

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 630**

21 Número de solicitud: 200930455

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE ADICIÓN A LA PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **14.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **22.02.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.02.2011

61 Número de solicitud de la patente principal:
200703249

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Abad Fernández, María Alba;**
Enguita Martínez, Marta y
Trullas Oliva, Ramón

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **RNA de interferencia útiles para la elaboración de medicamentos para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas neurodegenerativas, medicamentos así obtenidos y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

RNA de interferencia útiles para la elaboración de medicamentos para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas neurodegenerativas, medicamentos así obtenidos y sus aplicaciones.

La presente invención describe inhibidores de la expresión génica del gen que codifica para la proteína NP1, que actúa como un inductor de apoptosis neural y neurodegeneración, útiles para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas neurológicas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas. Más preferentemente, la enfermedad neurodegenerativa es el Alzheimer. Estos inhibidores incluyen RNAi que actúan silenciando la expresión génica del gen NP1.

ES 2 352 630 A1

DESCRIPCIÓN

RNA de interferencia útiles para la elaboración de medicamentos para el tratamiento o prevención de enfermedades humanas neurodegenerativas, medicamentos así obtenidos y sus aplicaciones.

Sector de la técnica

Métodos para la prevención y tratamiento de trastornos neurológicos incluyendo enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer y trastornos convulsivos.

Estado de la técnica

Evidencia previa sugiere que los mecanismos bioquímicos que causan la degeneración y muerte patológica de neuronas diferenciadas y maduras en diversos trastornos neurodegenerativos son los mismos que los que componen el programa intrínseco de suicidio celular o apoptosis una de cuyas funciones es inducir la síntesis “*de novo*” de proteínas letales para eliminar las células sobrantes durante el desarrollo del cerebro¹⁻³.

En neuronas maduras está bien establecido que la reducción de la actividad neuronal pone en funcionamiento el programa intrínseco de muerte celular que provoca la síntesis “*de novo*” de proteínas letales que causan neurodegeneración apoptótica⁴. Identificar cuáles son estas proteínas letales pro-apoptóticas que se sintetizan de nuevo antes de que las neuronas alcancen un punto irreversible del proceso de muerte ha sido la estrategia que ha guiado la investigación de nuestro laboratorio para obtener nuevas dianas para el desarrollo de tratamientos neuroprotectores.

Con este objetivo, se ha investigado la expresión génica durante la fase inicial del programa de muerte neuronal producido por reducción de la actividad sináptica. Mediante el uso de una técnica de análisis de expresión génica diferencial⁵, se ha demostrado que la Pentraxina Neuronal 1 (NP1) es una proteína letal pro-apoptótica que se sintetiza en mayor cantidad cuando se reduce la actividad neuronal. Estudios previos indican que la NP1 forma parte del programa intrínseco de muerte y que contribuye a la neurodegeneración apoptótica que provoca la reducción de la actividad neuronal⁶. Originalmente, la NP1 fue identificada y aislada como una proteína que se une de forma dependiente de calcio con taipoxina, una toxina de veneno de serpiente⁷. El gen NP1 codifica una glicoproteína de una masa molecular aparente de aproximadamente 50 kDa, cuya secuencia de aminoácidos predice que es secretada. La expresión de NP1 se restringe al sistema nervioso⁷.

La NP1 forma parte de la familia de proteínas Pentraxina, que recibe su nombre por su capacidad de formar pentámeros. Esta familia se compone de 8 proteínas que pueden subdividirse en dos clases estructurales de acuerdo a su tamaño; las pentraxinas cortas (aprox. 200 aminoácidos) y las largas (aprox. 400 aminoácidos)⁸. Las pentraxinas cortas, identificadas hace ya tiempo en primer lugar, forman parte de la respuesta de fase aguda del sistema inmunitario innato e incluyen la proteína C-reactiva (CRP) y el componente amiloide P del suero (SAP). Las Pentraxinas largas, que han sido identificadas más recientemente, comparten con las cortas el dominio Pentraxina en el lado C-terminal, pero en su lado Amino-terminal son muy diferentes entre sí. Existen al menos tres Pentraxinas largas que se expresan en sistema nervioso: la Pentraxina Neuronal 1 (NP1), la pentraxina relacionada con actividad neuronal o Pentraxina Neuronal 2 (Narp o NP2) y el receptor de pentraxina neuronal (NPR)^{7,9-11}. Del estudio de las secuencias se predice que la NP1 y la NP2 son proteínas de secreción, mientras que NPR se identifica como una proteína transmembrana tipo II sin dominio intracelular^{9,12}. La función fisiológica de las pentraxinas neuronales no ha sido aun establecida. Sin embargo, en base a la homología que NP1 tiene con las pentraxinas más cortas como la proteína C-reactiva y la proteína P amiloide de suero, se propuso inicialmente que la función de la NP1 es la de captar material de desecho durante la remodelación de la sinapsis (Schlimgen *et al.*, 1995; Omeis *et al.*, 1996; Kirkpatrick *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios más recientes del grupo de Paul Worley (J. Hopkins) han demostrado que Narp/NP2 tiene efectos sinaptogénicos y participa en fenómenos de remodelación sináptica^{13,14}.

Los estudios del grupo de Paul Worley and Richard Huganir han demostrado que la NP1 y la NP2 regulan el agrupamiento del subtipo AMPA de receptores de glutamato en sinapsis excitadoras, uniéndose a ellos en un dominio extracelular. La mitad amino terminal de la NP1 codifica varios dominios de espiral-enrollada (coiled-coil) que son esenciales para la multimerización de NP1 con ella misma o con otras proteínas¹³. Además, la mitad carboxilo terminal de la NP1 codifica un dominio de lectina dependiente de calcio que reconoce oligosacáridos en glicoproteínas o glicolípidos. Hasta el momento se ha demostrado que la NP1 se une a los subtipos de receptores AMPA de glutamato¹⁴, pero aún no se han identificado otras proteínas que interactúen con NP1, a excepción de NP2 y los receptores de AMPA. Hasta muy recientemente, tampoco se conocía ni la función, ni ninguna interacción, del receptor de pentraxinas NPR. Pero un estudio muy reciente ha demostrado que NPR tiene un dominio CROMO (dominio modificador de la organización de cromatina) que es un dominio de interacción con otras proteínas y ADN. En este estudio se demuestra que NPR a través de su dominio CROMO se une al dominio intracelular del receptor de tirosina fosfatasa PTPRO que está implicado en guía y crecimiento axonal¹⁵. Este resultado permite considerar que los posibles efectos sobre neurogénesis de la NP1 pueden estar mediados por una interacción con NPR y el receptor de tirosina fosfatasa PTPRO asociado a él.

Por otro lado, investigando la influencia de los diversos trayectos de señalización intracelulares que controlan la supervivencia y la muerte celular sobre la expresión de NP1 se ha demostrado que la sobreexpresión de NP1 durante el proceso de muerte apoptótica se induce por una fosforilación activadora de la actividad de la quinasa GSK3. Ni

los trayectos de señalización implicados en muerte celular, como las proteínas quinasas activadas por estrés (SAP quinasas) c-jun N-terminal (JNK) o p38, ni el trayecto de señalización trófica PI3K/AKT activado por IGF, regulan la expresión de NP1¹⁶. El hallazgo de que la expresión de NP1 se regula por la quinasa GSK3 proporciona evidencia que indica que la degeneración neurítica inducida por NP1 comparte un mecanismo común con la neurodegeneración inducida por beta-amiloide. Varios estudios han demostrado que beta-amiloide provoca un incremento de la actividad de la quinasa GSK3¹⁷ y que GSK3 está incrementada en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer (ver revisión en¹⁸. Por otro lado, existe evidencia muy bien fundamentada de que el incremento de la actividad de la quinasa GSK3 produce retracción neurítica, mientras que la reducción de la actividad GSK3 produce sinaptogénesis¹⁹⁻²².

La mayoría de los procedimientos y técnicas de intervención terapéutica que hasta la fecha se dirigen a impedir el daño neuronal en los trastornos neurológicos tienen como objetivo el disminuir los estímulos tóxicos que causan el trastorno²³. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, existe gran cantidad de resultados que indican que los oligómeros solubles de la proteína beta-amiloide (Ab) son la causa de la pérdida de memoria, la demencia y la neurodegeneración que son las características típicas de la enfermedad²⁴⁻²⁶. En base a esta evidencia, la mayoría de las estrategias de tratamiento y prevención de la enfermedad de Alzheimer pretenden reducir la cantidad de proteína Ab, ya sea por modulación farmacológica de las secretasas de Ab o por inmunoterapia activa o pasiva para reducir la cantidad de oligómeros solubles de Ab²³.

Hace ya tiempo que se ha postulado que la neurotoxicidad inducida por el péptido Ab es la responsable de las alteraciones sinápticas y la degeneración neuronal que se observa en la enfermedad de Alzheimer²⁷. A pesar de que la hipótesis apoptótica de la degeneración neuronal en el cerebro de Alzheimer es un tema aún en debate²⁶, varios análisis histológicos de cerebros de pacientes con la enfermedad han identificado neuronas con morfología apoptótica²⁸. Además, diversos estudios han demostrado que el péptido Ab induce el programa de muerte apoptótica en cultivos primarios de neuronas^{29;30}.

Experimentos previos han demostrado que la Pentraxina Neuronal 1 (NP1) forma parte del programa de muerte neuronal apoptótica^{6;16}. Así, los resultados demuestran que la reducción de actividad neuronal por privación de potasio produce un gran incremento en la expresión de NP1 antes de causar muerte neuronal. Estos resultados permitieron proponer una nueva función para la NP1: que la NP1 es parte del programa génico de muerte apoptótica que se induce por reducción de actividad⁶.

A diferencia de la proteína NP1, se ha demostrado que la expresión de la otra pentraxina de la familia de las pentraxinas largas, la Narp/NP2 no se altera por la reducción de actividad u otros estímulos neurotóxicos. Por el contrario, la expresión de Narp/NP2 se incrementa sólo cuando se aumenta la actividad neuronal en situaciones como la potenciación a largo plazo o las convulsiones¹¹. En base a estas observaciones, se ha planteado la hipótesis que las pentraxinas neuronales NP1/NP2 forman parte de un interruptor génico operado por actividad neuronal. Por otro lado, existe evidencia que indica que Ab induce degeneración neurítica en cultivos primarios de neuronas de hipocampo por un mecanismo común al proceso apoptótico³¹.

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la producción de Ab depende de la actividad neuronal y que a su vez, la proteína Ab reduce la neurotransmisión sináptica excitadora^{33;34}.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la presente invención lo constituye un compuesto útil para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas neurológicas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas, en adelante compuesto de la presente invención, constituido por un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína NP1 humana.

Por tanto, un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína NP1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína NP1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína NP1,
- d) un RNA de interferencia (shRNAi) específico del mRNA de la proteína NP1, y
- e) un microRNA específico del mRNA de la proteína NP1.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es vector, en adelante vector de la expresión, que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención que

ES 2 352 630 A1

impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana, ya sea un vector de expresión o un vector de transferencia.

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína NP1 humana y funcionalmente activo que impide o disminuye la actividad neurodegenerativa de la proteína NP1 humana, ya sea monoclonal o policlonal.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el anticuerpo de la invención en el que es un anticuerpo, preferentemente policlonal, específico de un epítipo constituido por la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia X-Y de la proteína NP1 Humana (SEQ ID NO18).

Otro aspecto particular de la invención lo constituye un péptido o epítipo de la proteína NP1 humana, en adelante péptido de la invención, basada porque constituida por un fragmento de la zona comprendida entre los aminoácidos 24 a 229 de la proteína NP1, preferentemente de un tamaño de 15 aminoácidos.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína NP1 humana, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades humanas neurológicas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas, más preferentemente la enfermedad de Alzheimer.

Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurológicas, preferentemente neurodegenerativas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína NP1 humana, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana y que comprende, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína NP1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína NP1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína NP1,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína NP1, y
- e) un microRNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína NP1.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína NP1. Esta composición terapéutica puede ser utilizada en un procedimiento terapéutico de inmunización pasiva de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un péptido de la invención y que puede ser utilizada en un procedimiento terapéutico de inmunización activa de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad neurológica, preferentemente una enfermedad neurodegenerativa, más preferentemente la enfermedad de Alzheimer, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso neuropatológico.

Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que la reducción de la expresión de una de las proteínas del programa intrínseco de muerte celular apoptótica, concretamente la pentraxina neuronal 1, proteína NP1, induce el incremento de proteínas sinápticas y un incremento de la excitabilidad neuronal lo que permite la reducción o detención de los procesos de neurodegeneración que tienen lugar en mamíferos, preferentemente humanos, y más preferentemente en la enfermedad de Alzheimer. Así, cuando la actividad neuronal disminuye, como pasa cuando se acumula mucho Ab, aumenta la cantidad de NP1 y se inicia el proceso de reducción de sinapsis y neurodegeneración apoptótica.

Más concretamente, los resultados que se han obtenido demuestran que la exposición de cultivos primarios de neuronas corticales al péptido Ab incrementa la expresión de NP1 antes de inducir la muerte apoptótica (Figura 1).

Además, se ha demostrado también que la NP1 es un factor esencial para que se produzca la neurotoxicidad por Ab, y que provoca a su vez pérdida de sinapsis y daño neuronal. La pérdida de contactos sinápticos entre neuronas está directamente relacionada con pérdida de memoria. Cuando se bloquea el incremento de NP1 mediante silenciamiento genético por RNA de interferencia se impide el daño a la sinapsis y se previene la aparición de los efectos neurotóxicos de Ab (Figura 2). En cambio, en ausencia de Ab, si se tratan las neuronas con NP1 se reproduce el proceso neuropatológico inducido por Ab. Además, se ha observado también que la cantidad de NP1 es mucho más elevada en cerebros de pacientes con Alzheimer que en cerebros control (Figura 3). En los cerebros diagnosticados con Alzheimer la NP1 se localiza en las dendritas neuronales dañadas, donde se asocia con proteínas sinápticas como SNAP-25 y sinaptofisina. Estos resultados establecen que la NP1 desempeña un papel clave en la neurotoxicidad provocada por los oligómeros solubles de la proteína beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

Igualmente, la reducción de la expresión de la proteína NP1 mediante silenciamiento genético por RNAi produce un incremento significativo de las proteínas sinápticas PSD95 y sinaptofisina y por tanto un incremento del número de sinapsis excitadoras, lo que constituye una evidencia de recuperación o mantenimiento de parámetros relacionados con la memoria (Figura 4); y al mismo tiempo produce un incremento de la excitabilidad neuronal en cultivos primarios de neuronas corticales (Figura 5).

Se ha comprobado que anticuerpos dirigidos contra epítopos de la proteína de la NP1 humana (NPTX1_HUMAN, SwissProt primary accession number Q15818) reconocen las formas nativas y desnaturalizadas de NP1 y son capaces de inmunoprecipitar NP1 (Figura 6), lo que permite postular su uso en procesos terapéuticos de inmunización pasiva de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer. Además, péptidos derivados de la secuencia de la proteína NP1 humana, más preferentemente, péptidos cuya secuencia se encuentre dentro de la zona entre los aminoácidos 24 a 229 de NP1, pueden utilizarse como medicamentos inductores de una inmunización activa (generación de anticuerpos endógenos) en pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

A diferencia de la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia es un trastorno neurológico crónico que se caracteriza por la aparición de forma recurrente de convulsiones espontáneas. Las convulsiones se asocian a un hipereexcitabilidad neuronal en determinadas zonas cerebrales que se produce por una actividad neuronal excesiva o asincrónica. Indicar comentario adicional que razone las posibles aplicaciones de estos mismos elementos para el tratamiento de la epilepsia.

En resumen, los resultados de la presente invención permiten el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas de enfermedades neurodegenerativas, mediante el uso de composiciones farmacéuticas que comprendan principios activos inhibidores de la expresión de la proteína humana NP1. Por otro lado, la regulación de la expresión de NP1 puede representar un tratamiento terapéutico eficaz para otros trastornos neurológicos crónicos como los trastornos convulsivos.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención lo constituye un compuesto útil para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas neurológicas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas, en adelante compuesto de la presente invención, constituido por un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína NP1 humana.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto/agente inhibidor o antagonista” se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína NP1 humana, o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica neurodegenerativa de dicha proteína. En esta definición se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traduccional. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimina el efecto y/o la función de la proteína NP1 humana.

A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína NP1, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima específica del mRNA de la proteína NP1, o bien un polinucleótido que codifica un aptámero específico del mRNA de la proteína NP1, o bien polinucleótido que codifica un RNA de interferencia (“small interference RNA” o siRNA) específico del mRNA de la proteína NP1, o bien polinucleótido que codifica un microRNA específico del mRNA de la proteína NP1 humana.

Tal como se utiliza en la presente invención “proteína NP1 humana” se refiere a una proteína con la secuencia de referencia siguiente: NPTX1_HUMAN, SwissProt primary accession number Q15818, o a una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Por “variante funcionalmente equivalente” o “variante” se entiende, en el contexto de la presente invención, toda proteína que se puede obtener a partir de la NP1 humana anteriormente indicada mediante la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos y que mantiene sustancialmente la función de la proteína original. La determinación de la función de la NP1 humana se puede llevar a cabo usando métodos convencionales ampliamente conocidos

ES 2 352 630 A1

para el experto en la materia, entre los cuales están los utilizados en la presente invención. Esta variante comprende fragmentos de la proteína NP1 humana con actividad neurodegenerativa.

En el caso de las variantes por sustitución, la sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas, esto es, los aminoácidos se sustituyen por otros con características similares en cuanto a la propiedades de su cadena lateral. Así, sustituciones conservativas incluyen sustituciones dentro de los grupos de amino ácidos según la tabla 1.

Tipo de cadena lateral	Amino ácido
Alifática apolar o ligeramente polares	Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
Polar con carga neutra positiva	His, Arg, Lys
Polar con carga neutra negativa y las amidas correspondientes	Asp, Asn, Glu, Gln
Aromática	Phe, Tyr, Trp
Alifática de gran tamaño y apolar	Met, Leu, He, Val, Cys

Adicionalmente, uno ó más de los aminoácidos de las variantes de la invención pueden estar sustituidos por aminoácidos no convencionales naturales o sintéticos como por ejemplo, beta-amino ácidos, ácido 2-aminoadípico, alpha-asparagina, ácido 2-aminobutanoico, ácido 2-aminocáprico, alpha-glutamina, alpha-metilalanina, ácido 2-aminopimélico, ácido gamma-amino-beta-hidroxibenzenopentanoico, ácido 2-aminosubérico, 2-carboxiazetidina, beta-alanina, ácido beta-aspártico, ácido 3,6 diaminohexanoico, ácido butanoico, ácido 4-amino 4-amino-3-hidroxi butanoico, ácido gamma-amino-beta-hidroxiciclohexanepentanoico, N5-aminocarbonilornitina, 3-sulfoalanina, ácido 2,4 diaminobutanoico, ácido diaminopimélico, ácido 2,3 diaminopropanoico, ácido 2,7 diaminosubérico, S-etiltiocisteina, ácido gamma-glutámico, ácido gamma-carboxiglutámico, ácido piroglutámico, homarginina, homocisteina, homohistina, homoserina, ácido 2-hidroxiisovalérico, ácido 2-hidroxipentanoico, 5-hidroxisilina, 4-hidroxiprolina, 2-carboxioctahidroindol, 3-carboxiisoquinolina, isovalina, ácido 2-hidroxipropanoico, ácido mercaptoacético, ácido mercaptobutanoico, 4-metil-3-hidroxiprolina, ácido mercaptopropanoico, norleucina, nortirosina, norvalina, ornitina, penicilamina, 2-fenilglicina, 2-carboxipiperidina, sarcosina, 1-amino-1-carboxiciclopentano, statin, 3-tienilalanina, epsilon-N-trimetilisina, 3-tiazolalanina, ácido alpha-amino-2,4-dioxopirimidinapropanoico.

Adicionalmente, la invención contempla variantes de los péptidos de la invención en los que uno o más aminoácidos han sufrido modificaciones en su cadena lateral. Ejemplos de modificaciones de cadena lateral contempladas en la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como alquilación, amidación, acilación, carbomilación, trinitrobencilación, piridoxilación, modificaciones del grupo guanidino de los restos de arginina consistentes en la formación de condensados heterocíclicos; modificaciones de los grupos carboxilo mediante amidación, modificaciones de tirosinas mediante metoxilación, modificación del anillo imidazólico de la histidina mediante alquilación o N-carboxietilación, modificaciones de la prolina mediante hidroxilación en posición 4. Alternativamente, la invención contempla variantes de los péptidos de la invención mediante glicosilación, es decir, la adición de grupos de glicano bien en la cadena lateral serine y/o treonina (O-glicosilación) o en la cadena lateral asparagina y/o glutamina (N-glicosilación). Los glicanos que pueden incorporarse a los polipéptidos de la invención incluyen un número variable de unidades glucídicas (mono-, di-, tri-, tetrasacáridos y sucesivos). Los monosacáridos que forman en glicano incluyen D-alosa, D-altrosa, D-glucosa, D-manosa, D-gulosa, D-idosa, D-galactosa, D-talosa, D-galactosamina, D-glucosamina, D-N-acetylglucosamina, D-N-acetylgalatosamina, D-fucosa o D-arabinosa.

Alternativamente, la invención contempla variantes de los polipéptidos de la invención en los que se incluyen los estereoisómeros D de al menos uno de los aminoácidos que constituyen la cadena peptídico para dar así lugar a los isómeros retro-inverensos.

En otra forma de realización, la invención contempla peptidomiméticos de los polipéptidos de la invención, es decir, variantes en las que uno o más de los enlaces peptídicos ha sido reemplazado por un tipo alternativo de enlace covalente. Dichos peptidomiméticos se caracterizan por mostrar una mayor estabilidad al ser más resistentes a proteasas. Modificaciones del esqueleto peptídico incluyen la sustitución o la inserción en los elementos del enlace peptídico

ES 2 352 630 A1

(-NH-, -CH-, -CO-) de grupos tales como -O-, -S-, -CH₂ en lugar de -NH-, -N-, -C-alkil p -BH- en lugar de -CHR y -CS-, -CH₂-, -SO_n-, -P=O(OH)- o -B(OH)- en lugar de -CO-. Adicionalmente, es posible aumentar la estabilidad de los péptidos de la invención usando grupos que bloqueen el extremo N-terminal tales como t-butiloxicarbonil, acetil, succinil, metoxisuccinil, suberil, adipil, dansil, benciloxicarbonil, fluorenilmetoxicarbonil, metoxiadipil, metoxiadipil, metoxisuberil y 2,3-dinitrofenil. Alternativa p simultaneamente, es posible modificar el extremo C-terminal de los péptidos mediante amidación.

La determinación del grado de identidad entre las variantes y los polipéptidos definidos en las secuencias 1 a 19 se lleva a cabo usando métodos y algoritmos informáticos ampliamente conocidos para el experto en la materia Preferentemente, la identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., *et al.*, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990). Preferiblemente, los polipéptidos objeto de la invención muestran una identidad de secuencia con los polipéptidos definidos en las secuencias de SEQ ID NO:1 a 19 de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

Por tanto, un aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína NP1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína NP1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína NP1,
- d) un RNA de interferencia (shRNAi) específico del mRNA de la proteína NP1, y
- e) un microRNA específico del mRNA de la proteína NP1.

