

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 283 463**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)**C12N 15/85** (2006.01)**C12N 5/10** (2006.01)**C07K 14/00** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**C07K 16/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01995259 .7**(86) Fecha de presentación : **27.11.2001**(87) Número de publicación de la solicitud: **1346041**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**(54) Título: **Agentes terapéuticos y métodos de uso de los mismos para tratar una enfermedad amiloidogénica.**(30) Prioridad: **27.11.2000 US 253302 P
29.11.2000 US 250198 P
20.12.2000 US 257186 P**(73) Titular/es: **Praecis Pharmaceuticals Incorporated
830 Winter Street
Waltham, Massachusetts 02451, US**(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007(72) Inventor/es: **Gefter, Malcolm, L.;
Israel, David, I.;
Joyal, John, L. y
Gosselin, Michael**(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Agentes terapéuticos y métodos de uso de los mismos para tratar una enfermedad amiloidogénica.

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/253,302 presentada en noviembre 27, 2000; Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/250,198 presentada en noviembre 29, 2000; y Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/257,186 presentada en diciembre 20, 2000, cuyos contenidos de cada una se incorporan aquí como referencia.

Antecedentes de la invención

Los fagocitos mononucleares están cercanamente asociados con enfermedades del sistema nervioso central. La microglia encontrada en el cerebro adulto normal son células quiescentes altamente ramificadas que retraen los procesos y los vuelven reactivos durante el daño al SNC (Rio-Hortega (1932). La microglia reactiva (fagocitos mononucleares activados del cerebro) se ha identificado con las placas neuríticas de la Enfermedad de Alzheimer (AD) (Bolsi, 1927; McGeer *et al.*, 1987; Rogers *et al.*, 1988; Giulian, 1992; Perlmutter *et al.*, 1992; Giulian *et al.*, 1995a). Como resultado, el daño neuronal inducido por el beta amiloide ($A\beta$) se cree que involucra células inflamatorias. En la Enfermedad de Alzheimer, la histopatología cuantitativa ha determinado que >80% de las placas de núcleo están asociadas con grupos de microglia reactivos aunque inferiores al 2% de los depósitos $A\beta$ difusos muestran tal asociación (Giulian *et al.*, 1995a). Estas observaciones sugieren que las respuestas inflamatorias del cerebro pueden estar específicamente dirigidas contra los constituyentes de las placas neuríticas de núcleo. Como las células causadoras inmunes principales del cerebro, la microglia activada es capaz de liberar tales agentes citotóxicos como enzimas proteolíticas, citoquinas, proteínas de complemento, intermedios reactivos de oxígeno, toxinas similares a NMDA, y óxido nítrico (Thery *et al.*, 1991; Giulian, 1992; Rogers *et al.*, 1992; Lees, 1993, Banati, R.B., 1993).

La enfermedad de Alzheimer (AD por sus siglas en inglés), descrita primero por el psiquiatra Bávaro Alois Alzheimer en 1907, es un desorden neurológico progresivo que inicia con pérdida de memoria de corto plazo y continua con desorientación, daño del juicio y el razonamiento y, finalmente la demencia. El curso de la enfermedad usualmente conduce a la muerte en un estado inmóvil severamente debilitado entre cuatro y 12 años después de la aparición. La AD se ha estimado que aflige 5 a 11 por ciento de la población de más de 65 años y tanto como el 47 por ciento de la población de más de 85 años. El costo para la sociedad del manejo de la AD está por encima de 80 billones de dólares anualmente, principalmente debido a los grandes cuidados de custodia requeridos para los pacientes de AD. Más aún, como los adultos nacidos durante la explosión de población de los años 1940 y 1950 se aproximan a la edad cuando la AD se volvió más prevalente, el control y tratamiento de la AD se volverá un problema de cuidado de la salud aún más significativo. Habitualmente, no existe ningún tratamiento que retarde significativamente la progresión de la enfermedad. Para revisiones sobre la AD, ver Selkoe, D.J. Sci. Amer., noviembre 1991, pp. 68-78; y Yankner, B.A. *et al.* (1991) N. Eng. J. Med. 325:1849-1857.

Se ha reportado (Games *et al.* (1995) Nature 373:523-527) que una neuropatología tipo Alzheimer ha sido creada en ratones transgénicos. Los ratones transgénicos expresan altos niveles de proteína precursora amiloide mutante humana y progresivamente desarrollan muchas de las condiciones patológicas asociadas con la AD.

Patológicamente, la AD se caracteriza por la presencia de lesiones distintivas en el cerebro de la víctima. Estas lesiones del cerebro incluyen filamentos intracelulares anormales denominados enmarañamientos neurofibriliares (NTF por sus siglas en inglés) y depósitos extracelulares de proteínas amiloidogénicas en placas seniles, o amiloides. Los depósitos de amiloido también están presentes en las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales de los pacientes de AD. El principal constituyente proteínico de las placas amiloides se ha identificado como un péptido de 4 quilodalton denominado péptido β -amiloide (β -AP por sus siglas en inglés) (Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120:885-890; Masters, C. *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4245-4249). Los depósitos difusos del β -AP son frecuentemente observados en cerebros adultos normales, mientras que el tejido del cerebro con AD se caracteriza por placas de β -amiloide de núcleo denso más compactadas (ver por ejemplo, Davies, L. *et al.* (1988) Neurology 38:1688-1693). Estas observaciones sugieren que la deposición del β -AP tiene preferencia, y contribuye con, la destrucción de las neuronas que ocurre en la AD. Como soporte adicional de un papel patogénico directo del β -AP, el β -amiloide ha mostrado ser tóxico a las neuronas maduras, tanto en cultivo como *in vivo*. Yankner, B.A. *et al.* (1989) Science 245:417-420; Yankner, B.A. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9020-9023; Roher, A.E. *et al.* (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 174:572-579; Kowall, N.W. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7247-7251. Adicionalmente, los pacientes con hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Holandesa (HCHWA-D por sus siglas en inglés), que se caracteriza por los depósitos de β -amiloide difusos dentro de la corteza cerebral y la cerebrovasculatura, han mostrado tener una mutación puntual que conduce a una sustitución de amino ácido dentro del β -AP. Levy, E. *et al.* (1990) Science 248:1124-1126. Esta observación demuestra que la alteración específica de la secuencia del β -AP puede hacer que se deposite el β -amiloide.

El β -AP natural se deriva mediante la proteólisis de una proteína mucho más larga denominada la proteína precursora amiloide (APP). Kang, J. *et al.* (1987) Nature 325:733; Goldgaber, D. *et al.* (1987) Science 235:877; Robakis, N.K. *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4190; Tanzi, R.E. *et al.* (1987) Science 235:880. El gen APP mapea al cromosoma 21, suministrando de esta manera una explicación para los depósitos de β -amiloide vistos a una edad

ES 2 283 463 T3

temprana en individuos con síndrome de Down, que es causada por la trisomía del cromosoma 21. Mann, D.M. *et al.* (1989) *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 15:317; Rumble, B. *et al.* (1989) *N. Eng. J. Med.* 320:1446. El APP contiene un dominio que alcanza la membrana simple, con una región amino Terminal larga, (aproximadamente dos tercios de la proteína) que se extiende en el ambiente extracelular y una región carboxi terminal más corta que se proyecta hacia el citoplasma. El empalme diferencial del ARN mensajero del APP conduce a al menos cinco formas de APP, compuestas de 563 amino ácidos (APP-563), 695 amino ácidos (APP-695), 714 amino ácidos (APP-714), 751 amino ácidos (APP-751) o 770 amino ácidos (APP-770).

Dentro del APP, el péptido β -amiloide de ocurrencia natural inicia en un residuo de ácido aspártico en la posición 10 del amino ácido 672 del APP-770. El β -AP de ocurrencia natural derivado de la proteólisis del APP es de 39 a 43 residuos de amino ácido de longitud, dependiendo del punto final carboxi terminal, que exhibe heterogeneidad. La forma circulante predominante del β -AP en la sangre y el fluido cerebroespinal de tanto los pacientes con AD como los adultos normales es β 1-40 (" β corto"). Seubert, P. *et al.* (1992) *Nature* 359:325; Shoji, M. *et al.* (1992) *Science* 258:126. Sin embargo, el β 1-42 y el β 1-43 (" β largo") también son formas en las placas β -amiloides. Masters, C. *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4245; Miller, D. *et al.* (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 301:41; Mori, H. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267:1708. Aunque el mecanismo molecular preciso que conduce a la agregación y depósito del β -APP es desconocido, el proceso se ha asemejado a aquel de las polimerizaciones dependientes de nucleación, tales como la cristalización de proteína, la formación de microtúbulo y la polimerización de actina. Ver por ejemplo, Jarrett, J.T. y Lansbury, P.T. (1993) *Cell* 73:1055-1058. En tales procesos, la polimerización de los componentes del monómero no ocurre hasta la formación del núcleo. Así, estos procesos se caracterizan por un tiempo de retardo antes de que ocurra la agregación, seguido por la rápida polimerización después de la nucleación. La nucleación se puede acelerar mediante la adición de una "semilla" o un núcleo preformado, lo que resulta en la rápida polimerización. Las formas β largas del β -AP han mostrado que actúan como semillas, acelerando de esta manera la polimerización tanto de las formas β -AP largas como cortas. Jarrett, J.T. *et al.* (1993) *Biochemistry* 32:4693.

En un estudio, en el cual se hicieron sustituciones de amino ácido en el β -AP, dos péptidos β mutantes se reportaron por interferir con la polimerización del β -AP no mutado cuando las formas mutante y no mutante del péptido se mezclaron. Hilbich, C. *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 228:460-473. Las cantidades equimolares de los péptidos β -amiloide mutante y no mutante (es decir, natural) se utilizaron para ver este efecto y se reportaron los péptidos mutantes por ser inadecuados para el uso *in vivo*. Hilbich, C. *et al.* (1992), *supra*.

La WO 96/28471 describe un compuesto modulador amiloide que comprende una proteína amiloidogénica, o un fragmento de péptido de éste, acoplado directamente o indirectamente a, al menos, un grupo modificante de tal forma que, el compuesto modula la agregación de las proteínas o los péptidos amiloides naturales cuando se ponen en contacto con las proteínas o los péptidos amiloidogénicos. Los compuestos, las células recombinantes, las composiciones farmacéuticas, el método de preparación de éstos y su uso de acuerdo con la invención no se describen ni se sugieren por la WO 96/28471.

Pallitto, M. *et al.* (Biochemistry, 1999, 38, 3570-3578) describe una estrategia modular para generar compuestos que inhiben la toxicidad del $A\beta$, con base en enlazar un elemento de reconocimiento para el $A\beta$ a un elemento de irrupción designado para interferir con la agregación $A\beta$. Uno de tales compuestos, con la secuencia 15-25 del $A\beta$ como el elemento de reconocimiento y el hexámero de lisina como el elemento de irrupción, alteraron las cinéticas de agregación del $A\beta$ y protegieron las células de la toxicidad del $A\beta$. Los experimentos de optimización con elementos de reconocimiento que consisten de 4-8 residuos revelaron que ninguno de los péptidos de reconocimiento alteró las cinéticas de agregación del $A\beta$ y solo dos, el KLVFF y el KLVF, tenían cualquier efecto protector contra la toxicidad del $A\beta$. El péptido híbrido KLVFF-KKKKKK alteró dramáticamente las cinéticas de agregación del $A\beta$ y la morfología del agregado y suministró una protección significativamente mejorada contra la toxicidad del $A\beta$ comparada con el péptido de reconocimiento sólo. La secuencia revuelta VLFKF fue un dominio de reconocimiento tan efectivo como el KLVFF, sugiriendo las características hidrófobas de la secuencia de reconocimiento como críticas. Los compuestos, las células recombinantes, las composiciones farmacéuticas, el método para la preparación de éstos y su uso de acuerdo con la invención no se describen ni se sugieren por Pallitto, M. *et al.* (Biochemistry, 1999, 38, 3570-3578).

Resumen de la invención

La presente invención suministra agentes terapéuticos, composiciones farmacéuticas de éstos, y métodos de uso de éstos para tratar una enfermedad amiloidogénica. Los agentes terapéuticos de la invención incluyen compuestos que comprenden la fórmula I-L-P, donde I es una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD o IgE, la región constante de cadena pesada o el fragmento de ésta; L es un grupo ligador o un enlace directo; y P es un péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica, por ejemplo, el β -amiloide, la transtiretina (TTR por sus siglas en inglés), la proteína priónica (PrP por sus siglas en inglés), amilina (IAPP por sus siglas en inglés), el factor natriurético auricular (ANF por sus siglas en inglés), la cadena ligera kappa, la cadena ligera lambda, el amiloide A, la procalcitonina, la cistatina C, la microglobulina β 2, el ApoA-I, la gelsolina, la calcitonina, el fibrinógeno, la lisozima, Huntington, o β -sinucleina. En una modalidad, I puede comprender la secuencia de amino ácido establecida en la SEQ ID NO: 10. En otra modalidad, I comprende una secuencia de amino ácido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o más de identidad con la secuencia del amino ácido establecido en la SEQ ID NO: 10. I puede ser aproximadamente 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, o 1-10 amino ácidos.

ES 2 283 463 T3

P puede comprender aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 amino ácidos, y preferiblemente aproximadamente 50, 40, 30, 20, o 10 amino ácidos. En algunas modalidades P puede comprender al menos un amino ácido de ocurrencia natural o al menos un amino ácido D. En una modalidad preferida, P puede comprender una subregión de una proteína amiloidogénica tal como el péptido β -amiloide, la transtiretina (TTR

- 5 por sus siglas en inglés), la proteína priónica (PrP por sus siglas en inglés), amilina (IAPP por sus siglas en inglés), el factor natriurético auricular (ANF por sus siglas en inglés), la cadena ligera kappa, la cadena ligera lambda, el amiloide A, la procalcitonina, la cistatina C, la microglobulina β 2, el ApoA-I, la gelsolina, la calcitonina, el fibrinógeno, la lisozima. En una modalidad preferida, P puede comprender la secuencia amino ácido establecida en la SEQ
10 ID NO: 1 o los fragmentos de éstos. En otra modalidad, P comprende una secuencia de amino ácido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o más de identidad con la secuencia de amino ácido establecida en la SEQ ID NO: 1.

En otra modalidad, P es un péptido comprendido completamente de amino ácidos D y que tienen al menos tres residuos de amino ácido independientemente seleccionados del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D, una estructura de yodotirosina D, y una estructura de alanina D. En una modalidad preferida, P es un péptido que comprende la estructura

$$(Y - Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Z)$$

20 En donde Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ son cada uno estructuras de amino ácido D y al menos dos de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ son, independientemente, seleccionados del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D y una estructura de valina D; Y, que puede estar o no presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_a, en donde Xaa es cualquier estructura de amino ácido D y a es un entero de 1 a 15; y Z, que puede estar o no 25 presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_b, en donde Xaa es cualquier estructura de amino ácido D y b es un entero de 1 a 15.

En una modalidad particularmente preferida, P es un péptido seleccionado del grupo que consiste de: D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-Phe-fenetilamida, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Tyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-lodoTyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Ala, D-Ala-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Tyr-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-lodoTyr-D-Ala, D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Leu, D-Leu-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Val, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Leu y D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Leu.

En otro aspecto, la presente invención caracteriza dímeros u otros multímeros de los compuestos de la invención.

40 En un aspecto adicional, la invención caracteriza una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención suministra métodos para retirar una proteína amiloidogénica de un sujeto al poner en contacto la proteína amiloidogénica con un compuesto de la invención de tal forma que la proteína amiloidogénica es retirada del sujeto.

50 En aún otro aspecto, la invención caracteriza métodos para tratar un sujeto que sufre de un desorden amiloidogénico, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o encefalopatía espongiforme, al administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, tratando de esta manera el sujeto que sufre de un desorden amiloidogénico.

En otra modalidad, la presente invención suministra un método para preparar un agente terapéutico que comprende la fórmula I-L-P', donde I es una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD o IgE, la región constante de cadena pesada o el fragmento de éste, L es un grupo ligador o un enlace directo; y P' es un péptido capaz de unir una proteína blanca. El método comprende (1) seleccionar una librería de péptido para identificar uno o más péptidos que se unen a la proteína blanca; (2) determinar la secuencia del amino ácido de al menos un péptido que se une a la proteína blanca; (3) producir un agente terapéutico que comprende un péptido que tiene la secuencia de amino ácido identificada en la etapa (2) y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de ésta, ligado por vía de un grupo ligador, L, o un enlace directo.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 describe un análisis Western blot de lisados de célula COS y un medio cosechado de células COS que expresan la región Fc de ratón IgG1 fusionada a los residuos de amino ácido 1-40, 1-42, 10-25, 16-30, 17-21, o 17-21 (A21L) del β -amiloide con o sin una tapa de glicina triple N-terminal.

La Figura 2 describe un análisis inmunohistoquímico de secciones del cerebro coronal de ratones de 20-22 semanas transgénicos tanto para la mutación sueca de la proteína precursora amiloide como la presenilina del IgG1 de ratón

ES 2 283 463 T3

fusionado a varios segmentos del β -amiloide, medio de células COS no transfectadas, o del anticuerpo policlonal anti- β -amiloide.

La Figura 3 describe los oligonucleótidos sintéticos que fueron utilizados para ensamblar el gen APP/IgG sintético.

- 5 Estos oligonucleótidos contienen sitios de endonucleaza de restricción únicos necesarios para el ensamblaje.

La Figura 4 es una representación esquemática del vector de expresión pTig.

La Figura 5 es una representación esquemática del montaje de un $A\beta$ 1-40 y un $A\beta$ 1-42 sintéticos, con y sin un

- 10 grupo ligador Gly triple entre el propéptido tPA y el péptido β -amiloide.

La Figura 6 describe la secuencia de ADN, la composición de amino ácido, y los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción del gen β -amiloide sintético.

- 15 La Figura 7A describe la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para ensamblar subfragmentos del gen β -amiloide sintético y una compilación de las construcciones β -amiloide/IgG1 químéricas que fueron hechas.

La Figura 7B describe la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para ensamblar subfragmentos del gen β -amiloide sintético y una compilación de las construcciones β -amiloide/IgG1 químéricas que fueron hechas.

- 20 La Figura 8 es una gráfica que demuestra que la toma por las células del fibrilo mediado por el receptor Fc ocurre en la presencia de la proteína de fusión $A\beta$ (16-30)-Fc del anticuerpo α - β -amiloide.

- 25 La Figura 9 es una gráfica que demuestra que la proteína de fusión $A\beta$ (16-30)-Fc interfiere con la unión del péptido β -amiloide soluble a las fibrillas amiloides.

La Figura 10 es una sección del cerebro teñida con Tioflavina S, que demuestra que el tratamiento de un ratón transgénico con un modelo de enfermedad de Alzheimer con la proteína de fusión $A\beta$ (16-30)-Fc da como resultado una disminución en la placa en el sitio de administración.

- 30 La Figura 11 describe la región codificante del gen sintético gen sintético tPA Δ pro/16-30/Fc cADN (SEQ ID NO: 11).

- 35 La Figura 12 describe la secuencia de amino ácido de la proteína de fusión tPA Δ pro/16-30/Fc (SEQ ID NO: 12). Los elementos fusionales anotados también son mostrados. La proteína $A\beta$ (16-30)-Fc se establece aquí como la SEQ ID NO: 13.

Descripción detallada de la invención

- 40 La presente invención suministra agentes terapéuticos y métodos de uso de éstos para tratar una enfermedad amiloidogénica. Los agentes terapéuticos de la invención incluyen los compuestos que comprenden la fórmula I-L-P, en donde I es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de ésta (por ejemplo, que comprende la región Fc); L es un grupo ligador o un enlace directo; y P es un péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.

- 45 Sin pretender estar limitados por la teoría se cree que la porción P de los compuestos de la invención servirá para unir una proteína amiloidogénica, por ejemplo, una proteína amiloidogénica dentro de la placa amiloide, y la porción I de los compuestos de la invención servirá para dirigir la microglia a la proteína amiloidogénica, cuya microglia puede entonces internalizar y degradar la proteína amiloidogénica y la placa amiloide.

- 50 Como se utiliza intercambiablemente aquí, los términos “I” y “región constante de cadena pesada de inmunoglobulina” están destinados a incluir la región constante de cualquier cadena pesada de inmunoglobulina, por ejemplo, la cadena pesada γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ , o ϵ , o un fragmento de éstas. La región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o el fragmento de ésta puede ser monoclonal o policlonalmente derivado, no tiene especificidad epitópica, y, preferiblemente, contiene una región Fc (es decir, retiene la capacidad de unirse a un receptor Fc, por ejemplo, un receptor Fc sobre una célula microglial tal como un receptor Fc γ). En modalidades preferidas, I incluirá la región Fc de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina. Por ejemplo, I preferiblemente incluye los dominios CH2 y el CH3 y la región pivot de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.

