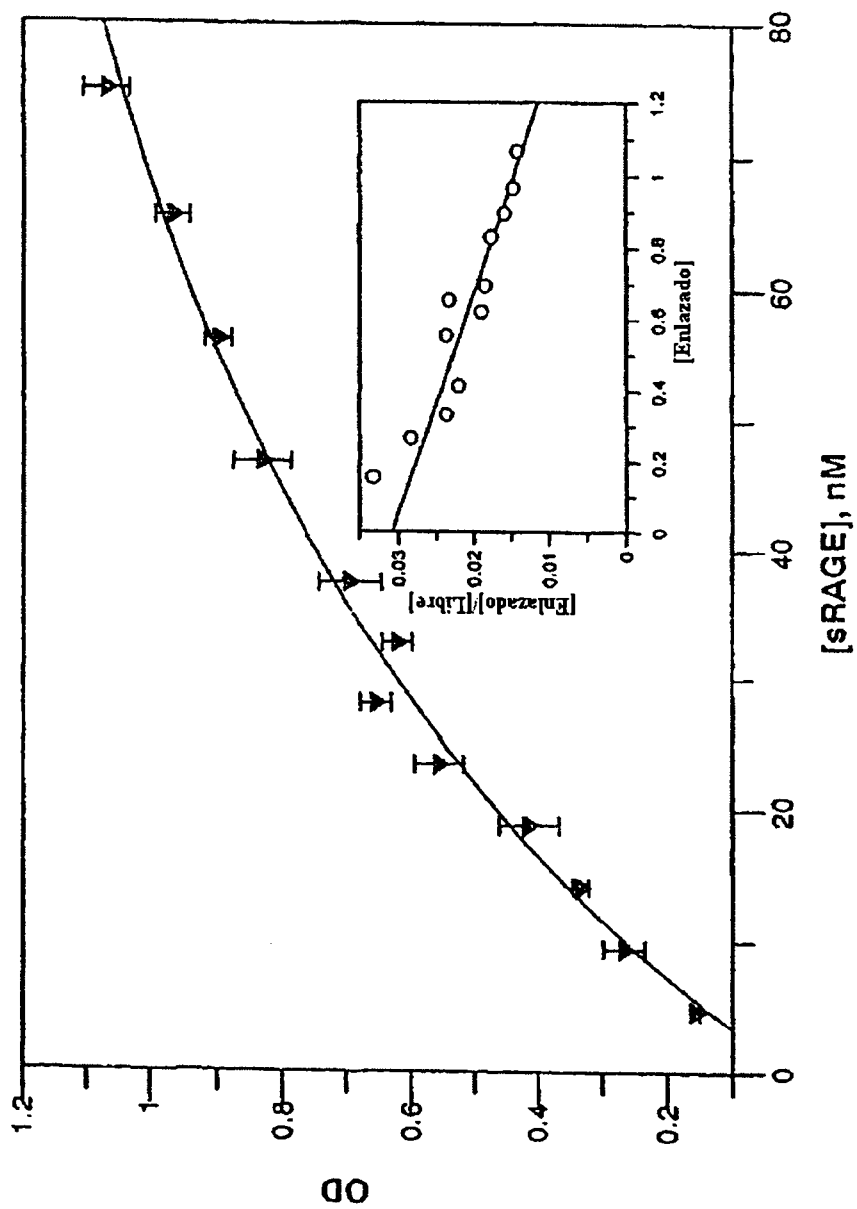


FIG. 11

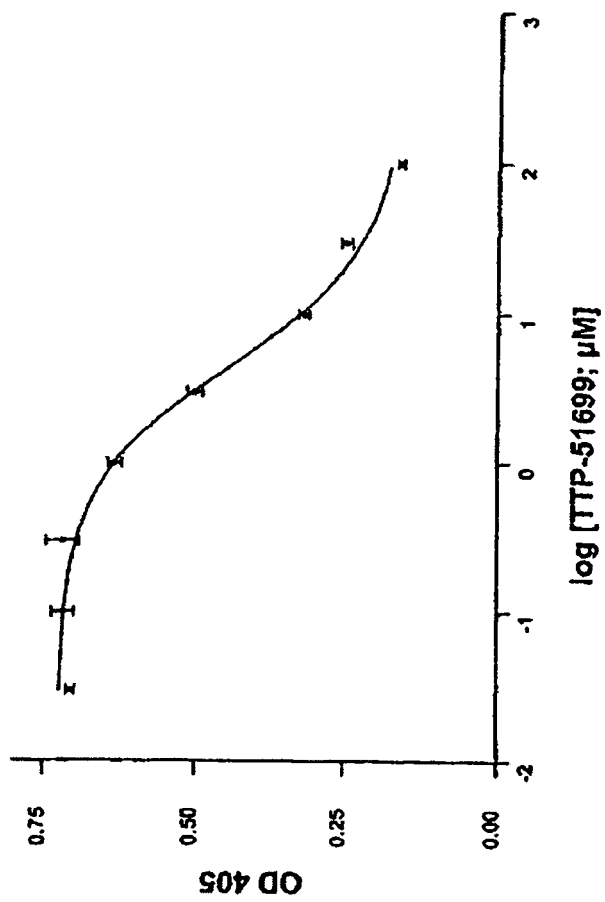


FIG. 12

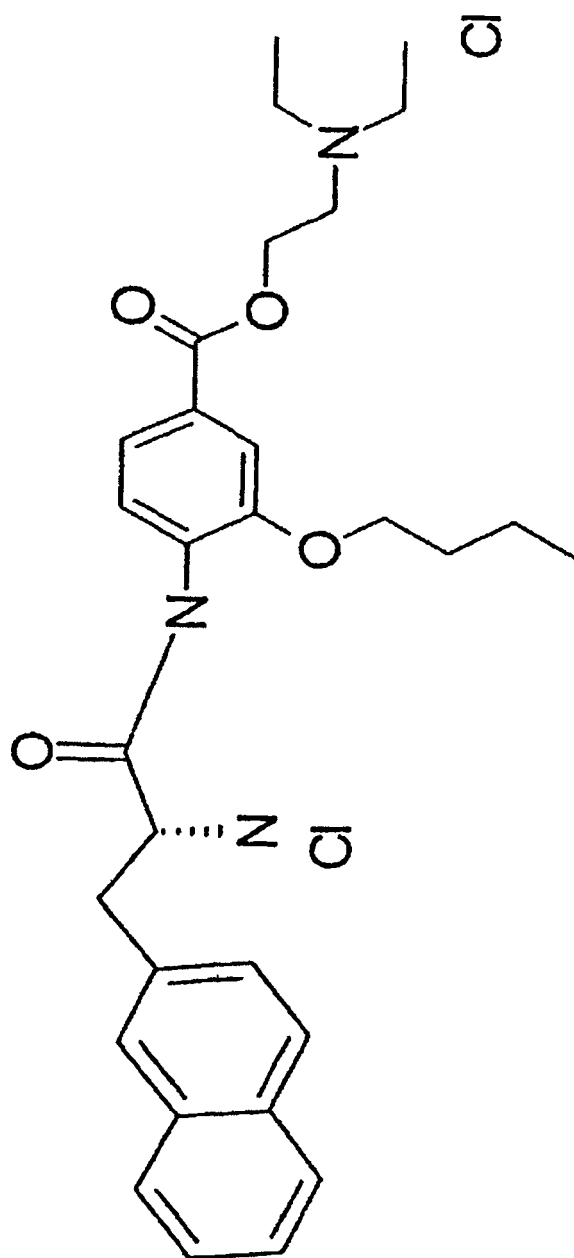


FIG. 13

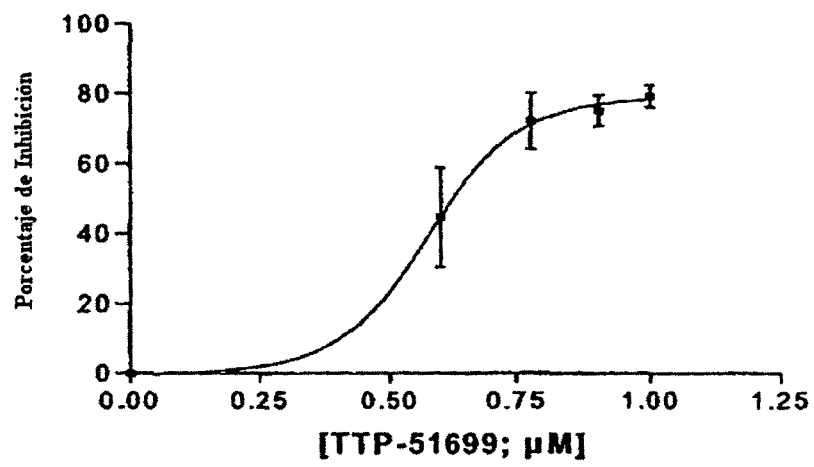


FIG. 14

ES 2 271 028 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Shahbaz, Manouchehr
5 <120> Métodos para Identificar Compuestos que Modulan al RAGE
<130> 41305/252460
<140> US 09/799.152
<141> 2001-03-05
10 <150> 60/207.342
<151> 2000-05-30
<160> 4
<170> PatentIn versión 3.0
15 <210> 1
<211> 404
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*
<400> 1

25 Gly Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
 20 25 30
30 Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
 35 40 45
35 Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
 50 55 60

40

45

50

55

60

65

ES 2 271 028 T3

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
 65 70 75 80
 5 Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile
 85 90 95
 Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn
 100 105 110
 10 Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp
 115 120 125
 Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys
 130 135 140
 15 Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp
 145 150 155 160
 20 Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln
 165 170 175
 Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu
 180 185 190
 25 Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys
 195 200 205
 Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220
 30 Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240
 35 Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255
 40 Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270
 Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285
