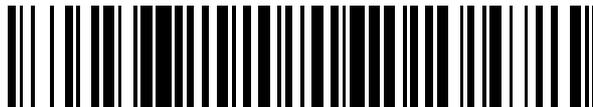


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 179**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2007 E 07870808 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2077838**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de trastornos relacionados con beta-amiloide y composiciones para los mismos**

30 Prioridad:

25.10.2006 US 854333 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.10.2013

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 YORK AVENUE FOUNDERS 502
NEW YORK, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

**FLAJOLET, MARC y
GREENGARD, PAUL**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 425 179 T3

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

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON BETA-AMILOIDE Y COMPOSICIONES PARA LOS MISMOS

Descripción

CAMPO TÉCNICO

5 **[0001]** La presente invención se refiere a métodos para la identificación de inhibidores de CK1 para su uso en el tratamiento de enfermedades que implican la sobreproducción de péptido β -amiloide (Abeta o A β), tales como la enfermedad de Alzheimer (EA).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 **[0002]** Es ampliamente aceptado que el péptido A β es un agente causante en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Los péptidos A β son metabolitos de la proteína precursora β -amiloide (proteína precursora asociada con la enfermedad de Alzheimer o APP) y están compuestos principalmente por 40 a 42 aminoácidos, A β 1-40 ("A β 40") y A β 1-42 ("A β 42"), respectivamente. A β 40 y A β 42 se generan por dos escisiones enzimáticas que se producen cerca del C-terminal de la APP. Las enzimas responsables de la escisión, la aspartil proteasa beta-secretasa ("BACE") y la proteasa
 15 γ -secretasa dependiente de la presenilina (" γ -secretasa"), generan los N- y C-terminales de A β , respectivamente. El amino terminal de A β está formado por escisión por β -secretasa entre el residuo de metionina 596 y el residuo de aspartato 597 de la APP (numeración basada en la isoforma 695 de la APP). Las escisiones por γ -secretasa en diferentes posiciones (C-terminal de 38, 40 o 43 residuos de ese producto de escisión por β -secretasa) para liberar los péptidos A β . Una tercera enzima, la α -secretasa, escinde la proteína precursora entre los sitios de escisión β y γ , impidiendo así la
 20 producción de A β y liberando un péptido de aproximadamente 3 kDa conocido como P3, que no es patológico. Tanto la escisión por β - como por α -secretasa también dan lugar a fragmentos solubles de terminal secretada de APP, conocidos como sAPP β y sAPP α , respectivamente. Se ha apuntado que el fragmento sAPP α es neuroprotector. Esas secretasas también pueden estar implicadas en el
 25 procesamiento de otras proteínas importantes. Por ejemplo, la γ -secretasa también escinde la proteína Notch-1.

[0003] En individuos normales, el péptido A β se encuentra en dos formas predominantes, la forma mayoritaria A β -40 (también conocida como A β 1-40) y la forma minoritaria A β 42 (también conocida como A β 1-42), teniendo cada uno un terminal COOH distinto. Las principales lesiones histológicas de
 30 la EA son las placas neuríticas y ovillos neurofibrilares que se producen en regiones cerebrales afectadas. Las placas neuríticas se componen de péptidos A β , principalmente A β 40 y A β 42. Aunque las neuronas sanas producen por lo menos diez veces más A β 40 en comparación con A β 42, las placas contienen una proporción mayor del menos soluble A β 42. Los pacientes con la forma más común de enfermedad de Alzheimer familiar muestran un aumento en la cantidad de la forma A β 42.
 35 La forma A β 40 no está asociada con los primeros depósitos de placas amiloides. Por el contrario, la forma A β 42 se acumula precozmente y sobre todo en las placas parenquimales y existen fuertes indicios de que A β 42 juegue un papel importante en los depósitos de placas amiloides en pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar. Los ovillos neurofibrilares están formados por la proteína tau agregada y su papel en la patología de la EA es menos claro. Los síntomas de la EA están
 40 correlacionados más estrechamente con A β cerebrales totales más que con placas. Alrededor del 10% de los casos de EA son resultado de la herencia autosómica dominante de mutaciones en

cualquiera de la APP o de los 2 genes presenilina 1 y presenilina. En ambos casos, se produce un aumento de la producción de A β o A β 42 total en comparación con A β 40.

