



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 642**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04822235 .0**

(86) Fecha de presentación : **24.11.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1778837**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

(54) Título: **Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por medio del uso de inhibidores de SCD4.**

(30) Prioridad: **09.08.2004 EP 04018874**
02.09.2004 WO PCT/EP04/009771

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(73) Titular/es: **CELLZOME AG.**
Meyerhofstrasse 1
69117 Heidelberg, DE

(72) Inventor/es: **Hopf, Carsten;**
Drewes, Gerard y
Ruffner, Heinz

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

ES 2 304 642 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por medio del uso de inhibidores de SCD4.

5 La presente invención se relaciona con el papel de SCD4 en el procesamiento de APP y el uso de inhibidores de SCD4 en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

La enfermedad de Alzheimer es una condición crónica que afecta a millones de personas en todo el mundo.

10 Los cerebros de aquellos que sufren de la enfermedad de Alzheimer muestran una patología característica de lesiones neuropatológicas prominentes, tal como los ovillos neurofibrilares (NFTs) inicialmente intracelulares, y las placas seniles extracelulares ricas en amiloide. Estas lesiones están asociadas con pérdida masiva de poblaciones de neuronas del CNS y su progreso acompaña la demencia clínica asociada con AD. El componente principal de las placas de amiloide son los péptidos beta amiloide (A-beta, Abeta o $A\beta$) de diferentes longitudes. Una variante del mismo que
15 es el $A\beta$ -42-péptido (Abeta-42) es el principal agente causante de la formación de amiloide. Otra variante es el $A\beta$ -40-péptido (Abeta-40). El beta amiloide es el producto proteolítico de una proteína precursora, proteína precursora beta amiloide (beta-APP o APP). APP es una proteína trans-membrana tipo I que es secuencialmente escindida por diferentes proteasas asociadas a la membrana. La primera escisión de APP se presenta por una o dos proteasas, alfa-secretasa o beta-secretasa. La alfa secretasa es una metaloproteasa cuya actividad es más probablemente proveída por una o por una combinación de las proteínas ADAM10 y ADAM17. La escisión por alfa-secretasa produce la formación de péptidos amiloide y por lo tanto se hace referencia a no amiloidogénicos. En contraste, la escisión de APP por beta-secretasa es un prerrequisito para la formación posterior de péptidos amiloide. Esta secretasa, también denominada BACE1 (enzima de escisión de APP en el sitio beta), es una proteína transmembrana tipo I que contiene actividad de aspartil proteasa (descrita en detalle más abajo).

25 La actividad de la beta-secretasa (BACE) escinde a APP en el ectodominio, dando como resultado el vertimiento de la APPb soluble secretada, y en un fragmento transmembrana C-terminal de 99 residuos (APP-C99). Vassar y colaboradores (Science 286, 735-741) clonaron una proteasa aspártica transmembrana que tenía las características de la beta-secretasa postulada de APP, que ellos llamaron BACE1. Los cultivos corticales primarios y de cerebro de ratones inactivados para BACE1 no mostraron actividad detectable de beta-secretasa, y cultivos corticales primarios de ratones inactivados para BACE produjeron mucho menos beta-amiloide de APP. Esto sugiere que BACE1, en lugar de su parálogo BACE2, es la beta-secretasa principal para la APP, BACE1 es una proteína de 501 aminoácidos que contiene un péptido señal de 21-aa seguido por una extensión de un dominio proproteína de 22 a 45 aa. Alternativamente existen formas empalmadas, BACE-1-457 y BACE-1-476. El dominio extracelular de la proteína madura es seguido por un
30 domino transmembrana predicho y una cola C-terminal citosólica corta de 24 aa. Está predicho que BACE1 es una proteína transmembrana tipo 1 con el sitio activo sobre el lado extracelular de la membrana, donde la beta-secretasa escinde a APP y a otros posibles sustratos aún no identificados. Aunque BACE1 es claramente una enzima clave requerida para el procesamiento de APP dentro de A-beta, evidencia reciente sugiere sustratos y funciones potenciales adicionales de BACE1 (J. Biol. Chem. 279, 10542-10550). Hasta la fecha, no se han descrito proteínas que interactúen
40 con BACE1 con funciones reguladoras o moduladoras.

El fragmento de APP generado por escisión de BACE1, APP-C99, es un sustrato para la actividad de la gama-secretasa, que escinde a APP-C99 dentro del plano de la membrana en un péptido A-beta (tal como el péptido amiloidogénico $A\beta$ 1-42), y en el fragmento C-terminal llamado dominio intracelular de la APP (AICD) (Annu Rev Cell Dev. Biol 19, 25-51). La actividad de la gama-secretasa reside dentro de un complejo multiproteína con al menos cuatro subunidades distintas. La primera subunidad que fue descubierta fue la presenilina (Proc Natl Acad Sci USA 94, 8208-13). Otros componentes conocidos de la proteína del complejo con la beta-secretasa son Pen-2, Nicastrina y Aph-1a.

A pesar del progreso reciente en eventos moleculares de delineación causantes de la etiología de la enfermedad de Alzheimer, no se han desarrollado hasta ahora terapias que modifiquen la enfermedad. Con este fin, la industria se ha esforzado en identificar compuestos adecuados de plomo para la inhibición de BACE1. Además, se ha reconocido que existe un número creciente de sustratos alternativos de gama-secretasa, más notablemente la proteína Notch. Consecuentemente, la inhibición de la gama-secretasa es probablemente la que causa efectos secundarios con base en el mecanismo. Las drogas de última generación (por ejemplo, Aricept®/donepezil) intentan lograr una mejora temporal de las funciones cognitivas por medio de la inhibición de la acetilcolinesterasa, que resulta en niveles más altos del neurotransmisor acetilcolina en el cerebro. Estas terapias no son adecuadas para etapas más avanzadas de la enfermedad, ellas no tratan la patología subyacente de la enfermedad, y ellas no detienen el progreso de la enfermedad.

60 Por lo tanto, existe una necesidad no satisfecha para la identificación de nuevos objetivos que permitan nuevas estrategias moleculares para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, existe una fuerte necesidad por nuevos compuestos terapéuticos que modifiquen los procesos moleculares anteriormente mencionados por medio del reconocimiento de dichos objetivos nuevos.

65 En un primer aspecto, la invención provee el uso de un inhibidor de SCD4 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde el inhibidor se selecciona del grupo que consiste de oligonucleótidos antisentido, ARNsi y ribozimas, y en donde el inhibidor modula la actividad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa.

En el contexto de la presente invención, utilizando ensayos funcionales, sorprendentemente se ha encontrado que SCD4 es un nuevo objetivo que permite nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La identificación de SCD4 como una molécula objetivo clave, posibilita el uso de moléculas que interactúan con SCD4 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Esto es mostrado especialmente en la sección de los Ejemplos (más abajo) donde se demuestra que ARNsi dirigido contra SCD4 resulta en una secreción/generación disminuida o atenuada de Abeta-42.

En el contexto de la presente invención, una “molécula que interactúa con SCD4” es una molécula que se enlaza al menos temporalmente a SCD4 y que modula preferiblemente la actividad de SCD4.

La estearoil-CoA desaturasa (SCD) es la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados. Existen al menos cuatro isoenzimas en el ratón (SCD1 a SCD4). La enzima convierte al estearato (y palmitato) en ácido grasos monoinsaturados (principalmente -oleato; C18:1).

En humanos, parece que existen únicamente dos genes ortólogos SCD (SCD1 y SCD4). La SCD4 humana (ver Fig. 3, también conocida como Proteína Hipotética FLJ21032) es similar a SCD1 en una extensión de la secuencia que contiene al dominio catalítico, pero es de otro modo muy distinta. La SCD4 se localiza sobre el cromosoma 4q21.3.

Evidencia reciente sugiere que la SCD4 humana es una enzima específica del cerebro en fetos humanos y que el gen se rompe en una familia con labio leporino (Beiraghi S, Zhou M, Talmadge CB, Went-Sumegi N, Davis JR, Huang D, Saal H, Seemayer TA, Sumegi J (2003) Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv(4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. *Gene*. 309(1):11-21) in a family with cleft lip, *Gene*, 309(1):11-21). Sin embargo, Beiraghi y colaboradores no encontraron expresión de SCD4 en ningún tejido humano adulto.

En contraste, en el contexto de la presente invención, se encontró que SCD4 es fuertemente expresada en niveles mucho más altos en cerebro de adulto humano que en cualquier otro tejido analizado (ver Fig. 1).

De acuerdo con la presente invención, la expresión “SCD4” no significa únicamente la proteína como la mostrada en la Fig. 3, sino también un derivado funcionalmente activo de la misma, o un fragmento funcionalmente activo de la misma, o un homólogo de la misma, o una variante codificada por un ácido nucleico que hibrida al ácido nucleico que codifica a dicha proteína bajo condiciones de baja rigurosidad. Preferiblemente, estas condiciones de baja rigurosidad incluyen hibridación en un amortiguador que contiene formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, BSA al 0,02%, 100 µg/ml de AND desnaturizado de esperma de salmón, y sulfato de dextrano al 10% (p/v) durante 18-20 horas a 40°C, lavando en un amortiguador que consta de 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% durante 1-5 horas a 55°C, y lavando en un amortiguador que consiste de 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% durante 1,5 horas a 60°C.

Generalmente, el término “funcionalmente activo” como se lo utiliza aquí se refiere a un polipéptido, especialmente un fragmento o derivado, que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de la proteína de acuerdo a la modalidad con la cual este polipéptido, especialmente fragmento o derivado, está relacionado.

En el caso de SCD4, un derivado funcionalmente activo significa preferiblemente un derivado que ejerce esencialmente la misma actividad que SCD4, por ejemplo que convierte estearato (y palmitato) en ácidos grasos monoinsaturados (principalmente oleato; C18:1) y/o que es capaz de jugar un papel similar al de SCD4 en la secreción de Abeta-42.

La actividad de SCD4 (como la actividad de la Delta-9 desaturasa) así como de un derivado funcionalmente activo del mismo, puede ser medida como se describe en Obukowicz MG y colaboradores, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (JPET) 287:157-166 (1998).

De acuerdo con la presente invención, el término “actividad” como se lo utiliza aquí, se refiere a la función de una molécula en su sentido más amplio. Esto incluye generalmente, pero no se limita a, funciones biológicas, bioquímicas, físicas o químicas de la molécula. Incluye por ejemplo la actividad enzimática, la habilidad para interactuar con otras moléculas y la habilidad para activar, facilitar, estabilizar, inhibir, suprimir o desestabilizar la función de otras moléculas, estabilidad, habilidad para localizar en ciertos sitios subcelulares. Cuando sea aplicable, dicho término también se relaciona con la disminución o atenuación de la secreción de Abeta-42 si la molécula es inhibida.

De acuerdo con la presente invención, los términos “derivados” o “análogos” de SCD4 o “variantes” como se los utiliza aquí incluyen preferiblemente, pero no se limitan a, moléculas que contienen regiones que son sustancialmente homólogas a la SCD4, en diferentes modalidades, pero al menos 70%, 80%, 90%, 95% ó 99% de identidad sobre una secuencia de aminoácidos de idéntico tamaño, o cuando se compara con una secuencia alineada en la cual la alineación es hecha por un programa de homología por computador conocido en el estado del arte, o cuyo ácido nucleico de codificación es capaz de hibridar a una secuencia que codifica a la proteína bajo condiciones no rigurosas, moderadamente rigurosas o rigurosas. El dominio catalítico puede ser más altamente conservado que una región no catalítica de la proteína. Por lo tanto, los porcentajes de identidad anteriores pueden ser superiores si se escoge una región que comprende, particularmente que consiste de, parte o la totalidad del dominio catalítico (por ejemplo, 85%,

90%, 95% ó 99%), o puede ser menor, si se escoge una región que no contiene al dominio catalítico (por ejemplo, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%). Esto significa, una proteína que es el resultado de una modificación de la proteína de ocurrencia natural, por sustituciones de aminoácidos, supresiones y adiciones, respectivamente, cuyos derivados exhiben aún la función biológica de proteína de ocurrencia natural aunque no necesariamente en el mismo grado.

5 La función biológica de tales proteínas puede ser examinada por ejemplo por medio de ensayos *in vitro* adecuados disponibles como los proveídos en la invención.

El término “fragmento” como se lo utiliza aquí se refiere a un polipéptido de al menos 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos de la proteína, particularmente SCD4, de acuerdo a la modalidad. En modalidades específicas, tales fragmentos

10 no son superiores a 35, 100 ó 200 aminoácidos.

El término “gen” como se lo utiliza aquí se refiere a un ácido nucleico que contiene un marco de lectura abierta que codifica a un polipéptido de, si no se establece otra cosa la presente invención, incluyendo tanto secuencias del exón como opcionalmente del intrón.

15

Los términos “homólogo” o “productos génicos homólogos” como se los utiliza aquí significan una proteína en otras especies, preferiblemente mamíferos, que realizan la misma función biológica que la proteína descrita aquí, en particular SCD4. Tales homólogos son también llamados “productos génicos ortólogos”. El algoritmo para la detección de los pares génicos ortólogos de humanos y de mamíferos o de otras especies utiliza el genoma completo de estos organismos. Primero, los mejores aciertos en la formación de parejas se recuperan, utilizando una alineación completa de Smith-Waterman de proteínas predichas. Para mejorar más la confiabilidad, estas parejas se agrupan con los mejores aciertos en la formación de parejas que involucran proteínas de *Drosophila melanogaster* y *C. elegans*. Tal análisis se suministra, por ejemplo en Nature, 2001, 409:860-921. Los homólogos de las proteínas de acuerdo con la invención pueden ser bien sea aislados con base en la homología de secuencia de los genes que codifican a las proteínas proveídas aquí para los genes con los genes de otras especies por clonación del gen respectivo aplicando tecnología convencional y expresando la proteína de tal gen, o por medio de otros métodos adecuados comúnmente conocidos en el arte.