Por otro lado, estas técnicas de inhibición génica, y más concretamente la vehiculización de los compuestos - oligonucleótidos antisentido, iRNA, ribozimas o aptameros- puede llevarse a cabo mediante el uso de nanopartículas que incrementan el éxito de dicha transferencia (Lu PV and Woodle MC, Adv Genet 54: 117-42, 2005; Hawker CJ and Wooley KL, Science 19 (309): 1200-5, 2005).

Un aspecto más particular de la invención lo constituye un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de NP1 GTACAGCCGCCTCAATTCT (SEQ ID NO1; esta secuencia se corresponde a las bases 1004 a 1022 del mRNA de NP1 de rata (Genbank Accession number U18772)) o a otro fragmento que comprenda a esta secuencia.

Así, una realización particular lo constituye un shRNAi contra NP1 (SEQ ID NO1) expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GTACAGCCGCCTCAATTCT tcaagaga AGAATTGAGGCGGCTGTAC tttt-3' (SEQ ID NO4, sentido) y la 5'-agctaaaa GTACAGCCGCCTCAATTCT tctctgaa AGAATTGAGGCGGCTGTAC ggg-3' (SEQ ID NO5, antisentido).

Otra realización particular lo constituye un shRNAi contra la forma homóloga de la SEQ ID NO1 correspondiente a las bases 602 a 620 del mRNA de NP1 humano (Genbank Acession number NM_002522) y expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GCAGTACAGCCGCCTCAAT tcaagaga ATGAGGCGGCTGTACTGC tttt-3' (SEQ ID NO6, sentido), y la 5'-agctaaaa GCAGTACAGCCGCCTCAAT tctctgaa ATGAGGCGGCTGTACTGC ggg-3' (SEQ ID NO7, antisentido).

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de NP1 GCGGACCAACTACATGTAT (SEQ ID NO2; esta secuencia se corresponde a las bases 1259 a 1277 del mRNA de NP1 de rata (Genbank Accession number U18772)) o a otro fragmento que comprenda a esta secuencia.

Otra realización particular lo constituye un shRNAi contra NP1 (SEQ ID NO2) expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GCGGACCAACTACATGTAT tcaagaga ATACATGTAGTTGGTCCGC tttt-3' (SEQ ID NO8, sentido) y la 5'-agctaaaa GCGGACCAACTACATGTAT tctctgaa ATACATGTAGTTGGTCCGC ggg-3' (SEQ ID NO9, antisentido).

Otra realización particular lo constituye un shRNAi contra la forma homóloga de la SEQ ID NO1 correspondiente a las bases 860 a 878 del mRNA de NP1 humano (Genbank Acession number NM_002522) y expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GCGGACCAACTATATGTAT tcaagaga ATACATATAGTTGGTCCGC tttt-3' (SEQ ID NO10, sentido), y la 5'-agctaaaa GCGGACCAACTATATGTAT tctctgaa ATACATATAGTTGGTCCGC ggg-3' (SEQ ID NO11, antisentido).

ES 2 352 630 A1

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye un RNAi que se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de NP1 GAGATACTCATTAACGACA (SEQ ID NO3; esta secuencia se corresponde a las bases 1434 a 1452 del mRNA de NP1 de rata (Genbank Accession number U18772)) o a otro fragmento que comprenda a esta.

Otra realización particular de la invención lo constituye un shRNAi contra NP1 (SEQ ID NO3) expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GAGATACTCATTAACGACA ttcaagaga TGTCGTTAATGAGTATCTC ttttt-3' (SEQ ID NO12, sentido) y la 5'-agctaaaaa GAGATACTCATTAACGACA tctcttgaa TGTCGTTAATGAGTATCTC ggg-3' (SEQ ID NO13, antisentido).

Otra realización particular de la invención lo constituye un shRNAi contra la forma homóloga de la SEQ ID NO1 correspondiente a las bases 1035 a 1053 del mRNA de NP1 humano (Genbank Accession number NM_002522) y expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GAGATCCTCATCAATGACA ttcaagaga TGTCATT GATGAGGATCTC ttttt-3' (SEQ ID NO14, sentido), y la 5'-agctaaaaa GAGATCCTCATCAATGACA tctcttgaa TGT CATTGATGAGGATCTC ggg-3' (SEQ ID NO15, antisentido).

Las secuencias de nucleótidos a)-e) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína NP1, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) Transgenesis Techniques. Principles and Protocols, 2ª Ed. Humana Press, Cardiff University; Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Fernández E *et al.* (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. FEMS Microbiology Reviews 27: 75-97; Kikuchi, *et al.*, 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus IRES that bind to its apical loop región. J. Biochem. 133, 263-270; Reynolds A. *et al.*, 2004. Rational siRNA design for RNA interference. Nature Biotechnology 22 (3): 326-330).

Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células, preferentemente, células de un paciente humano enfermo. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a las células neuronales de una construcción génica que comprende uno de los polinucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión de la proteína NP1. Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "vector" se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación de genes y construcciones génicas exógenas, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales (Pfeifer A, Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. Annu Rev Genomics Hum Genet 2: 177-211) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

En general, el vector de expresión de la presente invención comprende, al menos, la secuencia de nucleótidos de la invención, al menos, un promotor que dirige su transcripción (*pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ptet*, etc), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan la transcripción del gen. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión de microorganismos que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido o un vector viral, por ejemplo un lentivirus. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos o células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos - transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Por otro lado, un vector de transferencia puede estar constituido, a título ilustrativo y sin que limite la invención, al siguiente grupo: microesferas, liposomas, nanopartículas y dendrímeros; los cuales tiene la capacidad de acoplarse a la secuencia de nucleótidos de la invención, vehiculizarla al interior de las células y liberarla posteriormente.

Así, otro aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es vector, en adelante vector de la expresión, que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana, ya sea un vector de expresión o un vector de transferencia.

Otra realización particular de la invención lo constituye un vector de expresión viral, preferentemente un lentivirus capaz de expresar en el interior de la célula un nucleótido que inhibe la expresión la proteína NP1 humana, preferentemente el vector lentivirus pLVTHM-shRNAi-NP1 desarrollado en la presente invención (ver Material y Métodos) que comprende, al menos, una de las parejas de secuencias siguientes:

ES 2 352 630 A1

- 5 secuencias SEQ ID NO 4 y 5,
- 6 secuencias SEQ ID NO 6 y 7,
- 5 7 secuencias SEQ ID NO 8 y 9,
- 8 secuencias SEQ ID NO 10 y 11,
- 9 secuencias SEQ ID NO 12 y 13, y
- 10 10 secuencias SEQ ID NO 14 y 15.

15 Otro aspecto particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína NP1 humana y funcionalmente activo que impide o disminuye la actividad neurodegenerativa de la proteína NP1 humana, ya sea monoclonal o policlonal.

20 Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo funcionalmente activo” se refiere a un anticuerpo recombinante que mantiene su capacidad de unión a antígeno, incluyendo minianticuerpos, que se definen como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: antisueros policlonales, moléculas de IgG purificadas, sobrenadantes o líquido ascítico que contiene anticuerpos monoclonales, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, ScFvdiabodies, anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs), triabodies y tetrabodies anticuerpos humanizados. En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camélidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camélidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilagosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

35 El anticuerpo funcionalmente activo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej. camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes, y por otro lado, incluye tanto a anticuerpos monoclonales como a anticuerpos policlonales.

40 Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el anticuerpo de la invención, ya sea monoclonal o policlonal, específico de un epítipo que se encuentra entre los aminoácidos 24 a 229 de la secuencia de la proteína de la NP1 humana (NPTX1_HUMAN, SwissProt primary accesión number Q15818), preferentemente de epítipos ó péptidos de 15 aminoácidos de tamaño.

45 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el anticuerpo de la invención en el que es un anticuerpo, preferentemente policlonal, específico de un epítipo constituido por la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: SEQ ID NO18 y SEQ ID NO19. Tal como se comenta en los ejemplos la zona seleccionada por los inventores (aminoácidos 24 y 229) es la más característica de la NP1 y la que se diferencia más de otras proteínas como la NP2 y la NP3 y se predice dominios de interacción con otras proteínas, que hace de esta región una buena diana terapéutica, al igual que la región homóloga a ésta en la proteína NP1 humana.

55 Otro aspecto particular de la invención lo constituye un péptido o epítipo de la proteína NP1 humana, en adelante péptido de la invención, basada porque constituida por un fragmento de la zona comprendida entre los aminoácidos 24 a 229 de la proteína NP1, preferentemente de un tamaño de 15 aminoácidos, y perteneciente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: SEQ ID NO18 y SEQ ID NO19.

60 El péptido de la invención puede ser utilizado para la producción de un anticuerpo de la invención útil para la elaboración, por un lado, de un medicamento para un tratamiento de inmunización pasiva, y por otro lado, de un medicamento para un tratamiento de inmunización activa (generación de anticuerpos endógenos) en pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

65 Otro aspecto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína NP1 humana, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades humanas neurológicas, preferentemente enfermedades neurodegenerativas, más preferentemente la enfermedad de Alzheimer.

ES 2 352 630 A1

Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención en que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana.

5 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto en que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína NP1 humana y funcionalmente activo que impide o disminuye la actividad neurodegenerativa de la proteína NP1 humana.

10 Otro aspecto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto en que el compuesto inhibidor es el péptido de la invención, de tal forma que el medicamento así obtenido puede ser utilizado en un tratamiento de inmunización activa (generación de anticuerpos endógenos) en pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

15 Otro aspecto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurológicas, preferentemente neurodegenerativas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína NP1 humana, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto inhibidor de la actividad de la proteína NP1, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

30 En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

40 Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína NP1 humana y que comprende, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína NP1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína NP1,
- 45 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína NP1,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína NP1, y
- 50 e) un microRNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína NP1.

55 Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un anticuerpo específico de la proteína NP1. Esta composición terapéutica puede ser utilizada en un procedimiento terapéutico de inmunización pasiva de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

60 Otro aspecto particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inhibidor es un péptido de la invención y que puede ser utilizada en un procedimiento terapéutico de inmunización activa de pacientes con una enfermedad neurodegenerativa, preferentemente con enfermedad de Alzheimer.

65 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse en combinación con otros medicamentos que se utilicen para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, con el objeto de actuar de forma complementaria o como refuerzo (por ejemplo, con inhibidores de GSK3 que reducen la sobre-expresión de NP1⁶).

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad neurológica, preferentemente una enfermedad neurodegenerativa, más preferentemente la enfermedad de Alzheimer, en adelante

uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso neuropatológico.

Descripción de las figuras

5

Figura 1.- *Los oligómeros solubles de Ab 1-42 incrementan la expresión de NP1 en cultivos primarios de neuronas corticales.* A) Ensayo de Western Blot representativo que muestra el curso temporal del efecto de una concentración máxima (20 μ M) de oligómeros de Ab sobre los niveles de las proteínas NP1 y Actina. B) Análisis cuantitativo que muestra el efecto concentración-dependiente de los oligómeros solubles de Ab 1-42 (10 y 20 μ M) sobre los niveles de proteína NP1. Los valores densitométricos de las bandas correspondientes a la inmunoreactividad de NP1 fueron normalizados con los valores respectivos de la banda de actina. La proporción entre NP1 y actina se expresa como porcentaje de los valores control. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media de, al menos, tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de los valores control (Análisis de varianza de una vía y comparación Bonferroni entre grupos).