- 60 Las regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina son conocidas en la técnica. Por ejemplo, la secuencia IgG de ratón se puede encontrar en el Acceso No. M60428 del GenBank, la secuencia IgG1 humana se puede encontrar en el Acceso No. J00228 del GenBank, la secuencia IgG2 humana se puede encontrar en el Acceso No. J00230 del GenBank, la secuencia IgG3 humana se puede encontrar en el Acceso No. AJ390267 del GenBank, y la secuencia IgG4 humana se puede encontrar en el Acceso No. K01316 del GenBank, cuyos contenidos todos se 65 incorporan aquí como referencia. Las secuencias preferidas a ser utilizadas incluyen la secuencia IgG de ratón que parte en el residuo 98 y termina en el C-terminal de la molécula, la secuencia IgG1 humana que parte en el residuo 97 y termina en el C-terminal de la molécula, la secuencia IgG2 humana que parte en el residuo 97 y termina en el C-terminal de la molécula, la secuencia IgG3 humana que parte en el residuo 98 y termina en el C-terminal de la

ES 2 283 463 T3

molécula, y la secuencia IgG4 que parte en el residuo 97 y termina en el C-terminal de la molécula. En una modalidad, I puede comprender la secuencia de amino ácido establecida en la SEQ ID NO: 10 o fragmentos de ésta.

Un “receptor Fc” como se utiliza aquí, es una proteína expresada sobre la superficie de una célula, por ejemplo, 5 una célula microglial, que reconoce y se une a la región de cadena pesada constante no específica de inmunoglobulina circulante, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD o IgE.

Una “región Fc” como se utiliza aquí, incluye la parte de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que se requiere para unirse a un receptor Fc.

10 Como se utiliza intercambiablemente aquí, los términos “P” y “péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica” pretenden incluir compuestos que comprenden cuatro o más residuos de amino ácido ligados por enlaces amida que tienen la capacidad de unirse a una proteína amiloidogénica. Tales compuestos pueden ser biomoléculas de péptido natural, variantes de secuencia de amino ácido de una biomolécula de péptido natural, o péptidos sintéticos. En 15 una modalidad, el péptido incluye cualquiera o todos los veinte amino ácidos L naturales. El péptido también puede incluir uno o más residuos del amino ácido D y/o uno o más residuos de amino ácido no natural.

20 Como se utiliza aquí, el término “proteína amiloidogénica” incluye cualquier proteína que es capaz de, o está involucrada en formar un depósito amiloide, por ejemplo un depósito de proteína extracelular característico de un número de diferentes enfermedades. Aunque diverso en su ocurrencia, todos los depósitos amiloides tienen propiedades morfológicas comunes, tiñen con tintes específicos (por ejemplo, rojo Congo), y tienen una apariencia birrefringente rojo-verde característica en luz polarizada después de teñido. Ellas también comparten características ultraestructurales comunes y difracción de rayos x común y espectro infrarrojo. Ejemplos de proteínas amiloidogénicas incluyen 25 transtiretina (TTR por sus siglas en inglés), proteína priónica (PrP por sus siglas en inglés), amilina (IAPP por sus siglas en inglés), factor natriurético auricular (ANF por sus siglas en inglés), cadena ligera kappa, cadena ligera lambda, amiloide A, procalcitonina, cistatina C, microglobulina β^2 , ApoA-I, gelsolina, calcitonina, fibrinógeno, lisozima, Huntington, y α -sinucleina.

30 Como se utiliza intercambiablemente aquí, los términos “L” y “ligador” incluyen un enlace directo o cualquier agente que se pueda utilizar para ligar la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de éste y el péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.

35 Los ligadores preferidos incluyen ligadores peptídicos así como también reticuladores heterobifuncionales, que se pueden utilizar para enlazar proteínas en etapas. Una amplia variedad de reticuladores heterobifuncionales son conocidos en la técnica, incluyendo succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC por sus 40 siglas en inglés), éster de m-Maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida (MBS por sus siglas en inglés); N-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato (SIAB por sus siglas en inglés), succinimidil 4-(p-maleimidofenil) butirato (SMPB por sus siglas en inglés), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC por sus siglas en inglés), 4-succinimidil-oxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT por sus siglas en inglés), N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP por sus siglas en inglés), succinimidil 6-[3-(2-piridilditio)propionato]hexanoato (LC-SPDP por sus siglas en inglés).

45 En una modalidad, el ligador es un residuo de amino ácido o una secuencia de residuos de amino ácido. Preferiblemente, el ligador es de aproximadamente 1-20, aproximadamente 1-15, aproximadamente 1-10, o aproximadamente 1-5 residuos de amino ácido. Más preferiblemente, el ligador comprende residuos de amino ácido con cadenas laterales pequeñas, por ejemplo, alanina o glicina. Más preferiblemente, el ligador es Ala_N o Gly_N, donde N es aproximadamente 1-10 residuos.

50 La presente invención también suministra métodos para tratar un sujeto que sufre de un desorden amiloidogénico. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, tratando de esta manera al sujeto que sufre del desorden amiloidogénico.

Como se utiliza aquí, el término “desorden amiloidogénico” incluye cualquier enfermedad, desorden o condición causada o caracterizada por depósitos de una proteína amiloidogénica. Ejemplos no limitantes de desordenes amiloidogénicos incluyen aquellos causados o caracterizados por depósitos de Transtiretina (TTR por sus siglas en inglés), por ejemplo, polineuropatía amiloide familiar (tipos portugués, japones y suizo), cardiomiopatía amiloide familiar (tipo holandés), amiloide cardiaco aislado y amiloidosis senil sistémica; aquellas causadas o caracterizadas por depósitos de Proteína Priónica (PrP por sus siglas en inglés), por ejemplo, encefalopatías espongiformes, que incluye tembladera de las ovejas, encefalopatía espongiforme bovina en vacas y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ por sus 55 siglas en inglés) y síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS por sus siglas en inglés) en humanos; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Polipéptido Amiloide de Islet IAPP por sus siglas en inglés, (también conocida como amilina), por ejemplo, diabetes de aparición en adulto e insulinoma; causados aquellos o caracterizados por depósitos de Factor Natriurético Auricular (ANF por sus siglas en inglés), por ejemplo, amiloide auricular aislado; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Cadena Ligera Kappa o Lambda, por ejemplo, amiloidosis 60 idiopática (primaria), amiloidosis asociada a mieloma o macroglobulinemia, y amiloidosis nodular primaria cutánea localizada asociada con el síndrome de Sjogren; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Amiloide A, por ejemplo, amiloidosis reactiva (secundaria) (ver por ejemplo, Liepnieks, J.J., et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1270:81-86), Fiebre Mediterránea familiar y nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle- 65

ES 2 283 463 T3

Wells); causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Cistatina C, por ejemplo, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Islandia; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$), por ejemplo, complicaciones asociadas con hemodiálisis de largo plazo; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Apolipoproteína A-I (ApoA-I por sus siglas en inglés), por ejemplo, amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria (polineuropatía amiloide familiar III); causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Gelsolin, por ejemplo, amiloidosis familiar del tipo Terminación; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Procalcitonina o calcitonina, por ejemplo, fibrillas amiloides asociadas con carcinoma medular de la tiroides; causadas aquellas o caracterizadas por depósitos de Fibrinógeno, por ejemplo, amiloidosis renal hereditaria; y aquellas causadas o caracterizadas por depósitos de Lisozima, por ejemplo, amiloidosis sistémica hereditaria. Otros ejemplos de desordenes amiloidogénicos incluyen enfermedad de Huntington y miocitis de cuerpo de inclusión.

Como se utiliza aquí, el término “sujeto” incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, que incluye humanos. En una modalidad preferida, el sujeto es un primate. En aún una modalidad más preferida, el primate es un humano.

Como se utiliza aquí, el término “administrar” a un sujeto incluye dispensar, entregar o aplicar un compuesto, por ejemplo, un compuesto en una formulación farmacéutica (como se describió aquí), a un sujeto mediante cualquier ruta adecuada para entrega del compuesto al sitio deseado en el sujeto, incluyendo entrega por ruta parenteral u oral, inyección intramuscular, inyección subcutánea/intradérmica, inyección intravenosa, administración bucal, entrega transdérmica y administración por ruta del tracto rectal, colónico, vaginal, intranasal o respiratorio (por ejemplo, mediante inhalación).

Como se utiliza aquí, el término “cantidad efectiva” incluye una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado deseado, por ejemplo, suficiente para tratar un desorden amiloidogénico en un sujeto. Una cantidad efectiva de un compuesto de la invención, como se definió aquí puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto a elicitar la respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosis se pueden ajustar para suministrar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o de detimento (por ejemplo, efectos colaterales) del compuesto son sopesados por los efectos terapéuticamente benéficos.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención (es decir, una dosis efectiva) puede variar desde aproximadamente 0.001 a 30 mg/kg de peso de cuerpo, preferiblemente aproximadamente 0.01 a 25 mg/kg de peso de cuerpo, más preferiblemente aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso de cuerpo, y aún más preferiblemente aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de peso de cuerpo. La persona experta apreciará que ciertos factores pueden influenciar la dosis requerida para tratar efectivamente un sujeto, que incluye pero no está limitado a la severidad de la enfermedad o desorden, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Más aún, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención puede incluir un tratamiento simple o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo, un sujeto se trata con un compuesto de la invención en el rango de entre aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de peso de cuerpo, una vez por semana entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, y aún más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. También se apreciará que la dosis efectiva de un compuesto de la invención utilizada para el tratamiento puede incrementar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular.

Varios aspectos adicionales de la presente invención se describen con detalle adicional en las siguientes subsecciones.

I. Región Constante de Cadena Pesada de Inmunoglobulina

La región constante de cadena pesada de inmunoglobulina utilizada en los compuestos de la invención se puede obtener utilizando una variedad de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, las preparaciones de inmunoglobulina policlonales (que pueden ser descompuestas como se describe adelante para generar regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmentos de ésta) se pueden derivar directamente de la sangre de las especies animales deseadas. Así, en el caso de los humanos, las preparaciones de inmunoglobulina polyclonal se pueden preparar de unidades vencidas de sangre que utilizan protocolos conocidos o fácilmente descubiertos por aquellos expertos en la técnica. Tales productos son comercialmente disponibles (Sandoz Limited; Cutter Laboratories; Hyland Laboratories) y son utilizados rutinariamente para la preparación de inmunoglobulinas.

Además, si se desea, las preparaciones de inmunoglobulina polyclonal se pueden preparar de la sangre de los sujetos inmunizados de las especies deseadas luego de la inmunización con cualquiera de una variedad de antígenos, seguido por el producto de la sangre y procesándola de acuerdo con técnicas conocidas. Una ventaja distintiva de preparaciones de inmunoglobulina no específicas es que al preparar la inmunoglobulina de las mismas especies en la cual ésta se administrará, las reacciones inmunes a través de las barreras de las especies se evitan y las administraciones repetidas del mismo producto son menos probables para causar efectos colaterales. Se debe enfatizar que las administraciones a especies cruzadas se pueden hacer. Sin embargo, su uso podría incrementar la incidencia de reacciones adversas tales como reacciones anafilácticas, reacciones febris, y/o la generación de la respuesta inmune a la proteína de inmunoglobulina extraña que bloqueará su uso efectivo, así como también el peligro a la salud del sujeto. El evitar

ES 2 283 463 T3

tales reacciones aumenta grandemente la atracción de utilizar una preparación de inmunoglobulina que son de las mismas especies que están siendo tratadas.

Las inmunoglobulinas monoclonales (que se pueden descomponer como se describió adelante para generar re-

- 5 giones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmentos de éstas) se pueden preparar utilizando téc-
nicas bien conocidas tales como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver también, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-
10 83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75; la más
reciente técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72; o la técnica hibridoma
EBV (Cole *et al.* (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). La tecnología
de producir hibridomas de anticuerpo monoclonal es bien conocida (ver en general, R. H. Kenneth, in *Monoclonal
Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A.
Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54:387-402; M. L. Gefter *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36).

- 15 Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos utilizados para fusionar los linfocitos y las líneas celulares
inmortalizadas se puede aplicar para el propósito de generar un anticuerpo (ver, por ejemplo, G. Galfré *et al.* (1977)
Nature 266:55052; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth,
Monoclonal Antibodies, cited *supra*). Más aún, la persona medianamente versada apreciará que existen muchas variaciones
20 de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea
celular de mieloma) se deriva de las mismas especies de mamífero como los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas
de murino se pueden hacer al fusionar linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la
presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son las
líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y
timidina ("medio HAT"). Cualquier número de líneas celulares de mieloma se puede utilizar como un compañero de
25 fusión de acuerdo con las técnicas estándar, por ejemplo, las líneas del mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653
o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles del ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón
sensibles a HAT son fusionadas a esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol ("PEG" por sus siglas en inglés).
Las células de hibridoma que resultan de la fusión son entonces seleccionadas utilizando medio HAT, que mata las
30 células de mieloma no fundidas e improductivamente fusionadas (los esplenocitos no fusionados mueren después de
varios días porque ellos no son transformados).

- La alternativa a preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal (que se
puede clivar como se describió adelante para generar regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina o
35 fragmentos de éstas) se puede aislar de una librería de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo,
una librería de despliegue de fago de anticuerpo). Los kits para generar y seleccionar las librerías de despliegue de
fago están comercialmente disponibles (por ejemplo, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catálogo
No. 27-9400-01; y el Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, Catálogo No. 240612). Adicionalmente, ejemplos de
40 los métodos y reactivos particularmente responsables por el uso de generar y seleccionar librerías de despliegue de
anticuerpo se pueden encontrar en, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente U.S. No. 5,223,409; Kang *et al.* Publicación
Internacional PCT No. WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 91/17271; Winter *et al.*
Publicación Internacional PCT No. WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO 92/15679;
Breitling *et al.* Publicación Internacional PCT No. WO Publicación Internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.*
PCT Publicación Internacional No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT Publicación Internacional No. WO 92/09690;
45 Ladner *et al.* PCT Publicación Internacional No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Biol technology* 9: 1370-1372;
Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibody. Hibridomas* 3:81-85 *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281; Griffiths *et al.* (1993)
EMBO J 12: 725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-
628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Acad. Sci. USA* 89: 3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Biol Technology* 9: 1373-1377;
Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid. Res.* 19: 4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-
7982; y McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 378:552-554.

- 50 Adicionalmente, las inmunoglobulinas recombinantes, tales como las inmunoglobulinas químéricas y humaniza-
das, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden hacer utilizando técnicas de ADN
recombinantes estándar también se pueden utilizar para generar regiones constantes de cadena pesada de inmunoglo-
bulina o fragmentos de ésta. Tales inmunoglobulinas/anticuerpos monoclonales químéricos y humanizados se pueden
55 producir mediante técnicas de ADN recombinantes conocidas en el arte, por ejemplo utilizando los métodos descritos
en Robinsón *et al.* Solicitud Internacional No. PCT/US 86/02269; Akira *et al.* Solicitud de Patente Europea 184,187;
Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173,49; Neuberger
60 *et al.* Solicitud internacional No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente U.S. No. 4,816,567; Cabilly *et al.* Solicitud de
Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240: 1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-
218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Word *et al.* (Nature 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl.
Cancer. Inst.* 80:1553-1559); Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Bio Techniques* 4:214;
Winter U.S. Patente 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y
Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

- 65 Los anticuerpos/inmunoglobulinas preparados por cualquiera de las técnicas anteriores pueden entonces ser des-
compuestos, por ejemplo, utilizando enzimas conocidas tales como papaina, pepsina, y subtilisina, para generar regio-
nes constantes de cadena pesada inmunoglobulina o fragmentos de ésta.

ES 2 283 463 T3

Más aún, los compuestos de la invención (que comprenden una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de esta, por ejemplo un fragmento que comprende las regiones Fc) se pueden generar como proteínas de fusión utilizando técnicas de ADN recombinantes estándar como se describen en detalle adicional adelante.

5

II. Péptidos Capaces de Unirse a una Proteína Amiloidogénica

El componente “P” de los compuestos de la invención puede ser cualquier molécula que comprende 4 o más residuos de amino ácidos ligados por enlaces amida que tienen la capacidad de unirse a una proteína Amiloidogénica.

10

En una modalidad el componente “P” de los compuestos de la invención se diseña con base en la secuencia de amino ácido del β -AP natural. Los términos “ β -AP natural”, “péptido β -amiloide natural”, y “péptido $A\beta$ natural”, utilizados intercambiablemente aquí, pretenden comprender productos de descomposición proteolítica de ocurrencia natural de la proteína precursora β amiloide (APP) que están involucradas en la agregación de β -AP y β -amiloísis. Estos péptidos naturales incluyen péptidos β -amiloide que tienen 39-43 amino ácidos (es decir $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$, y $A\beta_{1-43}$). Los residuos de amino ácido aminoterminal del β -A β natural corresponden al residuo de ácido aspártico en la posición 672 de la forma de residuo de amino ácido 770 de la proteína precursora amiloide (“APP-770”). La forma larga de 43 amino ácidos del β -AP natural tiene la secuencia de amino ácido DAEFRHDSG YEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT (SEQ ID NO. 1), mientras que las formas más cortas tienen los residuos de aminoácido de unión suprimidos del extremo carboxi-terminal. Cualquier fragmento del β -AP natural que es capaz de unirse a una proteína amiloidogénica se puede utilizar en el componente “P” en los compuestos de la invención. Preferiblemente, el componente “P” en los compuestos de la invención puede comprender al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 amino ácidos contiguos del $A\beta$ natural.

25

En una modalidad preferida, el componente “P” en los compuestos de la invención se designa con base en la secuencia de amino ácido de un “dominio de núcleo de agregación $A\beta$ ” (ACD). Como se utiliza aquí, el término “dominio de núcleo de agregación $A\beta$ ” se refiere a la subregión del péptido β -amiloide que es suficiente para modular la agregación de los β -AP naturales cuando esta subregión, en su forma de amino ácido L, es apropiadamente modificada (por ejemplo modificada en el amino-terminal), como se describió en detalle en la Solicitud de Patente U.S. Serie No. 08/548,998 y la solicitud de Patente U.S. Serie No. 08/616,081, cuyos contenidos de cada una se incorporan expresamente aquí como referencia. Preferiblemente, el componente “P” en los compuestos de la invención es modelado después de una subregión del β -AP natural que es de menos de 15 amino ácidos de longitud y más preferiblemente está entre 4-10 amino ácidos de longitud. En varias modalidades, el componente “P” en los compuestos de la invención es, o se modifica después de, una subregión de β -AP que es de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más amino ácidos de longitud.

35

En una modalidad, la subregión del β -AP luego de la cual el componente “P” en los compuestos de la invención es modelado en una región interna o carboxi-terminal del β -AP (es decir corriente abajo del amino terminal en la posición del amino ácido 1). P puede así, ser un fragmento del β A que incluye 35 o menos, 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, o 15 o menos residuos de amino ácido. En otra modalidad, el componente “P” de los compuestos de la invención, es, o es modelado después, de una subregión de β -AP que es hidrófoba. Los componentes “P” preferidos comprenden los residuos de amino ácidos 16-30, 17-20, 17-21, 16-25, o 1-25 del β -AP natural ($A\beta_{16-30}$, $A\beta_{17-20}$, $A\beta_{17-21}$, $A\beta_{16-25}$, o $A\beta_{1-25}$, respectivamente). Las secuencias de amino ácido del $A\beta_{17-20}$, y el $A\beta_{17-21}$, son Leu-Val-Phe-Phe (SEQ ID NO: 2) y Leu-Val-Phe-Phe Ala (SEQ ID NO: 3), respectivamente.

45

El componente “P” en los compuestos de la invención puede comprender una secuencia del amino ácido D que corresponde a la secuencia del amino ácido L del $A\beta_{17-20}$, $A\beta_{17-21}$, $A\beta_{16-25}$, o $A\beta_{1-25}$, una secuencia del aminoácido D que es un isómero retroinverso de la secuencia del amino ácido L del $A\beta_{17-20}$, $A\beta_{17-21}$, $A\beta_{16-25}$, o $A\beta_{1-25}$, o una secuencia del amino ácido D que es una versión revuelta o sustituida de la secuencia del amino ácido L del $A\beta_{17-20}$, $A\beta_{17-21}$, $A\beta_{16-25}$, o $A\beta_{1-25}$. Las estructuras de los componentes “P” efectivos son generalmente hidrófobos y se caracterizan por la presencia de al menos dos estructuras de amino ácidos D independientemente seleccionados del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D y una estructura de valina D. Como se utiliza aquí el término “una estructura del amino ácido D” (tal como una “estructura de leucina D”, una “estructura de fenilalanina D” o una “estructura de valina D”) pretende incluir el amino ácido D, así como también los análogos, derivados y miméticos del amino ácido D que mantiene la capacidad del componente “P” a unirse a una proteína amiloidogénica. Por ejemplo, el término “estructura de fenilalanina D” pretende incluir la fenilalanina D así como también la piridil alanina D y la homofenil alanina D. El término “estructura de leucina D” pretende incluir la leucina D, así como también la sustitución con la valina D u otros amino ácidos naturales no naturales que tienen una cadena natural alifática tal como la norleucina D. El término “estructura de valina D” pretende incluir la valina D, así como también la sustitución de la leucina D u otros amino ácidos naturales o no naturales y que tienen una cadena lateral alifática.