20

25

De acuerdo con la presente invención, el término “inhibidor de SCD4” se refiere a una molécula que interactúa con SCD4 siendo un compuesto químico o bioquímico que preferiblemente inhibe o reduce la actividad de SCD4. Esto puede ocurrir, por ejemplo, a través de la supresión de la expresión del gen correspondiente. La expresión del gen se puede medir por medio de RT-PCR o del análisis de Western blot. Además, esto puede ocurrir a través de la inhibición de la actividad, por ejemplo por enlazamiento a SCD4.

30

Los ejemplos de tales inhibidores de SCD4 son proteínas de enlazamiento o péptidos de enlazamiento dirigidos contra SCD4, en particular contra el sitio activo de SCD4, y ácidos nucleicos dirigidos contra el gen de SCD4.

35

El término “ácidos nucleicos contra SCD4” se refiere a ADN o ARN monocatenarios o bicatenarios, o una modificación o derivado de los mismos que, por ejemplo, inhiben la expresión del gen de SCD4 o la actividad de SCD4 e incluye, sin limitación, ácidos nucleicos antisentido, aptámeros, los siARN (los ARN de interferencia pequeña) y ribozimas.

40

El inhibidor se puede seleccionar del grupo que consiste de anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, si ARN, moléculas de bajo peso molecular (LMW), péptidos de enlazamiento, aptámeros, ribozimas y péptido miméticos.

45

Las LMW son moléculas que no son proteínas, péptidos, anticuerpos o ácidos nucleicos, y que exhiben un peso molecular menor a 5.000 Da, preferiblemente menor a 2.000 Da, más preferiblemente menor a 500 Da. Tales LMW pueden ser identificadas en procedimientos de Alto Rendimiento partiendo de las bibliotecas.

50

Estos ácidos nucleicos pueden ser administrados directamente a una célula, o pueden ser producidos intracelularmente por transcripción de secuencias exógenas introducidas.

55

Un ácido nucleico “antisentido” como se lo utiliza aquí se refiere a un ácido nucleico capaz de hibridar a una porción específica de una secuencia de ARN que codifica a una proteína (preferiblemente ARNm) en virtud de alguna complementariedad de la secuencia. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a una región de codificación y/o de no codificación de un ARNm. Tales ácidos nucleicos antisentido que inhiben la expresión o la actividad de la proteína tienen utilidad como agentes terapéuticos, y pueden ser utilizados en el tratamiento o la prevención de trastornos como los descritos aquí.

60

Los ácidos nucleicos antisentido son de al menos seis nucleótidos y son preferiblemente oligonucleótidos en el rango desde 6 hasta aproximadamente 200 nucleótidos. En aspectos específicos, el oligonucleótido es de al menos 10 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos, al menos 100 nucleótidos, o al menos 200 nucleótidos.

65

Los ácidos nucleicos, por ejemplo, los ácidos nucleicos antisentido o los siARN, pueden ser sintetizados químicamente, por ejemplo de acuerdo con el método del fosfodiéster (ver, por ejemplo, Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584). Los aptámeros son ácidos nucleicos que se enlazan con alta afinidad a un polipéptido, aquí SCD4. Los aptámeros se pueden aislar por medio de métodos de selección tales como SELEX (ver, por ejemplo Jayasena (1999) Clin. Chem., 45, 1628-50; Klug y Famulok (1994) M. Mol. Biol. Rep., 20, 97-107; la paten-

tes estadounidense No. 5.582.981) a partir de un gran fondo común de diferentes moléculas monocatenarias de ARN. Los aptámeros pueden ser sintetizados y seleccionados también en su forma de imagen especular, por ejemplo como el L-ribonucleótido (Nolte y colaboradores, (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14, 1116-9; Klusmann y colaboradores, (1996) *Nat. Biotechnol.*, 14, 1112-5). Las formas que han sido aisladas en esta forma disfrutan de la ventaja de que no son degradadas por ribonucleasas de ocurrencia y, por lo tanto, poseen una mayor estabilidad.

Los ácidos nucleicos pueden ser degradados por endonucleasas o exonucleasas, en particular ADNasas y ARNasas que pueden ser encontradas en la célula. Es, por lo tanto, conveniente modificar los ácidos nucleicos con el propósito de estabilizarlos contra la degradación, asegurando así que se mantenga una alta concentración del ácido nucleico en la célula durante un largo período de tiempo (Beigelman y colaboradores, (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:3989-94; WO 95/11910; WO 98/37240; WO 97/29116). Típicamente, tal estabilización puede ser obtenida por medio de la introducción de uno o más grupos de fósforo dentro del nucleótido o por medio de la introducción de uno o más internucleótidos no fosforados.

Los internucleótidos modificados adecuados están compilados en Uhlmann y Peyman (1990), ver más arriba (ver también Beigelman y colaboradores, (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:3989-94; WO 95/11910; WO 98/37240; WO 97/29116). Los radicales fosfato internucleótido modificados y/o los puentes no fosforados en un ácido nucleico que pueden ser empleados en uno de los usos de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, metil fosfonato, fosforotioato, fosforoamidato, fosforoditioato y/o ésteres de fosfato, mientras que los análogos internucleótido no fosforados contienen, por ejemplo, puentes de siloxano, puentes de carbonato, carboximetil ésteres, puentes de acetamida y/o puentes de tioéter. También es la intención que esta modificación mejore la durabilidad de una composición farmacéutica que puede ser empleada en uno de los usos de acuerdo con la invención. En general, se puede modificar el oligonucleótido en la fracción de la base, en la fracción del azúcar, o en la columna vertebral de fosfato. El oligonucleótido puede incluir otros grupos añadidos tales como péptidos, agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger y colaboradores, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre y colaboradores, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; Publicación Internacional de Patente No. WO 88/09810) o una barrera hematoencefálica (ver, por ejemplo, la Publicación Internacional de Patente No. WO 89/10134), agentes de escisión activados para hibridación (ver, por ejemplo, Krol y colaboradores, 1988, *BioTechniques* 6:958-976), o agentes de intercalación (ver, por ejemplo, Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5:539-549).

En detalle, los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos una fracción de una base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tio-uridina, 5-carboximetilaminometil-uracilo, dihidouracilo, D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenine, 1-metilguanina, 1-metilinosine, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenine, 2-metilguanina, 3-metilcitosine, 5-metilcitosine, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, D-manosilqueosina, 5N-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

En otra modalidad, el oligonucleótido comprende al menos una fracción modificada de azúcar seleccionada del grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa.

El uso de ácidos nucleicos antisentido adecuados es descrito adicionalmente por ejemplo en Zheng y Kemeny (1995) *Clin. Exp. Immunol.*, 100, 380-2; Nellen y Lichtenstein (1993) *Trends Biochem. Sci.*, 18, 419-23, Stein (1992) *Leukemia*, 6, 697-74 o Yacyshyn, B. R. y colaboradores, (1998) *Gastroenterology*, 114, 1142).

En aún otra modalidad, el oligonucleótido es un oligonucleótido 2-a-anomérico. Un oligonucleótido a-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el cual, contrario a las unidades β usuales, las hebras corren paralelas entre sí (Gautier y colaboradores, 1987, *Nucl. Acids Res.* 15:6625-6641).

El oligonucleótido puede estar conjugado con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de entrelazamiento activado para hibridación, un agente de transporte, un agente de escisión activado para hibridación, etc.

A través de toda la invención, los oligonucleótidos de la invención pueden ser sintetizados por medio de métodos estándar conocidos en el arte, por ejemplo, por medio del uso de un sintetizador automatizado de ADN (tal como los que se encuentran disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, se pueden sintetizar los oligonucleótidos fosforotioato por medio del método de Stein y colaboradores, (1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209), se pueden preparar los oligonucleótidos metilfosfonato por medio del uso de soportes poliméricos con vidrio poroso controlado (Sarin y colaboradores, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7448-7451), etc.

En una modalidad específica, los oligonucleótidos antisentido comprenden a los ARN catalíticos, o ribozimas (ver, por ejemplo, la Publicación Internacional de Patente No. WO 90/11364; Sarver y colaboradores, 1990, *Science* 247:1222-1225). En otra modalidad, el oligonucleótido es un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue y colaboradores, 1987, *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148), o un análogo quimérico de ARN-DNA (Inoue y colaboradores, 1987, *FEBS Lett.* 215:327-330).

En una modalidad alternativa, los ácidos nucleótidos antisentido de la invención son producidos intracelularmente por transcripción de una secuencia endógena. Por ejemplo, se puede introducir un vector *in vivo* para que sea recogido por una célula, dentro de cuya célula se transcribe el vector o una porción del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN) de la invención. Tal vector contendría una secuencia que codifica a la proteína. Tal vector puede permanecer episomal, o llegar a integrarse cromosomalmente, siempre y cuando pueda ser transcrito para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores se pueden construir por medio de métodos estándar en el arte de tecnología de ADN recombinante. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros conocidos en el arte que son capaces de replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de las secuencias que codifican a los ARN antisentido puede ser por medio de cualquier promotor conocido en el arte para actuar en células de mamífero, preferiblemente en células de humano. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a, la región promotora temprana SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus de sarcoma de Rous (Yamamoto y colaboradores, 1980, Cell 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner y colaboradores, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster y colaboradores, 1982, Nature 296:39-42), etc.

Los ácidos nucleicos antisentido de la invención comprenden una secuencia complementaria al menos a una porción de un transcrito de ARN de un gen que codifica para una proteína, preferiblemente un gen humano, más preferiblemente el gen de SCD4 humano. Sin embargo, la complementariedad absoluta, aunque preferida, no es requerida. Una secuencia "complementaria al menos a una porción de un ARN", como la mencionada aquí, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ARN, formando un doblete estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, se puede analizar de este modo una hebra sencilla del doblete de ADN, o se puede ensayar la formación del triplete. La habilidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, entre mayor la hibridación del ácido nucleico, mayor la falta de concordancias de las bases que puede contener un ARN y formar aún un doblete estable (o triplete, según sea el caso). Alguien entrenado en el arte puede determinar un grado tolerable de falta de concordancia por medio del uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

La producción y el uso de los siARN como herramientas para interferencia de ARN en el proceso para reducir la expresión o para desactivar la expresión del gen, aquí la expresión del gen para SCD4, es por ejemplo descrita en Elbashir, S. M. y colaboradores, (2001) Genes Dev., 15, 188 o Elbashir, S. M. y colaboradores, (2001) Nature, 411, 494. Preferiblemente, los siARN exhiben una longitud de menos de 30 nucleótidos, en donde el tramo de identidad del ramal sentido del siARN es preferiblemente al menos de 19 nucleótidos.

Los ribozimas son también herramientas adecuadas para inhibir la traducción de ácidos nucleicos, aquí el gen para SCD4, ya que ellos son capaces de enlazar específicamente y cortar los ARNm. Ellos son descritos, por ejemplo en Amarzguoui y colaboradores, (1998) Cell. Mol. Life Sci., 54, 1175-202; Vaish y colaboradores, (1998) Nucleic Acids Res., 26, 5237-42; Persidis (1997) Nat. Biotechnol., 15, 921-2 o Couture y Stinchcomb (1996) Trends Genet., 12, 510-5.

Las composiciones farmacéuticas de la invención, que contienen una cantidad efectiva de ácido nucleico en un portador farmacéuticamente aceptable, pueden ser administradas a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno que es de un tipo que expresa o sobreexpresa SCD4.

La cantidad de ácido nucleico que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o condición particular dependerá de la naturaleza del trastorno o condición, y se puede determinar por medio de técnicas clínicas estándar. Donde sea posible, es deseable determinar la citotoxicidad del ácido nucleico *in vitro*, y luego en sistemas útiles de modelos animales, antes de probarlo y utilizarlo en humanos.

En una modalidad específica, se administran composiciones farmacéuticas que contienen ácidos nucleicos a través de liposomas, micropartículas, o microcápsulas. En diferentes modalidades de la invención, puede ser útil usar tales composiciones para lograr una liberación sostenida de los ácidos nucleicos. En una modalidad específica, puede ser deseable utilizar liposomas dirigidos a través de anticuerpos a tipos de células identificables específicas del sistema nervioso central (Leonetti y colaboradores, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2448-2451; Renneisen y colaboradores, 1990, J. Biol. Chem. 265:16337-16342).

El término "proteína de enlazamiento" o "péptido de enlazamiento" se refiere a una clase de proteínas o de péptidos que enlazan e inhiben a SCD4, e incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales o policlonales, fragmentos de anticuerpo y armazones de proteína dirigidos contra SCD4.

De acuerdo con la presente invención, el término anticuerpo o fragmento de anticuerpo se entiende que significan también anticuerpos o partes de enlazamiento de antígeno de los mismos, que han sido preparados en forma recombinante y, en caso de ser apropiado, modificados, tal como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, anticuerpos biespecíficos u oligoespecíficos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos F(ab) o F(ab)₂ (ver, por ejemplo, EP-B1-0 368 684, las patentes estadounidenses Nos. 4.816.567, 4.816.397, WO 88/01649, WO 93/06213 o WO 98/24884), preferiblemente producidos con la ayuda de una biblioteca de expresión de FAB.