15

Figura 2.- *El silenciamiento de la expresión de NP1 impide la reducción de sinapsis producida por Ab.* La expresión de NP1 fue silenciada por interferencia de RNA (RNAi) mediante transducción lentiviral. Cultivos primarios de neuronas corticales fueron transducidos con el vector lentiviral control pLVTHM-shRandom o con el vector lentiviral de RNAi dirigido contra NP1, pLVTHM-shRNAi-NP1 (ver Material y Métodos, secuencias SEQ ID NO 4 y 5). Cinco microlitros de partículas lentivirales se añadieron a las neuronas corticales en el momento de su siembra. A los 5 días de cultivo, las células fueron tratadas durante 48 horas con vehículo (V) o con oligómeros de Ab 1-42 (20 μ M). A) Ensayo de Western representativo que muestra que los oligómeros solubles Ab 1-42 producen una reducción significativa en los niveles de sinaptofisina y que el silenciamiento de NP1 es capaz de revertir este efecto. Se utilizó la inmunoreactividad contra Actina como control de carga de proteínas. B) Análisis cuantitativo de los efectos de los oligómeros solubles Ab 1-42 y del silenciamiento de NP1 por RNAi sobre los niveles de sinaptofisina. Los valores densitométricos de las bandas correspondientes a la inmunoreactividad de sinaptofisina fueron normalizados con los valores respectivos de la banda de actina. La proporción entre NP1 y actina se expresa como porcentaje de los valores control. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de los valores control (prueba t de grupos independientes). C, control. V, Vehículo.

30

Figura 3.- *Los niveles de NP1 están incrementados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.* Análisis de proteínas en tejido de hipocampo donde se comprueba que la cantidad de la banda de 54 KDa correspondiente a NP1 está incrementada en cerebros de dos (2) pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (AD) comparados con tejido de pacientes control (C). La especificidad de la inmunoreactividad de NP1 en el tejido humano se demuestra porque la banda desaparece después de la pre-absorción del anticuerpo con proteína NP1 recombinante (Pr).

35

Figura 4.- *El silenciamiento de la expresión de NP1 por RNAi incrementa los niveles de proteínas pre-sinápticas (Sinaptofisina) y post-sinápticas (PSD95) en las sinapsis excitadoras.* El silenciamiento de NP1 por RNAi, pero no la sobre-expresión de NP1, produce un incremento significativo de los niveles de sinaptofisina, representado en A) y de PSD95, representado en B). Los valores densitométricos de las bandas correspondientes a la inmunoreactividad de sinaptofisina y PSD95 fueron normalizados con los valores respectivos de la banda de actina. Las proporciones sinaptofisina/actina y PSD95/actina se expresan como porcentaje de los valores control. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, significativamente diferente de los valores control (análisis de varianza de una vía con la comparación de grupos Bonferroni).

45

Figura 5.- *El silenciamiento de la expresión de NP1 por RNAi incrementa la excitabilidad neuronal medida por las oscilaciones del nivel de calcio intracelular.* En A) se representa la oscilación espontánea en la concentración de calcio intracelular que muestran las neuronas corticales en cultivo tratadas con el vector lentiviral control pVLTHM-shRandom. B) Las neuronas corticales tratadas con el vector lentiviral pVTLHM-shNP1 para silenciar NP1 manifiestan un incremento significativo en oscilación espontánea de la concentración intracelular de calcio que indica que el silenciamiento de NP1 provoca un aumento de la excitabilidad neuronal que depende de receptores de amino-ácidos excitadores. El tratamiento con tetratoxina 5 μ M bloquea completamente las oscilaciones indicando que son resultado de actividad de neurotransmisión. Los resultados se expresan en % del valor basal de la fluorescencia de Fura-2 a 340/380 y son el promedio de al menos diez células corticales.

55

Figura 6.- *Un anticuerpo policlonal dirigido contra epítomos que se encuentran entre los aminoácidos 24 a 229 de la secuencia de la proteína de la NP1 humana inmunoprecipita NP1.* El ensayo de inmunoprecipitación se realizó en células SH-SY5Y que sobre-expresan de forma permanente NP1. El lisado Total fue incubado con el anticuerpo contra NP1 y la inmunoprecipitación fue realizada con proteína G unida a partículas de sefarosa. La figura es un ensayo de western blot representativo que muestra la inmunoreactividad de NP1 en el lisado total (carril 1), en el sobrenadante después de inmunoprecipitar (carril 2), y en el inmunoprecipitado con un anticuerpo contra los aminoácidos 210-224 de la proteína NP1 humana (carril 3).

65

Figura 7.- *La sobre-expresión de NP1 reduce la longitud de neuritas e incrementa la apoptosis, mientras que el silenciamiento de la expresión de NP1 bloquea estos efectos.* En A) se representa el efecto de sobre-expresión de NP1 en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Estas células fueron transducidas con el vector lentiviral control

pWPI que expresa la proteína verde fluorescente (GFP), o con el vector lentiviral pWPI-NP1 que además de GFP, sobre-expresa NP1. Las células transducidas con este último vector, si expresan GFP, también sobre-expresan NP1, que produce a su vez una reducción significativa de la longitud de sus prolongaciones neuríticas. En B) se representa el efecto de sobre-expresión de NP1 y silenciamiento de ésta sobre-expresión en neuronas corticales en cultivo. Las neuronas corticales fueron tratadas con doble infección: primero con el lentivirus control (pWPI-C) o con el lentivirus que sobre-expresa NP1 (pWPI-NP1) e inmediatamente después con el lentivirus de silenciamiento control (shRandom) o con el de RNAi de NP1 (shNP1). La sobre-expresión de NP1 incrementa la cantidad de núcleos apoptóticos medidos con la tinción Hoechst y reduce marcadamente la longitud de las neuritas. El silenciamiento génico impide de forma significativa estos efectos de NP1.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Los oligómeros solubles del péptido Ab incrementa la expresión de NP1 que induce la apoptosis y neurotoxicidad neuronal

A favor de esta hipótesis, los resultados que se han obtenido demuestran que la exposición de cultivos primarios de neuronas corticales a oligómeros solubles del péptido Ab incrementa la expresión de NP1 antes de inducir la muerte apoptótica (Figura 1). Además, se ha demostrado también que la NP1 es un factor esencial para que se produzca la neurotoxicidad por Ab. Los experimentos establecen que Ab causa un incremento de la cantidad de NP1 que provoca a su vez pérdida de sinapsis y daño neuronal. La pérdida de contactos sinápticos entre neuronas está directamente relacionada con pérdida de memoria. Por el contrario, cuando se bloquea el incremento de NP1 mediante silenciamiento génico por RNA de interferencia (ver material y Métodos, los datos mostrados en las figuras y posteriores ejemplos de la invención fueron llevados a cabo mediante los RNAi de SEQ ID NO4 y 5, mientras que similares resultados aunque con niveles menores de silenciamiento (entre 30-70%) se realizaron también con dos parejas distintas de RNAi, las secuencias SEQ ID NO8 y 9 y SEQ ID NO12 y 13, respectivamente) se impide el daño a la sinapsis y se previene la aparición de los efectos neurotóxicos de Ab (Figura 2). En cambio, en ausencia de Ab 1-42, si se tratan las neuronas con NP1 se reproduce el proceso neuropatológico inducido por Ab. Además, se ha observado también que la cantidad de NP1 es mucho más elevada en cerebros de pacientes con Alzheimer (AD) que en cerebros control (Figura 3). En los cerebros diagnosticados con Alzheimer la proteína NP1 se localiza en las dendritas neuronales dañadas, donde se asocia con proteínas sinápticas como SNAP-25 y sinaptofisina. Estos resultados establecen que la NP1 desempeña un papel clave en la neurotoxicidad provocada por los oligómeros solubles de la proteína beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 2

Los RNAi de silenciamiento génico de NP1 disminuyen la apoptosis neuronal, inducen el crecimiento neurítico, incrementan el número de sinapsis e incrementan la excitabilidad neuronal

Utilizando vectores lentivirales de sobre-expresión y silenciamiento de NP1 se ha demostrado que la sobre-expresión de NP1 en cultivos primarios de neuronas corticales activa e incrementa el número de núcleos apoptóticos y reduce el crecimiento neurítico. Por el contrario, la co-transducción de NP1 con el silenciador de la expresión shRNAi-NP1 (SEQ ID NO 4 y 5), bloquea significativamente estos efectos (Figura 7).

Además, se ha demostrado que cuando se reduce la expresión de la proteína NP1 mediante silenciamiento génico por RNAi se produce un incremento significativo de las proteínas sinápticas PSD95 y sinaptofisina que estudios previos han demostrado que están reducidas en modelos de la enfermedad de Alzheimer, lo mismo que cuando se expresa NP1 mediante vectores (Figura 4A y 4B) El incremento de PSD95 y sinaptofisina indica que la reducción de NP1 produce un incremento del número de sinapsis excitadoras, lo que constituye una evidencia de recuperación o mantenimiento de parámetros relacionados con la memoria.

Por otro lado, se ha demostrado que el silenciamiento génico de la expresión de NP1, mediante la expresión shRNAi-NP1 (SEQ ID NO 4 y 5), produce un incremento de la excitabilidad neuronal medido por las oscilaciones del nivel de calcio intracelular en cultivos primarios de neuronas corticales (Figura 5). Las oscilaciones de la concentración de calcio intracelular en neuronas en las que se ha silenciado la expresión de NP1 por shRNAi son mucho mayores (B) que las neuronas control (A) (Figura 5). Además, se demuestra que las oscilaciones de la concentración de calcio intracelular son debidas a actividad sináptica porque Tetradotoxina, un bloqueante de canales de sodio que elimina la actividad sináptica, las reduce marcadamente (Figura 5B).

Ejemplo 3

Secuencias peptídicas de NP1 como antígenos para su utilización como vacuna por inmunización activa o para generar anticuerpos para su utilización por inmunización pasiva para reducir la expresión de NP1

La proteína de NP1 tiene 432 aminoácidos que incluye una secuencia de secreción o señal de aproximadamente 16-23 aminoácidos en el lado aminoterminal. La NP1 se expresa fundamentalmente en sistema nervioso, mientras otras proteínas de la familia de las pentraxinas se expresan también en otros órganos. Los aminoácidos que se encuentran

entre el 229 y el 432 tienen una elevada homología con otras proteínas de la familia de las pentraxinas. Por el contrario, la zona que se encuentra entre los aminoácidos 24 y 229 es la más característica de la NP1 y la que se diferencia más de otras proteínas como la NP2 y la NP3. Además, se predice que en esta zona existen dos dominios super-enrollados que se circunscriben entre los amino-ácidos 33-79 y 105-207 y que son los que probablemente permiten a la NP1 interactuar o unirse con otras proteínas. De la zona de entre los amino-ácidos 24 a 229 se han seleccionado varias secuencias de 15 aminoácidos de longitud con capacidad antigénica para generar anticuerpos contra esta zona de la proteína NP1 (ver material y métodos).

Así, se ha comprobado que los anticuerpos dirigidos contra epítomos que se encuentren entre los aminoácidos 24 a 229 de la secuencia de la proteína de la NP1 humana (NPTX1_HUMAN, SwissProt primary accesión number Q15818) reconocen las formas nativas y desnaturalizadas de NP1 y son capaces de inmunoprecipitar NP1, en concreto con el anticuerpo generado contra el péptido correspondiente a los aminoácidos 210-224 (SEQ ID NO18) (Figura 6) (Figura 6). La capacidad de estos anticuerpos de inmunoprecipitar NP1, predice que tanto la inmunización pasiva con anticuerpos anti-péptidos cuya secuencia se encuentre dentro de la zona entre los aminoácidos 24 a 229, como la generación de anticuerpos endógenos mediante péptidos antigénicos contenidos en la misma zona, reducirán la cantidad de NP1. El procedimiento de obtención de anticuerpos contra péptidos de la zona 24 a 229 de la proteína NP1 consiste en conjugar péptidos de 15 aminoácidos con un transportador adecuado e inyectarlos de forma subcutánea en presencia de un adyuvante (Ver material y métodos).

Los resultados de la invención indican que la sobre-expresión de NP1 reduce el crecimiento neurítico en células de neuroblastoma SH-SY5Y (Figura 7 A). Asimismo, la sobre-expresión de NP1 incrementa la apoptosis y reduce la longitud de neuritas en neuronas corticales en cultivos primarios (Figura 7 B). El silenciamiento de NP1 por RNAi bloquea estos efectos tóxicos de la sobre-expresión de NP1 (Figura 7B).