 45 Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300
 His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320
 Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335
 55 Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly
 340 345 350
 Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg
 355 360 365
 60 Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu
 65

ES 2 271 028 T3

	370					375						380				
5	Arg	Ala	Glu	Leu	Asn	Gln	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu	Ala	Gly	Glu	Ser	Ser
	385					390					395					400
	Thr	Gly	Gly	Pro												
10	<210>	1														
	<211>	339														
	<212>	PRT														
	<213>	<i>Homo sapiens</i>														
15	<400>	2														
	Gly	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Leu
20	1				5					10					15	
	Trp	Gly	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Ile	Thr	Ala	Arg	Ile	Gly	Glu
			20						25					30		
25	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Cys	Lys	Gly	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg
			35					40					45			
	Leu	Glu	Trp	Lys	Leu	Asn	Thr	Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Val	Leu
30		50					55					60				
	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro
	65					70					75					80
35	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile
					85					90					95	
	Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn
40			100						105					110		
	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp
			115					120					125			
45	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys
		130					135					140				
	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp
50		145				150					155					160
	Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln
				165						170					175	
55	Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu
				180					185					190		
60	Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys
			195					200					205			

65

ES 2 271 028 T3

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro
 210 215 220
 5 Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu
 225 230 235 240
 10 Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr
 245 250 255
 15 Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met
 260 265 270
 20 Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu
 275 280 285
 25 Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr
 290 295 300
 30 His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile
 305 310 315 320
 35 Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser
 325 330 335
 Gly Leu Gly

<210> 3

<211> 112

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

40 Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
 1 5 10 15
 45 Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys Leu Asn
 20 25 30
 50 Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu Ser Pro Gln Gly Gly Gly
 35 40 45
 55 Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Ser Leu Phe Leu
 50 55 60
 60 Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile Phe Arg Cys Gln Ala Met
 65 70 75 80
 65 Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn Tyr Arg Val Arg Val Tyr
 85 90 95
 70 Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Glu Leu Thr
 100 105 110

<210> 4

<211> 30

ES 2 271 028 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5 Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu Pro Leu Val Leu Lys Cys
1 5 10 15
Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg Leu Glu Trp Lys
20 25 30
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65