Como una alternativa a los anticuerpos clásicos, también es posible, por ejemplo, utilizar armazones de proteína contra SCD4, por ejemplo anticalinas que están basadas en lipocalina (Beste y colaboradores, (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1898-1903). Los sitios naturales de enlazamiento del ligando de las lipocalinas, por ejemplo la proteína de enlazamiento de retinol o la proteína de enlazamiento de bilina, pueden ser alterados, por ejemplo por medio de una metodología de un “diseño de proteína combinatoria”, en tal forma que ellos enlazan a haptenos seleccionados, aquí a SCD4 (Skerra, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1482, 337-50). Otros armazones conocidos de proteína se sabe que son alternativas a los anticuerpos para reconocimiento molecular (Skerra (2000) J. Mol. Recognit., 13, 167-187).

El procedimiento para preparar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se efectúa de acuerdo con métodos que son bien conocidos para una persona capacitada, por ejemplo, por medio de inmunización de un mamífero, por ejemplo un conejo, con SCD4, donde sea apropiado en presencia de, por ejemplo, adyuvante de Freund y/o geles de hidróxido de aluminio (ver, por ejemplo, Diamond, B.A. y colaboradores, (1981) The New England Journal of Medicine: 1344-1349). Los anticuerpos policlonales que se forman en el animal como resultado de una reacción inmunológica pueden ser aislados posteriormente de la sangre utilizando métodos conocidos y, por ejemplo, purificados por medio de cromatografía en columna. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con el método conocido de Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299).

En detalle, los anticuerpos policlonales se pueden preparar como se describió anteriormente por medio de inmunización de un sujeto adecuado con un polipéptido como inmunógeno. Las composiciones preferidas de anticuerpo policonal son aquellas que han sido seleccionadas por anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Las preparaciones preferidas de anticuerpo policonal son aquellas que contienen únicamente anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos dados. Las composiciones particularmente preferidas de inmunógeno son aquellas que no contienen otras proteínas humanas tales como, por ejemplo, composiciones de inmunógeno elaboradas utilizando células huésped no humanas para expresión recombinante de un polipéptido de la invención. De tal forma, el único epítipo o epítopos humanos reconocidos por las composiciones resultantes de anticuerpo surgidas contra este inmunógeno estarán presentes como parte de un polipéptido o polipéptidos de la invención.

El título del anticuerpo en el sujeto inmunizado puede ser monitoreado durante el tiempo por medio de técnicas estándar, tales como con el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un polipéptido inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificadas luego por medio de técnicas conocidas, tales como cromatografía sobre proteína A para obtener la fracción de IgG. Alternativamente, se pueden seleccionar los anticuerpos específicos para una proteína o polipéptido de la invención (por ejemplo, parcialmente purificados) o purificados, por ejemplo, por cromatografía de afinidad. Por ejemplo, se produce una proteína expresada y purificada en forma recombinante (o parcialmente purificada) de la invención como se describe aquí, y se la acopla en forma covalente o no covalente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. La columna puede ser utilizada entonces para purificación de anticuerpos por afinidad, específica para las proteínas de la invención a partir de una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra un gran número de epítopos diferentes, con lo cual se genera una composición de anticuerpo sustancialmente purificada, esto es, una que esté sustancialmente libre de anticuerpos contaminantes. Por una composición sustancialmente purificada de anticuerpo se entiende, en este contexto, que la muestra de anticuerpo contiene a lo sumo únicamente 30% (en peso seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítopos diferentes a aquellos sobre la proteína o polipéptido deseado de la invención, y preferiblemente a lo sumo 20%, aún más preferiblemente a lo sumo 10%, y lo más preferible a lo sumo 5% (en peso seco) de la muestra es de anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpo purificada significa que al menos el 99% de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseado de la invención.

En un momento apropiado después de la inmunización, por ejemplo, cuando los títulos del anticuerpo específico son más altos, se pueden obtener las células que producen anticuerpo del individuo y utilizarlas para preparar anticuerpos monoclonales por medio de técnicas estándar, tales como la técnica del hibridoma originalmente descrita por Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495-497, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor y colaboradores, 1983, Immunol. Today 4:72), la técnica de hibridoma de EBV (Cole y colaboradores, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) a las técnicas trioma. La tecnología para la producción de hibridomas (ver, generalmente, Current Protocols in Immunology 1994, Coligan y colaboradores, (eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención son detectadas por selección de los sobrenadantes del cultivo de hibridoma para anticuerpos que se enlacen al polipéptido de interés, por ejemplo, utilizando un ensayo estándar de ELISA.

Como una alternativa para la preparación de hibridomas que segregan anticuerpo monoclonal, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención seleccionando una biblioteca de inmunoglobulina combinatorial recombinante (por ejemplo, una biblioteca de anticuerpo desplegada en el fago) con el polipéptido de interés. Los kits para generación y muestreo de bibliotecas desplegadas en el fago se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, el Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catálogo No. 27-9400-01; y el Stratagene SurfZAP Phage Display Kit, Catálogo No. 240612). Adicionalmente, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente asequibles para uso en la generación y selección de una biblioteca desplegada en el anticuerpo, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.223.409; la publicación PCT No. WO 92/18619; la publicación PCT No. WO 91/17271; la publicación PCT No. WO 92/20791; la publicación PCT No. WO 92/15679; la publicación PCT No. WO 93/01288; la publicación PCT No. WO 92/01047; la publicación PCT No. WO 92/09690; la publicación PCT No. WO 90/02809; Fuchs y colaboradores, 1991, Bio/Technology 9:1370-1372; Hay

y colaboradores, 1992, Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse y colaboradores, 1989, Science 246:1275-1281; Griffiths y colaboradores, 1993, EMBO J. 12:725-734.

Adicionalmente, los anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que contienen tanto porciones humanas como no humanas, que pueden ser elaborados utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, están dentro del alcance de la invención. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tal como aquellos que tienen una región variable derivada de mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana. (Ver, por ejemplo, Cabilly y colaboradores, patente estadounidense No. 4.816.567; y Boss y colaboradores, patente estadounidense No. 4.816.397, que se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinación complementaria (CDR) de las especies no humanas y de una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Ver, por ejemplo, Queen, patente estadounidense No. 5.585.089, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad). Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos por medio de técnicas de ADN recombinante conocidas en el estado del arte, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en la publicación PCT No. WO 87/02671; la solicitud de patente europea 184.187; la solicitud de patente europea 171.496; la solicitud de patente europea 173.494; la publicación PCT No. WO 86/01533; la patente estadounidense No. 4.816.567; la solicitud de patente europea 125.023; Better y colaboradores, 1988, Science 240:1041-1043; Liu y colaboradores, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu y colaboradores, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun y colaboradores, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura y colaboradores, 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood y colaboradores, 1985, Nature 314:446-449; y Shaw y colaboradores, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229: 1202-1207; Oi y colaboradores, 1986, Bio/Techniques 4:214; la patente estadounidense No. 5.225.539; Jones y colaboradores, 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan y colaboradores, 1988, Science 239:1534; y Beidler y colaboradores, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Tales anticuerpos pueden ser producidos, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes que codifican cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes que codifican una cadena liviana y pesada humana. Los ratones transgénicos se inmunizan en forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando tecnología convencional de hibridoma. Los transgenes para inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de la célula B, y posteriormente sufren activación de clase inmutación somática. De esta forma, utilizando tal técnica, es posible producir anticuerpos terapéuticamente útiles de IgG, IgA e IgE. Para un vistazo general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar, 1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para la producción de tales anticuerpos, ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.625.126; la patente estadounidense No. 5.633.425; la patente estadounidense No. 5.569.825; la patente estadounidense No. 5.661.016; y la patente estadounidense No. 5.545.806. Además, se puede involucrar a compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA), para proveer anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a aquella anteriormente.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen a un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada como "selección guiada". En esta metodología, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de murino, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano en el reconocimiento del mismo epítipo. (Jespers y colaboradores, 1994, Bio/technology 12:899-903).

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos de una proteína, en particular SCD4, por medio de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin limitarse a, el fragmento F(ab')₂ que puede ser producido por medio de digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; el fragmento Fab' que puede ser generado por medio de la reducción de los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂; el fragmento Fab que puede ser generado por medio de tratamiento del anticuerpo molecular con papaína y un agente de reducción; y fragmentos Fv.

En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado se puede lograr por medio de técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Para seleccionar anticuerpos específicos para un dominio particular de la proteína, o un derivado del mismo, uno puede ensayar hibridomas generados por un producto que enlaza al fragmento de la proteína, o a un derivado del mismo, que contiene a dicho dominio.

Los anticuerpos anteriores se pueden utilizar en métodos conocidos en el arte relacionados con la localización y/o cuantificación de la proteína o proteínas dadas, por ejemplo, para la obtención de imágenes de estas proteínas, midiendo los niveles de las mismas en muestras fisiológicamente apropiadas (por medio de inmunoensayo), en métodos de diagnóstico, etc. Esto es cierto también para un derivado, u homólogo del mismo de SCD4.

En una modalidad preferida, el inhibidor de SCD4 es un siARN con la secuencia:

AGUACUCAGAGACGGAUGC

Como se explicó anteriormente, sorprendentemente se ha encontrado en el contexto de la presente invención que SCD4 disminuye o atenúa la secreción de Abeta-42. De este modo, regula directa o indirectamente la actividad de la beta-secretasa y/o de la gama-secretasa. Por lo tanto, el inhibidor modula la actividad de la beta-secretasa y/o de la gama-secretasa. En el contexto de la presente invención, la “modulación de la actividad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa” significa que la actividad se reduce en tal forma que se reduce o no se forma producto (inhibición parcial o completa) o que la enzima respectiva produce un producto diferente (en el caso de gama secretasa, por ejemplo, Abeta-40 en vez de Abeta-42) o que las cantidades relativas de los productos son diferentes (en el caso de la gama secretasa, por ejemplo, más Abeta-40 que Abeta-42).

A lo largo de toda la invención, el término “modulación de la actividad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa” incluye que la actividad de la enzima es modulada directamente o indirectamente. Esto significa que el modulador de SCD4 puede o bien enlazarse también directamente a la enzima o, más preferiblemente, puede ejercer una influencia sobre SCD4 que a su vez, por ejemplo, por medio de interacciones proteína-proteína o por transducción de señal o a través de metabolitos pequeños, modula la actividad de la enzima.

Además, está incluido que el modulador modula ya sea a la gama secretasa o a la beta secretasa o la actividad de ambas enzimas.

A lo largo de toda la invención, se prefiere que el modulador de la beta secretasa inhiba la actividad de la beta secretasa ya sea completamente o parcialmente.

Con respecto al modulador de la actividad de la gama secretasa, se prefiere que este modulador inhiba la actividad de la gama secretasa. Sin embargo, también se prefiere que la actividad de la gama secretasa sea cambiada en una forma tal que más Abeta-40 y/o Abeta-38 sea producida en vez de Abeta-42.

La actividad de la gama secretasa se puede medir, por ejemplo, determinado el procesamiento de APP, por ejemplo, determinando si se produce Abeta-40 o Abeta-42 (ver la sección de los Ejemplos, más abajo).

Para medir la actividad de BACE1, se pueden analizar los cambios de la relación entre los fragmentos C-terminales alfa y beta de APP por medio de Western blotting (Blasko y colaboradores, J Neural Transm 111, 523); los ejemplos adicionales de los ensayos de la actividad de BACE1 incluyen pero no se limitan a: el uso de un péptido donante de una enzima ciclizada que contiene un sitio de escisión de BACE1 para reconstituir y medir la actividad reportera de la beta-galactosidasa (Naqvi y colaboradores, J Biomol Screen. 9, 398); el uso de sustratos de péptidos fluorimétricos apagados y de mediciones de fluorescencia (Andrau y colaboradores, J.Biol Chem 278, 25859); el uso de ensayos basados en la célula que utilizan proteínas quiméricas recombinantes, en las cuales una enzima (tal como la fosfatasa alcalina) es enlazada a través de una sección de aminoácidos, que contienen la secuencia de reconocimiento de BACE1, a una proteína residente de Golgi (Oh y colaboradores, Anal Biochem, 323, 7); ensayos basados en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Kennedy y colaboradores, Anal Biochem 319, 49); un sistema de selección de crecimiento celular en levadura (Luthi y colaboradores, Biochim Biophys Acta 1620, 167).

Preferiblemente, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

Se describe que la molécula que interactúa con SCD4 puede ser utilizada para preparar una composición farmacéutica.

Por lo tanto, la invención describe composiciones farmacéuticas, que pueden ser administradas a sujetos en una cantidad efectiva. En un aspecto preferido, la composición terapéutica está sustancialmente purificada. El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo, pero sin limitarse a, animales tales como vacas, cerdos, caballos, gallinas, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente humanos. En una modalidad específica, el sujeto es un mamífero no humano.

Se conocen diferentes sistemas de aplicación y pueden ser utilizados para administrar un compuesto terapéutico, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, y microcápsulas; el uso de células recombinantes capaces de expresar al compuesto terapéutico, el uso de endocitosis mediada por el receptor (por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432); una construcción de un ácido nucleico terapéutico como parte de un vector retroviral o de otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos se pueden administrar por medio de cualquier ruta conveniente, por ejemplo por medio de infusión, por inyección de bolo, por absorción a través de recubrimientos mucosos y cutáneos (por ejemplo, de la mucosa oral, rectal, e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas en el sistema nervioso central por cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un recipiente, tal como un recipiente Ommaya. También se puede emplear administración pulmonar, por ejemplo, por medio del uso de un inhalador o de un nebulizador, y la formulación con un agente formador de aerosol.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas en forma local al área que requiere del tratamiento. Esto se puede lograr por ejemplo, pero no como una limitación, por medio de

infusión local durante una cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de una cirugía, por medio de una inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluidas membranas, tal como membranas Silastic® (de silicona y plástico), o fibras. En una modalidad, la administración puede hacerse por medio de inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o neoplásico o tejido preneoplásico.