Material y Métodos

Tanto la sobre-expresión de NP1 como el silenciamiento génico se realizan mediante transducción con vectores lentivirales en cultivos primarios de neuronas corticales. Se ha utilizado los vectores lentivirales di-cistrónicos auto-inactivantes, pWPI i pLVTHM, conjuntamente con plásmidos de empaquetado y cápside de segunda generación³⁵. Para ello se ha clonado la secuencia codificante de NP1 a partir de cDNA de cerebro de rata (Quick Clone cDNA, Invitrogen) mediante PCR y se ha insertado dentro del vector pWPI entre el lugar de restricción PmeI por ligación de extremos romos. Por otro lado, se ha construido el vector de silenciamiento génico de NP1, pLVTHM-shRNAi-NP1-GFP para expresar RNAs cortos de interferencia (shRNAi). Después de diversas pruebas con diversas secuencias de DNA para comprobar la eficiencia de silenciamiento génico, se ha demostrado que los shRNAis dirigidos contra la secuencia 1 de 19 bases del cDNA de NP1 "GTACAGCCGCCTCAATTCT" (SEQ ID NO1) permiten reducir aproximadamente un 70% de la expresión de proteína NP1. Otras secuencias utilizadas y que se ha comprobado que también producen silenciamiento de la expresión génica de NP1 en un rango entre 70 y 30% son las siguientes: secuencia 2: "GCGGACCAACTACATGTAT" (SEQ ID NO2); secuencia 3: "GAGATACTCATTAACGACA" (SEQ ID NO3).

En general, dos oligonucleótidos complementarios de DNA se hibridan para producir un fragmento de DNA de doble cadena que codifica una cadena de RNA de 19 nucleótidos en la orientación sentido con un bucle de 9 nucleótidos y una cadena de 19 nucleótidos anti-sentido dirigida contra la secuencia de NP1. Así, la secuencia 1 sentido del shRNAi contra NP1 (SEQ ID NO1) es la siguiente: 5'-gatcccc GTACAGCCGCCTCAATTCT tcaaga ga AGAATTGAGGCGGCTGTAC ttttt-3' (sentido) (SEQ ID NO4), y la secuencia 2 antisentido es la 5'-agctaaaa GTACAGCCGCCTCAATTCT tctttgaa AGAATTGAGGCGGCTGTAC ggg-3' (SEQ ID NO5). La secuencia en mayúsculas es la secuencia objetivo de NP1 que corresponde a las bases 1004 a 1022 del mRNA de NP1 de rata (SEQ ID NO1) (Genbank Accession number U18772).

Por otro lado, la secuencia correspondiente de shRNAi dirigida contra la forma humana homóloga de la secuencia SEQ ID NO1 de NP1 es: 5'-gatcccc GCAGTACAGCCGCCTCAAT tcaagaga ATTGAGGCGGCTGTACTGC ttttt-3' (sentido) (SEQ ID NO6), y 5'-agctaaaa GCAGTACAGCCGCCTCAAT tctttgaa ATTGAGGCGGCTGTACTGC ggg-3' (antisentido) (SEQ ID NO7), que se corresponde con las bases 602 a 620 del mRNA de NP1 humano (Genbank Accession number NM_002522).

Las otras secuencias que se ha comprobado que también producen silenciamiento de la expresión génica de NP1 en un rango entre 70 y 30% son las siguientes:

- secuencias frente a la secuencia "GCGGACCAACTACATGTAT" (SEQ ID NO2), donde la secuencia 1 sentido del shRNAi es 5'-gatcccc GCGGACCAACTACATGTAT tcaagaga ATACATGTAGTTGGTCCGC ttttt-3' (SEQ ID NO8), y la secuencia 2 antisentido es la siguiente 5'-agctaaaa GCGGACCAACTACATGTAT tctttgaa ATACATGTAGTTGGTCCGC ggg-3' (SEQ ID NO9). La secuencia en mayúsculas es la secuencia objetivo de NP1 que corresponde a las bases 1259 a 1277 del mRNA de NP1 de rata (Genbank Accession number U18772). La secuencia correspondiente de shRNAi contra la forma humana de NP1 es 5'-gatcccc GCGGACCAACTATATGTAT tcaagaga ATACATATAGTTGGTCCGC ttttt-3' (sentido) (SEQ ID NO10), y 5'-agctaaaa GCGGACCAACTATATGTAT tctttgaa ATACATATAGTTGGTCCGC ggg-3' (antisentido) (SEQ ID NO11) que corresponde a las bases 860 a 878 del mRNA de NP1 humano (Genbank Accession number NM_002522).

ES 2 352 630 A1

- secuencias frente a la secuencia “GAGATACTCATTAACGACA” (SEQ ID NO3), donde la secuencia 1 sentido del shRNAi es 5'-gatcccc GAGATACTCATTAACGACA ttcaagaga TGTCGTTAATGAGTATCTC ttttt-3' (SEQ ID NO12), y la secuencia 2 antisentido es la siguiente 5'-agctaaaaa GAGATACTCATTAACGACA tctcttgaa TGTCGT TAATGAGTATCTC ggg-3' (SEQ ID NO13). La secuencia en mayúsculas es la secuencia objetivo de NP1 que corresponde a las bases 1434 a 1452 del mRNA de NP1 de rata (Genbank Accession number U18772). La secuencia correspondiente de shRNAi contra la forma humana de NP1 es 5'-gatcccc GAGATCCTCATCAATGACA ttcaagaga TGT CATTGATGAGGATCTC ttttt-3' (sentido) (SEQ ID NO14), y 5'-agctaaaaa GAGATCCTCATCAATGACA tctcttgaa TGTCATTGATGAGGATCTC ggg-3' (antisentido) (SEQ ID NO15) que corresponde a las bases 1035 a 1053 del mRNA de NP1 humano (Genbank Accession number NM_002522).

El shRNAi que se diseñó para utilizar como control es una secuencia al azar (Random) que se introdujo en el vector lentiviral control. La secuencia del shRNAi-Random es: 5'- gatcccc GCAGTGCAATATCGGAAAC ttcaagaga GTTCCGATATTGCACTGC ttttt-3' (sentido) (SEQ ID NO16) y 5'-agctaaaaa GCAGTGCAATATCGGAAAC tctcttgaa GTTCCGATATTGCACTGC ggg-3' (antisentido) (SEQ ID NO17).

Los dúplex de DNA de shRNAi-NP1 y shRNAi-Random fueron clonados entre los lugares de restricción HindIII and BglII del vector pSUPER.retro. Después de confirmar que shRNAi es capaz de silenciar la expresión de NP1, las secuencias anteriores fueron sub-clonadas en el vector lentiviral pLVTHM entre los lugares de restricción EcoRI-ClaI.

Producción y titulación de los vectores lentivirales

Las partículas víricas son pseudotipadas con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular y se obtienen mediante transfección transitoria en células 293T siguiendo el procedimiento estándar descrito por el laboratorio del Dr. Trono³⁶. Las partículas víricas se concentran por centrifugación. La titulación para determinar la concentración de partículas víricas se realiza mediante transducción de células 293T de diluciones seriadas del concentrado vírico y conteo posterior por citometría de flujo del número de células que expresan el marcador codificado por el virus que es la proteína verde fluorescente (GFP). Los valores de concentración viral que se obtienen con este procedimiento están en el rango de 1-2 x 10⁹ unidades de transducción por mililitro (TU/ml).

Transducción de cultivos primarios de neuronas corticales con los vectores lentivirales

Las partículas lentivirales se añaden a los cultivos de neuronas corticales inmediatamente después de sembrarlas en las placas en algunos experimentos, o después de su maduración en otros experimentos. La cantidad de partículas por titulación utilizada en nuestros experimentos es en el rango de 2-10 x 10⁶ TUs en un volumen de entre 2 y 5 μ l del concentrado vírico. El porcentaje de neuronas corticales que expresan GFP 48 horas después de la transducción es de 80-90%.

Cultivos primarios de neuronas corticales

Los cultivos se realizan a partir de fetos E18 de ratas de la cepa Sprague-Dawley. El procedimiento de cultivo sigue básicamente el protocolo descrito por Enguita y cols¹⁶. El procedimiento consiste en: disección del córtex, disociación química de las células en presencia de tripsina y DNasa I, su posterior dilución en el medio de cultivo Eagle Basal suplementado con 2 mM glutamina, 25 mM potasio y 10% suero fetal bovino y la siembra de las células en pocillos recubiertos con poli-L-lisina (10 μ g/ml) a una densidad de 9 x 10⁵ células/cm² en medio suplementado con glucosa (25 mM). Para impedir la proliferación glial, se añade 10 μ M citosina arabinósido a las 72 horas de la siembra y los experimentos se realizan en cultivos durante 8 días *in vitro*.

Preparación de los oligómeros solubles de Ab 1-42

Los oligómeros solubles de Ab 1-42, conocidos también por Ligandos solubles derivados de amiloide (ADDLs), se preparan siguiendo procedimientos estándar descritos por varios grupos³⁷⁻³⁹.

Análisis de inmunoreactividad de proteínas NP1 y sinaptofisina mediante SDS-PAGE y Western blot

La obtención de proteínas a partir de los cultivos primarios y de los cultivos de líneas celulares se realiza tras los diversos tratamientos experimentales por procedimientos estándar. Las células se solubilizan en tampón SDS (62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5 mM EDTA, 75 mM DTT y 0.001% bromofenol azul). A continuación, las proteínas se separan mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida por procedimientos estándar. Los polipéptidos separados se pasan a membranas activadas de PVDF (Millipore) por electrotransferencia. La unión no específica se bloquea incubando las membranas en una solución de TBS tween con 5% de leche desnatada en polvo. Para detectar específicamente la NP1, las membranas se incuban en presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales contra NP1 de rata (1:1500, Transduction Laboratories) en una solución de 3% BSA en TBST. Para detectar sinaptofisina, las membranas se incuban con el anticuerpo monoclonal SY38 (1:1000, Chemicon). Seguidamente, las membranas se incuban con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Como control de carga de proteínas se utiliza la inmunodetección de actina mediante un anticuerpo policlonal de conejo contra actina 20-33 (1:3000, Sigma). La visualización de las proteínas inmunoreactivas se realiza utilizando un sistema mejorado de quimioluminiscencia (Supersignal WestDura, Pierce), y la detección de las bandas de inmunoreactividad se realiza

ES 2 352 630 A1

con un sistema de análisis de imagen VersaDoc Modelo 5000 (Bio-Rad). La intensidad de las bandas obtenidas se cuantifica mediante densitometría con el programa de análisis por ordenador Quantity One (Bio-Rad). Los valores densitométricos de las bandas de inmunoreactividad de NP1 y sinaptofisina se normalizan con el valor de la banda de actina correspondiente.

5

Determinación de la concentración de calcio intracelular en neuronas corticales en cultivo

Las neuronas corticales se cargan con una concentración 5 μ M del indicador de calcio Fura-2-AM (Molecular Probes) durante una hora a temperatura ambiente en una solución salina tamponada con 10 mM HEPES (pH 7.4). La medida de la fluorescencia inducida por la entrada de calcio se realiza en un microscopio invertido de epifluorescencia con un objetivo de fluorita 20X. Se determina la fluorescencia de emisión a 510 nm en cada neurona después de excitar a con un haz de luz de 340 nm y 380 nm de forma alternativa utilizando un filtro de emisión de 390 nm. La fluorescencia generada por la unión de Fura-2 con calcio intracelular se expresa como F340/F380 (proporción de la fluorescencia de emisión a 340/fluorescencia de emisión a 380).