55

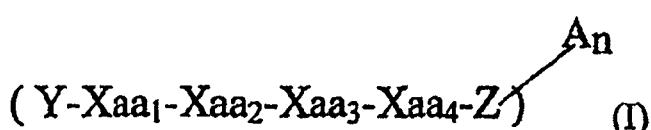
En otras modalidades, la estructura peptídica del componente “P” en los compuestos de la invención comprende al menos dos estructuras del amino ácido D independientemente seleccionados del grupo que consiste de la estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D, una estructura de valina D, una estructura de alanina D, una estructura de tirosina D y una estructura de yodo tirosina D. En otra modalidad, la estructura peptídico del componente “P” en los compuestos de la invención está comprendida de al menos tres estructuras de amino ácido D independientemente seleccionadas del grupo que consiste de la estructura de leucina D, la estructura de fenil alanina D y la estructura de la valina D. En aún otra modalidad, la estructura peptídico del componente “P” en los compuestos de la invención está

comprendida de al menos tres estructuras del amino ácido D independientemente seleccionadas del grupo que consiste de la estructura de leucina D, una estructura de fenil alanina D, una estructura de valina D, una estructura de alanita D, una estructura de tirosina D, una estructura de yodo tirosina D. En aún otra modalidad, la estructura peptídica del componente "P" en los compuestos de la invención comprende al menos cuatro estructuras del amino ácido D

5 independientemente seleccionadas del grupo que consiste de la estructura de leucina D, una estructura de fenil alanina D y una estructura de valina D. En aún otra modalidad, la estructura peptídica del componente "P" en los compuestos de la invención está comprendida de al menos cuatro estructuras de aminoácido D independientemente seleccionadas del grupo que consiste de la estructura de leucina D, una estructura de fenil alanina D y una estructura de valina D. En una modalidad preferida, la estructura peptídica del componente "P".

10 En los compuestos de la invención incluye un dipéptido de amino ácido D seleccionado del grupo que consiste de D-Phe-D-Phe, D-Phe-D-Tyr, D-Tyr-D-Phe, D-Phe-D-yodo Tyr D-yodo Tyr-D-Phe.

15 En una modalidad, el componente "P" de los compuestos de la invención comprende una fórmula (I):



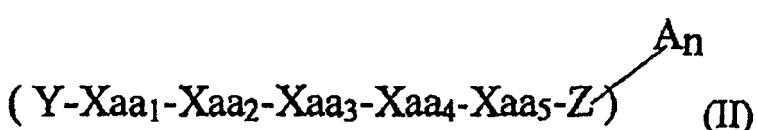
20 En donde Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ son cada uno estructuras del amino ácido D y al menos dos de Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ son, independientemente, seleccionados del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D y una estructura de valina D;

25 Y, que puede estar o no presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_a, en donde Xaa es cualquier estructura del amino ácido D y a es un entero de 1 a 15;

30 Z, que puede estar o no presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_b, en donde Xaa es cualquier estructura del amino ácido D y b es un entero de 1 a 15;

A, que puede estar o no presente, es un grupo modificador unido directamente o indirectamente al componente "P"; y n es un entero de 1 a 15;

35 En donde Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Y, Z, A y n son seleccionados de tal forma que el componente "P" se une a una proteína amiloidogénica. En una sub-modalidad de esta fórmula, un quinto residuo del amino ácido, Xaa₅, es el Terminal C especificado para Xaa₄ y Z, que puede estar o no presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_b, en donde Xaa es cualquier estructura del amino ácido D y b es un entero de 1 a 14. De acuerdo con esto, el componente "P" de los compuestos de la invención puede comprender una fórmula (II):



40 En donde b es un entero de 1 a 14.

45 En una modalidad preferida, Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ de la fórmula (I) se seleccionan con base en la secuencia del A β_{17-20} , o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en las modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D, Xaa₂ es una estructura de valina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, y una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D y Xaa₄ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D.

50 En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ de la fórmula (II) se seleccionan con base en la secuencia del A β_{17-21} , o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en las modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D, Xaa₂ es una estructura de valina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, y una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₄ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, y Xaa₅ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D.

55 En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ de la fórmula (I) se seleccionan con base en el isómero retroinverso del A β_{17-20} , o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D o una estructura de fenilalanina D, Xaa₂ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₄ es una estructura de valina D, o una estructura de leucina D.

ES 2 283 463 T3

En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ de la fórmula (II) se seleccionan con base en el isómero retroinverso del A β_{17-21} , o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en las modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D, una estructura de leucina D o una estructura de fenilalanina D, Xaa₂ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D, o una estructura de yodotirosina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₄ es una estructura de valina D o una estructura de leucina D, y Xaa₅ es una estructura de leucina D.

En otra modalidad, el componente “P” de los compuestos de la invención puede comprender una fórmula (III):

$$10 \quad A - (Y) - Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - (Z) - B \quad (III)$$

En donde Xaa_1 , Xaa_2 , Xaa_3 y Xaa_4 son cada uno estructuras del amino ácido D y al menos dos de Xaa_1 , Xaa_2 , Xaa_3 y Xaa_4 son, independientemente, seleccionadas del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D y una estructura de valina D;

Y, que puede estar o no presente, es una estructura peptídica que tiene la fórmula $(Xaa)_a$, en donde Xaa es cualquier estructura de amino ácido y a es un entero de 1 a 15;

20 Z, que puede estar o no presente, es una estructura peptídica que tiene la fórmula $(Xaa)_b$, en donde Xaa es cualquier estructura de amino ácido y b es un entero de 1 a 15;

A, que puede estar o no presente, es un grupo modificador unido directamente o indirectamente al terminal amino del componente "P"; y

25 B, que puede estar o no presente, es un grupo modificante unido directa o indirectamente al terminal carboxi del componente "P".

30 Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Y, Z, A y B son seleccionados de tal forma que el compuesto se une a una proteína amiloidogénica. En una sub-modalidad de la fórmula (III), un quinto residuo de amino ácido, Xaa₅, es el terminal C especificado para el Xaa₄ y Z, que puede estar o no presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_b, en donde Xaa es cualquier estructura del amino ácido D y b es un entero de 1 a 14. De acuerdo con esto, el componente "P" de los compuestos de la invención puede comprender una fórmula (IV):

$$A - (Y) - X_{aa_1} - X_{aa_2} - X_{aa_3} - X_{aa_4} - X_{aa_5} - (Z) - B \quad (IV)$$

En donde b es un entero de 1 a 14.

En una modalidad preferida, Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ de la fórmula (III) se seleccionan con base en la secuencia del Aβ₁₇₋₂₀, o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en las modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D, Xaa₂ es una estructura de valina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D y Xaa₄ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D.

45 En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ de la fórmula (IV) se seleccionan con base en la secuencia del Aβ₁₇₋₂₁, o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en las modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D, Xaa₂ es una estructura de valina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₄ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, y Xaa₅ es una estructura de alanina D o una estructura de leucina D.

50

En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃ y Xaa₄ de la fórmula (III) se seleccionan con base en el isómero retroinverso del A β_{17-20} , o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D, una estructura de leucina D o una estructura de fenilalanina D, Xaa₂ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D y Xaa₄ es una estructura de valina D o una estructura de leucina D.

En otra modalidad preferida Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄ y Xaa₅ de la fórmula (IV) se seleccionan con base en el isómero retroinverso del A β ₁₇₋₂₁, o las sustituciones aceptables de éste. De acuerdo con esto, en modalidades preferidas, Xaa₁ es una estructura de alanina D, una estructura de leucina D o una estructura de fenilalanina D, Xaa₂ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₃ es una estructura de fenilalanina D, una estructura de tirosina D o una estructura de yodotirosina D, Xaa₄ es una estructura de valina D o una estructura de leucina D y Xaa₅ es una estructura de leucina D.

En modalidades preferidas, el componente “P” en los compuestos de la invención puede comprender una estructura peptídica seleccionada del grupo que consiste de D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-Phe-fenetylami-

ES 2 283 463 T3

da, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Tyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-lodoTyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala, D-Ala-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Tyr-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-lodoTyr-D-Ala, D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Leu, D-Leu-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Leu-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Leu, y D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu.

Los componentes "P" preferidos pueden comprender las amidas peptídicas del amino ácido D diseñadas con base en los isómeros retroinversos anteriores del $\text{A}\beta_{17-21}$, o las sustituciones aceptables de éste.

Las estructuras peptídicas del amino ácido D de los componentes "P" en los compuestos de la invención están destinadas además a incluir otras modificaciones de péptido, que incluyen análogos, derivados y miméticos, que retienen la capacidad del componente "P" a unirse a una proteína amiloidogénica. Por ejemplo, una estructura peptídica del amino ácido D de un componente "P" puede ser adicionalmente modificado para incrementar su estabilidad, biodisponibilidad, o solubilidad. Los términos "análogo", "derivado" y "mimético" como se utiliza aquí están destinados a incluir moléculas que semejan la estructura química de una estructura peptídica D y retener las propiedades funcionales de la estructura peptídica D. Las aproximaciones para diseñar análogos de péptido, derivados y miméticos son conocidas en la técnica. Por ejemplo, ver Farmer, P.S. in Drug Design (E.J. Ariens, ed.) Academic Press, New York, 1980, vol. 10, pp. 119-143; Ball, J.B. y Alewood, P.F. (1990) J. Mol. Recognition 3:55; Morgan, B.A. y Gainor, J.A. (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243; y Freidinger, R.M. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10:270. Ver también Sawyer, T.K. (1995) "Peptidomimetic Design and Chemical Approaches to Peptide Metabolism" en Taylor, M.D. y Amidon, G.L. (eds.) Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, Chapter 17; Smith, A.B. 3rd, et al. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:11113-11123; Smith, A.B. 3rd, et al. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116:9947-9962; y Hirschman, R., et al. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115:12550-12568.

Como se utiliza aquí, un "derivado" de un compuesto X (por ejemplo, un péptido o amino ácido) se refiere a una forma de X en la cual uno o más grupos de reacción sobre el compuesto se han derivado con un grupo sustituyente. Ejemplos de derivados de péptido incluyen péptidos en los cuales la cadena lateral de un amino ácido, la estructura del péptido, o el amino o el carboxi Terminal se han derivado (por ejemplo, compuestos peptídicos con enlaces amida metilados). Como se utiliza aquí un "análogo" de un compuesto X se refiere a un compuesto que retiene las estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X la cual todavía también contiene ciertas estructuras químicas que difieren de X. Unos ejemplos de un análogo de un péptido de ocurrencia natural es un péptido el cual incluye uno o más amino ácidos de ocurrencia no natural. Como se utiliza aquí, un "mimético" de un compuesto X se refiere a un compuesto en el cual las estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X se han reemplazado con otras estructuras químicas que semejan la conformación de X. Ejemplos de peptidomiméticos incluyen compuestos peptídicos en los cuales la estructura del péptido se sustituye con una o más moléculas de benzodiazepina (ver, por ejemplo, James, G.L. et al. (1993) Science 260:1937-1942).

Los análogos del componente "P" pretenden incluir los compuestos en los cuales uno o más amino ácidos D de la estructura del péptido son sustituidos con un amino ácido homólogo de tal forma que las propiedades del componente "P" original se mantiene. Preferiblemente las sustituciones conservadoras del amino ácido se hacen en uno o más residuos de amino ácido. Una "sustitución de amino ácido conservadora" es aquella en la cual el residuo del amino ácido se reemplaza con un residuo de amino ácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de amino ácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, trionina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Ejemplos no limitantes de sustituciones homólogas que se pueden hacer en las estructuras peptídicas del componente "P" incluyen la sustitución de la fenilalanina D con la tirosina D, la piridilalanina D o la homofenilalanina D, la sustitución de la leucina D con la valina D u otro amino ácido natural o no natural que tiene una cadena lateral alifática y/o la sustitución de la valina D con la leucina D u otro amino ácido natural o no natural que tiene una cadena lateral alifática.

El término mimético, y en particular, peptidomimético, pretenden incluir isosteres. El término "isostere" como se utiliza aquí pretende incluir una estructura química que se puede sustituir por una segunda estructura química porque la conformación estérica de la primera estructura se ajusta a un sitio de unión específico para la segunda estructura. El término específicamente incluye modificaciones de la estructura del péptido (es decir, los miméticos de unión de amida) bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen modificaciones del nitrógeno amida, el α -carbono, amida carbonilo, completan el reemplazo de la unión de amida, extensiones, supresiones o reticulaciones de estructura. Varias modificaciones de la estructura del péptido son conocidas, incluyendo $\psi[\text{CH}_2\text{S}]$, $\psi[\text{CH}_2\text{NH}]$, $\psi[\text{CSNH}_2]$, $[\text{NHCO}]$, $\psi[\text{COCH}_2]$, y $\psi[(\text{E}) \text{ CH}=\text{CH}]$. En la nomenclatura utilizada anteriormente, ψ indica la ausencia de una unión amida. La estructura que reemplaza el grupo amida se especifica dentro de paréntesis.

Otras posibles modificaciones incluyen una sustitución N-alquilo (o arilo) ($\psi[\text{CONR}]$), o la reticulación de la estructura para construir lactamas y otras estructuras cíclicas. Otros derivados del componente "P" incluyen derivados de hidroximetilo C-terminales, los derivados O-modificados (por ejemplo, el hidroximetil bencil éter C-terminal), los

ES 2 283 463 T3

derivados modificados N-terminalmente que incluye amidas sustituidas tales como alquilamidas e hidrazidas y los componentes "P" en los cuales el residuo fenilalanina C-terminal se reemplaza con un análogo de fenetilamida (por ejemplo, Val-Phe-fenetilamida como un análogo del tripéptido Val-Phe-Phe).

5 Un componente "P" también se puede modificar con un grupo modificador. El término "grupo modificador" pretende incluir estructuras que están directamente unidas a la estructura peptídica del componente "P" (por ejemplo, por un grupo acoplante), así como también aquellos que están indirectamente unidos a la estructura peptídica (por ejemplo, por una asociación no covalente estable o por un acoplamiento covalente a residuos de amino ácido adicionales, o miméticos, análogos o derivados de éstos, que pueden flanquear la estructura peptídica). Por ejemplo, el grupo modificador se puede acoplar al amino terminal o al carboxi terminal del componente "P". Alternativamente, el grupo modificador se puede acoplar a la cadena lateral de al menos un residuo amino ácido L o D del componente "P" (por ejemplo, a través del grupo amino épsilon de un residuo o residuos lisilo, a través del grupo carboxilo del residuo o residuos de ácido aspártico o un residuo o residuos de ácido glutámico, a través de un grupo hidroxi de un residuo o residuos tirosilo, un residuo o residuos serina o un residuo o residuos treonina u otro grupo reactivo adecuado o una cadena lateral de amino ácido). Los grupos modificantes covalentemente acoplados al componente "P" se puede unir por medio y utilizando métodos bien conocidos en la técnica para enlazar estructuras químicas, que incluyen, por ejemplo, amida, alquilamino, carbamato, urea o uniones éster.

20 Un componente "P" de los compuestos de la invención (así como también un componente "L" o un componente "I" de los compuestos de la invención) se pueden modificar además para marcar el componente "P" (o el componente "L" o el componente "I") con una sustancia detectable. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de cola de caballo, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupo prostético adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferon, fluorescina, fluoresceína isotiocianato, rodamina, diclorotriazinilamina fluorescina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye lumitol; y ejemplos de material radioactivo adecuado incluye ^{14}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{35}S o ^3H . En una modalidad preferida, un componente "P" (o un componente "L" o uno "I") es radioactivamente marcado con ^{14}C , o mediante incorporación del ^{14}C en el grupo modificador o una o más estructuras de amino ácido en el componente "P" (o el componente "L" o el "I"). Los componentes marcados de la invención se pueden utilizar para evaluar las farmacocinéticas *in vivo* de los compuestos de la invención, así como también detectar la agregación de la proteína amiloidogénica, por ejemplo para propósitos de diagnóstico. La agregación de la proteína amiloidogénica se puede detectar en una muestra *in vivo* o *in vitro* derivada de un sujeto.

35 Preferiblemente, para el uso como un agente de diagnóstico *in vivo*, un compuesto de la invención se marca (por vía del componente "P" o del "L" o el "I") con tecnecio radioactivo, por ejemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o yodo. Los métodos para marcar compuestos peptídicos con tecnecio son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, las Patentes U.S. No. 5,443,815, 5,225,180 y 5,405,597, todas de Dean *et al.*; Stepniak-Biniakiewicz, D., *et al.* (1992) J. Med. Chem. 35:274-279; Fritzberg, A.R., *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4025-4029; Baidoo, K.E., *et al.* (1990) Cancer Res. Suppl. 50:799s-803s; y Regan, L. y Smith, C.K. (1995) Science 270:980-982). Un grupo modificador se puede escoger el cual suministra un sitio al cual un grupo de quelación para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se puede introducir, tal como el derivado Aic del ácido cárboxico, que tiene un grupo amino libre. En otra modalidad, el componente "P" (o el componente "L" o el "I") se pueden marcar con yodo radioactivo. Por ejemplo, un residuo de fenilalanina con el componente "P" (tal como Phe₁₉ o Phe₂₀ dentro de la secuencia A β) se puede sustituir con yodotirosilo radioactivo. Cualquiera de los varios isótopos del yodo radioactivo se pueden incorporar para crear un agente de diagnóstico. Preferiblemente, ^{123}I (vida media = 13.2 horas) se utiliza para gammagrafía del cuerpo completo, ^{124}I (vida media = 4 días) se utiliza para tomografía de emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés), ^{125}I (vida media = 60 días) se utiliza para estudios de cambio metabólico y ^{131}I (vida media = 8 días) se utiliza para estudios con imágenes de conteo completo del cuerpo y de resolución baja retrazada.

50 En una modalidad, un componente "P" se prepara en una forma de "profármaco", en donde el componente "P" mismo no se une a una proteína amiloidogénica, sino en su lugar es capaz de ser transformado, luego del metabolismo *in vivo*, en un péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica, como se definió aquí. Una variedad de estrategias son conocidas en la técnica para preparar profármacos de péptido que limitan el metabolismo con el fin de optimizar el suministro de la forma activa del fármaco basado en péptido (ver, por ejemplo, Moss, J. (1995) en Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, Taylor, M.D. y Amidon G.L. (eds), Capítulo 18. Adicionalmente las estrategias se han ajustado específicamente para lograr el suministro de CNS con base en el "metabolismo secuencial" (ver, por ejemplo, Bodor, N., *et al.* (1992) Science 257:1698-1700; Prokai, L., *et al.* (1994) J. Am. Chem. Soc. 116: 2643-2644; Bodor, N. y Prokai, L. (1995) en Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, Taylor, M.D. y Amidon, G.L. (eds), Capítulo 14. En una modalidad de una forma de profármaco de un componente "P", el grupo modificador comprende un alquil éster para facilitar la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro.

65 Los péptidos capaces de unir una proteína amiloidogénica (el componente "P" en los compuestos de la invención) se puede separar mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como aquellas descritas en Bodansky, M. Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin (1993) y Grant, G.A. (ed.). Synthetic Peptides: A User's Guide, W.H. Freeman and Company, New York (1992). Los sintetizadores de péptido automatizados están comercialmente disponibles (por ejemplo, Advanced ChemTech Modelo 396; Milligen/Bioscience 9600). Adicionalmente, uno o más grupos modulantes se pueden unir al componente "P" mediante métodos estándar, por ejemplo utilizando métodos

para la reacción a través del grupo amino (por ejemplo, el grupo alfa-amino en el amino-terminal de un péptido), un grupo carboxilo (por ejemplo, en el terminal carboxi de un péptido), un grupo hidroxilo (por ejemplo, sobre un residuo tirosina, serina o treonina) u otro grupo reactivo adecuado sobre una cadena lateral de amino ácido (ver, por ejemplo, Greene, T.W y Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Inc., New York (1991).

5

Más aún, los compuestos de la invención que comprenden un componente “P” se pueden generar como proteínas de fusión que utilizan técnicas de ADN recombinante estándar, como se describe adelante adicionalmente en detalle.

10

III. Métodos para Preparar los Compuestos de la Invención

Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un segmento de ésta, por ejemplo, un fragmento que comprende la región Fc, (“I”) y el péptido capaz de unirse a la proteína amiloidogénica (“P”) se pueden preparar, como se describió en las secciones anteriores, y reticular químicamente por vía de un grupo reticulador. Numerosos agentes reticulanetes químicos son conocidos en el arte (por ejemplo, aquellos comercialmente disponibles de Pierce, Rockford IL). Un agente reticulante se puede escoger el cual permite para alto rendimiento el acoplamiento de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina al péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.

20

Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden preparar como proteínas de fusión que utilizan técnicas de ADN recombinante estándar como se describió en, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. En resumen, una construcción se puede generar, en un vector de expresión apropiado, en el cual una molécula de ácido nucleico que codifica una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de ésta, por ejemplo, un fragmento que comprende la región Fc, (“I”) está operativamente ligado a una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica (“P”). El término “operativamente ligado” pretende indicar que el polipéptido de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina codificada y el péptido capaz de unirse a la proteína amiloidogénica se fusionan en marco uno al otro. El polipéptido de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se puede fusionar al N-terminal o al C-terminal del péptido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica, en tanto que la actividad del compuesto resultante se retiene. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las dos secuencias de polipéptido están ligados juntos en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear terminales de extremos cerrado o extremo escalonado para ligación, digestión de enzima de restricción para suministrar los terminales apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar las uniones indeseables, y ligación enzimática.

25

La amplificación PCR de los fragmentos de gen también se puede llevar a cabo utilizando los cebadores de ancla que dan origen a los sobrecuelgos complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden ser sucesivamente hibridizados y re-amplificados para generar una secuencia de gen químérico (ver, por ejemplo, Current

40

protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992).

50

El vector de expresión resultante se puede introducir en una célula huésped apropiada para producir de esta manera la proteína de fusión. Los vectores de expresión recombinantes utilizados se pueden diseñar para expresión de la proteína de fusión en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, las proteínas de fusión anteriores se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (que utilizan vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Las células huéspedes adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in Vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimeraza T7.