En otra modalidad, se puede administrar el compuesto terapéutico en una vesícula, en particular un liposoma (Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat y colaboradores, 1989, En: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler, eds., Liss, New York, páginas 353-365; Lopez-Berestein, igual que la referencia anterior, páginas 317-327; ver generalmente igual que la referencia anterior).

En aún otra modalidad, se puede administrar el compuesto terapéutico a través de un sistema de liberación controlada. En una modalidad, se puede utilizar una bomba (Langer, ver más arriba; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald y colaboradores, 1980, Surgery 88:507-516; Saudek y colaboradores, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otra modalidad, se pueden utilizar materiales poliméricos (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball, eds., Wiley, New York, 1984; Ranger y Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy y colaboradores, 1985, Science 228:190-192; During y colaboradores, 1989, Ann. Neurol. 25:351-356; Howard y colaboradores, 1989, J. Neurosurg. 71:858-863). En aún otra modalidad, se puede colocar un sistema de liberación controlada en cercanías del objetivo terapéutico, esto es, el cerebro, requiriendo así únicamente una fracción de la dosis sistémica (por ejemplo, Goodson, 1984, En: Medical Applications of Controlled Release, ver más arriba, Vol. 2, páginas 115-138). Otros sistemas de liberación controlada son discutidos por Langer (1990, Science 249:1527-1533).

En una modalidad específica en donde el compuesto terapéutico es un ácido nucleico, que codifica preferiblemente una proteína terapéutica, se puede administrar el ácido nucleico *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector apropiado de expresión de ácido nucleico y administrándola para que se vuelva intracelular, por ejemplo, por medio del uso de un vector retroviral (patente estadounidense No. 4.980.286), o por medio de inyección directa, o por medio del uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o por recubrimiento del mismo con lípidos, receptores de la superficie de la célula o agentes de transfección, o administrándolo en unión con un péptido del tipo de secuencia homeótica que es conocido por entrar al núcleo (por ejemplo, Joliet y colaboradores, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico terapéutico intracelularmente e incorporarlo por medio de recombinación homóloga dentro del ADN de la célula huésped para expresión.

En general, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición terapéutica, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o el listado en la U.S. Pharmacopeia u otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales, y más particularmente, en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el compuesto terapéutico. Tales portadores terapéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, origen animal, vegetal o sintético, incluyendo, pero sin limitarse a, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra en forma oral. Una solución salina y dextrosa acuosa son portadores preferidos cuando la composición farmacéutica es administrada en forma intravenosa. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol se emplean preferiblemente como portadores líquidos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes de humectación y emulgentes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación continuada y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglomerantes tradicionales y portadores tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio de grado farmacéutico, etc. Ejemplos de los portadores farmacéuticamente aceptables son descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto terapéutico, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proveer la forma para una administración apropiada al paciente. La formulación debe satisfacer la forma de administración.

La composición puede ser formulada, de acuerdo con procedimientos de rutina, como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente de solubilización y un anestésico local tal como lidocaína para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, se suministran los ingredientes o bien separadamente o en forma mezclada en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un contenedor herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando

la composición se va administrar en infusión, puede ser dispensada con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril grado farmacéutico. Cuando la composición se administra por medio de inyección, se la puede proveer agua estéril o solución salina para inyección para que los ingredientes puedan ser mezclados antes de su administración.

5

Los compuestos terapéuticos se pueden formular como formas neutras o en forma de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen a aquellas formadas con grupos carboxilo libres tal como aquellos derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., a aquellas formadas con grupos amino libres tal como aquellas derivadas de isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc., y aquellas derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio y férricos, etc.

10

La cantidad del compuesto terapéutico que será efectiva en el tratamiento de un trastorno particular o condición, dependerá de la naturaleza del trastorno o condición, y se puede determinar por medio de técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* pueden opcionalmente ser empleados para ayudar a identificar rangos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación dependerá de la ruta de administración, y de seriedad de la enfermedad o el trastorno, y se deberá decidir de acuerdo con el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Sin embargo, los rangos adecuados de las dosis para administración intravenosa están generalmente alrededor de 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramos de peso corporal. Los rangos adecuados de las dosis para administración intranasal están generalmente alrededor de 0,01 pg/kg de peso corporal hasta 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o *in vitro*.

20

Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente de 10% a 95% de ingrediente activo.

25

La invención también describe un paquete o kit farmacéutico que contiene uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con tal(es) contenedor(es) puede haber una información en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de compuestos farmacéuticos o productos biológicos, dicha información reflejando la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración en humanos.

30

Los kits pueden contener también vectores de expresión SCD4 o un péptido o polipéptido de interacción o de enlazamiento que puede ser utilizado para expresar SCD4 o al respectivo péptido o polipéptido de interacción o de enlazamiento. Tal kit contiene preferiblemente también los amortiguadores y reactivos requeridos. Opcionalmente asociado con tal(es) contenedor(es) pueden estar las instrucciones para uso del kit y/o una información en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de compuestos farmacéuticos o productos biológicos, cuya información refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración en humanos.

35

La invención describe además un método de tratamiento, en donde una cantidad efectiva de una molécula que interactúa con SCD4 o de un inhibidor o de una composición farmacéutica, es administrada a un sujeto que sufre de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente enfermedad de Alzheimer.

40

Con respecto a este método, todas las modalidades dadas anteriormente aplican para el uso de la invención.

45

La invención se relaciona además con un método para identificar un modulador de gama secretasa y/o un modulador de beta secretasa, que comprende las siguientes etapas:

50

- a. identificar una molécula que interactúa con SCD4 determinando si un compuesto de prueba dado es una molécula que interactúa con SCD4,
- b. determinar si la molécula que interactúa con SCD4 de la etapa a) es capaz de modular la actividad de la gama secretasa o la actividad de la beta secretasa.

55

En una modalidad preferida de la invención, en la etapa a) el compuesto de prueba es puesto en contacto con SCD4 y se determina la interacción de SCD4 con el compuesto de prueba. Preferiblemente, se mide si la molécula candidata se enlaza a SCD4.

60

El método de la invención se lleva a cabo preferiblemente en el contexto de un ensayo de alta producción. Tales ensayos son conocidos por una persona capacitada en el arte.

65

Las moléculas candidatas o de prueba para ser seleccionadas pueden ser suministradas como mezclas de un número limitado de compuestos especificados, o como bibliotecas de compuestos, bibliotecas de péptidos y similares. Los agentes/moléculas que van a ser seleccionados pueden incluir también todas las formas de antisuero, ácidos nucleicos antisentido, etc., que pueden modular la actividad o la expresión de SCD4. Los ejemplos de moléculas candidatas y de bibliotecas para selección se exponen más abajo.

La selección de bibliotecas se puede lograr por medio de cualquiera entre una variedad de métodos comúnmente conocidos. Ver, por ejemplo, las siguientes referencias, que divulgan la selección de bibliotecas de péptidos: Parmley y Smith. 1989. *Adv. Exp. Med. Biol.* 251:215-218; Scott y Smith. 1990. *Science* 249:386-390; Fowlkes y colaboradores. 1992. *BioTechniques* 13:422-427; Oldenburg y colaboradores. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5393-5397; Yu y colaboradores. 1994. *Cell* 76:933-945; Staudt y colaboradores. 1988. *Science* 241:577-580; Bock y colaboradores. 1992. *Nature* 355:564-566; Tuerk y colaboradores. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6988-6992; Ellington y colaboradores. 1992. *Nature* 355:850-852; patente estadounidense No. 5.096.815, patente estadounidense No. 5.223.409, y patente estadounidense No. 5.198.346, todas de Ladner y colaboradores; Rebar y Pabo. 1993. *Science* 263:671-673; y publicación internacional de patente No. WO 94/18318.

En una modalidad específica, la selección se puede llevar a cabo poniendo en contacto a los miembros de la biblioteca con una SCD4 inmovilizada sobre una fase sólida, y cosechar estos miembros de la biblioteca que se enlazan a la proteína (o ácido nucleico de codificación o derivado). Los ejemplos de tales métodos de selección, llamadas técnicas de "criba", son descritas a manera de ejemplo en Parmley y Smith, 1988, *Gene* 73:305-318; Fowlkes y colaboradores, 1992, *BioTechniques* 13:422-427; publicación internacional de patente No. WO 94/18318; y en las referencias citadas aquí anteriormente.

En una modalidad específica, los fragmentos y/o los análogos de SCD4, especialmente peptidomiméticos, se seleccionan por la actividad como inhibidores competitivos o no competitivos de la presencia de SCD4 (por ejemplo, expresión o estabilidad de SCD4) o, particularmente, la actividad de SCD4 en la célula.

En una modalidad, los agentes que modulan (esto es, que inhiben o activan) la actividad de SCD4 se pueden seleccionar utilizando un ensayo de secreción de Abeta-42, en donde se seleccionan los agentes por su habilidad para modular la actividad de SCD4 bajo condiciones acuosas, o fisiológicas, en las cuales SCD4 es activa en ausencia del agente que va a ser analizado. Preferiblemente, los agentes candidatos son agentes que interactúan con, o que se enlazan a SCD4. Los agentes que interfieren con la secreción de Abeta-42 se identifican como inhibidores de la actividad de SCD4. Los agentes que promueven la secreción de Abeta-42 se identifican como activadores de SCD4.

Preferiblemente, se puede utilizar un procedimiento en dos etapas que involucra (a) identificar moduladores en un ensayo de actividad de SCD4 (por ejemplo, un ensayo que mide la actividad de la Delta-9 desaturasa de SCD4, por ejemplo, como se describe en Obukowicz MG y colaboradores, ver más arriba), y (b) analizar los moduladores para disminuir o atenuar la actividad de Abeta-42.

Los métodos para selección, particularmente los métodos para selección de agentes que se enlazan a SCD4, pueden involucrar la marcación de SCD4 con radioligandos (por ejemplo, ^{125}I o ^3H), ligandos magnéticos (por ejemplo, gránulos paramagnéticos unidos en forma covalente a acetato de fotobiotina), ligandos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína o rodamina), ligandos de enzimas (por ejemplo, luciferasa o β -galactosidasa). Los reactantes que se enlazan en solución pueden ser aislados luego por medio de una de muchas técnicas conocidas en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoprecipitación de la proteína marcada utilizando antisuero contra el compañero de enlazamiento no marcado (o compañero de enlazamiento marcado con un marcador distinguible de aquel utilizado sobre la segunda proteína marcada), cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y centrifugación en gradiente de densidad. En una modalidad, el compañero de enlazamiento marcado es un fragmento pequeño o peptidomimético que no es retenido por un filtro comercialmente disponible. Después del enlazamiento, la especie marcada es luego incapaz de pasar a través del filtro, permitiendo un ensayo simple de enlazamiento.

Se utilizan métodos comúnmente conocidos en el arte para marcar al menos a una de las proteínas o polipéptidos. Los métodos adecuados de marcación incluyen, pero no se limitan a, radiomarcación por incorporación de aminoácidos radiomarcados, por ejemplo, ^3H -leucina o ^{35}S -metianina, marcando en forma radioactiva por medio de yodación posterior a la traducción con ^{125}I o ^{131}I utilizando el método de la cloramina T, reactivos de Bolton-Hunter, etc., o marcando con ^{32}P utilizando fosforilasa y fósforo inorgánico marcado en forma radioactiva, marcación de biotina con acetato de fotobiotina y exposición a una lámpara de rayos ultravioleta, etc. En los casos en donde se moviliza a uno de los compañeros de enlazamiento, por ejemplo, como se describe más abajo, se marca la especie libre. Cuando ninguna de las especies que interactúan se inmoviliza, cada una puede ser marcada con un marcador distinguible de tal manera que el aislamiento de ambos compañeros pueda ser seguido para permitir una cuantificación más precisa, y para distinguir la formación, por ejemplo, de enlazamiento homomérico a partir de enlazamiento heteromérico. Se proveen métodos que utilizan proteínas accesorias que se enlazan a uno de los compañeros modificados para mejorar la sensibilidad de la detección, incrementan la estabilidad del enlazamiento, etc.

Los mismos métodos de marcación que se describieron anteriormente pueden ser utilizados también para marcar, por ejemplo, a la APP, Abeta-40 o Abeta-42, por ejemplo para determinar la cantidad de Abeta-40 o Abeta-42 secretadas en un ensayo de secreción de Abeta.

Las condiciones típicas para enlazamiento, por ejemplo, pero no como una limitante, son en una solución salina acuosa de NaCl 10-250 mM, Tris-HCl 5-50 mM, pH 5-8, y Triton X-100 al 0,5% u otro detergente que mejore la especificidad de la interacción. Se pueden añadir queladores metálicos y/o cationes divalentes para mejorar el enlazamiento y/o reducir la proteólisis. Las temperaturas de reacción pueden incluir 4, 10, 15, 22, 25, 35 ó 42 grados Celsius, y el período de incubación es típicamente al menos de 15 segundos, pero se prefieren períodos más largos para permitir que ocurra el equilibrio del enlazamiento. Se puede ensayar un enlazamiento particular utilizando ensayos de

enlazamiento de proteína rutinarios para determinar las condiciones óptimas de enlazamiento para un enlazamiento reproducible.

Los parámetros físicos de enlazamiento se pueden analizar por cuantificación del enlazamiento utilizando métodos de ensayo específicos para el marcador utilizado, por ejemplo, recuento de centelleo líquido para detección de la radioactividad, actividad de la enzima para fracciones marcadas con la enzima, etc. Se analizan luego los resultados de la reacción utilizando el análisis de Scatchard, el análisis de Hill, y otros métodos comúnmente conocidos en el estado del arte (ver, por ejemplo, *Proteins, Structures, and Molecular Principles*, 2nd Edition (1993) Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York).