15

Producción de anticuerpos dirigidos contra epítomos que se encuentran entre los aminoácidos 24 a 229 de la secuencia de la proteína de la NPI humana

Mediante el análisis del patrón de hidrofobicidad del fragmento que incorpora los aminoácidos 24 a 229 de la secuencia de la proteína NP1 humana se seleccionaron péptidos de 15 aminoácidos con capacidad antigénica:

20

- Péptido NP1_210-224: QRISELEKGQKDNRP (amino-ácidos 210-224 secuencia rata, SEQ ID NO18),
- Péptido NP1_100-115: GEARSGGGRKQPGSG (amino-ácidos 100-115 secuencia rata, SEQ ID NO19).

25

Después de sintetizar y purificar, dichos péptidos sintéticos se acoplaron a proteínas transportadoras como KLH o BSA por procedimientos estándar. A continuación, se inyectaron junto con adyuvante para inmunizar y producir anticuerpos policlonales en conejos. El nivel de anticuerpos anti-péptido NP1 se determinó en muestras de suero por ELISA indirecto en placas en las que previamente se había fijado cada uno de los péptidos sintéticos. Finalmente, la purificación de los anticuerpos se realizó en una columna de inmovinoafinidad por procedimientos estándar.

30

Para más detalle de los materiales y métodos puede tomarse en cuenta el estudio de los inventores (Maria A. Abad, Marta Enguita, Nuria DeGregorio-Rocasolano, Isidre Ferrer, and Ramón Trullas. Neuronal Pentraxin 1 Contributes to the Neuronal Damage Evoked by Amyloid- β and Is Overexpressed in Dystrophic Neurites in Alzheimer's Brain. The Journal of Neuroscience, December 6, 2006, 26(49):12735-12747).

35

Bibliografía

- 1.- M. Vila and S. Przedborski, *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 365-375 (2003).
- 2.- R. R. Buss, W. Sun, R. W. Oppenheim, *Annu. Rev. Neurosci.* 29:1-35., 1-35 (2006).
- 3.- G. Kroemer and J. C. Reed, *Nat. Med.* 6, 513-519 (2000).
- 4.- D. E. Bredesen, R. V. Rao, P. Mehlen, *Nature.* 443, 796-802 (2006).
- 5.- P. Liang and A. B. Pardee, *Science* 1992, 967-971 (1992).
- 6.- N. DeGregorio-Rocasolano, T. Gasull, R. Trullas, *J. Biol. Chem.* 276, 796-803 (2001).
- 7.- A. K. Schlimgen, J. A. Helms, H. Vogel, M. S. Perin, *Neuron* 14, 519-526 (1995).
- 8.- A. R. Goodman *et al.*, *Cytokine. Growth Factor. Rev.* 7, 191-202 (1996).
- 9.- D. C. Dodds, I. A. Omeis, S. J. Cushman, J. A. Helms, M. S. Perin, *Journal of Biological Chemistry* 272, 21488-21494 (1997).
- 10.- Y. C. Hsu and M. S. Perin, *Genomics* 28, 220-227 (1995).
- 11.- C. C. Tsui *et al.*, *J. Neurosci.* 16, 2463-2478 (1996).
- 12.- R. J. O'Brien *et al.*, *Neuron* 23, 309-323 (1999).
- 13.- D. Xu *et al.*, *Neuron* 39, 513-528 (2003).
- 14.- R. O'Brien *et al.*, *J. Neurosci.* 22, 4487-4498 (2002).
- 15.- B. Chen and J. L. Bixby, *J. Comp. Neurol.* 481, 391402 (2005).

65

ES 2 352 630 A1

- 16.- M. Enguita, N. DeGregorio-Rocasolano, A. Abad, R. Trullas, *Mol. Pharmacol.* 67, 1237-1246 (2005).
- 17.- A. Takashima, K. Noguchi, K. Sato, T. Hoshino, K. Imahori. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 7789-7793 (1993).
- 5 18.- R. V. Bhat, S. L. Budd Haerberlein, J. Avila, *J Neurochem.* 89, 1313-1317 (2004).
- 19.- C. L. Sayas, J. Avila, F. Wandosell, *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 144-153 (2002).
- 10 20.- S. Sánchez *et al.*, *J Neurochem.* 78, 468-481 (2001).
- 21.- J. R. Munoz-Montano, F. Lim, F. J. Moreno, J. Avila, J. Diaz-Nido, *J Alzheimers. Dis.* 1, 361-378 (1999).
- 22.- F. Q. Zhou, J. Zhou, S. Dedhar, Y. H. Wu, W. D. Snider, *Neuron* 42, 897-912 (2004).
- 15 23.- E. D. Roberson and L. Mucke, *Science.* 314, 781-784 (2006).
- 24.- D. M. Walsh and D. J. Selkoe, *J. Neurochem.* 101, 1172-1184 (2007).
- 20 25.- C. Haass and D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101-112 (2007).
- 26.- D. M. Walsh and D. J. Selkoe, *Neuron* 44, 181-193 (2004).
- 27.- J. Hardy and D. J. Selkoe, *Science* 297, 353-356 (2002).
- 25 28.- C. W. Cotman and J. H. Su, *Brain Pathol.* 6, 493506 (1996).
- 29.- Y. Morishima *et al.*, *J. Neurosci.* 21, 7551-7560 (2001).
- 30 30.- D. T. Loo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 7951-7955 (1993).
- 31.- K. J. Ivins, E. T. Bui, C. W. Cotman, *Neurobiol. Dis.* 5, 365-378 (1998).
- 32.- M. A. Abad, M. Enguita, N. DeGregorio-Rocasolano, I. Ferrer, R. Trullas, *J. Neurosci.* 26, 12735-12747 (2006).
- 35 33.- F. Kamenetz *et al.*, *Neuron* 37, 925-937 (2003).
- 34.- D. M. Walsh *et al.*, *Nature* 416, 535-539 (2002).
- 40 35.- M. Wiznerowicz and D. Trono, *J. Virol.* 77, 89578961 (2003).
- 36.- R. Zufferey *et al.*, *J. Virol.* 72, 9873-9880 (1998).
- 45 37.- M. P. Lambert *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 6448-6453 (1998).
- 38.- K. N. Dahlgren *et al.*, *J Biol.Chem.* 277, 3204632053 (2002).
- 50 39.- W. L. Klein, *Neurochem. Int.* 41, 345-352 (2002).
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

5 1. RNA de interferencia (shRNAi) **caracterizado** porque se une preferentemente a la secuencia fragmento de RNAm de la proteína NP1 humana GAGATACTCATTAACGACA (SEQ ID NO3) o a otro fragmento que comprenda a esta secuencia.

10 2. shRNAi según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la proteína NP1 presenta la secuencia NPTX1_HUMAN, SwissProt primary accesión number Q15818 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

15 3. shRNAi según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el shRNAi es un shRNAi expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GAGATACTCATTAACGACA ttaagaga TGTCGTTAATGAGTATCTC tttt-3' (SEQ ID NO12, sentido) y la 5'-agctaaaa GAGATACTCATTAACGACA tctctgaa TGTCGTTAATGAGTATCTC ggg-3' (SEQ ID NO13, antisentido).

20 4. shRNAi según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el shRNAi es un shRNAi expresado por la pareja de nucleótidos siguiente: 5'-gatcccc GAGATCCTCATCAATGACA ttaagaga TGTCATTGATGAGGATCTC tttt-3' (SEQ ID NO14, sentido), y la 5'-agctaaaa GAGATCCTCATCAATGACA tctctgaa TGTCATTGATGAGGATCTC ggg-3' (SEQ ID NO15, antisentido).

25 5. shRNAi según la reivindicación 1 **caracterizado** porque dicho shRNAi está comprendido en un vector de expresión o en un vector de transferencia.

6. shRNAi según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el vector de expresión es un vector de expresión viral.

7. shRNAi según la reivindicación 6, donde el vector de expresión viral es un lentivirus.

30 8. shRNAi según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el vector de expresión viral lentivirus es el vector pLVTHM-shRNAi-NP1 que comprende, al menos, una de las parejas de las secuencias siguientes:

a. secuencias SEQ ID NO 12 y 13, y

b. secuencias SEQ ID NO 14 y 15.

35 9. Uso de un shRNAi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades humanas neurológicas.

10. Uso según la reivindicación 9, donde la enfermedad neurológica es neurodegenerativa.

40 11. Uso según la reivindicación 10, donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer.

12. Medicamento o composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades neurológicas, **caracterizada** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del shRNAi según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

45 13. Medicamento o composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde la enfermedad neurológica es neurodegenerativa.

50 14. Medicamento o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, que además comprende uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