55

El sitio preciso en el cual se hace la fusión no es crítico; los sitios particulares son bien conocidos y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica y las características de unión de los componentes “P” e “I” de los compuestos de la invención. Típicamente, tales fusiones retienen al menos una funcionalidad activa CH1, CH2, CH3, y/o el dominio de pivote de la región constante de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina. En modalidades preferidas, las proteínas de fusión retienen un dominio CH2 funcionalmente activo de la región constante de cadena pesada de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones se pueden hacer en el C-terminal del dominio CH3 de la región constante de cadena pesada, o inmediatamente N-terminal al dominio CH1 de la región constante de cadena pesada. Preferiblemente, P se fusiona, opcionalmente por vía de L, al N-terminal de I.

60

Preferiblemente, I incluye los dominios CH2 y CH3 y el dominio de pivote o una porción de éste. En una modalidad particularmente preferida, I incluye los dominios CH2 y CH3 y el dominio de pivote o una porción de éste, pero no incluye el dominio CH1. En esta modalidad, P se fusiona directamente por vía de un ligador al N-terminal de I.

65

La expresión de las proteínas de fusión de la invención se puede lograr utilizando una variedad de construcciones. Las construcciones que contienen una secuencia líder con o sin un propéptido expresan y secretan las proteínas de fusión directamente hacia el sobrenadante. Además, las proteínas de fusión de la invención se pueden fusionar a un dominio extracelular de una proteína de membrana, tal como el dominio extracelular del receptor FGF, el receptor TNF o gp 120, por ejemplo, con un sitio de descomposición de proteaza entre las dos fusiones. En una modalidad

ES 2 283 463 T3

preferida, el sitio de descomposición de proteaza es un sitio enteroquinaza. En esta modalidad, la proteína de fusión grande que incluye el dominio extracelular se expresa y se secreta en el sobrenadante y la proteína de fusión deseada de la invención se puede separar del dominio extracelular mediante descomposición específica con enteroquinaza.

- 5 En algunas modalidades los compuestos de la invención se ensamblan como monómeros, hetero u homodímeros, o como multímeros. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la cual el IgG, IgD, e IgE existen. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular superior; el IgM generalmente existe como un pentámero de una unidad de cuatro cadenas básica mantenida junto con las uniones disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero. En el
10 caso de los multímeros, cada unidad de cuatro cadenas puede ser igual o diferente.

Preferiblemente, los compuestos de la invención se preparan como dímeros con dos unidades monoméricas ligadas por vía de uniones disulfuro entre las dos regiones constantes de cadena pesada o los fragmentos de éstas, por ejemplo, los fragmentos que comprenden la región Fc. Los compuestos de la invención se pueden preparar como homodímeros o como heterodímeros, por ejemplo, como heterodímeros de los compuestos que contienen los diferentes componentes "P".
15

IV. Composiciones Farmacéuticas

- 20 Otro aspecto de la invención pertenece a composiciones farmacéuticas de los compuestos de la invención. En una modalidad, la composición incluye un compuesto de la invención en una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva suficiente para unirse a una proteína amiloidogénica y dirigida a una célula microglial, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como la reducción de la deposición de
25 proteína amiloidogénica y/o la reducción o el reverso de la neurotoxicidad relacionada con la proteína amiloidogénica. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto a elicitar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosis se pueden ajustar para suministrar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la cual cualquier efecto tóxico o de detrimento del compuesto son preponderados por los efectos terapéuticamente benéficos. La neurotoxicidad potencial de los compuestos de la invención se puede ensayar utilizando los ensayos descritos aquí y un compuesto terapéuticamente efectivo se puede seleccionar el cual no exhiba neurotoxicidad significativa. En una modalidad preferida, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención es suficiente para alterar, y preferiblemente inhibir, la agregación de una cantidad molar en exceso de proteínas amiloidogénicas. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a
30 una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado, tal como evitar o inhibir la tasa de deposición de proteína amiloidogénica y/o la neurotoxicidad asociada a la proteína amiloidogénica en un sujeto predispuesto a deposición de la proteína amiloidogénica. Una cantidad profilácticamente efectiva se puede determinar como se describió anteriormente para la cantidad terapéuticamente efectiva. Típicamente, en razón a que se utiliza la dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad
35 profilácticamente efectiva será menos que la cantidad terapéuticamente efectiva.
40

Un factor que puede ser considerado cuando se determina una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del compuesto de la invención es la concentración de una proteína amiloidogénica, por ejemplo, β -AP natural, en una muestra biológica obtenida de un sujeto, tal como en el fluido cerebroespinal (CSF por sus siglas en inglés) del sujeto. La concentración del β -AP natural en el CSF (por sus siglas en inglés) se ha estimado en 3nM (Schwartzman, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8368-8372). Un rango no limitante para una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de un compuesto de la invención es 0.01 nM-10 μ M.
45

Se debe notar que los valores de dosis pueden variar con la severidad de la condición a ser aliviada. Se debe entender además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos se deben ajustar durante el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de los compuestos, y que los rangos de dosificación establecidos aquí son sólo ejemplos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.
50

55 La cantidad del compuesto en la composición puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del sujeto, cada uno de los cuales puede afectar la cantidad de proteína amiloidogénica en el sujeto. Los regímenes de dosis se pueden ajustar para suministrar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, un bolo simple se puede administrar, varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es esencialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma unitaria de dosis como se utiliza aquí se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias en los sujetos mamíferos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosis de la invención son dictadas por y dependen directamente de
60 (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de hacer compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.
65

ES 2 283 463 T3

Como se utiliza aquí “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifungosos, isotónicos y agentes retrazantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. En una modalidad, el vehículo es adecuado para administración parenteral o para administración por vía de inhalación. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para la administración

- 5 en el sistema nervioso central (por ejemplo, intraespinalmente o intracerebralmente). Alternativamente, el vehículo puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. En otra modalidad, el vehículo es adecuado para administración oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de las soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el arte.
- 10 Excepto hasta ahora como cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de éstos en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles e inestables bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similar), y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar al incluir en la composición un agente que retraza la absorción, por ejemplo, sales de monostearato y gelatina. Más aún, los compuestos de la invención se pueden administrar en una formulación de liberación en el tiempo, por ejemplo en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Las formulaciones de liberación en el tiempo se describen en la Patente U.S. No. 5,968,895, incorporada aquí en su totalidad como referencia. Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulado. Los polímeros biodegradables, biocompatibles se pueden utilizar, tal como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliacético y poliláctico, copolímeros poliglicólicos (PLG por sus siglas en inglés). Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar 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 los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son, secado por vacío y secado por congelamiento el cual produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril-filtrada previamente de ésta.

40 Un compuesto de la invención se puede formular con uno o más compuestos adicionales que mejoren la solubilidad del compuesto. Los compuestos preferidos a ser agregados a las formulaciones para mejorar la solubilidad de los compuestos de la invención son derivados de ciclodextrina, preferiblemente hidroxipropil- γ -ciclodextrina. Los vehículos de suministro de fármaco que contienen un derivado de ciclodextrina para el suministro de péptidos al sistema nervioso central se describe en Bodor, N., *et al.* (1992) Science 257:1698-1700. Para los compuestos descritos aquí, la inclusión en la formulación del hidroxipropil- γ -ciclodextrina en una concentración de 50-200 mM puede incrementar la solubilidad acuosa de los compuestos. Además a la solubilidad incrementada, la inclusión de un derivado de ciclodextrina en la formulación puede tener otros efectos benéficos, en razón a que la β -ciclodextrina misma se ha reportado por interactuar con una proteína amiloidogénica, por ejemplo, el péptido A β , e inhibir la formación de fibrila *in Vitro* (Camilleri, P., *et al.* (1994) FEBS Letters 341:256-258. De acuerdo con esto, el uso de un compuesto de la invención en combinación con un derivado de ciclodextrina puede resultar en una mayor inhibición de la agregación de A β que el uso de un compuesto sólo. Las modificaciones químicas de la ciclodextrina son conocidas en la técnica (Hanessian, S., *et al.* (1995) J. Org. Chem. 60:4786-4797).

55 Otra formulación preferida de los compuestos de la invención que ayuda a mejorar la toma del cerebro comprende el detergente Tween-80, polietilenglicol (PEG por sus siglas en inglés) y etanol en solución salina. Un ejemplo no limitante de tal formulación preferida es 0.16% de Tween-80, 1.3% de PEG-3000 y 2% de etanol en solución salina.

En otra modalidad, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención se formula de tal forma que el compuesto se transporta a través de la barrera sangre-cerebro (BBB por sus siglas en inglés). Las varias estrategias conocidas en la técnica para incrementar el transporte a través del BBB se pueden adaptar a los compuestos de la invención para mejorar de esta manera el transporte de los compuestos a través del BBB (para revisiones de tales estrategias, ver por ejemplo, Pardridge, W.M. (1994) Trends in Biotechnol. 12:239-245; Van Bree, J.B. *et al.* (1993) Pharm. World Sci. 15:2-9; y Pardridge, W.M. *et al.* (1992) Pharmacol. Toxicol. 71:3-10). En una aproximación, el compuesto es químicamente modificado para formar un profármaco con transporte de transmembrana mejorada. Las modificaciones químicas adecuadas incluyen enlace covalente de un ácido graso al compuesto a través de una amida o enlace éster (ver por ejemplo, Patente Estadounidense 4, 933, 324 y Publicación PCT WO 89/07938, ambas otorgadas a Shashoua, Patente Estadounidense 5, 284, 876 otorgada a Hesse *et al.*; Toth, L. *et al.* (1994) J. Drug Target. 2:217-

239; y Shashoua, V.E. *et al.* (1984) J. Med. Chem. 27:659-664) y hacer glicación al compuesto (ver por ejemplo Patente Estadounidense 5, 260, 308 otorgada a Poduslo *et al.*). También, se pueden utilizar derivados de ácido N-acilamino en un compuesto para formar un profármaco "lipídico" (ver por ejemplo, 5, 112, 863 otorgada a Hashimoto *et al.*).

5 En otra aproximación para mejorar el transporte a través del BBB, se conjuga un compuesto a un segundo péptido o proteína, formando por lo tanto una proteína quimérica, en donde el segundo péptido o proteína experimenta transcitosis mediada por receptor o mediada por absorbito a través del BBB. De acuerdo con esto, al acoplar el compuesto a su segundo péptido o proteína, la proteína quimérica se transporta a través del BBB. El segundo péptido o proteína 10 puede ser un ligando de receptor de célula endotelial de capilar de cerebro. Por ejemplo, un ligando preferido es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al receptor de transferrina en células endoteliales de capilares del cerebro (ver por ejemplo, Patentes Estadounidenses 5, 182, 107 y 5, 154, 924 y Publicaciones PCT WO 93/10819 y WO 95/02421, todas otorgadas a Friden *et al.*). Otros péptidos adecuados o proteínas que pueden mediar el transporte a través del BBB incluyen histonas (ver por ejemplo, Patente estadounidense 4, 902, 505 otorgada a Pardridge y Schimmel) y ligandos tales como biotina, folato, niacina, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina, piridoxal y ácido ascórbico 15 (ver por ejemplo, Patentes Estadounidenses 5,416,016 y 5,108,921 otorgadas ambas a Heinstein). Adicionalmente, el transportador de glucosa GLUT-1 se ha reportado por transportar glicopéptidos (análogos de L-serinil- β -D-glucósido de [Met5] encefalina) a través del BBB (Polo, R. *et al.* (1994) Natl. Acad. Sci. USA 91:7114-1778). De acuerdo con esto, un compuesto de la invención se puede acoplar a tal un glicopéptido para objetivar el compuesto al transportador 20 de glucosa GLUT-1. Las proteínas químéricas se pueden formar mediante métodos de ADN recombinante (por ejemplo mediante formación de un gen químérico que codifica una proteína de fusión) o mediante reticulación química del compuesto para el segundo péptido o proteína para formar una proteína químérica como se describió anteriormente.

En aún otra aproximación para mejorar el transporte a través del BBB, el compuesto de la invención se capsula en 25 un vector portador que media el transporte a través del BBB. Por ejemplo, el compuesto se puede encapsular en un liposoma, tal como un liposoma uniláminar cargado positivamente (ver por ejemplo, Publicaciones PCT WO 88/07851 y WO 88/07852, ambas otorgadas a Faden) o en micro esferas poliméricas (ver por ejemplo, Patente Estadounidense 5, 413, 797 otorgada a Khan *et al.*; Patente Estadounidense 5, 271, 961 otorgada a Mathiowitz *et al.* y 5, 019, 400 otorgada a Gombotz *et al.*). Más aún, el portador se puede modificar para objetivarlo para transporte a través del 30 BBB. Por ejemplo, el portador (por ejemplo liposoma) se puede modificar covalentemente con una molécula que se transporta activamente a través del BBB o con un ligando para los receptores de célula endotelial de cerebro, tal como un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a los receptores de transferrina (ver por ejemplo, publicaciones PCT WO 91/04014 otorgada a Collins *et al.* y WO 94/02178 otorgada a Greig *et al.*).

35 Todavía en otra aproximación para mejorar el transporte del compuesto BBB, el compuesto se puede formular con otro agente que funciona para permeabilizar el BBB. Ejemplo de tales "permeabilizadores" del BBB incluyen agonistas de bradikinina y bradikinina (ver por ejemplo, Patente Estadounidense 5, 112, 596 otorgada a Malfroy-Camine) y compuestos peptídicos descritos en la Patente Estadounidense 5, 268, 164 otorgada a Kozarich *et al.*

40 Ensayos que miden la estabilidad *in Vitro* de los compuestos en el fluido cerebro espinal (CSF) y el grado de la toma del cerebro de los compuestos en modelos animales se puede utilizar como pronóstico de eficacia *in vivo* de los compuestos. Ensayos adecuados para medir la estabilidad del CSF y la toma del cerebro se describen aquí.

45 Un compuesto de la invención se puede formular en una composición farmacéutica en donde el compuesto de la invención es el único compuesto activo o, alternativamente, la composición farmacéutica puede contener compuestos activos adicionales. Por ejemplo, dos o más compuestos se pueden utilizar en combinación. Más aún, un compuesto de la presente invención se puede combinar con uno o más de otros agentes que pueden tener propiedades anti-amiloidogénicas. Por ejemplo, un compuesto de la invención se puede combinar con el inhibidor de colinesterasa no específico tacrina (COGNEX®, Parke-Davis) con Aricept™, inhibidores de secretasa, u otros agentes conocidos por 50 tratar una condición neurológica.

En otra modalidad, una composición farmacéutica de la invención se suministra como una formulación empacada. La formulación empacada puede incluir una composición farmacéutica de la invención en un recipiente y con instrucciones impresas para la administración de la composición para tratar un sujeto que tiene un trastorno amiloidogénico, 55 por ejemplo, enfermedad de Alzheimer.

V. Métodos para utilizar los compuestos de la invención

Otro aspecto de la invención pertenece a los métodos para tratar un sujeto que sufre de un trastorno amiloidogénico 60 al administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención, que trata por lo tanto el sujeto que sufre de un trastorno amiloidogénico.

Un "trastorno amiloidogénico" incluye cualquier enfermedad, trastorno o condición originada o caracterizada por depósitos de proteínas amiloidogénicas. Ejemplos no limitantes de proteínas amiloidogénicas o péptidos, y sus trastornos amiloidogénicos asociados, incluyen:

Transtiretina (TTR)-amiloides que contienen transtiretina ocurren en la poli neuropatía amiloide familiar (tipo portugués, Japonés y Sueco), cardiopatía amiloide familiar (tipo Danés), amiloidosis senil sistémica y amiloide cardiaca

ES 2 283 463 T3

aislada. Fragmentos de péptido de transtiretina se han mostrado por formar fibrilos amiloideos *in Vitro*. Por ejemplo, TTR 10-20 y TTR 105-115 forman fibrillas similares a amiloïdes en 20-30% de acetonitrilo/agua a temperatura ambiente (Jarvis, J. A., *et al.* (1994) Int. J. Pept. Protein Res. 44:388-398). Más aún, la cardiomiopatía familiar (tipo Danés) se asocia con una mutación de Leu en la posición 111 a Met, y un análogo de TTR 105-115 en el que el Leu

5 tipo natural en la posición 111 se ha sustituido con Met (TTR 105-115, met 111) también forma fibrillas similares a amiloïde *in vitro* (ver por ejemplo, Hermansen, L.F. *et al.* (1995) Eur. J. Biochem. 227: 772-779; Jarvis *et al. Supra*). Fragmentos de péptidos de TTR que forman fibrillas amiloïdes *in vitro* también se describen en Jarvis, J.A., *et al.* (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun 192:991-998 y Gustavsson, A., *et al.* (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 175:1159-1164). Un fragmento de péptido de tipo natural o transtiretina mutada que forma fibrillas amiloïdes se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de una poli neuropatía amiloïde familiar (tipo Portugués, Japonés y Sueco), cardiomiopatía amiloïde familiar (tipo Danés), amiloidosis senil sistémica o amiloïde cardiaca aislada.

15 Proteína Priónica (PrP)- los amiloïdes en un número de encefalopatías esponjiformes, que incluye encefalopatía esponjiforme ovina, encefalopatía esponjiforme bovina en vacas y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ) y síndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) en humanos, contienen PrP. La proteólisis limitada del PrP Sc (proteína priónica asociada con encefalopatía esponjiforme) conduce a un fragmento de 27-30 KdA (PrP 27-30) que polimeriza en amiloïdes con forma de barra (ver por ejemplo, Pan, K.M. *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10962-10966; Gasset M., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1-5). Los fragmentos de péptido del PrP de humanos y otros 20 mamíferos se han mostrado por formar fibrillas amiloïdes *in Vitro*. Por ejemplo, los poli péptidos que corresponden a las secuencias codificadas por alelos mutantes y normales del gen PRNP (que codifica el precursor de la proteína priónica involucrada en el CJ), en las regiones de codón 178 y codón 200, forman espontáneamente fibrillas amiloïdes *in vitro* (ver por ejemplo, Goldfarb, L.G. *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4451-4454). Un péptido que abarca residuos 106-126 del PrP humano se ha reportado que forma fibrillas rectas similares a aquellas extraídas de 25 cerebros GSS, mientras que un péptido que abarca residuos 127-147 de PrP humano se ha reportado que forma fibrillas retorcidas que semejan fibrillas asociadas con encefalitis esponjiforme (Tagliavini, F. *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 9678-9682). Los péptidos de PrP de hámster Sirio que abarcan los residuos 109-122, 113-127, 113-120, 178-191 o 202-218 se han reportado por formar fibrillas amiloïdes, con el péptido más amiloidogénico que es ALA-GLY-ALA-ALA-ALA-ALA-GLY-ALA (SEQ ID No: 4), que corresponde a residuos 113-120 del PrP de hámster 30 sirio pero que también se conserva en PrP de otras especies (Gasset, M., *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10940-10944). Un fragmento de péptido del PrP que forma fibrillas amiloïdes se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de encefalitis esponjiforme, encefalopatía esponjiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o síndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS).

35 Poli péptido amiloïde islote (IAPP, también conocido como amilina)- el IAPP que contiene amiloïdes ocurre en aparición de diabetes e insulinoma en adultos. El IAPP es un poli péptido de aminoácido 37 formado de una proteína precursora de aminoácido 89 (ver por ejemplo, Betsholtz, C., *et al.* (1989) Exp. Cell. Res. 183: 484-493; Westermark, P., *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3881-3885). Un péptido que corresponde a los residuos IAPP 20-29 se ha reportado por formar fibrillas similares a amiloïdes *in Vitro*, con residuos 25-29, que tienen la secuencia ALA-Ile-Leu-Ser-Ser (SEQ ID No: 5), que es fuertemente amiloidogénico (Westermark, P., *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5036-5040; Glener, G. G., *et al.* (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155: 608-614). Un fragmento de péptido de IAPP que forma fibrillas amiloïde se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de la aparición de diabetes o insulinota en adulto.

45 Factor natriurético auricular (ANF)-los amiloïdes que contienen ANF se asocian con amiloïdes auriculares aislados (ver por ejemplo, Johansson, B., *et al.* (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 1087-1092). El ANF corresponde a residuos de aminoácidos 99-126 (proANF 99-126) de la prohormona ANF (proANP 1-126) (Pucci, A. *et al.* (1991) J. Pathol. 165: 235-241). EL ANF, o fragmento de este, que forma fibrillas amiloïdes se puede utilizar como 50 se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloïde auricular aislado.

55 Cadena liviana kappa o lambda - los amiloïdes que contienen cadenas livianas kappa o lambda es amiloidosis (primaria) idiopática asociada, amiloidosis asociada con macro globulinemia o mieloma, y amiloidosis nodosa cutánea localizada primariamente asociada con el síndrome de Sjögren. La estructura de las cadenas liviana kappa y lambda amiloidogénicas, que incluyen análisis de secuencia de aminoácido, se ha caracterizado (ver por ejemplo, Buxbaum, J. N., *et al.* (1990) Ann. Intern. Med. 112: 455-464; Schormann, N., *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9490-9494; Hurle, M.R. *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5446-5450; Liepniks, J.J. *et al.* (1990) Mol. Immunol. 27: 481-845; Gertz, M. A., *et al.* (1985) Scand. J. Immunol. 22: 245-250; Inazumi, P., *et al.* (1994) Dermatology 189: 125-128). Las cadenas livianas kappa o lambda, o un fragmento de péptido de este que forma fibrillas amiloïdes, se 60 puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis (primaria Idiopática, amiloidosis asociada con macro globulinemia o mieloma o amiloidosis nodosa cutánea localizada primariamente asociada con el síndrome de Sjögren).