En una segunda metodología común para los ensayos de enlazamiento, se inmoviliza sobre un filtro una de las especies de enlazamiento, en un pozo de una placa de microtitulación, en un tubo de ensayo, a una matriz de cromatografía, etc., ya sea en forma covalente o no covalente. Las proteínas pueden ser inmovilizadas en forma covalente utilizando un método conocido en el estado del arte, por ejemplo, pero sin limitarse a, el método de Kadonaga y Tjian, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5889-5893, esto es, enlazamiento a un sustrato derivado de bromuro de cianógeno tal como CNBr-Sefarosa 4B (Farmacia). Cuando sea necesario, el uso de espaciadores puede reducir el impedimento estérico por parte del sustrato. La unión no covalente de proteínas a un sustrato incluye, pero no se limita a, la unión de una proteína a una superficie cargada, enlazamiento con anticuerpos específicos, enlazamiento a una tercera proteína de interacción no relacionada, etc.

Se proveen ensayos de los agentes (incluidos los extractos celulares o una reserva de biblioteca) que compiten por el enlazamiento de una molécula dada a SCD4 para la selección de competidores, reforzadores, o agentes con características de enlazamiento específicamente deseadas (por ejemplo, afinidad más alta o más baja) comparadas con un compañero de enlazamiento dado. Nuevamente, o bien la molécula o SCD4 pueden ser marcadas por cualquier medio (por ejemplo, aquellos medios descritos anteriormente).

En modalidades específicas, los agentes de bloqueo para inhibir el enlazamiento no específico de reactivos con otras proteínas, o pérdidas de absorción de los reactivos con plásticos, matrices de inmovilización, etc., están incluidos en la mezcla de ensayo. Los agentes de bloqueo incluyen, pero no están restringidos a albúmina de suero bovino, caseína, leche desengrasada seca, reactivo de Denhardt, Ficoll, polivinilpirrolidina, detergentes no iónicos (NP40, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes iónicos (por ejemplo, SDS, LDS, etc.), polietilén glicol, etc. Las concentraciones de los agentes de bloqueo apropiados permiten enlazamiento específico.

Después de llevar a cabo el enlazamiento, se remueve el agente marcado no enlazado en el sobrenadante, y la proteína inmovilizada (o, si es aplicable, el agente inmovilizado) que retiene a cualquier agente marcado, enlazado, es lavada extensivamente. La cantidad de marcador enlazado es cuantificada luego utilizando métodos estándar en el arte para detectar al marcador, como se describió más arriba.

En otras modalidades específicas, se puede llevar a cabo la selección de moduladores de la proteína como se dispuso aquí, por medio de la unión de aquellos y/o de los anticuerpos como se dispuso aquí con un portador sólido.

La preparación de tal disposición que contiene diferentes tipos de proteínas (incluyendo anticuerpos) es bien conocida en el arte y es clara para una persona capacitada en el arte (ver, por ejemplo, Ekins y colaboradores, 1989, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7:155-168; Mitchell y colaboradores 2002, *Nature Biotechnol.* 20:225-229; Petricoin y colaboradores, 2002, *Lancet* 359:572-577; Templin y colaboradores, 2001, *Trends Biotechnol.* 20:160-166; Wilson y Nock, 2001, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:81-85; Lee y colaboradores, 2002 *Science* 295:1702-1705; MacBeath y Schreiber, 2000, *Science* 289:1760; Blawas y Reichert, 1998, *Biomaterials* 19:595; Kane y colaboradores, 1999, *Biomaterials* 20:2363; Chen y colaboradores, 1997, *Science* 276:1425; Vaughan y colaboradores, 1996, *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Mahler y colaboradores, 1997, *Immunotechnology* 3:31-43; Roberts y colaboradores, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-273; Nord y colaboradores, 1997, *Nature Biotechnol.* 15:772-777; Nord y colaboradores, 2001, *Eur. J. Biochem.* 268:4269-4277; Brody y Gold, 2000, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74:5-13; Karlstroem y Nygren, 2001, *Anal. Biochem.* 295:22-30; Nelson y colaboradores, 2000, *Electrophoresis* 21:1155-1163; Honore y colaboradores, 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3:265-274; Albala, 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2:145-152, Figeys y Pinto, 2001, *Electrophoresis* 2: 208-216 y las referencias en las publicaciones enlistadas aquí).

Las proteínas u otros agentes se pueden unir a un ordenamiento por diferentes medios como será evidente para una persona capacitada en el arte. Las proteínas se pueden añadir por ejemplo a la disposición a través de una marca TAP (como se describe en WO/0009716 y en Rigaut y colaboradores, 1999, *Nature Biotechnol.* 10:1030-1032) después de la etapa de purificación o por medio de otro esquema de purificación adecuado como será evidente para una persona capacitada en el arte.

Opcionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos funcionales como será evidente para una persona capacitada en el arte, algunos de los cuales se suministran como ejemplos aquí, para chequear la integridad de la proteína enlazada a la matriz.

Opcionalmente, la unión de las proteínas o del anticuerpo como se reseñó anteriormente puede ser monitoreada adicionalmente por medio de métodos diferentes evidentes para una persona capacitada en el arte. Aquellos incluyen, pero no se limitan a resonancia del plasmón de superficie (ver, por ejemplo, McDonnel, 2001, *Curr. Opin. Chem.*

Biol. 5:572-577; Lee, 2001, Trends Biotechnol. 19:217-222; Weinberger y colaboradores, 2000, 1:395-416; Pearson y colaboradores, 2000, Ann. Clin. Biochem. 37:119-145; Vely y colaboradores, 2000, Methods Mol. Biol. 121:313-321; Slepak, 2000, J. Mol. Recognit. 13:20-26.

Los ejemplos de ensayos útiles para medir la producción de péptidos Abeta-40 y Abeta-42 por medio de ELISA incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Vassar R y colaboradores, 1999, Science, 286:735-41.

Los ejemplos de ensayos útiles para medir la producción de fragmentos de APP C-terminal en líneas de células o en animales transgénicos por medio de Western Blot incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Yan R y colaboradores, 1999, Nature, 402:533-7.

Los ejemplos de ensayos útiles para medir la actividad proteolítica de beta o gama secretasas hacia los fragmentos bacteriamente expresados de APP *in vitro* (por ejemplo, por medio de la modificación de la expresión de proteínas SCD4 en células por medio de ARNi (siARN)) y/o de plásmidos que codifican a la proteína SCD4 incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Tian G y colaboradores, 2002, J Biol Chem, 277:31499-505.

Los ejemplos de ensayos útiles para medir la transactivación de un gen reportero conducido por Gal4 (por ejemplo, por la modificación de la expresión de SCD4 por medio de ARNi (siARN) y/o de plásmidos que codifican a la proteína SCD4, incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Cao X y colaboradores, 2001, Science, 293:115-20.

Cualquier molécula conocida en el estado del arte puede ser analizada por su habilidad para ser una molécula que interactúa o un inhibidor de acuerdo con la presente invención. Las moléculas candidatas pueden ser directamente suministradas a una célula que expresa a la SCD4, o, en el caso de proteínas candidatas, pueden ser suministradas proveyendo sus ácidos nucleicos codificadores bajo condiciones en las cuales los ácidos nucleicos se expresan en forma recombinante para producir la proteína candidata.

El método de la invención es ideal para seleccionar bibliotecas químicas para moléculas que modulan, por ejemplo, inhiben, antagonizan, o agonizan, la cantidad de actividad de la proteína, en particular de SCD4. Las bibliotecas químicas pueden ser bibliotecas de péptidos, bibliotecas de peptidomiméticos, bibliotecas sintetizadas químicamente, recombinantes, por ejemplo, bibliotecas desplegadas por fagos y bibliotecas basadas en la traducción *in vitro*, otras bibliotecas orgánicas sintéticas que no peptídicas, etc.

Se encuentran disponibles comercialmente ejemplos de bibliotecas de diferentes fuentes (ArQule, Tripos/PanLabs, Chem-Design, Pharmacopoeia). En algunos casos, estas bibliotecas químicas se generan utilizando estrategias de combinación que codifican la identidad de cada miembro de la biblioteca sobre un sustrato al cual se une el compuesto miembro, permitiendo así la identificación directa e inmediata de una molécula que es un modulador efectivo. De esta forma, en muchas metodologías de combinación, la posición sobre una placa de un compuesto especifica esa composición del compuesto. También, en un ejemplo, una posición en una placa única puede tener de 1-20 químicos que pueden ser seleccionados por medio de la administración a un pozo que contiene las interacciones de interés. De esta forma, si se detecta modulación, se pueden ensayar reservas más y más pequeñas de pares que interactúan para la modulación de la actividad. Por medio de tales métodos, se pueden seleccionar muchas moléculas candidatas.

Se conocen una gran diversidad de bibliotecas adecuadas para uso en el estado del arte y se las puede utilizar para proveer compuestos que son ensayados de acuerdo con la presente invención. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas utilizando métodos estándar. Las bibliotecas químicas (sintéticas), bibliotecas de expresión recombinante, o bibliotecas con base en polisomas son ejemplos típicos de bibliotecas que pueden ser utilizadas.

Las bibliotecas pueden ser encogidas o semirrígidas (teniendo algún grado de rigidez estructural), o lineal o no encogida. La biblioteca puede ser una biblioteca de expresión genómica o un ADNc, una biblioteca aleatoria de expresión de péptidos, o una biblioteca aleatoria de péptidos sintetizada químicamente, o una biblioteca que no es de péptidos. Las bibliotecas de expresión se introducen dentro de las células en las cuales ocurre el ensayo, donde los ácidos nucleicos de la biblioteca se expresan para producir sus proteínas codificadas.

En una modalidad, las bibliotecas de péptidos que pueden ser utilizadas en la presente invención pueden ser bibliotecas que son químicamente sintetizadas *in vitro*. Los ejemplos de tales bibliotecas se encuentran en Houghten y colaboradores, 1991, Nature 354:84-86, que describe mezclas de hexapéptidos libres en los cuales el primero y segundo residuos en cada péptido fueron individual y específicamente definidos; Lam y colaboradores, 1991, Nature 354:82-84, que describen una metodología "un granulo, un péptido" en la cual un esquema de síntesis de división en fase sólida produjo una biblioteca de péptidos en la cual cada gránulo en el compendio había inmovilizado sobre ella una secuencia aleatoria única de residuos de aminoácidos; Medynski, 1994, Bio/Technology 12:709-710, que describe métodos de síntesis de división y de síntesis T-bag; y Gallop y colaboradores, 1994, J. Med. Chem. 37:1233-1251. Simplemente a manera de otros ejemplos, se puede preparar una biblioteca de combinación para uso, de acuerdo con los métodos de Ohlmeyer y colaboradores, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926; Erb y colaboradores, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426; Houghten y colaboradores, 1992, Biotechniques 13:412; Jayawickreme y colaboradores, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1614-1618; o Salmon y colaboradores, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712. La publicación PCT No. WO 93/20242 y Brenner y Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383 describen "bibliotecas químicas codificadas de combinación", que contienen identificadores de oligonucleótidos para cada miembro de la biblioteca química de polímeros.

En una modalidad preferida, la biblioteca seleccionada es una biblioteca de expresión biológica que es una biblioteca de péptidos aleatorios expresados en fago, donde los péptidos aleatorios están encerrados (por ejemplo, en virtud de tener enlaces disulfuro).

- 5 Además, en forma más general, también se pueden utilizar bibliotecas orgánicas diversas estructuralmente encerradas (por ejemplo, no peptídicas). A manera de ejemplo, se puede utilizar una biblioteca de benzodiazepina (ver, por ejemplo, Bunin y colaboradores, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712).

- 10 Las bibliotecas conformacionalmente encerradas que pueden ser utilizadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen residuos invariables de cisteína los cuales, en un ambiente oxidante, se entrelazan por medio de enlaces disulfuro para formar cistinas, péptidos modificados (por ejemplo, el flúor, los metales, los marcadores isotópicos, están fosforilados, etc.), péptidos que contienen uno o más aminoácidos de ocurrencia no natural, estructuras no peptídicas, y péptidos que contienen una fracción significativa de ácido carboxiglutámico.

- 15 Se pueden utilizar también las bibliotecas no peptídicas, por ejemplo, derivados de péptido (por ejemplo, que contienen uno o más aminoácidos de ocurrencia no natural). Un ejemplo de estas son las bibliotecas de peptoides (Simon y colaboradores, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371). Los peptoides son polímeros de aminoácidos no naturales que tienen cadenas laterales de ocurrencia natural unidas no al carbono α sino al nitrógeno del grupo amino de la cadena principal. Ya que los peptoides no son degradados fácilmente por enzimas digestivas humanas, se adaptan convenientemente más fácilmente para ser utilizados como drogas. Otro ejemplo de una biblioteca que puede ser utilizada, en la cual las funciones amida en los péptidos han sido permitidas para generar una biblioteca de combinación químicamente transformada, es descrita por Ostresh y colaboradores, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142).

- 25 Los miembros de las bibliotecas de péptidos que pueden ser seleccionados de acuerdo con la invención no están limitados para contener los 20 aminoácidos de ocurrencia natural. En particular, las bibliotecas sintetizadas químicamente y las bibliotecas con base en polisomas permiten el uso de aminoácidos además de los 20 aminoácidos de ocurrencia natural (por su inclusión en el reservorio precursor de aminoácidos utilizados en la producción de la biblioteca). En modalidades específicas, los miembros de la biblioteca contienen uno o más aminoácidos no naturales o no clásicos o péptidos cíclicos. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico; -Abu, -Ahx, ácido 6-amino hexanóico; Aib, ácido 2-amino isobutírico; ácido 3-amino propiónico; ornitina; norleucina; norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cistéico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, aminoácidos de diseño tales como β -metil aminoácidos, C-metil aminoácidos, N-metil aminoácidos, fluoroaminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, los aminoácidos pueden ser D (dextrorrotatorios) o L (levorrotatorios).