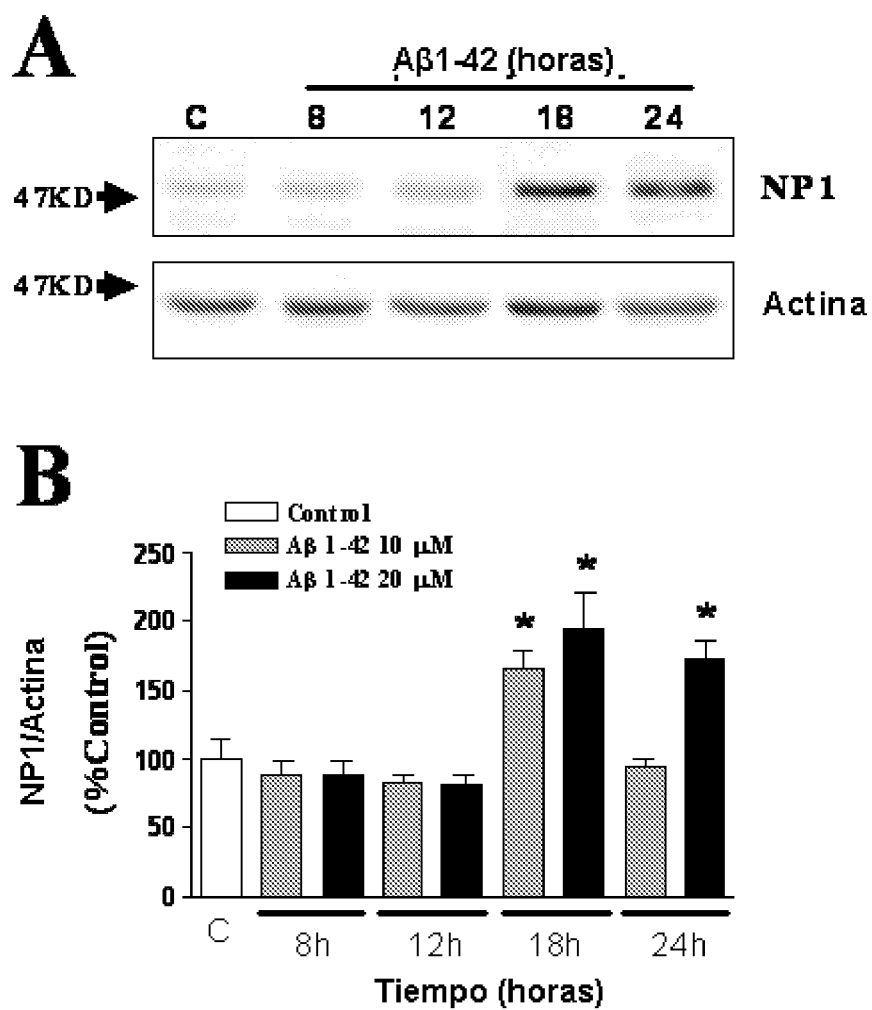


FIG. 1

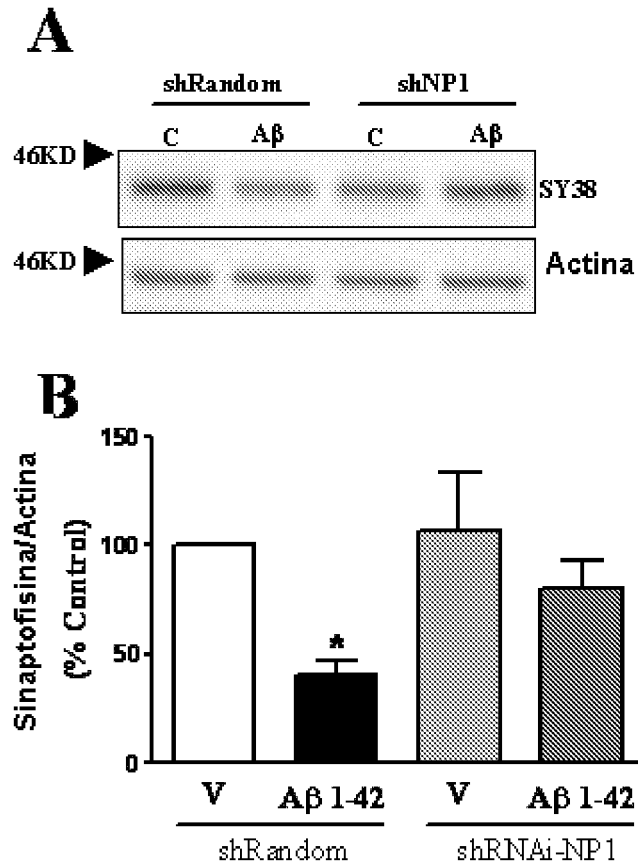


FIG. 2

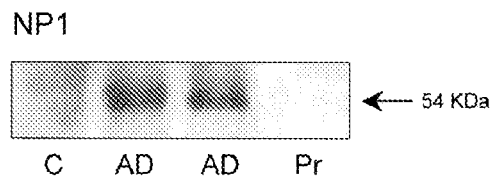


FIG. 3

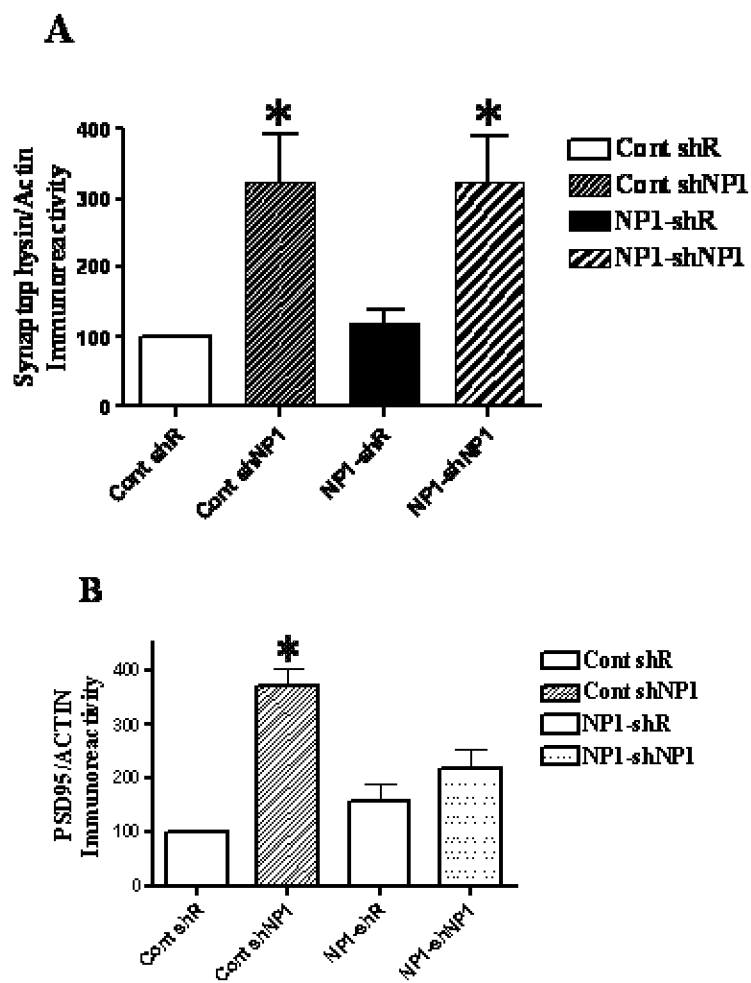


FIG. 4

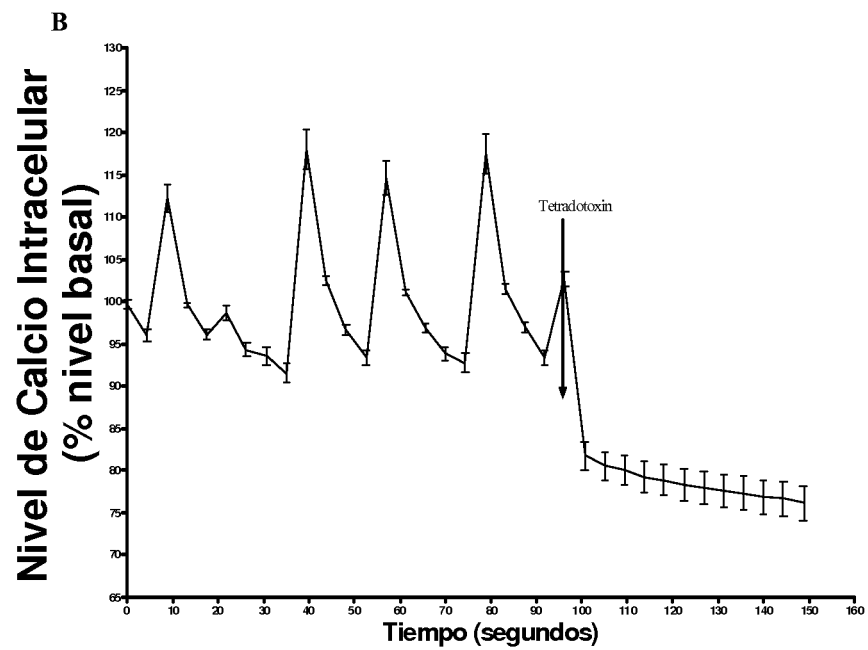
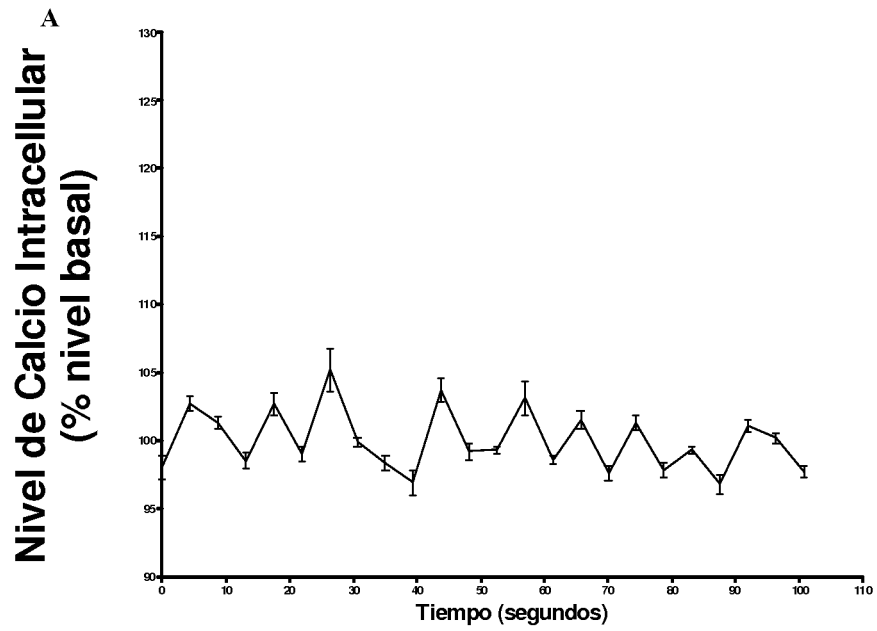


FIG. 5

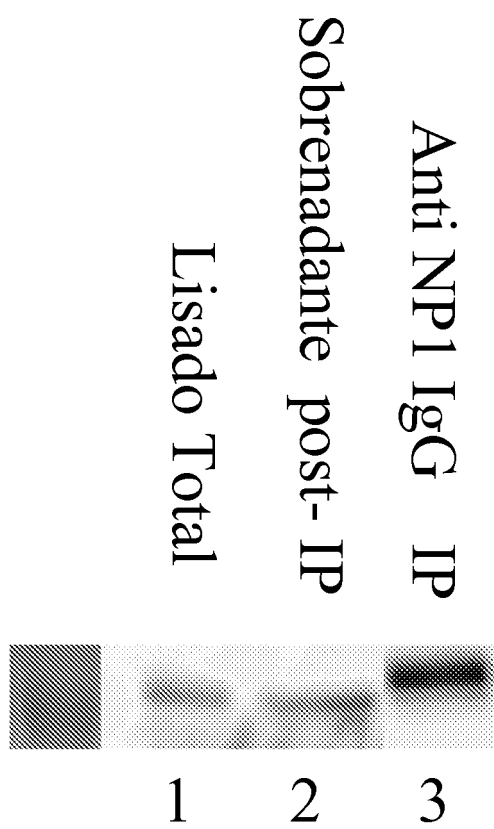
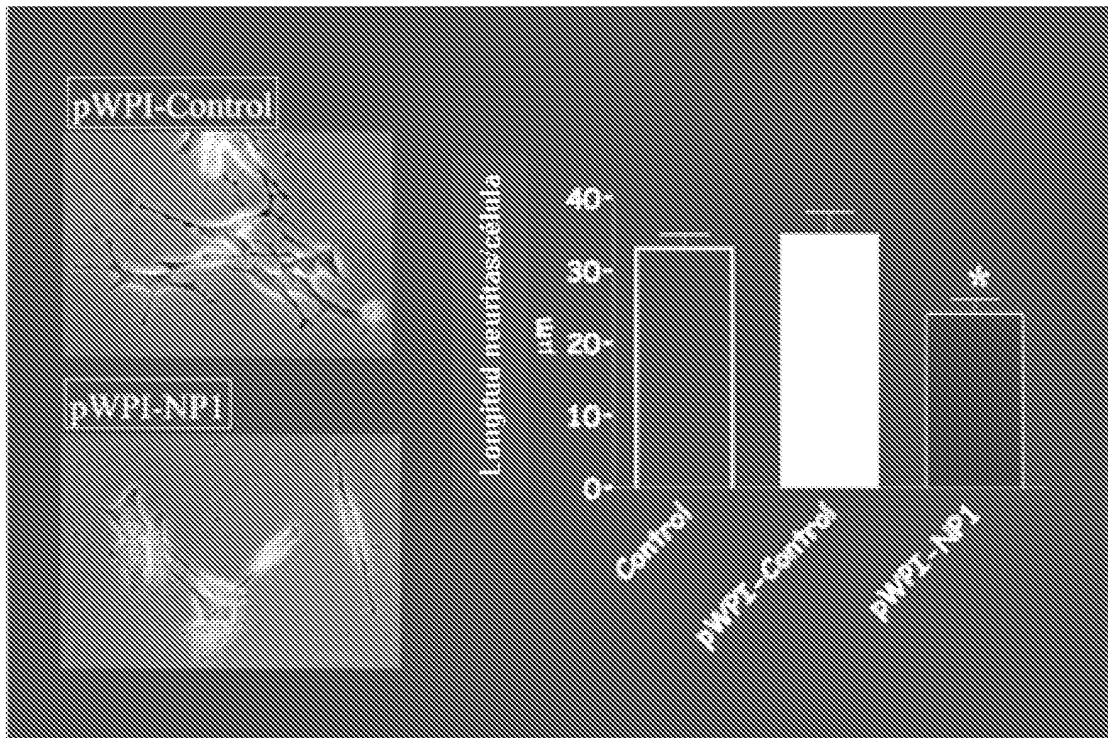