65 Amiloïde A- la amiloidosis que contiene la proteína amiloïde A (proteína AA), derivada del amiloïde suero A, se asocia con amiloidosis secundaria reactiva (secundaria) (ver por ejemplo, Liepniks, J.J. *et al.* (1995) Biochem. Biophys. Acta 1270: 81-86), nefropatía amiloïde familiar y fiebre mediterránea familiar con urticaria y sordera (síndrome moco-wells) (ver por ejemplo, Linke, R. P., *et al.* (1983) Lab. Invest. 48: 698-704). El amiloïde de suero A humano recombinante forma fibrillas similares a amiloïdes *in Vitro* (Yamada, T., *et al.* (1994) Biochim. Biophys. Acta

ES 2 283 463 T3

1226: 323-329) y los estudios de dicroismo circular revelan una estructura de lámina β /giro predominante (McCubbin, W. D., *et al.* (1988) Biochem J. 256: 775-783). El A amiloide de suero, la proteína A amiloide o un fragmento de esta que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis reactiva (secundaria), nefropatía amiloide familiar y fiebre mediterránea familiar con urticaria y sordera (síndrome moco-wells).

5 Cistatina C- los amiloides que contienen una variante de la cistatina C se asocian con hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Islandés. La enfermedad se asocia con una mutación de glicina A leucina en la posición 10 68 y la cistatina C que contiene está mutación se agrega *in Vitro* (Abrahamson, M. y Grubb, A. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1416-1420). La cistatina C o un fragmento de péptido de esta que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Islandés.

15 Microglobulina β 2- los amiloides que contienen microglobulina β 2 (β 2M) tienen una mayor complicación de hemodiálisis a largo plazo (ver por ejemplo, Stein, G., *et al.* (1994) Nephrol. Dial. Transplant. 9: 48-50; Floege, J., *et al.* (1992) Kidney Int. Suppl. 38: S78-S85; Maury, C. P. (1990) Rheumatol. Int. 10: 1-8). La proteína β 2M nativa ha sido mostrada por formar fibrillas amiloides *in vitro* (Connord, L. H. *et al.* (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 131: 1063-1068; Ono, K. *et al.*, (1994) Nephron 66: 404-407). La β 2M, o un fragmento de péptido de esta que forma fibrillas amiloides, se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis asociada con hemodiálisis a largo plazo.

20 Apolipoproteína A-L (ApoA-L)- los amiloides que contienen formas variantes de ApoA-L se han encontrado en amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria (poli neuropatía amiloide familiar iii). Por ejemplo, fragmentos del terminal N, residuos 1-86, 1-92 y 1-93) de una variante ApoA-L que tiene una mutación Arg a Trp en la posición 25 50 se han detectado en amiloides (Booth, D. R. *et al.* (1995) QJM. 88: 695-702). En otra familia, una mutación de arginina aleucina en la posición 60 se encuentra (Soltar, A. K. *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7389-7393). El ApoA-L o un fragmento de péptido de este que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria.

30 Gelsolina - los amiloides que contienen variantes de gelsolina se asocian con amiloidosis familiar del tipo Finnish. Los péptidos de gelsolina sintéticos que tienen homología de secuencia con tipo natural o gelsolinas mutantes y que forman fibrillas amiloides *in Vitro* se reportan en Maury, C. P. *et al.* (1994) Lab. Invest. 70: 558-564. Un segmento de nueve residuos que rodea el residuo 187 (que se muta en amiloidosis de gelsolina familiar) se define como una 35 región amiloidogénica (Maury, *et al.*, *supra*; ver también Maury C. P. *et al.* (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183: 227-231; Maury, C. P. (1991) J. Clin. Invest. 87: 1195-1199). La gelsolina o un fragmento de péptido de esta que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis familiar del tipo Finnish.

40 Procalcitonina o calcitonina- los amiloides que contienen procalcitonina, calcitonina o inmuno reactividad similar a la calcitonina se han detectado en fibrillas amiloides asociadas con carcinoma medular de la tiroides (ver por ejemplo, Butler, M. y Khan, S. (1986) Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 647-649; Sletten, K., *et al.* (1976) J. Exp. Med. 143: 993-998). La calcitonina, se ha mostrado por formar una estructura en forma de fibrillas no ramificada *in Vitro* (Kedar, I., *et al.* (1976) Isr. J. Med. Sci. 12: 1137-1140). La procalcitonina, calcitonina o un fragmento de esta, que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis asociada con carcinoma medular de la tiroides.

50 Fibrinógeno- los amiloides que contienen una forma variante de cadena alfa de fibrinógeno se han encontrado en amiloidosis renal hereditaria. Una mutación de leucina a arginina en la posición 554 se ha reportado en la proteína de fibrillas amiloide aislada de riñón post mortem de un individuo afectado (Benson, M. D. *et al.* (1993) Nature Genetics 3: 252-255). La cadena alfa de fibrinógeno o un fragmento de péptido de esta que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis renal hereditaria asociada con fibrinógeno.

55 Lisosima- los amiloides que contienen una forma variante de lisosima se han encontrado en amiloidosis sistémica hereditaria. En una familia la enfermedad se asocia con una mutación de isoleucina a treonina en la posición 56, mientras que en otra familia la enfermedad se asocia con una mutación de ácido aspártico a histidina en la posición 67 (Pepys, M. B. *et al.* (1993) Nature 362: 553-557). La lisosima o un fragmento de péptido de esta que forma fibrillas amiloides se puede utilizar como se describe aquí para crear un compuesto que se puede utilizar en la detección o tratamiento de amiloidosis sistémica hereditaria asociada con lisosima.

60 Los métodos de la invención también se pueden utilizar profilácticamente o terapéuticamente para tratar otras ocurrencias clínicas de deposición de proteína amiloidogénica, tal como en individuos con síndrome de Down y en pacientes con hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis del tipo Holandés (HCHWA-D). Adicionalmente, la acumulación anormal de proteínas amiloidogénicas, por ejemplo, proteína precursora β -amiloide en fibras musculares se ha implicado en la patología de la miocitis corporal de inclusión esporádica (IBM) (Askanas, V. *et al.*, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1314-1319; Askanas, V. *et al.* (1995) Current. Opinión in Rheumatology 7: 486-496). De acuerdo con esto, los compuestos de la invención se pueden utilizar profilácticamente o terapéuticamente

ES 2 283 463 T3

en el tratamiento de trastornos en el que las proteínas amiloidogénicas se depositan anormalmente en ubicaciones no neurológicas, tal como el tratamiento de IBM por suministro de los compuestos a las fibras musculares.

- Los compuestos de la invención se pueden administrar a un sujeto mediante cualquier ruta adecuada efectiva para inhibir la agregación de proteína amiloidogénica en el sujeto, aunque en una modalidad particularmente preferida, el compuesto se administra parenteralmente, más preferiblemente al sistema nervioso central del sujeto. Las rutas posibles de administración al SNC incluyen administración intra espinal y administración intra cerebral (por ejemplo administración intra cerebro vascular). Alternativamente, el compuesto se puede administrar, por ejemplo, oralmente, intra peritonealmente, intra penosamente o intra muscularmente. Para las rutas de administración diferentes al SNC, el compuesto se puede administrar en una formulación que permite el transporte a través del BBB. Ciertos compuestos se pueden transportar a través del BBB sin ninguna modificación adicional mientras que otras pueden necesitar modificación adicional como se describió anteriormente en la subsección IV.

Dispositivos y formas adecuadas para suministro de los compuestos de la invención al SNC de un sujeto se conocen en la técnica, e incluyen reservorios cerebro vasculares (por ejemplo, reservorios Ommaya o Riker; ver por ejemplo, Raney, J. P. *et al.* (1998) *J. Neurosci. Nurs.* 20: 23-29; Sundaresan, N. *et al.* (1898) *Oncology* 3: 15-22), catéteres para suministro intratecal (por ejemplo, Port-a-Cath, catétere Y y similares; ver por ejemplo (Plumier, J. L. (1991) PAIn 44: 215-220; Yaksh, T. L. *et al.* (1986) *Pharmacol. Biochem. Beba.* 25: 483-485), reservorios intratecales inyectables (por ejemplo, Spinalgesic; ver por ejemplo, Brazenor, G. A. (1987) *Neu-rosurgery* 21: 484-491), sistemas de bomba de fusión implantables (por ejemplo Infusaid; ver por ejemplo, Zierski, J. *et al.* (1988) *Acta Neu-rochem. Suppl.* 43: 94-99; Kanoff, R. B. (1994) *J. Am. OSteopath. Assoc.* 94: 487-493) y bombas osmóticas (vendidas por Alza Corporation). Una forma particularmente preferida de administración es por vía de una bomba de infusión programable externamente, implantable. Los sistemas de bomba de infusión adecuada y sistemas de reservorio también se describen en la Patente Estadounidense No 5, 368, 562 otorgada a Blomquis y la Patente Estadounidense número 4, 731, 058 25 otorgada a Doan, desarrollada por Farmacia Deltec Inc.

Los métodos de la invención incluyen adicionalmente administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención en combinación con otro compuesto farmacéuticamente activo conocido por inhibir la deposición de proteína amiloidogénica, por ejemplo, un derivado de ciclodextrina, o en combinación con un agente que funciona para permeabilizar la barrera hematoencefálica (BBB). Ejemplo de tales "permeabilizadores" de BBB incluyen agonistas de bradikinina y bradikinina (ver por ejemplo Patente Estadounidense número 5, 112, 596 otorgada a Malfroy-Camine) y los compuestos peptídicos descritos en la Patente Estadounidense 5, 268, 164 otorgada a Kozarich *et al.* Otros compuestos activos farmacéuticamente que se pueden utilizar en los métodos de la invención se pueden encontrar en Harrison's Principles of Internal Medicine, Thirteenth Edition, Eds. T. R. Harrison *et al* - McGraw - Hill N. Y., NY; y el Physicians Desk Reference 50th Edition 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co., los contenidos completos se incorporan expresamente aquí como referencia. Los compuestos de la presente invención y el compuesto farmacéuticamente activo adicional se puede administrar al sujeto en la misma composición farmacéutica o en diferentes composiciones farmacéuticas (al mismo tiempo o en diferentes tiempos).

En aún otra modalidad, la presente invención suministra métodos para tratar un sujeto que sufre de un trastorno amiloidogénico al administrar al sujeto un vector de expresión recombinante que codifica un compuesto de la invención de tal forma que el compuesto se sintetiza en el sujeto, tratando por lo tanto al sujeto que sufre de un trastorno amiloidogénico.

Las construcciones que codifican los compuestos de la invención se pueden insertar en vectores adecuados para uso como vectores de terapia de gen. Los vectores de terapia de gen se pueden suministrar a un sujeto, por ejemplo, por inyección intra venosa, administración local (ver Patente Estadounidense 5, 328, 470) o por inyección estereo táctica (ver por ejemplo, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). Una preparación farmacéutica del vector de terapia de gen también se puede administrar a un sujeto. La preparación farmacéutica del vector de terapia de gen puede incluir el vector de terapia de gen con un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se embede el vehículo de suministro del gen. Alternativamente, cuando el vector de suministro de gen completo se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retro virales, una preparación farmacéutica que incluye una o más células que producen el sistema de suministro de gen se puede administrar al sujeto.

En otra modalidad, un compuesto de la invención se puede utilizar *in vivo* para detectar, y, si se desea, cuantificar la deposición de la proteína amiloidogénica en un sujeto para, por ejemplo, ayudar el diagnóstico de un trastorno amiloidogénico en el sujeto, para ayudar en la detección, el compuesto se puede modificar con una sustancia detectable, preferiblemente ^{99m}Tc o yodo radiactivo (descrito anteriormente), que se puede detectar *in vivo* en un sujeto. El compuesto etiquetado se administra al sujeto y, después de un tiempo suficiente permite la acumulación del compuesto en los sitios de deposición del amiloide, el compuesto etiquetado se detecta mediante técnicas de formación de imágenes estándar. La señal radioactiva generada por el compuesto etiquetado se puede detectar directamente (por ejemplo, conteo corporal completo), o alternativamente, la señal radiactiva se puede convertir en una imagen o en una auto radiografía o en una pantalla de computador para permitir la formación de imagen de los depósitos amiloides en el sujeto. Los métodos para formación de imagen de amiloidosis que utilizan proteínas radio-etiquetadas se conocen en la técnica. Por ejemplo, el componente p amiloide de suero (SAP), radio etiquetado con ¹²³I o ⁹⁹MTC, se ha utilizado para imágenes de amiloidosis sistémica (ver por ejemplo, Hawkins, P. N. y Pepys, M. B. (1995) *Eur. J. Nucl. Med.* 22: 595-599). De varios isotipos de yodo radiactivo, preferiblemente el ¹²³I (vida media = 13.2 horas) se utiliza para gam-

ES 2 283 463 T3

magrafía de cuerpo completo, se utiliza ^{124}L (vida media = 4 días) para tomografía de emisión de positrones (PET), se utiliza ^{125}L (vida media = 60 días) para estudios de recambio metabólico y se utiliza ^{131}L (vida medio = 8 días) para estudios de formación de imagen de baja resolución retrasados y conteo corporal completo. Análogos para estudios que utilizan SAP radio etiquetado, un compuesto etiquetado de la invención se puede suministrar a un sujeto mediante una ruta apropiada (por ejemplo, intra venosamente, intra espinalmente, intra cerebralmente) en un bolo único, por ejemplo que contiene 100 μg de compuesto etiquetado que lleva aproximadamente 180 MBq de radioactividad.

VI. Agentes terapéuticos que comprenden la forma I-L-P'

10 En otra modalidad, la presente invención suministra un método para preparar un agente terapéutico que comprende la forma I-L-P', en donde I es una inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD, o IgE, fragmento o región constante de cadena pesada de esta; L es un grupo ligador o una unión directa; y P' es un péptido capaz de unir una proteína objetivo. El método comprende (1) seleccionar una librería de péptido para identificar uno o más péptidos que se unen a la proteína objetivo; (2) determinar la secuencia de aminoácido de al menos un péptido que se une a la 15 proteína objetivo; y (3) producir un agente terapéutico que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácido identificada en la etapa (2) y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de esta, ligada por vía de un grupo ligador, L, o una unión directa.

20 En una modalidad, el agente terapéutico se prepara al sintetizar la secuencia de aminoácido identificada en dos etapas y conjugar esta secuencia con una secuencia de aminoácido que comprende la región FC de una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que utiliza un ligador peptídico o un ligador no peptídico, como se describió anteriormente. En esta modalidad, la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo puede comprender los 25 residuos de aminoácido L, residuos de aminoácido D y/o residuos de aminoácidos no naturales.

25 El agente terapéutico que comprende la región FC de una cadena pesada de inmunoglobulina y secuencia de aminoácido que se une a una proteína objetivo también puede ser una proteína de fusión, como se discutió anteriormente. Por ejemplo, una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, o la región FC; se puede fusionar directamente a la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo, o se funde indirectamente a la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo por vía de uno o más residuos de aminoácido ligantes. Tales proteínas 30 de fusión se pueden preparar como se discutió anteriormente, por ejemplo, por vía de expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión en un huésped adecuado.

35 La librería de péptidos seleccionada en la etapa (1) puede ser una librería de péptidos de aminoácido L, por ejemplo, una librería fago, una librería fagémido o una librería de péptido producida por métodos sintéticos, tal como aquellos conocidos en la técnica. Una librería de péptido sintético también puede incluir péptidos que comprenden residuos de aminoácido D y residuos de aminoácido no natural. En una modalidad, la secuencia de aminoácido que se une a la 40 proteína objetivo se identifica utilizando los métodos descritos en la WO 97/22617, los contenidos completos de los cuales se incorporan aquí como referencia. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo comprende 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, o 25 o menos residuos de aminoácidos. En una modalidad preferida, la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo comprende 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos o 7 o menos residuos de aminoácido.

45 La presente invención suministra adicionalmente los agentes terapéuticos preparados utilizando el método anterior. Agentes terapéuticos preferidos de este tipo incluyen aquellos en los que la secuencia de aminoácido que se une a la proteína objetivo no son significativamente homólogos con una serie de residuos de aminoácidos contiguos en una proteína o péptido que es un ligando de ocurrencia natural de la proteína objetivo. Como se utiliza aquí, el término "no significativamente homólogo" significa que el grado de homología, o identidad entre dos secuencias de aminoácido es menor de 50%.

50 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias de alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en uno o ambos de un primero y un segundo aminoácidos para alineación óptima y las secuencias no idénticas se pueden descartar para propósitos de comparación). Los residuos de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondientes se comparan luego. Cuando una posición en la primer secuencia se ocupa mediante el mismo residuo de aminoácido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces la molécula es idéntica en esa posición (como se utiliza aquí "identidad" de aminoácido es equivalente a "homología" de aminoácido). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas comparado por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan ser introducidos para alineación óptima de las dos secuencias.

60 La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. En una modalidad preferida, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácido se determina utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsh (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en www.gcg.com), que utiliza una matriz 62 Blosum o una matriz PAM250, y un espacio ponderado de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y una longitud ponderada de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra modalidad, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácido se determina utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Millar (Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0 o versión 2.0 u), utilizando la tabla de residuo ponderado PAM120, una penalidad de longitud de espacio de 12 y una penalidad de espacio de 4.

ES 2 283 463 T3

Otros agentes terapéuticos preferidos de este tipo incluyen aquellos en los que el péptido que se une a la proteína objetivo (P') es una variante de un ligando de ocurrencia natural de la proteína objetivo, por ejemplo, una variante en la que uno o más residuos se han reemplazado con un residuo de aminoácido no natural o un residuo de aminoácido D.

5

La presente invención también caracteriza moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión mencionadas anteriormente y las células recombinantes que contienen un gen heterólogo que codifica las proteínas de fusión mencionadas anteriormente.

10 En una modalidad, la secuencia de aminoácido que se une a un objetivo es una secuencia de ocurrencia natural, tal como un fragmento de un ligando que es conocido por unir el objetivo *in Vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido que une al objetivo se deriva de la misma especie como la secuencia de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de esta. Más preferiblemente, ambas secuencias se derivan de las especies a ser tratadas con la proteína. En una modalidad, la secuencia de unión objetivo y la región constante de cadena pesada
15 de inmunoglobulina o fragmento de esta, tal como la región FC, ambas se derivan de proteínas humanas, esto es, ambas secuencias se codifican por el genoma humano. Preferiblemente la secuencia de aminoácido que se une a un objetivo consiste de menos de 100 residuos de aminoácido, más preferiblemente menos de 50 residuos de aminoácido, y más preferiblemente, aproximadamente 20 residuos de aminoácidos o menos.

20 La proteína objetivo puede ser cualquier proteína o péptido. En una modalidad, la proteína se asocia con un organismo patogénico, y es, preferiblemente, una proteína externa o asociada a membrana, tal como una proteína de recubrimiento vírico o una proteína de membrana bacteriana. La proteína también puede ser una proteína de superficie de una célula aberrante, tal como una célula de cáncer u otra célula que exhibe una proliferación no regulada. Luego de administración de un agente terapéutico de la invención a un sujeto infectado con tal un organismo patogénico o que tiene tales células que exhiben una proliferación no regulada, el agente terapéutico une a la proteína objetivo y los componentes celulares y no celulares del sistema inmune se recupera para la región FC de la cadena pesada de inmunoglobulina, que asiste en la claridad del organismo patogénico mediante el sistema inmune del sujeto.

30 En otra modalidad, la proteína objetivo puede ser una proteína que se asocia con un estado de la enfermedad, tal como una molécula de toxina, por ejemplo, una toxina vírica o bacteriana, o una proteína que se acumula inapropiadamente como parte del proceso de la enfermedad. Ejemplos de moléculas de toxina incluyen endotoxinas bacterianas, tal como toxinas C. difficile A y B y toxinas producidas por cepas *E. coli* patogénicas.

35 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben constituir como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a través de esta solicitud, así como también las figuras y las listas de secuencias se incorporan aquí como referencia.

40 Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de los compuestos de la invención

45

Método A

El péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica en la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se puede preparar en un sintetizador de péptido múltiple Advanced ChemTech modelo 396 utilizando un protocolo
50 automatizado establecido por el fabricante para síntesis a escala 0.025 mmol. Se desarrollan acoplamientos dobles en todos los ciclos utilizando hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1, 1, 3,3-tetrametiluronio(HBTU)/N,N-diisopropiletilamina (DIEA)/aminoácido HOBT/FMOC en exceso de cuatro veces durante 30 minutos seguido por DIC/HOBT/aminoácido FMOC en exceso de cuatro veces durante 45 minutos. Los péptidos se desprotegen y remueven de la resina mediante tratamiento con TFA/agua (95%/5%) durante 3 horas y se precipitan con éter. El glóbulo
55 se resuspende en 10% de ácido acético y se liofiliza. El material se purifica mediante HPLC preparativo utilizando 15%-40% de acetonitrilo durante 80 minutos en una columna Vydac C18 (21 x 250 mm).

El péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica y una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina se ligan luego utilizando un grupo ligador, por ejemplo, un reticulador hetero bifuncional.

60

Método B

Plásmidos de expresión que codifican el péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica fusionada a la región
65 FC de IgG 2a de murino se construyen al ligar una secuencia de cADN que codifica el péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica a un segmento de ADN genómico que codifica los dominios de articulación CH2-CH3 para un IgG 2a.