- 40 En una modalidad específica, fragmentos y/o análogos de proteínas de la invención, especialmente peptidomiméticos, son seleccionados por su actividad como inhibidores competitivos o no competitivos de la expresión o actividad de SCD4 (por ejemplo, estabilidad).

- En otra modalidad de la presente invención, se puede utilizar química de combinación para identificar moduladores de SCD4. La química de combinación es capaz de crear bibliotecas que contienen cientos de miles de compuestos, muchos de los cuales pueden ser estructuralmente similares. Mientras que los programas de selección de alta producción son capaces de seleccionar estas vastas bibliotecas por afinidad con objetivos conocidos, se han desarrollado nuevas metodologías que logran bibliotecas de menor dimensión pero que proveen máxima diversidad química. (Ver, por ejemplo, Matter, 1997, J. Med. Chem. 40:1219-1229).

- Un método de química de combinación, huella digital de afinidad, ha sido utilizado anteriormente para analizar una biblioteca discreta de moléculas pequeñas para afinidades de enlazamiento para un panel definido de proteínas. Las huellas digitales obtenidas por la selección se utilizan para predecir la afinidad de los miembros individuales de la biblioteca para otras proteínas o receptores de interés, en particular de SCD4. Se comparan las huellas digitales con las huellas digitales obtenidas a partir de otros compuestos conocidos por reaccionar con la proteína de interés para predecir si el compuesto de la biblioteca puede reaccionar en forma similar. Por ejemplo, en vez de analizar cada ligando en una gran biblioteca por interacción con una proteína, se podrían analizar únicamente aquellos ligandos que tienen una huella digital similar a otros compuestos que se sabe que tienen esa actividad (Ver, por ejemplo, Kauvar y colaboradores, 1995, Chem. Biol. 2:107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28; y Kauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, Kurtz, Stanker y Skerritt (eds), 1995, AOAC:Washington, D.C., 305-312).

- 60 Kay y colaboradores (1993, Gene 128:59-65) divulgaron un método de construcción de bibliotecas de péptidos que codifican péptidos de secuencia completamente aleatoria que son tan largas como aquellas de cualquiera de las bibliotecas convencionales anteriores. Las bibliotecas divulgadas por Kay y colaboradores codifican péptidos sintéticos totalmente aleatorios aproximadamente mayores a 20 aminoácidos en longitud. Tales bibliotecas pueden ser convenientemente seleccionadas para identificar moduladores de proteínas. (Ver también la patente estadounidense No. 5.498.538 fechada el 12 de marzo de 1996; y la publicación PCT No. WO 94/18318 fechada el 18 de agosto de 1994).

Una revisión integral de diferentes tipos de bibliotecas de péptidos pueden ser encontradas en Gallop y colaboradores, 1994, J. Med. Chem. 37:1233-1251.

En una modalidad preferida, la interacción de los compuestos de prueba con SCD4 resulta en una inhibición de la actividad de SCD4.

De acuerdo con una modalidad preferida, en la etapa b) se mide la habilidad de la gama secretasa para escindir a la APP. Esta se puede medir como se indicó más arriba.

De acuerdo con otra modalidad preferida, en la etapa b) se mide la habilidad de la molécula que interactúa con SCD4 para disminuir o atenuar la secreción de Abeta-42.

Además, la invención también describe un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades degenerativas, preferiblemente la enfermedad de Alzheimer, que comprende las siguientes etapas:

- a) identificar un modulador de la gama secretasa y/o un modulador de la beta secretasa, preferiblemente un inhibidor, de acuerdo con el método de la invención, y
- b) formular al modulador de la gama secretasa y/o de la beta secretasa, preferiblemente un inhibidor, para una composición farmacéutica.

Con respecto a la composición farmacéutica, todas las modalidades como se indicó anteriormente también aplican aquí. Este método puede comprender además la etapa de mezclar la molécula identificada con un portador farmacéuticamente aceptable como se explicó anteriormente.

La invención también describe una composición farmacéutica que contiene un inhibidor de SCD4 como se definió anteriormente.

Además, la invención también describe una composición farmacéutica obtenible por medio del método anterior para la preparación de una composición farmacéutica.

La invención también describe la composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Alzheimer y trastornos neurodegenerativos relacionados.

La invención también describe un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, preferiblemente la enfermedad de Alzheimer, que comprende la administración a un sujeto que necesite de tal tratamiento o prevención de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica como la descrita anteriormente.

Con respecto a ese método, todas las modalidades como las descritas anteriormente aplican también para el uso de la invención.

La invención también se relaciona con el uso de un inhibidor de SCD4 para la modulación, preferiblemente la inhibición de la actividad *in vitro* de la beta secretasa y/o de la gama secretasa, en donde el inhibidor es seleccionado del grupo que consiste oligonucleótidos antisentido, siARN y ribozimas. Por ejemplo, está incluido dentro de la presente invención, modular, preferiblemente inhibir la actividad de la beta secretasa y/o de la gama secretasa en cultivos celulares por medio del inhibidor de SCD4. Todas las modalidades con respecto al inhibidor de SCD4 como se describió anteriormente, también aplican a este uso de la invención.

La invención se ilustra adicionalmente, pero no está limitada de ninguna manera por las siguientes figuras y ejemplos:

Fig. 1

SCD4 es muy altamente expresada en cerebro humano. Se transcribieron en forma inversa 5 µg de ARN total de diferentes fuentes de tejido humano (Clontech). Se utilizaron cantidades iguales de los ADNC de cada tejido e iniciadores específicos de SCD4 para la determinación de niveles de expresión relativos de SCD4 por medio de PCR cuantitativo. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes y se normalizaron todos los valores para un ARN humano de referencia (Stratagene).

Fig. 2

La desactivación mediada por siARN de la expresión de SCD4 atenúa la secreción de Aβ1-42.

(Panel izquierdo) Los siARN dirigidos contra BACE1, SCD4 o Luc3 fueron transfectados dentro de células H4 de neuroglioma que sobreexpresan APPsw mutante. 48 horas después de la transfección se removió el medio de crecimiento y se incubaron las células durante la noche en medio libre de suero. Se recolectaron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de Aβ1-42 por medio de ELISA (Innogenetics). Se realizaron al menos tres experimentos independientes por duplicado.

(Panel derecho) El siARN dirigido contra SCD4 reduce específicamente los niveles de ARNm. Se preparó ARN total a partir de células H4/APPsw con siARN dirigido o bien contra Luc3 o contra SCD4. Después de la transcripción inversa, se determinaron las cantidades relativas de transcritos de SCD4 por medio de PCR cuantitativa. Se llevaron a cabo al menos dos experimentos independientes.

Fig. 3

Secuencia de aminoácidos de SCD4 humana (SCD4/Proteína Hipotética FL J21032), descrita en código de una letra.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se refieren a todas las modalidades de la invención y especialmente a modalidades como las reivindicadas en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Determinación de los niveles de expresión en tejido de SCD4

Para evaluar si SCD4 califica como un objetivo potencial para AD, investigamos si se expresó en cerebro humano. Con ese fin, determinamos sus niveles de expresión en diferentes tejidos por medio de la transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). En resumen, se transcribieron en forma inversa 5 µg de ARN total de diferentes fuentes de tejido humano (Clontech) utilizando procedimientos estándar. Se utilizaron cantidades iguales de los ADNc de cada tejido e iniciadores específicos de SCD4 para la determinación de los niveles de expresión relativa de SCD4 por medio de la PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Se normalizaron todos los valores con un ARN humano de referencia (Stratagene).

Ejemplo 2

Inhibición de SCD4 con siARN

Se empleó una estrategia de perturbación de la expresión del gen ARNi para la validación funcional de SCD4 como un efector del procesamiento de APP: Unos siARN dirigidos contra SCD-4 así como unos siARN dirigidos contra BACE1 o dentro de Luc3, fueron transfectados dentro de células de neuroblastoma SKNBE2 o células de neuroglioma H4. Los siARN para SCD-4 humanas fueron sintetizados por Dharmacon Research Inc.

La secuencia del siARN utilizada para SCD-4 es: AGUACUCAGAGACGGAUGC.

La transfección de células SK-N-BE2 se realizó utilizando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron las células con una densidad de $1,0 \times 10^4$ células en un volumen final de 85 µl por placa de 96 pozos, 12 a 16 horas antes de la transfección. Se mezclaron 25 nM de los siARN con 8 µl de amortiguador Opti-MEM (Gibco) y 60 ng de ADN portador, y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a las células. 16 y 48 horas después de la transfección se reemplazó el medio con 100 µl ó 200 µl de medio de crecimiento con o sin suero, respectivamente. 72 horas después de la transfección, se cosecharon 100 µl de sobrenadantes para el ELISA de Aβ42. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Innogenetics).

La transfección de células H4 se llevó a cabo utilizando RNAiFect (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se sembraron las células con una densidad de $1,0 \times 10^4$ células en un volumen final de 100 µl por placa de 96 pozos, 12 a 16 horas antes de la transfección. Se mezclaron 270 nM (0,375 µg) de los siARN con 25 µl de amortiguador EC-R y 2,3 µl de RNAiFect y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a las células. Se reemplazó el medio sobre las células con 75 µl de medio de crecimiento fresco. 5 horas después de la transfección, se lavaron las células una vez con medio de crecimiento y se añadieron 100 µl para cultivo adicional. 48 horas después de la transfección se reemplazó con 200 µl de medio de crecimiento libre de suero. 72 horas después de la transfección se cosecharon 100 µl de sobrenadantes para el ELISA de Aβ42. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Innogenetics).

La eficiencia de la inactivación de los siARN se evaluó con el nivel de proteína por medio de la cotransfección de los siARN y los vectores de expresión correspondientes de ADNc etiquetados con TAP, o por medio del uso de líneas celulares que expresan en forma estable a la respectiva proteína etiquetada de interés. 48 horas después de la transfección, se prepararon extractos, se separaron las proteínas por medio de SDS-PAGE y se las transfirió a nitrocelulosa. Los Western blot se probaron con anticuerpos dirigidos contra el marcador y la tubulina.

Nos hemos percatado de que semejante a los siARN dirigidos contra el efector conocido del procesamiento de APP, BACE1, el siARN dirigido a SCD-4 provocó una atenuación significativa de la secreción de Aβ1-42, mientras que el siARN de Luc3 no tuvo efecto.

ES 2 304 642 T3

De esta forma, pudimos mostrar que SCD-4 juega un papel funcional en el procesamiento de APP. Se observó que por medio de la inhibición de SCD-4, se podría reducir la producción del péptido A β 1-42.

Confirmamos que los SiARN de SCD-4 realmente interfirieron con la expresión de la desaturasa sobre el nivel de ARNm por medio del análisis de la RT-PCR como se describió anteriormente.

Ejemplo 3

10 *Determinación de la actividad de SCD-4*

a) *Ensayo microsomal de hígado de rata*

Adaptado para la medición de la actividad SCD-4 a partir de: (Obukowicz MG, Raz A, Pyla PD, Rico JG, Wendling JM, Needleman P (1998a) Identification and characterization of a novel delta6/delta5 fatty acid desaturase inhibitor as a potential anti-inflammatory agent. *Biochem. Pharmacol.* 1;55(7): 1045-58; Obukowicz MG, Welsch DJ, Salsgiver WJ, Martin-Berger CL, Chinn KS, Duffin KL, Raz A, Needleman P (1998b) Novel, selective delta6 or delta5 fatty acid desaturase inhibitors as anti-inflammatory agents in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287(1):157-66).

20 Las membranas microsomas de rata se obtienen por medio de procedimientos estándar de fraccionamiento bioquímico.

En una placa de 48 pozos se mezclan los siguientes componentes: a) 150 μ l de amortiguador/cofactores (sacarosa 250 mM, KCl 150 mM, NaF 40 mM, ATP 1,3 mM, 1 mg/ml de $MgCl_2 \cdot 5 H_2O$, glutatona reducida 1,5 mM, CoA reducida 60 μ M, nicotinamida 330 μ M, 670 μ g/ml de NADH, fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4); b) 50 μ l de microsomas de hígado de rata (~500 μ g de proteína total); c) 2,2 μ l de compuesto de prueba (patrón de DMSO; concentración final 1% de DMSO); d) 20 μ l (0,05 μ Ci) Sustratos de Ácido Graso con ^{14}C .

El ensayo permite la medición simultánea de la actividad de SCD1 y SCD4 (desaturasa D9). El sustrato para estas actividades enzimáticas es ácido esteárico ($^{14}C18:0$).

Se incuban las muestras a 37°C durante 1 hora, y luego se detienen las reacciones y se hidrolizan los enlaces éster del ácido graso por medio de incubación con 200 μ l de KOH 2,5N en metanol:agua (4:1) durante 4 h a 65°C. Se protonan los ácidos grasos libres con 280 μ l de ácido fórmico y se extrae dentro de la fase orgánica (700 μ l de hexano). Se analizan 200 μ l de la capa de hexano sobre placas de cromatografía en capa delgada de $AgNO_3$ (TLC). Las placas se secan durante la noche y se cuantifica la actividad por medio de del formador de imágenes en pantalla de fósforo. Como una alternativa al análisis por TLC, la separación de las muestras podría lograrse por medio de HPLC.