FIG. 6

A



B

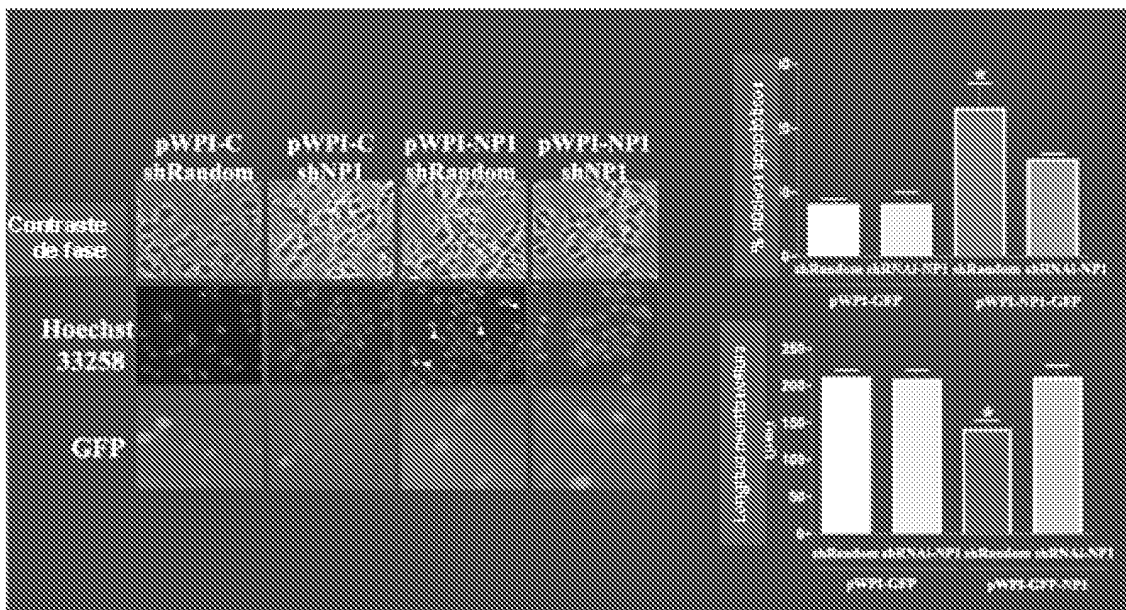


FIG. 7

ES 2 352 630 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
- 5 <120> RNA DE INTERFERENCIA ÚTILES PARA LA ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS PARA EL TRATAMIENTO O PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES HUMANAS NEURODEGENERATIVAS, MEDICAMENTOS ASÍ OBTENIDOS Y SUS APLICACIONES
- 10 <130> NP1
- <160> 19
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 19
- 20 <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Dominio 1004-1022 nt de NP1 de rata
- <400> 1
- 30 gtacagccgc ctcaattct
19
- <210> 2
- <211> 19
- 35 <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 40 <223> Dominio 1259-1277 nt de NP1 de rata
- <400> 2
- 45 gcggaccaac tacatgtat 19
- <210> 3
- <211> 19
- <212> DNA
- 50 <213> Artificial
- <220>
- <223> Dominio 1434-1452 nt de NP1 de rata
- 55 <400> 3
- gagatactca ttaacgaca 19
- 60 <210> 4
- <211> 59
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 65 <220>
- <223> shRNAi 1r sentido NP1 1004/1022

ES 2 352 630 A1

<400> 4
gatccccgta cagccgcctc aattctttca agagaagaat tgaggcggct gtacttttt 59

5 <210> 5
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> shRNAi 1r antisentido NP1 1004-1022

15 <400> 5
agctaaaaag tacagccgcc tcaattcttc tcttgaaaga attgaggcgg ctgtacggg 59

<210> 6
20 <211> 59
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> shRNAi 1h sentido NP1 602-620 nt

30 <400> 6
gatccccgca gtacagccgc ctcaatttca agagaattga ggcggctgta ctgcttttt 59

<210> 7
35 <211> 59
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> shRNAi 1h antisentido NP1 602-620 nt

<400> 7
45 agctaaaaag cagtacagcc gcctcaattc tcttgaaatt gaggcggctg tactgcggg 59

<210> 8
<211> 59
50 <212> DNA
<213> Artificial

<220>
55 <223> shRNAi 2r sentido NP1 1259-1277 nt

<400> 8
60 gatccccgcg gaccaactac atgtatttca agagaatata tgtagttggt cgccttttt 59

<210> 9
<211> 59
<212> DNA
65 <213> Artificial

<220>

ES 2 352 630 A1

<223> shRNAi 2r antisentido NP1 1259-1277 nt
<400> 9
5 agctaaaaag cggaccaact acatgtattc tcttgaaata catgtagttg gtccgcggg 59
<210> 10
<211> 59
10 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
15 <223> shRNAi 2h sentido NP1 860-878 nt
<400> 10
20 gatccccgcg gaccaactat atgtatttca agagaataca tatagttggt ccgcttttt 59
<210> 11
<211> 59
<212> DNA
25 <213> Artificial
<220>
30 <223> shRNAi 2h antisentido NP1 860-878 nt
<400> 11
35 agctaaaaag cggaccaact atatgtattc tcttgaaata catatagttg gtccgcggg 59
<210> 12
<211> 59
<212> DNA
40 <213> Artificial
<220>
<223> shRNAi 3r sentido NP1 1434-1452 nt
45 <400> 12
gatccccgag atactcatta acgacattca agagatgtcg ttaatgagta tctcttttt 59
<210> 13
50 <211> 59
<212> DNA
<213> Artificial
55 <220>
<223> shRNAi 3r antisentido NP1 1434-1452 nt
60 <400> 13
agctaaaaag agatactcat taacgacatc tcttgaatgt cgttaatgag tatctcggg 59
<210> 14
65 <211> 59
<212> DNA
<213> Artificial

ES 2 352 630 A1

<220>
 <223> shRNAi 3h sentido NP1 1035-1053 nt
 5 <400> 14
 gatccccgag atcctcatca atgacattca agagatgtca ttgatgagga tctcttttt 59
 <210> 15
 10 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> shRNAi 3h antisentido NP1 1035-1053 nt
 20 <400> 15
 agctaaaaag agatcctcat caatgacatc tcttgaatgt cattgatgag gatctcggg 59
 <210> 16
 25 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> shRNAi-Random sentido
 <400> 16
 35 gatccccgca gtgcaatatc ggaaacttca agagagtttc cgatattgca ctgcttttt 59
 <210> 17
 <211> 59
 40 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> shRNAi-Random antisentido
 <400> 17
 50 agctaaaaag cagtgcaata tcggaaactc tcttgaagtt tccgatattg cactgcggg 59
 <210> 18
 <211> 15
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 60 <223> Péptido NP1_210-224
 <400> 18
 65 Gln Arg Ile Ser Glu Leu Glu Lys Gly Gln Lys Asp Asn Arg Pro
 1 5 10 15
 <210> 19

ES 2 352 630 A1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Péptido NP1_100-115

10 <400> 19

Gly Glu Ala Arg Ser Gly Gly Gly Arg Lys Gln Pro Gly Ser Gly
1 5 10 15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200930455

22 Fecha de presentación de la solicitud: 14.07.2009

32 Fecha de prioridad: 00-00-0000
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: Ver hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ABAD MA et al. Neuronal Pentraxin 1 Contributes to the Neuronal Damage Evoked by Amyloid-B and Is Overexpressed in Dystrophic Neurites in Alzheimer's BrainNeurobiology of Disease. Dic 2006, Vol 26(49), páginas 12735-12747, todo el documento.	1-14
X	WO 0136626 A2 (MERCK PATENT GMBD) 25.05.2001, página 1, párrafo 1; página 9, párrafos 3-4; página 10, párrafo 1 - página 15, párrafo 2; reivindicaciones 10-18.	1-14
X	MILLER VM et al. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. Nucleid Acids Research. 2004, Vol 32(2), páginas 661-668, todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.07.2010

Examinador
Mª D. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ NO
	Reivindicaciones _____	
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones _____	SÍ NO
	Reivindicaciones 1-14	

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ABAD MA et al. Neurobiology of Disease. Dic 2006, Vol 26(49), páginas 12735-12747.	2006
D02	WO 0136626 A2	25.05.2001
D03	MILLER VM et al. Nucleid Acids Research. 2004, Vol 32(2), páginas 661-668.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un RNA de interferencia (shRNAi) útil para la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento o prevención de enfermedades neurológicas, preferentemente Alzheimer, que se une a la secuencia fragmento, definida como SEQ ID NO3, del ARN mensajero de la proteína humana pentraxina neuronal 1 (NP1); o, que corresponde a las secuencias SEQ ID NO12 y 13 o SEQ ID NO14 y 15; pudiendo estar incluidas estas secuencias en un vector viral o de transferencia (reivindicaciones 1-14).

El documento D01 divulga función de la proteína pentraxina neuronal 1 (NP1) en procesos de enfermedades neurodegenerativas. Estudios realizados con cultivos primarios de neuronas corticales, tratadas con el péptido beta-amiloide, muestran el incremento de la expresión de NP1 antes de inducir la neurodegeneración apoptótica. Asimismo, este documento divulga que la inhibición de la expresión del gen NP1, empleando un ARN de interferencia, expresado mediante un vector, contribuye a prevenir y controlar enfermedades neurológicas (ver todo el documento).

El documento D02 divulga una composición farmacéutica que contiene un inhibidor de la síntesis de la proteína pentraxina neuronal 1 (NP1). Dicho inhibidor puede ser una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para estas proteínas o para una parte de ellas; una secuencia de nucleótidos antisentido, específica de los genes o de los ARN mensajeros; o una secuencia de aminoácidos que constituye una proteína o un anticuerpo específico para estas proteínas. Los nucleótidos se expresan con ayuda de un vector recombinante en una célula huésped (ver página 1, párrafo 1; página 11, párrafo 2 - página 15, párrafo 2; reivindicaciones 10-12).

El documento D03 divulga la síntesis de moléculas de ARN de interferencia que puedan suprimir la expresión de genes involucrados en el desarrollo de enfermedades como los genes que codifican para las proteínas tau y el precursor de la proteína amiloide, ambas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer. También se refiere a la aplicación terapéutica de estas moléculas para combatir la enfermedad (ver todo el documento).

Hoja adicional

1. NOVEDAD (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

1.1. REIVINDICACIONES 1-14

El documento D01 se considera el más cercano al Estado de la Técnica ya que anticipa el efecto que produce la inhibición de la expresión de la proteína pentraxina neuronal 1 (NP1), empleando un ARN de interferencia, en enfermedades neurodegenerativas, especialmente Alzheimer. Sin embargo, en este documento no se encuentran recogidas ninguna de las secuencias definidas como SEQ ID NO12 y 13 o SEQ ID NO14 y 15, que expresan un shRNAi que se une a la secuencia fragmento, definida como SEQ ID NO3, del ARN mensajero de la proteína humana pentraxina neuronal 1 (NP1).

En consecuencia, según lo divulgado en el documento D01, las reivindicaciones 1-14 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 1-14

Los documentos D01 y D02 anticipan el efecto de la inhibición de la expresión de la proteína pentraxina neuronal 1 (NP1) en enfermedades neurodegenerativas, especialmente Alzheimer.

El D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa secuencias del tipo de las definidas como NO12 y 13 o SEQ ID NO14 y 15 en la presente solicitud, que expresan un shRNAi que se une a una secuencia fragmento del ARN mensajero de la proteína humana pentraxina neuronal 1 (NP1). La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud radica en las moléculas de shARNi definidas como SEQ NO12 y 13 o SEQ ID NO14 y 15, que no se han encontrado en el estado de la técnica, ni la definida como SEQ ID NO3, del ARN mensajero de NP1.

El documento D02 anticipa el uso de moléculas de shRNAi, que interfieren en la síntesis de la proteína pentraxina neuronal 1 (NP1) para elaborar un medicamento o composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer.

Aunque en los documentos D01 y D02 no se encuentren las secuencias anteriormente indicadas, se considera que resultaría obvio para un experto en la materia el uso de otros shARNi que se unan a otras secuencias del ARN mensajero de la proteína NP1, así como el uso de estas secuencias en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-14 carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

El documento D03, se refiere al estado de la técnica y no se considera relevante en relación con el objeto de la invención.