ES 2 283 463 T3

Para la producción de la proteína de fusión, las secuencias reconstruidas se insertan en el vector de expresión pHTOP (Kaufmann, R. J. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4485-4490). Los plásmidos recombinantes se transfecan en la línea de células CHO y se amplifican mediante técnicas estándar (Kaufmann, R. J. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4485-4490). Las células CHO que expresan la proteína de fusión crecen en DME/F12 (Life Technologies, Inc) complementado con 10% FCS, 0.02 µm de metotrexato (Kaufmann, R. J. et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4485-4490), y 1mg/ml G418 (Geneticina; Life Technologies, Inc;). En confluencia, se descarta el medio de crecimiento, las células se lavan con PBS y se agrega medio libre de suero. Los súper nadantes del cultivo se recolectan en 24 horas, se clarifican mediante pasaje secuencial a través de filtros de 5.0 y 0.2 µm, y se concentran utilizando filtro de cartucho bajo tangencial de 30-KDA. El concentrado se carga en una columna de flujo rápido de Sefarosa A (Pharmacia Biotech), se lava con PBS, y se eluye con 20 mm de citrato (ph 3.0). Las fracciones de elución que contienen la proteína de fusión se neutralizan con tris 1 m (ph 8.0: sigma, St. Louis, MO), y el material se formula en PBS (ph 7.2) mediante intercambio de amortiguador utilizando una célula agitada con membrana YM30 (Amicon, Beverly, MA). La proteína se depirogena mediante cromatografía en PI Poros (Perseptive Biosystems, Framingham, MA). La concentración de proteína se calcula utilizando absorbancia en 280 nm.

15

Ejemplo 2

Ensayo de estabilidad de compuesto en fluido cerebro espinal

20

La estabilidad de un compuesto de la invención en el fluido cerebro espinal (CSF) se puede ensayar en un ensayo *in Vitro* como sigue. Una solución CSF se prepara conteniendo 75% de CSF de mono Rhesus (disponible comercialmente de Northern Biomedical Research), 23% de salina amortiguada con fosfato estéril y 2% de dimetilsulfóxido (v/v) (Aldrich Chemical Co., Catálogo número 27, 685-5). Se agregan compuestos de ensayo a la solución CSF a una concentración final de 40 µm o 15 µm. Todas las muestras de manejo se llevan a cabo en una cabina de flujo laminar y las soluciones de ensayo se mantienen a 97°C durante el ensayo. Después de 24 horas, la actividad enzimática en las soluciones se apaga al agregar acetonitrilo para producir una concentración final de 25% (v/v). Las muestras (en el tiempo de punto 0 y el punto de tiempo de 24 horas) se analizan a temperatura ambiente utilizando HPLC de fase inversa. Se utiliza una columna microbore para maximizar la sensibilidad. Los parámetros para HP analíticos son como sigue:

25

Sistema disolvente

A: ácido trifluoroacético 0.1% (TFA) en agua (v/v)

30

B: 0.085% TFA/acetonitrilo, 1% H₂O (v/v)

Inyección y gradiente

35

Inyección: 100-250 µl de muestra de ensayo

Serie: 10% para B durante 5 min, luego 10-70% B durante 60 min

40 Se desarrolla análisis cromatográfico utilizando un HPLC de Hewlett Packard 1090 serie II. La columna utilizada para la separación es una C4, 5 µm, 1 x 250 mm (Vydac # 214 TP 51). El índice de flujo es de 50 µl/min y el perfil de elución de los compuestos de ensayo se monitorea en 214, 230, 260 y 280 nm.

45

Ejemplo 3

Ensayo de toma de cerebro

50 La toma de cerebro de los compuestos de ensayo se mide utilizando la técnica de Oldendorff (Brain Research (1970) 24: 372-376). En este modelo establecido, el índice de toma cerebral (BUI) es un estimado de la capacidad relativa de un compuesto particular para cruzar la barrera hematoencefálica, expresada como un porcentaje de lo observado mediante la referencia libremente difundible, agua. Los compuestos radio etiquetados se administran a un animal de ensayo como un bolo rápido (200 µl) en la arteria carótida izquierda común (con la arteria carótida externa izquierda ligada). El animal se sacrifica 15 segundos después y la cantidad de radioactividad dentro del proencefalo ipsilateral se determina. El BUI se computa utilizando la siguiente ecuación:

55

$$\text{Índice de toma cerebral (BUI)} = \frac{(\text{dpm del compuesto de ensayo en cerebro}) / (\text{dpm de agua en cerebro})}{(\text{dpm de compuesto de ensayo en Inyectado}) / (\text{dpm de agua en Inyectado})}$$

60

65 El vehículo utilizado para los compuestos de ensayo puede ser 50 mm de ciclodextrina en 75% de salina amortiguada con fosfato. El agua se puede utilizar como la referencia libremente difundible, y la sacarosa se puede utilizar como un control negativo.

ES 2 283 463 T3

Ejemplo 4

Síntesis de genes sintéticos que codifican una fusión entre fragmentos de proteína precursora amiloide humana y cadena pesada de inmunoglobulina y clonación en un vector de expresión de célula de mamífero

5 Un fragmento de IgG1 de ratón se amplifica mediante PCR utilizando un cebador 5' (5'-CTGGTCCCGCGTG GATCCGT-GCCCAGGGATTGTGGT-3' (SEQ ID No: 6) y el cebador 3' (5-ATTAAGCATTCAGATCATTTAC CAGGAGAGTG-3' (SEQ ID No: 7)). Este fragmento codifica la articulación, las regiones CH2 y CH3 de IgG1 de ratón y se flanquea mediante un sitio BamHI de cuadro en su extremo 5' y el sitio XbaI después del codón de terminación. Este fragmento se clona en varios vectores de expresión celular de mamíferos comunes, que incluyen 10 pCMV4 y pED.

15 Un segundo fragmento de gen que codifica la secuencia líder y el propéptido de activador de plasminógeno de tejido humano (tPA) se ensambla por PCR. Se introduce una mutación conservadora en este fragmento para crear un sitio de restricción BssHII único. Este fragmento se clona en el vector de expresión pED.

20 Un nuevo vector se construye luego mediante la ligación de tres vías del fragmento KpnI-BssHII del vector tPA, un BaH y para el fragmento KpnI del vector de expresión IgG1, y los oligonucleótidos sintéticos de doble hélice mostrado 25 en la figura 3. Este vector contiene elementos reguladores para expresión de alto nivel en células de mamíferos que incluyen COS; CHO, y células 293, una secuencia líder secretora del gen tPA, un fragmento que codifica la región FC 30 del IgG1 de ratón, un BssHII único dentro de la secuencia tPA, y un sitio sPEI único entre la secuencia tPA y la región IgG1. El vector se muestra en la figura 4 y se designa pTig.

25 Un fragmento de ADN sintético que codifica una porción de β amiloide del gen de proteína precursora amiloide β humana se ensambla utilizando una estrategia de super posición de PCR como se indica en la figura 5. El sitio BssHII en el extremo 5' y el sitio sPEI en el extremo 3' flanquea este fragmento. El fragmento β amiloide sintético se ensambla 30 con y sin una secuencia flanqueadora gly-gly-gly en el extremo 5', y termina en el aminoácido 40 de amiloide β o el aminoácido 42 de amiloide β . Las condiciones utilizadas para ensamble PCR y clonación del fragmento amiloide β sintético son como sigue: una amplificación PCR o Klenow se desarrolla para cada par de oligos en una temperatura 35 de hibridación de aproximadamente 42°C durante 25 ciclos, 15" de extensión para que cada ciclo. Para la síntesis PCR secuencial, se mezcla los productos 217/218 con los productos 219/220, o los productos 219/220 se mezclan con los productos 221/222, y la reacción PCR se repite sin cebadores externos. Estos productos se mezclan (o un producto PCR de esta etapa se mezcla con un producto de otra etapa) y la reacción PCR se repite con cebadores externos para ensamble final. Las reacciones PCR se limpian mediante purificación de gel sin muchos subproductos se presentan o mediante purificación por columna si la mezcla de reacción PCR es relativamente limpia.

40 Los productos PCR y el vector pTig se digieren luego con BssHII y sPEI, y los dos fragmentos se ligan. La secuencia del gen amiloide β sintético ensamblado se confirma y contiene los codones y los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción mostrados en la figura 6.

45 El gen amiloide β se utiliza como plantilla para PCR para generar fragmentos más pequeños del amiloide β . Los fragmentos del gen PCR se clonian como productos de digestión BssHII-sPEI (como se describió anteriormente para los fragmentos 1-40 y 1-42). Los fragmentos que codifican penta péptidos de amiloide β con o sin ligadores gly-gly-gly se ensamblan utilizando oligonucleótidos complementarios con terminales sobresalientes BssHII y sPEI. Los fragmentos del gen amiloide β y los oligonucleótidos utilizados para sintetizar aquellos fragmentos se muestran en las figuras 7A y 7B. Todas las construcciones se confirman por secuenciamiento de ADN.

Ejemplo 5

50 *Expresión y caracterización de proteínas de fusión*

Se utilizan los siguientes métodos en estos experimentos

55 *Transfección celular y análisis de proteína*

Células COS se colocan en placas en platos de 100 mm en medio Eagle modificado de Duvelco (Gibco-BRL) complementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma), 4 mm de L-glutamina, 50 μ g de gentamisina, y transfectado con HDNA que codifican varios segmentos del amiloide β flaquéado por la región IgG1 FC de ratón cuando las células alcanzan aproximadamente 50% de confluencia. El reactivo de transfección se prepara al agregar 12 μ l de 60 fugene (Roche) seguido por 5 μ g de plásmido de ADN a 0.3 ml de medio libre de suero. Después de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, el reactivo de transfección se agrega al medio de baño de las células. Los platos se arremolinan gentilmente para distribuir el reactivo. Despues de 24 horas, se remueve el medio y las células se lavan una vez con medio Eagle modificado de Duvelco/F12 (Gibco-BRL) complementado con 4mm de L-glutamina, 0.8 mm de L-serina, 0.3 mm de L-asparagina, y 10 μ g/ml de insulina, 1.5 μ m de sulfato ferroso, 100 nm de hidrocortisona, 10 mm de putresina, y 28 nm de selenita de sodio luego se incuba en 6 ml del mismo medio. Despues de 24 horas, se recolecta el medio condicionado. Una alícuota del medio se agrega al amortiguador de carga de gel 6.25 X (concentración final, 50 mm tris ph 6.8, % SDS, 0.1% azul bromofenol, y 10% glicerol). Las células se lisán en amortiguador de carga de gel y se recolectan. Las muestras se calientan a 100°C durante 10 minutos y se redissuelven en 10% de gel de 65

ES 2 283 463 T3

SBS - poliacrilamina (Millipore). Las membranas se bloquean durante una hora en 5% de leche seca sin grasa, 1% de albúmina de suero bovino, 0.02% de azida de sodio en salina amortiguada con fosfato (PBS), se lava tres veces en PBS que contiene 0.05% Tween-20 (PBS-T), e incuba durante dos horas en anticuerpo anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano en caballo incrementado en ovejas (Amersham) diluido 1-5000 en 1% de leche seca son grasa en PBS-T. Se visualizan las transferencias mediante quimio luminiscencia utilizando un kit de Roche.

Inmuno histoquímica

Se preparan secciones de corona de cerebro en 20 micro series de ratones transgénicos de 20-22 semanas de mutación sueca de proteína precursora amiloide y presenilina m1461 (Ref.). Se desarrollan todas las incubaciones a temperatura ambiente. Las secciones se lavan en 100 mm tris, ph 7.4 (amortiguador tris), incubado en 70% de ácido fórmico durante tres minutos, luego se lava tres veces en amortiguador tris. La actividad de la peroxidasa endógena se bloque al incubar durante 20 minutos en 10% de metanol, 3% de peróxido de hidrógeno en 40 mm tris, ph 7.4, las secciones se lavan tres veces en amortiguador tris luego se incuban en 0.85% NaCl, 0.1% triton X-100, 100 mm tris ph 7.4 (amortiguador Tris A durante cinco minutos seguido por amortiguador B) durante 15 minutos. Las secciones se incuban durante la noche en medio condicionado de células que expresan proteínas de fusión secretadas o anticuerpo policlonal anti- β -amiloide diluidos 1-1000 en amortiguador B tris. Las secciones se lavan dos veces en amortiguador tris A y una vez en amortiguador tris B luego se incuban con anticuerpo anti ratón conjugado con biotina incrementado en monos de laboratorios Jackson diluidos 1/500 en amortiguador tris A durante 1 hora. Las secciones se lavan dos veces en amortiguador tris A y una vez en amortiguador Tris B. luego se incuban con peroxidasa de rábano en caballo conjugada con avidina utilizando un kit de inmuno histoquímica ABC de vector Laboratories. Las secciones se lavan tres veces en amortiguador tris y se tiñen durante cinco minutos con clorhidrato de diaminobencidino de Vector Laboratories. Las secciones se deshidratan mediante pasaje sucesivo a través de 50% de etanol, 70% de etanol, dos veces en 95% de etanol, dos veces en 100% de etanol, y dos veces en sileno. Después de aplicar un cobre objeto, los portaobjetos se revisan utilizando un microscopio Olympus BX-60 y se capturan las imágenes con el software Bioquant.

Resultados

El medio cosechado a partir de células COS que expresan la región FC de IgG1 de ratón fusionado con residuos de aminoácido 1-40, 1-42, 10-25, 16-30, 17-21, o 17-21 (A21L) del amiloide β con o sin una tapa de glicina triple N-terminal se redissuelve mediante electroforesis de gel de poliacrilamida SDS en la ausencia de un agente de reducción y examinado mediante análisis Western Blot. Las transferencias por sondeo con anticuerpo anti ratón demuestran que cada construcción produce una proteína que migra en aproximadamente 75 kDa (figura 1). La migración de las bandas se cambia a aproximadamente 35 kDa si el β -mercaptopropionato se agrega a las muestras, lo que confirma que las proteínas forman dímeros por vías de enlaces de disulfuro (datos no mostrados). Especies de peso molecular mayor se detectan a partir de algunas de las proteínas de fusión y probablemente representan agregados no dispersos por SDS. Una cantidad reducida de proteína secretada se detecta en el medio de células que expresan el dominio FC fusionado a los residuos 1-40, 1-42, o 10-25 del amiloide β .

El medio cosechado de células COS que secretan la región FC del IgG1 de ratón fusionado a varios segmentos del amiloide β se incuba con secciones de corona de cerebro de 20-22 semanas de ratones transgénicos para la mutación Sueca de la proteína precursora amiloide y la presenilina M146L y el desarrollo con el anticuerpo anti ratón. Las secciones de tejido incubadas con medio de células que expresan segmentos de amiloide β fusionado a la distribución Fc de placas es consistente con la distribución de las placas amiloides. Se examina la intensidad del teñido que es mayor cuando los residuos 17-21 o 16-30 del amiloide β se unen a la región FC del IgG1. No se detectan placas amiloides cuando el medio condicionado de células no transfectadas o formas de células que expresan el dominio FC sin un fragmento amiloide β se ensayan (figura 2). Adicionalmente, las placas no se observan cuando se incuban las secciones con IgG1 purificado. La colocalización de las proteínas de fusión con placas amiloides se confirma mediante teñido adyacente de secciones de cerebro con un anticuerpo policlonal anti-B-amiloide o tioflavina.

Ejemplo 6

Toma de fibrillas por células

La unión de la proteína de fusión del A β (16-30) y el IgG1 Fc de ratón (A β (16-30)-Fc) con receptores Fc en macrófagos J774 y para células de cáncer de mama MCF7 que les falta el receptor Fc se determina mediante una modificación del procedimiento por Webster, S. D. et al. (2001) J. Immunol., 166, 7496-7503. En resumen, los macrófagos J774 en medio Eagle modificado de Duvelco (Gibco # 11960-051) complementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma # 2442) se colocan en placas de 24 pozos en una densidad de 3×10^5 células/pozo y se mantienen a 37°C durante 24 horas antes del ensayo. El β -amiloide₁₋₄₀ fluorescente agregado (FA β ₁₋₄₀) se prepara al incubar 500 μ M A β ₁₋₄₀ (California Peptide Research, Inc # 641-10) con 30 μ M de A β ₁₋₄₀ conjugado con fluoresceína (AnaSpec # 23513) en 10 mM de Hepes (ph 7.4) mientras que se agita durante la noche a temperatura ambiente. El FA β ₁₋₄₀ se diluye a 50 μ M en salina amortiguada con fosfato (PBS). Las proteínas de ensayo se unen al FA β ₁₋₄₀ al incubar 100 μ g de A β (16-30)-Fc, IgG1 FC de ratón sólo, o anticuerpo α B-amiloide (Biosource International # 44-352), o IgG1 de ratón (Sigma # M9269) con un ml de FA β ₁₋₄₀ a 37°C durante 30 minutos. Se forman glóbulos del FA β ₁₋₄₀ unido a proteína mediante centrifugación a 14.000 XG durante cinco minutos, se lava dos veces en PBS, y se resuspende a 500 μ M en PBS. Inmediatamente antes del ensayo, el medio celular J774 se reemplaza con 0.5 ml de medio Eagle

ES 2 283 463 T3

modificado de Dulveco que contiene 1% BSA. Se agrega fucoidan a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y las células se incuban durante 30 minutos a 37°C. En algunos experimentos 25 μg del anticuerpo receptor α FC (Pharmingen # 01241D) se agrega y las células se incuban a 37°C durante 15 minutos adicionales. Las células se mueven a 4°C durante 30 minutos. Se agrega FA β_{1-40} unido a proteína en una concentración final de 10 μm y se incuba a 4°C durante 5 45 minutos. La solución se remueve y las células se lavan dos veces con salina amortiguada con Hepes frío. (HBS). Se agrega tripsina fría (Gibco # 25200-056) durante 20 minutos a 4°C para sacar las células. Las células se resuspenden en HBS frío que contiene 0.1% BSA y se analizan en un analizador FACS Can de Becton Dickinson.

10 Los resultados de este experimento se presentan en la figura 8, que presenta una gráfica que muestra una fluorescencia celular relativa en la presencia de cada una de las proteínas, y en la presencia y ausencia del anticuerpo receptor anti-Fc. La fluorescencia celular se iguala con la toma de fibrillas mediante la células y muestra que en la ausencia de anticuerpo receptor anti-FC, la proteína de fusión A β (16-30)- FC y el anticuerpo α - β -amiloide originan la toma 15 celular mediante las células macrófagos J774, pero en la ausencia de proteína adicional de la proteína de control, no se observa toma de fibrilla. La toma de fibrilla en la presencia de proteína de fusión A β (16-30)- FC y el anticuerpo α - β -amiloide se inhibe por el anticuerpo receptor α -FC. En contraste, no hubo toma de fibrilla por las células MCF7, que les falta el receptor FC, bajo cualquiera de las condiciones examinadas. Los anteriores resultados indican que la toma 20 de fibrilla mediada por el receptor FC ocurre en la presencia de la proteína de fusión A β (16-30)- FC o el anticuerpo α - β -amiloide.

20 Ejemplo 7

Ensayo de unión de fibrilla

25 La capacidad de un compuesto de la invención para modular (por ejemplo, inhibir o promover) la agregación de β AP natural cuando se combina con el β -AP natural se examina utilizando el ensayo de unión de fibrilla. El β -AP natural (β AP₁₋₄₀) para uso en ensayos de agregación está disponible comercialmente de Bachem (Torrance, CA).

30 Se necesitan los siguientes materiales para el ensayo de unión de fibrilla: un aparto multi filtro Millipore; 12 x 75 tubos de vidrio; filtros de vidrio de 25 mm GF/F; PBS/0.1% tween 20 a 4°C (PBST); fibrillas A β ; compuesto radiactivo; compuesto no radiactivo; y peteador de repetición Eppendorf con boquillas; etiquetas; fórceps; y vacío.

35 En este ensayo, cada muestra corre por triplicado. La “edad” de la fibrilla A β se prepara primero a aproximadamente 8 días en avance al envejecer alícuotas de 1 ml de una disolución de péptido a β_{1-40} de 200 μm en 4% de MSO-PBS durante 8 días a 37°C con agitación. Tal péptido A β “envejecido” se puede probar directamente en las células o congelar a -80°C.

La fibrilla A β de 200 μm se diluye en PBST para producir una disolución de 4 μm (320 μl en 16 ml de PBST). Alícuotas de 100 μl de esta disolución se agregan por tubo por el pipeteador de repetición.

40 El compuesto ensayado (por ejemplo, A β (16-30)-FC PPI-1019 o PPI-1621) se prepara en diluciones de 2 μm - 200 FM. El compuesto ensayado (200 μl) se agrega luego al tubo apropiado que contiene la fibrilla A β .

45 El compuesto etiquetado radiactivamente se prepara utilizando protocolos de seguridad radioactivo estándares al elaborar una dilución en una disolución tween-20 PBS-0.1% de tal forma que existe una concentración final de 20.000 DPM x 100 μl . Alícuotas de 100 μl de compuesto etiquetado radiactivamente se agregan por tubo utilizando el pipeteador de repetición. Las muestras se cubren con parafilm e incuban a 37°C dentro de bolsas plásticas para radioactividad durante la noche.