40 b) *Ensayo celular*

Se utiliza una línea celular que expresa altos niveles de SCD4. Se adaptan las células al crecimiento en un medio adecuado libre de suero que contiene sustratos de SCD4 (tal como ácido esteárico 10 μ M /BSA libre de ácido graso 15 μ M). Para medir la actividad de SCD4 se siembran 2×10^5 células por placa de 48 pozos y luego se incuban en un medio que contiene 10 μ M de un sustrato adecuado (tal como ácido esteárico ($^{14}C18:0$)). Para determinar el metabolismo del ácido graso, se lava la capa celular con PBS y se añaden 200 μ l de KOH 2,5 N en metanol:agua (4:1). Se procesan adicionalmente las muestras como se describió anteriormente.

50 c) *Ensayos de selección de Alto Rendimiento utilizando enzimas sintéticas de ácido graso* (ver WO-03/019146, página 27 y siguientes)

El ensayo utiliza ésteres de acil CoA graso tritiados en posiciones específicas en un formato de ensayo microsomal (ver más arriba). El método detecta la liberación de agua tritiada y elude el requerimiento de análisis por TLC o HPLC de ácidos grasos marcados con ^{14}C .

En resumen, se mezclan los siguientes componentes (volumen total: 100 μ l): 2 μ l de acil CoA graso no marcado 1,5 mM; 1 μ l de acil CoA graso tritiado, 10 μ l de NADH 20 mM, compuestos a partir del patrón de DMSO, 67 μ l de amortiguador de fosfato 100 mM, pH 7,2. Se añaden 80 μ l de esta mezcla a 20 μ l de microsomas (~20 μ g de proteína total) y se le permite proseguir a la reacción durante 5-30 min a temperatura ambiente. Se añaden 10 μ l de ácido perclórico al 6% para detener la reacción. Para sedimentar el sustrato tritiado no utilizado, se someten las muestras a agitación tipo vórtice con 100 μ l de suspensión de carbón vegetal y se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se analizan 400 μ l del sobrenadante en un contador de centelleo líquido.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 10 | • US 5582981 A [0032] | • WO 9002809 A [0057] |
| | • WO 9511910 A [0033] [0034] | • US 5585089 A, Queen [0058] |
| | • WO 9837240 A [0033] [0034] | • WO 8702671 A [0058] |
| 15 | • WO 9729116 A [0033] [0034] | • EP 184187 A [0058] |
| | • WO 8809810 A [0035] | • EP 171496 A [0058] |
| 20 | • WO 8910134 A [0035] | • EP 173494 A [0058] |
| | • WO 9011364 A [0042] | • WO 8601533 A [0058] |
| | • EP 0368684 B1 [0051] | • EP 125023 A [0058] |
| 25 | • US 4816567 A [0051] [0058] [0058] | • US 5225539 A [0058] |
| | • US 4816397 A [0051] [0058] | • US 5625126 A [0059] |
| 30 | • WO 8801649 A [0051] | • US 5633425 A [0059] |
| | • WO 9306213 A [0051] | • US 5569825 A [0059] |
| | • WO 9824884 A [0051] | • US 5661016 A [0059] |
| 35 | • US 5223409 A [0057] [0095] | • US 5545806 A [0059] |
| | • WO 9218619 A [0057] | • US 4980286 A [0080] |
| 40 | • WO 9117271 A [0057] | • US 5096815 A [0095] |
| | • WO 9220791 A [0057] | • US 5198346 A, Ladner [0095] |
| | • WO 9215679 A [0057] | • WO 9418318 A [0095] [0096] [0132] |
| 45 | • WO 9301288 A [0057] | • WO 0009716 A [0111] |
| | • WO 9201047 A [0057] | • WO 9320242 A [0123] |
| 50 | • WO 9209690 A [0057] | • US 5498538 A [0132] |

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- | | |
|----|---|
| 55 | • VASSAR y colaboradores <i>Science</i> , vol. 286, 735-741 [0004] |
| | • <i>J. Biol. Chem.</i> , vol. 279, 10542-10550 [0004] |
| | • <i>Annu Rev Cell Dev. Biol.</i> , vol. 19, 25-51 [0005] |
| 60 | • <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> , vol. 94, 8208-13 [0005] |
| | • BEIRAGHI S; ZHOU M; TALMADGE CB; WENT-SUMEGI N; DAVIS JR; HUANG D; SAAL H; SEE-MAYER TA; SUMEGI J. Identification and characterization of a novel gene disrupted by a pericentric inversion inv (4)(p13.1q21.1) in a family with cleft lip. <i>Gene</i> , <u>2003</u> , vol. 309 (1), 11-21 [0014] |
| 65 | |

ES 2 304 642 T3

- **OBUKOWICZ** MG. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (*JPET*, 1998, vol. 287, 157-166 [0018]
- *Nature*, 2001, vol. 409, 860-921 [0023]
- **UHLMANN, E.; PEYMAN, A.** *Chemical Reviews*, 1990, vol. 90, 543-584 [0032]
- **JAYASENA.** *Clin. Chem.*, 1999, vol. 45, 1628-50 [0032]
- **KLUG; FAMULOK. M.** *Mol. Biol. Rep.*, 1994, vol. 20, 97-107 [0032]
- **NOLTE** y colaboradores *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 1116-9 [0032]
- **KLUSSMANN** y colaboradores *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 1112-5 [0032]
- **BEIGELMAN** y colaboradores *Nucleic Acids Res.*, 1995, vol. 23, 3989-94 [0033] [0034]
- **LETSINGER** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0035]
- **LEMAITRE** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 648-652 [0035]
- **KROL** y colaboradores *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958-976 [0035]
- **ZON.** *Pharm. Res.*, 1988, vol. 5, 539-549 [0035]
- **ZHENG; KEMENY.** *Clin. Exp. Immunol.*, 1995, vol. 100, 380-2 [0038]
- **NELLEN; LICHTENSTEIN.** *Trends Biochem. Sci.*, 1993, vol. 18, 419-23 [0038]
- **STEIN.** *Leukemia*, 1992, vol. 6, 697-74 [0038]
- **YACYSHYN, B. R.** y colaboradores *Gastroenterology*, 1998, vol. 114, 1142 [0038]
- **GAUTIER** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6625-6641 [0039]
- **STEIN** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1988, vol. 16, 3209 [0041]
- **SARIN** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 7448-7451 [0041]
- **SARVER** y colaboradores *Science*, 1990, vol. 247, 1222-1225 [0042]
- **INOUE** y colaboradores *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6131-6148 [0042]
- **INOUE** y colaboradores *FEBS Lett.*, 1987, vol. 215, 327-330 [0042]
- **BERNOIST; CHAMBON.** *Nature*, 1981, vol. 290, 304-310 [0043]
- **YAMAMOTO** y colaboradores *Cell*, 1980, vol. 22, 787-797 [0043]
- **WAGNER** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, 1441-1445 [0043]
- **BRINSTER** y colaboradores *Nature*, 1982, vol. 296, 39-42 [0043]
- **ELBASHIR, S. M.** y colaboradores *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 188 [0045]
- **ELBASHIR, S. M.** y colaboradores *Nature*, 2001, vol. 411, 494 [0045]
- **AMARZGUIQUI** y colaboradores *Cell. Mol. Life Sci.*, 1998, vol. 54, 1175-202 [0046]
- **VAISH** y colaboradores *Nucleic Acids Res.*, 1998, vol. 26, 5237-42 [0046]
- **PERSIDIS.** *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 921-2 [0046]
- **COUTURE; STINCHCOMB.** *Trends Genet.*, 1996, vol. 12, 510-5 [0046]
- **LEONETTI** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87, 2448-2451 [0049]
- **RENNEISEN** y colaboradores *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, 16337-16342 [0049]

ES 2 304 642 T3

- **BESTE** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1898-1903 [0052]
- **SKERRA**. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, vol. 1482, 337-50 [0052]
- 5 • **SKERRA**. *J. Mol. Recognit.*, 2000, vol. 13, 167-187 [0052]
- **WINTER**, G.; **MILSTEIN**, C. *Nature*, 1991, vol. 349, 293-299 [0053]
- **KOHLER**; **MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0056]
- 10 • **KOZBOR** y colaboradores *Immunol. Today*, 1983, vol. 4, 72 [0056]
- **COLE** y colaboradores Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss, Inc*, 1985, 77-96 [0056]
- 15 • Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc, 1994 [0056]
- **FUCHS** y colaboradores *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1370-1372 [0057]
- **HAY** y colaboradores *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0057]
- 20 • **HUSE** y colaboradores *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0057]
- **GRIFFITHS** y colaboradores *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0057]
- 25 • **BETTER** y colaboradores *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0058]
- **LIU** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3439-3443 [0058]
- **LIU** y colaboradores *J. Immunol.*, 1987, vol. 139, 3521-3526 [0058]
- 30 • **SUN** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 214-218 [0058]
- **NISHIMURA** y colaboradores *Canc. Res.*, 1987, vol. 47, 999-1005 [0058]
- 35 • **WOOD** y colaboradores *Nature*, 1985, vol. 314, 446-449 [0058]
- **SHAW** y colaboradores *J. Natl. Cancer Inst.*, 1988, vol. 80, 1553-1559 [0058]
- **MORRISON**. *Science*, 1985, vol. 229, 1202-1207 [0058]
- 40 • **OI** y colaboradores *Bio/Techniques*, 1986, vol. 4, 214 [0058]
- **JONES** y colaboradores *Nature*, 1986, vol. 321, 552-525 [0058]
- 45 • **VERHOEYAN** y colaboradores *Science*, 1988, vol. 239, 1534 [0058]
- **BEIDLER** y colaboradores *J. Immunol.*, 1988, vol. 141, 4053-4060 [0058]
- **LONBERG**; **HUSZAR**. *Int. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0059]
- 50 • **JESPERS** y colaboradores *Bio/technology*, 1994, vol. 12, 899-903 [0060]
- **BLASKO** y colaboradores *J Neural Transm*, vol. 111, 523 [0072]
- 55 • **NAQVI** y colaboradores *J Biomol Screen.*, vol. 9, 398 [0072]
- **ANDRAU** y colaboradores *J. Biol Chem*, vol. 278, 25859 [0072]
- **OH** y colaboradores *Anal Biochem*, vol. 323, 7 [0072]
- 60 • **KENNEDY** y colaboradores *Anal Biochem*, vol. 319, 49 [0072]
- **LUTHI** y colaboradores *Biochim Biophys Acta*, vol. 1620, 167 [0072]
- 65 • **WU**; **WU**. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0076]
- **LANGER**. *Science*, 1990, vol. 249, 1527-1533 [0078] [0079]

ES 2 304 642 T3

- **TREAT** y colaboradores *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer. Liss, 1989*, 353-365 [0078]
- **LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER.** 317-327 [0078]
- 5 • **SEFTON.** *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 1987, vol. 14, 201-240 [0079]
- **BUCHWALD** y colaboradores *Surgery*, 1980, vol. 88, 507-516 [0079]
- **SAUDEK** y colaboradores *N. Engl. J. Med.*, 1989, vol. 321, 574-579 [0079]
- 10 • **Medical Applications of Controlled Release.** *CRC Press*, 1974 [0079]
- **Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance.** *Wiley*, 1984 [0079]
- 15 • **RANGER; PEPPAS.** *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 1983, vol. 23, 61 [0079]
- **LEVY** y colaboradores *Science*, 1985, vol. 228, 190-192 [0079]
- **DURING** y colaboradores *Ann. Neurol.*, 1989, vol. 25, 351-356 [0079]
- 20 • **HOWARD** y colaboradores *J. Neurosurg.*, 1989, vol. 71, 858-863 [0079]
- **GOODSON.** *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, vol. 2, 115-138 [0079]
- 25 • **JOLIOT** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 1864-1868 [0080]
- **PARMLEY; SMITH.** *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1989, vol. 251, 215-218 [0095]
- **SCOTT; SMITH.** *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0095]
- 30 • **FOWLKES** y colaboradores *BioTechniques*, 1992, vol. 13, 422-427 [0095] [0096]
- **OLDENBURG** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5393-5397 [0095]
- 35 • **YU** y colaboradores *Cell*, 1994, vol. 76, 933-945 [0095]
- **STAUDT** y colaboradores *Science*, 1988, vol. 241, 577-580 [0095]
- **BOCK** y colaboradores *Nature*, 1992, vol. 355, 564-566 [0095]
- 40 • **TUERK** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6988-6992 [0095]
- **ELLINGTON** y colaboradores *Nature*, 1992, vol. 355, 850-852 [0095]
- 45 • **REBAR; PABO.** *Science*, 1993, vol. 263, 671-673 [0095]
- **PARMLEY; SMITH.** *Gene*, 1988, vol. 73, 305-318 [0096]
- **KADONAGA; TJIAN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 5889-5893 [0105]
- 50 • **EKINS** y colaboradores *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1989, vol. 7, 155-168 [0110]
- **MITCHELL** y colaboradores *Nature Biotechnol.*, 2002, vol. 20, 225-229 [0110]
- 55 • **PETRICOIN** y colaboradores *Lancet*, 2002, vol. 359, 572-577 [0110]
- **TEMPLIN** y colaboradores *Trends Biotechnol.*, 2001, vol. 20, 160-166 [0110]
- **WILSON; NOCK.** *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, vol. 6, 81-85 [0110]
- 60 • **LEE** y colaboradores *Science*, 2002, vol. 295, 1702-1705 [0110]
- **MACBEATH; SCHREIBER.** *Science*, 2000, vol. 289, 1760 [0110]
- 65 • **BLAWAS; REICHERT.** *Biomaterials*, 1998, vol. 19, 595 [0110]
- **KANE** y colaboradores *Biomaterials*, 1999, vol. 20, 2363 [0110]