50 Para filtrar las muestras, los filtros se prehumedecen en un volumen pequeño de PBST. Dos aparatos de multi filtración Millipore se configuran con filtros GF-F en cada ranura de filtración siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se remueven de la incubadora a 37°C y cada muestra se filtra utilizando un volumen pequeño (~ 5 ml) de amortiguador PBST frío. El tubo de muestra se lava luego con dos volúmenes de 5 ml adicionales de amortiguador PBST frío. Al vacío se le permite retirarse a un semifiltro seco durante aproximadamente 2 minutos después de agregar la última muestra y el filtro se transfiere a un tubo etiquetado para conteo de yodinación, se registran conteos durante 55 un minuto, los datos se grafican, y el programa Prism (GraphPAD) se utiliza para analizar la gráfica, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados de este experimento (establecidos en la figura 9), demuestran que los compuestos ensayados (por ejemplo pPI-1019, pPI-1621 y tres diferentes preparaciones de A β (16-30)-FC) son inhibidores efectivos de la agregación A β .

Ejemplo 8

Expresión de una proteína de fusión que comprende a β (16-30) fusionada al terminal N del dominio IgG1 FC humano

65 La expresión de la proteína de fusión A β (16-30) fusionada al terminal N de un péptido que consiste de dominio IgG1 FC y el dominio de la región de articulación (A β (16-30)-HFC) se logra utilizando una construcción de expresión generada en el vector PC ADN 3.1 en el que el gen de resistencia a la neomicina se reemplaza con un gen que codifica

ES 2 283 463 T3

la reductasa dihidrofolato (DHFR). La expresión de la construcción se dirige por el promotor CMD. La construcción incluye adicionalmente la secuencia de señal TPA (secuencia de aminoácido MDAMKRLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID No: 8)) fusionada a aminoácidos 16-30 de la secuencia β amiloide humana (secuencia de aminoácido KLVF FAEDVGSNKGA (SEQ ID No: 9)) fusionada al terminal N de la región de articulación y FC de la cadena pesada IgG1

- 5 humana (secuencia de aminoácido que inicia EPKSCD... (SEQ ID No: 10)) Seguido por la señal de poliadenilación BGH. Las proteínas de fusión intactas son los aminoácidos 272 y luego del procesamiento de la secuencia de señal, la proteína madura es de 247 aminoácidos. La expresión transitoria en cos, células 297-293T suministra una proteína de fusión que está principalmente presente como un dímero en análisis PAGE no reducido y, luego de la reducción, se detectan los monómeros.

10

Ejemplo 9

Evaluación in vivo del A β (16-30) - FC

- 15 Se evalúa la capacidad del A β (16-30)- FC para limpiar placas amiloides en un modelo de ratón de enfermedad de Alzheimer. La proteína de fusión se administra a un ratón transgénico para mutación Sueca de la proteína precursora amiloide y presenilina M146L mediante infusión directa dentro de la corteza cerebral en un hemisferio. El ratón se sacrifica y la cantidad de amiloide en las secciones de cerebro se determina por teñido de tioflavina S. Como se indica en la figura 10, el límite de la placa en el sitio de infusión se reduce significativamente comparado con el hemisferio 20 controlado. Las secciones de cerebro de un ratón que recibe una proteína que consiste de la región (IgG1 Fc de ratón) pero no secuencia de unión amiloide no exhiben diferencia en el límite de la placa entre los dos hemisferios.

Ejemplo 10

- 25 *Construcción y análisis de un gen sintético que codifica una fusión entre fragmentos de proteína precursora amiloide humana y un fragmento de cadena pesada G1 de inmunoglobulina humana en vectores de expresión celular de mamífero*

Un fragmento de cADN de IgG1 que codifica la región FC de la proteína, que corresponde a los aminoácidos 30 242-473 de la cadena pesada IgG1 humana (número de acceso de secuencia CAA75030), se sintetiza utilizando RT-PCR. En el proceso de síntesis de este fragmento, un sitio de endonucleasa de restricción EcoRV conservador se crea dentro de la región FC para facilitar las etapas de clonación posteriores. Una segunda pieza de ADN sintético que corresponde a la secuencia líder y al propéptido de activador de plasminógeno de tejido (TPA) se sintetiza y se fusiona con el fragmento FC utilizando PCR. Se clona la fusión TPA/FC en un derivado del vector de expresión PCDNA 3.1 35 en el que el gen de resistencia a la neomicina se reemplaza con reductasa dihidrofolato. El gen sintético se designa de tal forma que el sitio BamHI único flaquea el extremo 5' y el sitio EcoRV único introducido dentro de la región Fc se puede reemplazar con un fragmento BamHI/EcoRV correspondiente para hacer proteínas de fusión FC adicionales.

Una pieza de ADN sintético que codifica 16-30 aminoácidos del péptido β amiloide humano se genera utilizando 40 PCR y se clona en el vector de fusión tpA/FC. Se elimina la región de propéptido de este vector utilizando PCR, produciendo el vector pt Δ pro16-30HFC. La región de codificación del gen sintético se muestra en la figura 11 y la SEQ ID No: 11. La secuencia de aminoácido de la proteína codificada y los elementos funcionales anotados se muestran en la figura 12 y la SEQ ID No: 12.

45 El vector se transfecta en células COS y 293T utilizando el reactivo FuGENE 6 (Boehringer Mannheim), y el medio condicionado de proteína expresada transitoriamente se cosecha 48-72 horas después. Alternativamente, el vector se transfecta en células CHO y las líneas de células estables que expresan la proteína se generan utilizando amplificación de gen mediada por metotrexato, o se cotransfectan en células 293 con un segundo plásmido que contiene el marcador de resistencia a la neomicina, y se selecciona para resistencia al G418.

50

Transfección celular y análisis de proteína de construcciones humanas

Se colocan en placas células 293T en platos de seis pozos en medio Eagle modificado de Dulveco (Gibco-BRL) complementado con 10% de suero bovino fetal (Sigma) y 4 mm de L-glutamina y se transfecan con ADN que codifica 55 16-30 aminoácidos de β amiloide fusionado a la región IgG1 Fc humana cuando las células alcanzan aproximadamente 70% de confluencia. El reactivo de transfección se prepara al agregar 3 μ l de FuGENE (Roche) seguido por 1 μ g de plásmido de ADN a 50 μ l de medio libre de suero. Después de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se agrega el reactivo de transfección al medio de baño de las células. Los platos se giran gentilmente para distribuir el reactivo. Después de 24 horas, el medio se remueve y las células se lavan una vez con medio Eagle modificvado de Duvelco/F12 (Gibco-BRL) complementado con 4 mm de L-glutamina, 0,8 mm de L-serina, 0,3 mm de L-asparagina, 60 10 μ g/ml de insulina, 1,5 μ m de sulfato feroso, 100 nm de hidrocortisona, 10 mm de putresina, y 28 nm de selenita de sodio luego se incuban en 2 ml del mismo medio. Después de 24 horas, el medio condicionado se recolecta. Se agrega una alícuota del medio a 4X de amortiguador de carga de gel (Invitrogen). Las células se lisan en amortiguador de carga de gel y se recolectan. Las muestras se calientan a 100°C durante 2 minutos y se redissuelven en 10% de gel 65 de SBS - poliacrilamina y se transfieren a una membrana de polivinilíno de fluoruro (Millipore). Las membranas se bloquean durante una hora en 5% de leche en polvo baja en grasa que contiene 0,05% tween - 20 en salina amortiguada con fosfato (PBS) e incubada durante una hora con anticuerpo anti humano conjugado con peroxidasa de rábano en caballo incrementado en ovejas (Amersham) diluido en 5% de leche en polvo baja en grasa 1/7000 IN en PBS con

ES 2 283 463 T3

0.05% tween 20. Se visualizan las transferencias mediante quimio luminiscencia mejorada utilizando un kit de Roche. Las proteínas se analizan de forma similar para su incorporación de las secuencias β amiloide al hacer reaccionar las membranas después de bloqueo con dilución 1/1000 de aminoácidos 17-24 anti- β -amiloide biotinilado (Signet) en 5% de leche en polvo baja en grasa en PBS con 0.05% tween 20. Las membranas se lavan luego con PBS con 0.05% tween 20. Luego de lavar, las membranas se incuban con 1/10000 de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano para caballo (Pierce) en 5% de leche en polvo baja en grasa en PBS con 0.05% tween 20. Las trasferencias se lavan luego con PBS con 0.5% tween 20 seguido por PBS y luego se visualizan mediante quimio luminiscencia mejorada utilizando un kit de Roche.

10 *Equivalentes*

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de discernir utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes para las modalidades específicas de la invención descrita aquí, tales equivalentes están destinados a ser abarcados por las siguientes reivindicaciones.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la forma I-L-P, en donde:

5 I es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de esta que retiene la capacidad para unirse a un receptor FC;

L es un grupo ligador o una unión directa; y

10 P es un péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde I comprende la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID No: 1 o una secuencia de aminoácido que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID No: 1.

15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde I es una región constante de cadena pesada IgG o fragmento de esta.

20 4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde L es un enlace directo, o un grupo ligador.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde P es un péptido capaz de unir el β -amiloide, o una proteína amiloidogénica seleccionada del grupo que consiste de transtiretina (TTR), proteína priónica (PRP), poli péptido amiloide isloote (IAPP), factor natriurético auricular (ANF), cadena liviana kappa, cadena liviana lambda, amiloide A, procalcitonina, cistatina C, microglobulina β 2, ApoA-I, gelsolina, calcitonina, fibrinógeno y lisozima.

25 6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde P comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos, o 40 aminoácidos, preferiblemente 30 aminoácidos, más preferiblemente 20 aminoácidos.

30 7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde P comprende al menos un aminoácido de ocurrencia no natural.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde P comprende al menos un aminoácido D.

35 9. El compuesto de la reivindicación 5, en donde P comprende una subregión de una proteína amiloidogénica seleccionada del grupo que consiste de transtiretina (TTR), proteína priónica (PRP), poli péptido amiloide isloote (IAPP), factor natriurético auricular (ANF), cadena liviana kappa, cadena liviana lambda, amiloide A, procalcitonina, cistatina C, microglobulina β 2, ApoA-I, gelsolina, calcitonina, fibrinógeno y lisosima, o una subregión de un péptido β -amiloide natural.

40 10. El compuesto de la reivindicación 5, en donde P es un péptido comprendido completamente de aminoácidos D y que tiene al menos tres residuos de aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste de una estructura leucina D, una estructura fenilalanina D, una estructura valina D, una estructura tiroxina D., Una estructura yodotiroxina D, y una estructura alanina D.

45 11. El compuesto de la reivindicación 5, en donde P es un péptido que comprende la estructura

$$(Y - Xaa_1 - Xaa_2 - Xaa_3 - Xaa_4 - Z)$$

50 En donde Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, y Xaa₄ cada uno son estructuras de aminoácido D y al menos 2D Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, y Xaa₄, independientemente, se seleccionan del grupo que consiste de una estructura de leucina D, una estructura de fenilalanina D, y una estructura de valina D;

55 Y, que puede o no estar presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_a en donde Xaa es cualquier estructura de aminoácido D y a es un entero de 1 a 15; y

Z, que puede o no estar presente, es una estructura que tiene la fórmula (Xaa)_b en donde Xaa es cualquier estructura de aminoácido D y b es un entero de 1 a 15.

60 12. El compuesto de la reivindicación 5, en donde P es un péptido seleccionado del grupo que consiste de: D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-Phe-fenilalamida, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe, D-Leu-D-Val-Phe-D-Tyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-lodoTyr, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala, D-Ala-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Leu, D-Leu-D-Val-D-Tyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-lodoTyr-D-Phe-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-Tyr-D-Ala, D-Leu-D-Val-D-Phe-D-loodoTyr-D-Ala, D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Leu-, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Ala-D-Phe-D-Phe-D-Leu-D-Leu, D-Leu-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, D-Phe-D-Phe-D-Phe-D-Val-D-Leu, A β (16-30), A β (10-25), A β (10-29), A β (1-14) y A β (1-42).

ES 2 283 463 T3

13. Un dímero del compuesto de la reivindicación 1.

14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 15. Uso de un compuesto de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para eliminar una proteína amiloidogénica de un sujeto.

10 16. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para tratar un sujeto que sufre de un trastorno amiloidogénico.

17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el trastorno amiloidogénico es la enfermedad de Alzheimer, o una encefalopatía esponjiforme.

15 18 Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido que codifica una proteína de fusión, dicha proteína de fusión comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmento de esta, que retiene la capacidad para unirse a un receptor FC y una secuencia de aminoácido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.

20 19. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la proteína amiloidogénica se selecciona del grupo que consiste de β -amiloide, transtiretina (TTR), proteína priónica (PRP), poli péptido amiloide de islote (IAPP), factor natriurético auricular (ANF), cadena liviana kappa, cadena liviana lambda, amiloide A, procalcitonina, cistatina C, microglobulina β 2, ApoA-I, gelsolina, calcitonina, fibrinógeno, Huntington y α -sinucleína.

25 20. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de cadena pesada IgG o fragmento de esta.

21. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 20, en donde el IgG es un humano, canino, bovino, porcino, muríno, ovino o rata IgG.

30 22. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es un IgM, IgA, IgD o IgE de región constante de cadena pesada o fragmento de esta.

23. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 21, en donde el IgG humano es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

35 24. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 funcionalmente activo.

40 25. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la secuencia de aminoácido capaz de unir la proteína amiloidogénica comprende $A\beta_{1-42}$ o un fragmento de esta.

26. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde la secuencia de aminoácido capaz de unir la proteína amiloidogénica comprende al menos 4, o al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido de $A\beta_{1-42}$.

45 27. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde la secuencia de aminoácido capaz de unir la proteína amiloidogénica comprende aproximadamente 4-15, preferiblemente aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido $A\beta_{1-42}$.

50 28. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25, en donde la secuencia de aminoácido capaz de unir la proteína amiloidogénica comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de Leu-Val-Phe-Phe, Leu-Val-Phe-Phe-Ala (SEQ ID No: 3), Leu-Val-Phe-Phe-Leu, $A\beta$ (16-30), $A\beta$ (10-25), $A\beta$ (1-29), $A\beta$ (1-40), y $A\beta$ (1-42).

55 29. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 18, en donde la proteína de fusión comprende adicionalmente un grupo ligador de al menos un residuo de aminoácido, dicho grupo ligador liga la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina y la secuencia de aminoácido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.

30 30. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 29, en donde el grupo ligador comprende aproximadamente 1-20, preferiblemente 1-10, más preferiblemente 1-5 residuos de aminoácido.

60 31. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 29, en donde el grupo ligador comprende la secuencia - (Gly)_n -, en donde n es un entero de aproximadamente 1-10.

32. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 17-31.

65 33. Una célula recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 17-31.

ES 2 283 463 T3

34. La célula recombinante de la reivindicación 33, en donde dicha célula es una célula de mamífero.
35. La célula recombinante de la reivindicación 33, en donde dicha célula es una célula CHO o una célula COS.
- 5 36. Un método para producir un poli péptido que comprende cultivar la célula recombinante de la reivindicación 33 en un medio de cultivo apropiado para, por lo tanto, producir el poli péptido.
- 10 37. El poli péptido que comprende una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmento de esta, que retiene la capacidad para unir un receptor FC y una secuencia de aminoácido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.
- 15 38. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde la proteína amiloidogénica se seleccionad del grupo que consiste de, transtiretina β -amiloide (TTR), proteína priónica (PRP), poli péptido amiloide de islote (IAPP), factor natriurético auricular (ANF), cadena liviana kappa, cadena liviana lambda, amiloide A, procalcitonina, cistatina C, microglobulina β 2, ApoA-I, gelsolina, calcitonina, fibrinógeno, lisosima, Huntington y α -sinucleina.
39. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es una región constante de cadena pesada IgG o fragmento de esta.
- 20 40. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde el IgG es un humano, canino, bovino, porcino, murino, ovino o rata IgG.
- 25 41. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina es un IgM, IgA, IgD o IgE de región constante de cadena pesada o fragmento de esta.
42. El poli péptido de la reivindicación 40, en donde el IgG humano es IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 25 43. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina comprende un dominio CH2 funcionalmente activo.
- 30 44. El poli péptido de la reivindicación 38, en donde la proteína amiloidogénica comprende $A\beta_{1-42}$ o un fragmento de esta.
- 35 45. El poli péptido de la reivindicación 44, en donde la proteína amiloidogénica comprende al menos 4, o al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácido de $A\beta_{1-42}$.
- 40 46. El poli péptido de la reivindicación 44, en donde la proteína amiloidogénica comprende aproximadamente 4-15, preferiblemente aproximadamente 5-10 residuos de aminoácidos contiguos de las secuencia de aminoácido $A\beta_{1-42}$.
- 45 47. El poli péptido de la reivindicación 44, en donde la proteína amiloidogénica comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de Leu-Val-Phe-Phe, Leu-Val-Phe-Phe-Ala (SEQ ID No: 3), Leu-Val-Phe-Phe-Leu, $A\beta$ (16-30), $A\beta$ (10-25), $A\beta$ (1-29), $A\beta$ (1-40), y $A\beta$ (1-42).
- 50 48. El poli péptido de la reivindicación 37, en donde la proteína de fusión comprende adicionalmente un grupo ligador de al menos un residuo de aminoácido, dicho grupo ligador liga la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina y la secuencia de aminoácido capaz de unirse a una proteína amiloidogénica.
- 55 49. El poli péptido de la reivindicación 48, en donde el grupo ligador comprende aproximadamente 1-20, preferiblemente aproximadamente 1-10, más preferiblemente aproximadamente 1-5 residuos de aminoácido.
- 55 50. El poli péptido de la reivindicación 48, en donde el grupo ligador comprende la secuencia - (Gly)_n -, en donde n es un entero de aproximadamente 1-10.
- 55 51. Un método para preparar un agente terapéutico que comprende la fórmula I-L-P', en donde:
- I es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de esta que retiene la capacidad para unirse a un receptor FC;
- 60 L es un grupo ligador o una unión directa; y
- P' es un péptido capaz de unir una proteína amiloidogénica, el método comprende:
- 65 1) seleccionar una librería de péptido para identificar uno o más péptidos que se unen a la proteína amiloidogénica;
- 2) determinar la secuencia de aminoácido de al menos un péptido que se une a la proteína amiloidogénica; y

ES 2 283 463 T3

- 3) producir un agente terapéutico que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácido identificada en la etapa (2), una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de esta que retiene la capacidad de unirse a un receptor FC, y un grupo ligador o una unión directa.
- 5 52. El método de la reivindicación 51, en donde la librería de péptido comprende péptidos de aminoácido L, o péptidos de aminoácido D.
- 10 53. Un agente terapéutico preparado por el método de la reivindicación 51.
- 15 54. Una composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico de la reivindicación 53.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

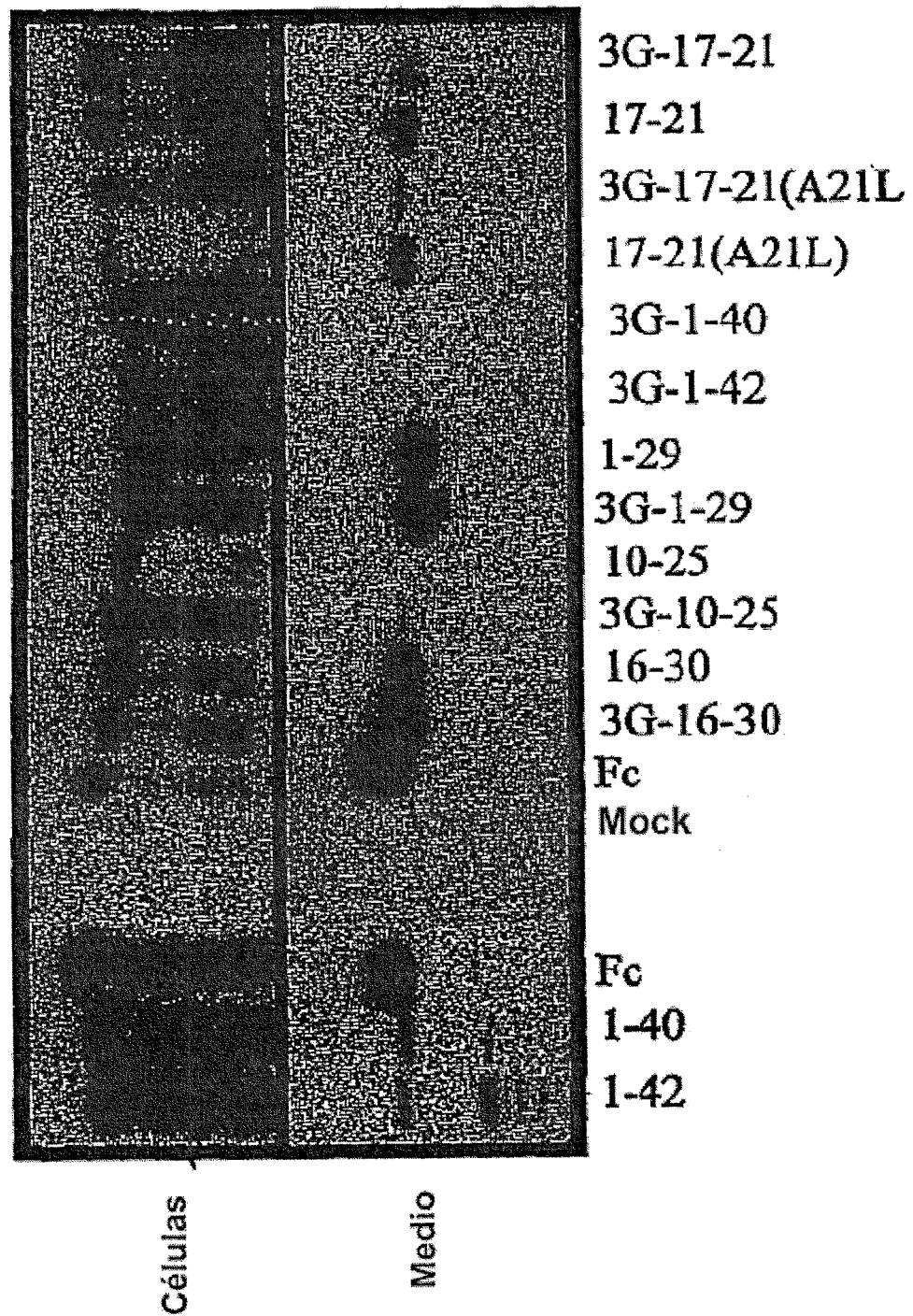


FIGURA 1

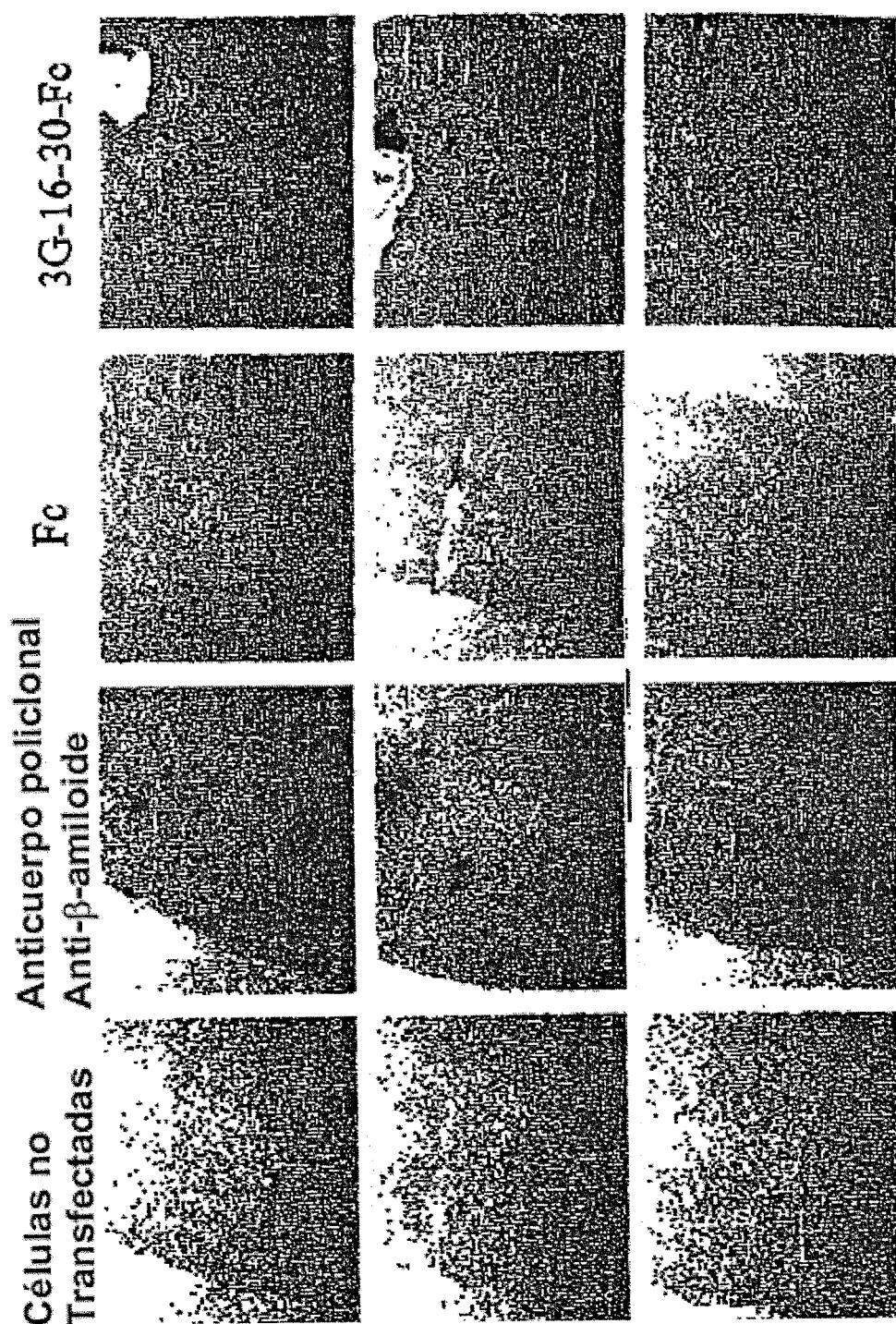


FIGURA 2

convertidor BssHII-Spe-BamHI:

DI215	<u>BssHII</u> CGCGCTTCAGAAGAACTAGTG GAAGTCTTCTTGATCACCTAG DI216	<u>SpeI</u> <u>BamHI</u>
	A R F R R T S A S	

FIGURA 3

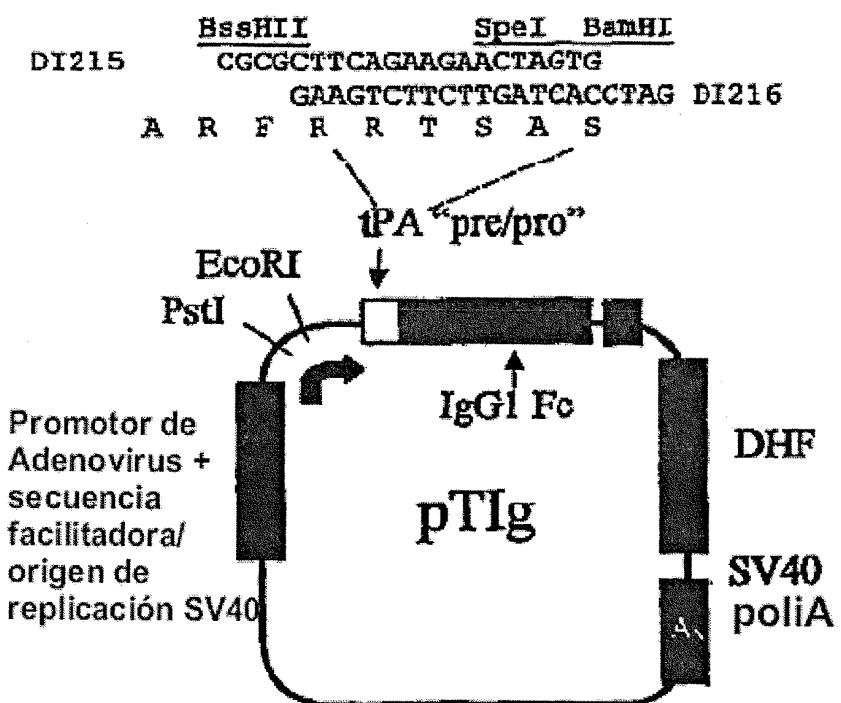


FIGURA 4

ES 2 283 463 T3

DI217
TTAGCGCGCTTCAGAAGAGACGGAGAAATTCCGT

DI217-3G
TTAGCGCGCTTCAGAAGAGGCGGTGGTGACGCAGAATTCCGT
Triple gly CTGGCCTTAAAGGCAGTACTGAGGCCTATGCTTCACGTG
DI218

DI219
GGATACGAAGTGCACCACCAAAAGCTTGTATTCTTCGCA
GAACATAAGAAGGCTCTCTGCAGCTTAGGTTGTTCCAC
DI220

DI221
GGATCCAACAAGGTGCCATAATAGGCCTTATGGTAGGT
CCGGAATACCATCCACCTCATCACTGATCAGGT
DI222-40

CCGGAATACCATCCACCTCATCACTATCGTTGATCAGGT
DI222-4

FIGURA 5

ES 2 283 463 T3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A
GACGCAGAATTCCGTCATGACTCCGGATACGAAGTGCACCACCAAAAGCTTGATTCTCGCA
EcoRI BspHI BspEI ApaLI HinDIII

22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42
E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A
GAAGACGTGGATCCAACAAAGTGCCATAATAGGCCTATGGTAGGTGGAGTAGTGTAGCA
AatII BamHI StuI

FIGURA 6

fragmentos β -amiloide hechos como fusiones Fc IgG1:

- LVFFA
 - LVFFL
 - 16-30
 - 10-25
 - 1-29
 - 1-40
 - 1-42

Todos los terminales N clonados o luego gly triple

 - también controla la construcción de Fc IgG1 (secuencia no β -amiloide)

- Superposición oligonucleótidos complementarios para pentapéptidos

GGGLVFIA:

DI223 CGCGCTTCAGAAGAGCCGGTGGTCTTGTATCTTCGCAA
GAAGTCTTCTCCGCCACCAAGAACATAAGAAGCGTTGATC DI224
BssHII SpeI 5'

LIVEFAIR

DI225 CGCGCTTCAGAAGACTTGTATTCTTCGCAA
 GAAGTCTTCTGAACATAAGAAGCGTTGATC **DI226**

GGGLVET-1

DI227 CGCGCTTCAGAAGAGGCGGTGGTCTGTATTCTTCCTTA
GAAGTCTCTCCGCCACCAAGAACATAAGAAGGAATGATC **DI228**

FIGURA 7A

ES 2 283 463 T3

LVFFL:

DI229 CGCGCTTCAGAAGACTGTATTCTCCTTA
 GAAGTCTTCTAACATAAGAAGGAATGATC DI230

- cebadores PCR para fragmentos más largos

1 - 29 oligos β -amiloide

217 217-3G

DI-231 TGGACTAGTACCTTGTTGGATCCGAC

10 - 25 oligos β -amiloide

DI-232 TTAGCGCGCTTCAGAAGATAACGAAGTGCACCAACAA

DI-232-3G TTAGCGCGCTTCAGAAGAGGCCGGTGGTACGAAGTGCACCAACAA

DI-233 TGGACTAGTCCGACGTCTCTGCGAA

16 - 30 oligos β -amiloide

DI-234 TTAGCGCGCTTCAGAAGAAAGCTTGATTCTCGCA

DI-234-3G TTAGCGCGCTTCAGAAGAGGCCGGTGGTAAGCTTGATTCTCGCA

DI-235 TGGACTAGTGGCACCTTGTTGGATCC

FIGURA 7B

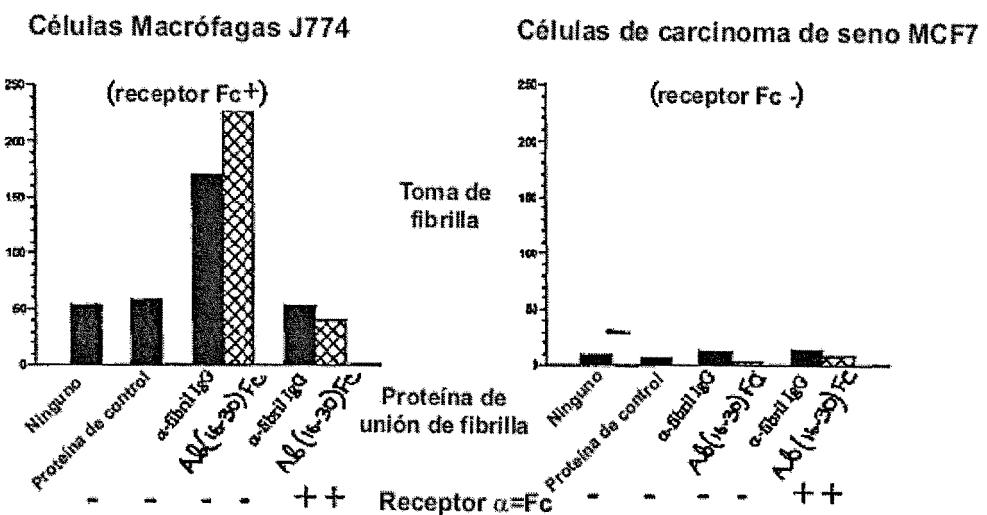


FIGURA 8

ES 2 283 463 T3

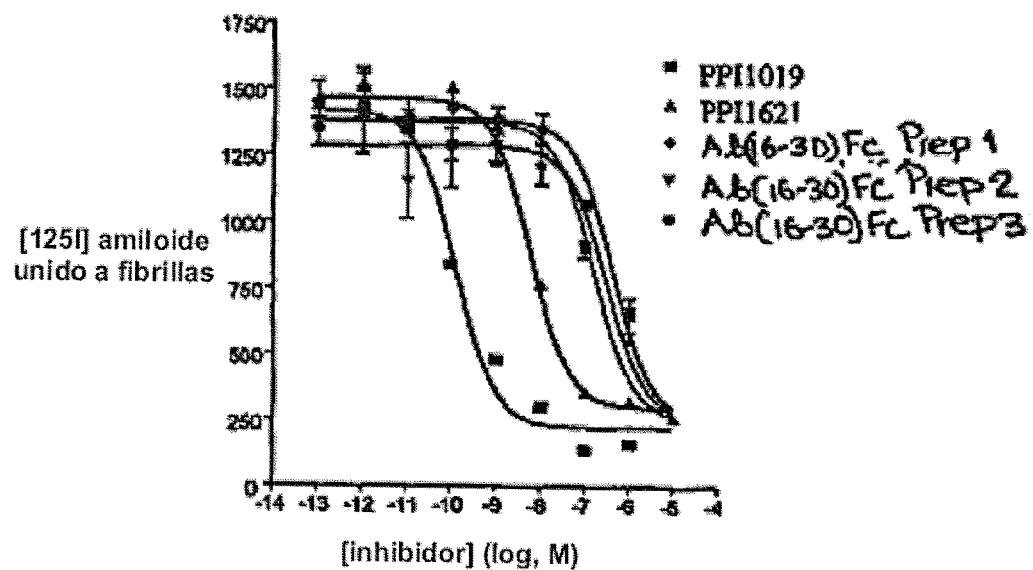


FIGURA 9

ES 2 283 463 T3

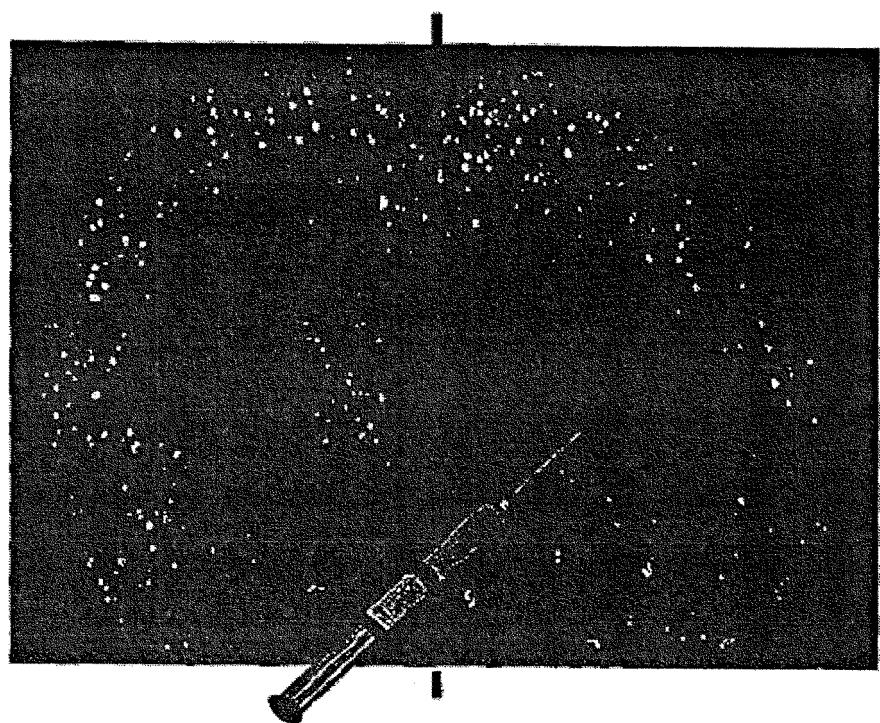


FIGURA 10

ES 2 283 463 T3

ATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTGCTGTGCTGCTGTGGAGC
AGCTTCGTTAACGCTTGTATTCTTCGAGAACAGTCGGATCGAACAAAG
GTGCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCAACCGTGCCA
GCACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCCTAAACCC
AAGGACACCCCATGATACTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT
GGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCCTCACCGTCCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAACAAAGCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAACCCAC
AGGTGTACACCCATGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGA
GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAACTACAAGACCAACGCCCTCCC
GTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTACAGCAAGCTACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTTCATGCTCCGTGATGCATGA
GGCTCTGCACAACCAACTACACGCAGAACAGGCCTCTCCGTCTCCGGTA
AATGA

FIGURA 11

ES 2 283 463 T3

tPA → 16-30 beta amiloide → Fc humano →
MDAMKRLCCVLLCGAVFVKLVFFAEDVGSNKGAEPKSCDKTHTCPCTAPE
→
LLGGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
→
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
→
QPREPQVTLPSSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP
→
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

FIGURA 12

ES 2 283 463 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Praecis Pharmaceuticals, Inc

5 <120> AGENTES TERAPÉUTICOS Y MÉTODOS DE USO DE ESTOS PARA TRATAR UNA ENFERMEDAD
AMILOIDOGENA

10 10 <130> PPI-105PC

<140>
<141>

15 15 <150> 601253,302
<151> 2000-11-27

20 20 <150> 601250,198
<151> 2000-11-29

25 25 <150> 601257,186
<151> 2000-12-20

<160> 13

30 30 <170> PatentIn Ver, 2.0

<210> 1

<211> 43

35 35 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

40 .Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30
Gly Leu Met Val Gly Val Val Ile Ala Thr
35 40

50 <210> 2

<211> 4

<212> PRT

55 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Leu Val Phe Phe
1

60 <210> 3

<211> 5

65 65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 283 463 T3

<400> 3

Leu Val Phe Phe Ala
1 5

5

<210> 4

<211> 8

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

15 Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala
1 5

<210> 5

20 <211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 5

Ala Ile Leu Ser Ser
1 5

30

<210> 6

<211> 38

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores

<400> 6

45 ctgggtccgc gtggatccgt gcccaggat tgggt

36

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores

<400> 7

60 attaaggcatt ctagatcatt taccaggaga gtg

33

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 283 463 T3

<400> 8

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15
5 Ala Val Phe Val Ser Pro
20

<210> 9

10 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 9

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala
1 5 10 15

20

<210> 10

<211> 232

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 283 463 T3

<400> 10

	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
5	1	5	10	15
	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
	20	25	30	
10	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	35	40	45	
15	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	50	55	60	
	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	65	70	75	80
20	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	85	90	95	
25	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	100	105	110	
30	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	115	120	125	
	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
	130	135	140	
35	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	145	150	155	160
40	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	165	170	175	
	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
	180	185	190	
45	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe			
	195	200	205	
50	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
	210	215	220	
55	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	225	230		

<210> 11

<211> 804

<212> ADN

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores

ES 2 283 463 T3

<400> 11

```

5      atggatgcaa tgaagagagg gctctgtgt gtgtgtgtgc tgggtggcgc agtcttcgtt 60
       aagcttgtat ttctcgaga agacgttggaa tcgaaacaaag gtggccgagcc caaatcttgt 120
       gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gacactgaaac ttcttgggggg accgtcagtc 180
       ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatat cccggacccc tgaggtcaca 240
       tgcgtggtgg tggacgttag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 300
       ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag cgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 360
       cgggtggtca ggttcttac cgttctgtcac cggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 420
       tgcagggtct ccaacaaage cttcccgagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 480
       gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcacccat cccgggatga gctgaceaaag 540
       aaccaggtaa gctgtacotg octggtcmaa gggttcttac ccagcgacat cgcgtggag 600
       tggagagca atggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gtcggactee 660
       gacggtctt tcttctcta cagaagctc accgtgacaa agagcaggta gcaagcaggq 720
       vacgttctt catgtccgt gatgtatgag gctotgcaca accactacac gcagaagagc 780
       ctctccctgt ctccggtaa atga                                804

```

20 <210> 12

<211> 267

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebadores

30 <400> 12

<pre> Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15 </pre>	
<pre> 35 Ala Val Phe Val Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn 20 25 30 </pre>	
<pre> 40 Lys Gly Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 35 40 45 </pre>	
<pre> 45 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 50 55 60 </pre>	
<pre> 55 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 65 70 75 80 </pre>	
<pre> 60 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 85 90 95 </pre>	
<pre> 65 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 100 105 110 </pre>	
<pre> 75 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 115 120 125 </pre>	
<pre> 80 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 130 135 140 </pre>	
<pre> 85 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 145 150 155 160 </pre>	
<pre> 90 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp 165 170 175 </pre>	

ES 2 283 463 T3

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
180 185 190

5 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
195 200 205

10 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
210 215 220

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
225 230 235 240

15 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
245 250 255

20 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265

<210> 13

25 <211> 247

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 283 463 T3

<400> 13

5	Lys	Leu	Val	Phe	Phe	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Glu
	1					5				10					15	
10	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
					20				25					30		
15	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
					35				40					45		
20	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
					50				55					60		
25	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
					65				70				75		80	
30	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Gln	Tyr	
					85				90					95		
35	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
					100				105					110		
40	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
					115				120					125		
45	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
					130				135					140		
50	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
					145				150				155		160	
55	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
					165				170				175			
60	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
					180				185					190		
65	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					195				200					205		
70	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
					210				215					220		
75	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
					225				230				235		240	
80	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
					245											