ES 2 304 642 T3

- **CHEN** y colaboradores *Science*, 1997, vol. 276, 1425 [0110]
- **VAUGHAM** y colaboradores *Nature Biotechnol.*, 1996, vol. 14, 309-314 [0110]
- 5 • **MAHLER** y colaboradores *Immunotechnology*, 1997, vol. 3, 31-43 [0110]
- **ROBERTS** y colaboradores *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, vol. 3, 268-273 [0110]
- 10 • **NORD** y colaboradores *Nature Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 772-777 [0110]
- **NORD** y colaboradores *Eur. J. Biochem.*, 2001, vol. 268, 4269-4277 [0110]
- **BRODY; GOLD**. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 2000, vol. 74, 5-13 [0110]
- 15 • **KARLSTROEM; NYGREN**. *Anal. Biochem.*, 2001, vol. 295, 22-30 [0110]
- **NELSON** y colaboradores *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, 1155-1163 [0110]
- 20 • **HONORE** y colaboradores *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2001, vol. 3, 265-274 [0110]
- **ALBALA**. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2001, vol. 2, 145-152 [0110]
- **FIGEYS; PINTO**. *Electrophoresis*, 2001, vol. 2, 208-216 [0110]
- 25 • **RIGAUT** y colaboradores *Nature Biotechnol.*, 1999, vol. 10, 1030-1032 [0111]
- **MCDONNEL**. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, vol. 5, 572-577 [0113]
- 30 • **LEE**. *Trends Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 217-222 [0113]
- **WEINBERGER** y colaboradores *TRENDS BIOTECHNOL.*, 2000, vol. 1, 395-416 [0113]
- **PEARSON** y colaboradores *Ann. Clin. Biochem.*, 2000, vol. 37, 119-145 [0113]
- 35 • **VELY** y colaboradores *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 121, 313-321 [0113]
- **SLEPAK**. *J. Mol. Recognit.*, 2000, vol. 13, 20-26 [0113]
- 40 • **VASSAR R** y colaboradores *Science*, 1999, vol. 286, 735-41 [0114]
- **YAN R** y colaboradores *Nature*, 1999, vol. 402, 533-7 [0115]
- **TIAN G** y colaboradores *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 31499-505 [0116]
- 45 • **CAO X** y colaboradores *Science*, 2001, vol. 293, 115-20 [0117]
- **HOUGHTEN** y colaboradores *Nature*, 1991, vol. 354, 84-86 [0123]
- 50 • **LAM** y colaboradores *Nature*, 1991, vol. 354, 82-84 [0123]
- **MEDYNSKI**. *Bio/Technology*, 1994, vol. 12, 709-710 [0123]
- **GALLOP**. *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 1233-1251 [0123]
- 55 • **OHLMEYER** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 10922-10926 [0123]
- **ERB** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11422-11426 [0123]
- **HOUGHTEN** y colaboradores *Biotechniques*, 1992, vol. 13, 412 [0123]
- 60 • **JAYAWICKREME** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 1614-1618 [0123]
- **SALMON** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 11708-11712 [0123]
- 65 • **BRENNER; LERNER**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 5381-5383 [0123]
- **BUNIN** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 4708-4712 [0125]

ES 2 304 642 T3

• **SIMON** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 9367-9371 [0127]

• **OSTRESH** y colaboradores *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 11138-11142 [0127]

5 • **MATTER**. *J. Med. Chem.*, 1997, vol. 40, 1219-1229 [0130]

• **KAUVAR** y colaboradores *Chem. Biol.*, 1995, vol. 2, 107-118 [0131]

10 • **KAUVAR**. *Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International*, 1995, vol. 8, 25-28 [0131]

• **KAUVAR**. Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay. 1995 [0131]

15 • **KAY** y colaboradores *Gene*, 1993, vol. 128, 59-65 [0132]

• **GALLOP** y colaboradores *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 1233-1251 [0133]

20 • **OBUKOWICZ MG; RAZ A; PYLA PD; RICO JG; WENDLING JM; NEEDLEMAN P**. Identification and characterization of a novel delta6/delta5 fatty acid desaturase inhibitor as a potential anti-inflammatory agent. *Biochem. Pharmacol.* 1, 1998, vol. 55 (7), 1045-58 [0155]

25 • **OBUKOWICZ MG; WELSCH DJ; SALSGIVER WJ; MARTIN-BERGER CL; CHINN KS; DUFFIN KL; RAZ A; NEEDLEMAN P**. Novel, selective delta6 or delta5 fatty acid desaturase inhibitors as antiinflammatory agents in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, vol. 287 (1), 157-66 [0155]

REIVINDICACIONES

1. El uso de un inhibidor de SCD4 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde se selecciona al inhibidor del grupo que consiste de oligonucleótidos antisentido, siARN y ribozimas, y en donde el inhibidor modula la actividad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa.

2. Un método para identificación de un modulador de gama secretasa y/o de beta secretasa, que comprende las siguientes etapas:

a. identificar una molécula que interactúa con SCD4 determinando si un compuesto de prueba dado es una molécula que interactúa con SCD4,

b. determinar si la molécula que interactúa con SCD4 de la etapa a) es capaz de modular la actividad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa.

3. El método de la reivindicación 2, en donde en la etapa a) se pone en contacto al compuesto de prueba con SCD4 y se determina la interacción de SCD4 con el compuesto de prueba.

4. El método de la reivindicación 3, en donde la interacción del compuesto de prueba con SCD4 resulta en una inhibición de la actividad de SCD4.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde en la etapa b) se mide la habilidad de la gama secretasa y/o de la beta secretasa para escindir a APP.

6. El uso de un inhibidor de SCD4 para la modulación de la actividad *in vitro* de la beta secretasa y/o de la gama secretasa, en donde se selecciona al inhibidor del grupo que consiste de oligonucleótidos antisentido, siARN, y ribozimas.

Fig. 1

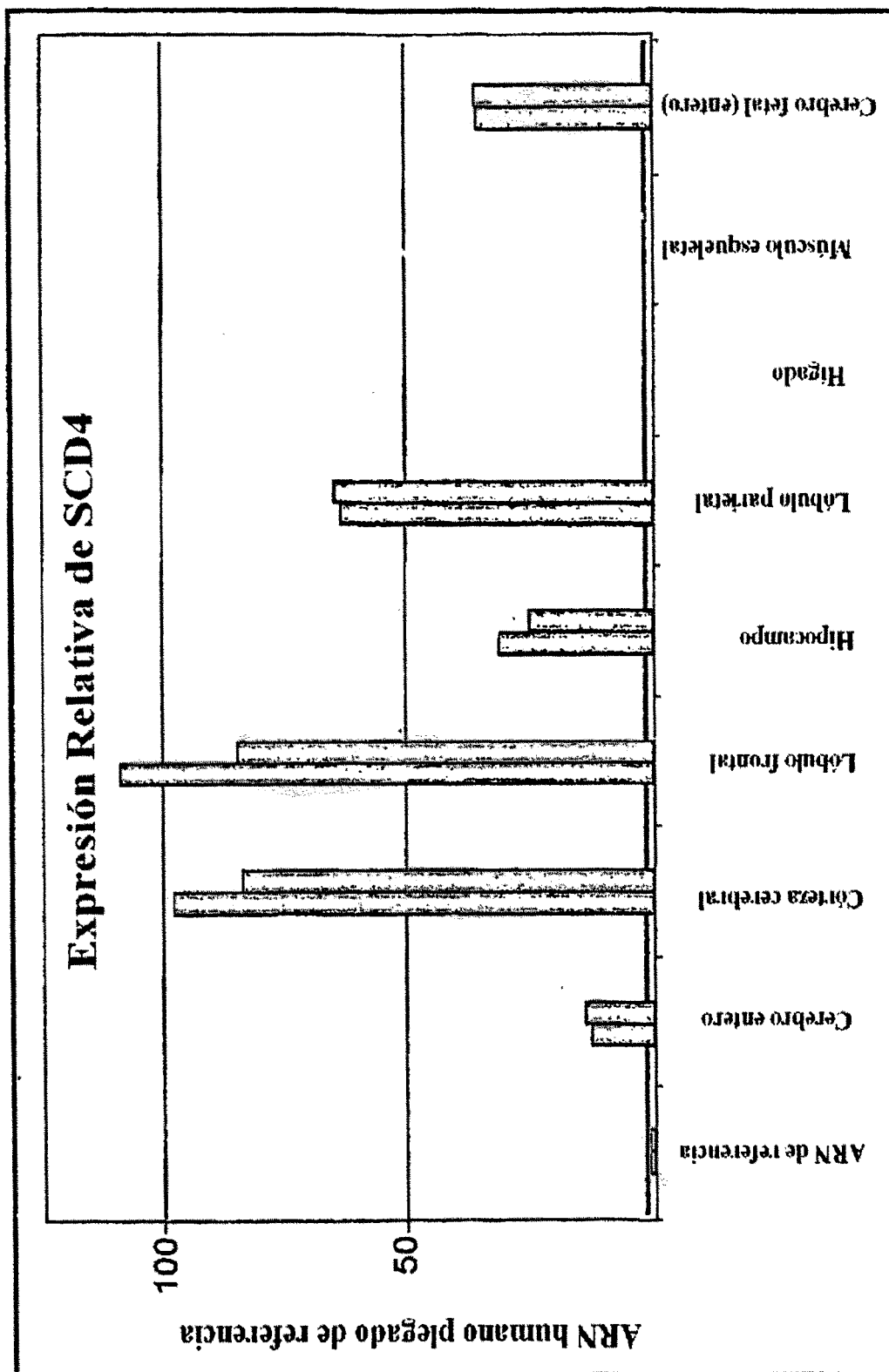


Fig. 2

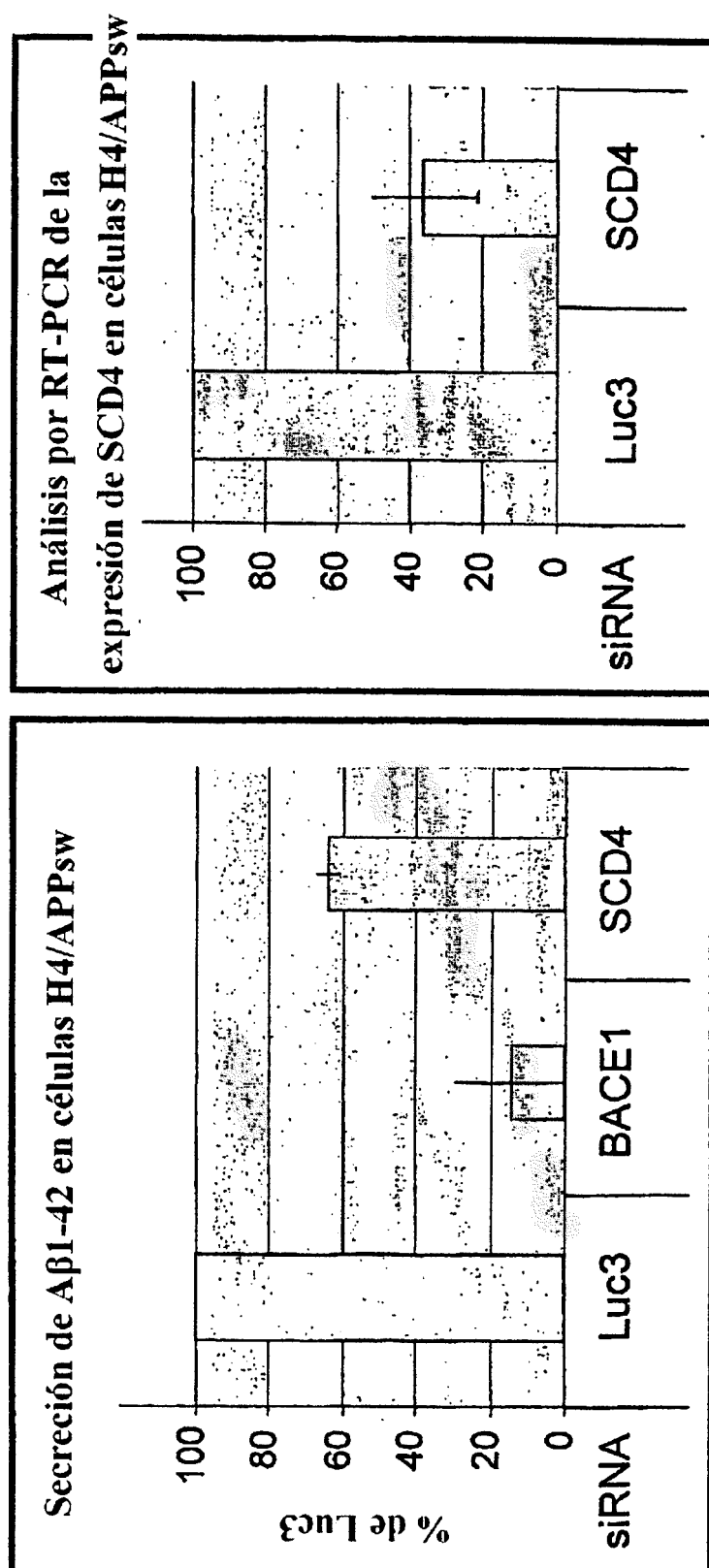


Fig. 3

MPGPATDAGK IPFCDAKEEI RAGLESSEGG GGPERPGARG QRQNIVWRNV
VLMSLLHLGA VYSLVLIPKA KPLTLLWAYF CLLLAALGVT AGAHLRWSHR
SYRAKLPLRI FLAVANSMAF QNDIFERSRD HRAHHKYSET DADPHNARRG
FFFSHIGWLF VRKHRDVIEK GRKLDVTDLL ADPVVRIQRN TQHIQKEGRA
LNQEAACEML REWHQGHILK VTLPLGLHILA LLHTHCNHSE KCCLMLRALS
VSLEVF