[0004] Como se ha mencionado anteriormente, se considera que la enfermedad de Alzheimer está asociada con la acumulación del péptido neurotóxico A β . Mientras A β se produce por escisión secuencial de APP por BACE y γ -secretasa, esfuerzos importantes para desarrollar inhibidores selectivos de esas enzimas han tenido un éxito limitado. Por ejemplo, la mayoría de los inhibidores de γ -secretasa sufren el inconveniente de que inhiben la escisión de Notch, una proteína esencial para el desarrollo normal.

[0005] Además de BACE y γ -secretasa, la caseína quinasa 1 ("CK 1") también se ha implicado en la producción de péptidos A β -40 y A β -42. Por ejemplo, se ha demostrado que ARNm CK1 δ está sobrerregulada en muestras cerebrales de EA (Yasojima, K. et al. (2000) *Brain Res* 865, 116-20) y puede estar asociado con una asociación patológica con tau (Schwab, C. et al., (2000) *Neurobiol Aging* 21, 503-10). Curiosamente, la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), una de las quinasas más estudiadas en el campo del Alzheimer, puede fosforilar sus sustratos sólo si son pre-fosforilados por una quinasa cebadora, y CK1 es una de las pocas quinasas cebadoras GSK-3 (PKA, CK1, CK2, Cdk5 y DYRK1A) (Véase, por ejemplo, Meijer, L. et al., (2004) *Trends Pharmacol Sci* 25, 471-80). También se ha demostrado que CK1 es una reguladora aguas arriba de Cdk5, otra proteína quinasa implicada en la EA (Liu, F. et al., (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11062-8). Además, CK1 fosforila BACE y regula su localización subcelular (Pastorino, L., Ikin, A.F., Nairn, A.C., Pursnani, A. & Buxbaum, J.D. (2002) *Mol Cell Neurosci* 19, 175-85.). También se ha demostrado que CK1 fosforila PS2 (Walter, J., Grünberg, J., Schindzielorz, A. & Haass, C. (1998) *Biochemistry* 37, 5961-7).

[0006] En ratones, CK1 consiste en una familia de ocho genes que parecen funcionar como enzimas monoméricas: α , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ϵ 1, ϵ 2 y ϵ 3. Los miembros de la familia contienen un dominio catalítico N-terminal de residuo 290 altamente conservado acoplado a una región C-terminal variable cuyo tamaño oscila de 40 a 180 aminoácidos. Es posible que las diferentes isoformas se expresen en diferentes poblaciones neuronales y/o sean dirigidas a diferentes regiones de la neurona, y así puedan tener acceso a diferentes sustratos. Poco se sabe sobre la regulación de CK1. CK1 es basalmente activa, pero ciertas isoformas (en particular CK1 δ y ϵ) están reguladas por la autofosforilación inhibidora en sus regiones C-terminales (Zhai, L. et al., (1995) *J Biol Chem* 270, 12717-24). En particular, se ha demostrado que la región C-terminal de CK1 ϵ es fosforilada en sitios múltiples y que la actividad enzimática se puede aumentar después de la defosforilación por una vía de señalización que implica la activación de la serina/treonina fosfatasa, calcineurina en respuesta a la estimulación de los receptores de glutamato metabotrópicos en las neuronas (Liu, F., et al., (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11062-8; Liu, S.J. et al., (2003) *J Neurochem* 87, 1333-1344).

[0007] CK1 se localiza tanto en el citosol como en el núcleo; se ha demostrado que la región C-terminal de CK1 promueve la localización subcelular diferencial de las isoformas individuales (por ejemplo, núcleo frente a citoplasma). Se ha descubierto que una cantidad de proteínas interactúan con las isoformas de CK1 en tejidos no neuronales dando lugar a su orientación hacia vías de señalización específicas (Amit, S., et al (2002) *Genes Dev* 16, 1066-76;. Cong, F., et al, (2004) *Mol Cell Biol* 24, 2000-11; Davidson, G., et al, (2005) *Nature* 438, 867-72).

[0008] También se ha informado de la asociación de CK1 con la membrana plasmática y el

citoesqueleto. (Ahmed, K. (1994) Cell Mol Biol Res 40,1-11; Vancura, A. et al, (1994) J Biol Chem 269, 19271-8; Walter, J., Schnolzer, M., Pyerin, W., Kinzel, V. & Kubler, D. (1996) J Biol Chem 271, 111-9). En las neuronas, CK1 fosforila una variedad de proteínas, incluyendo factores de transcripción, así como ciertas proteínas de la vesícula sináptica (Issinger, O.G. (1993) Pharmacol Ther 59, 1-30; Gross, S.D. et al (1995) J Cell Biol 130, 711-24). CK1 δ y CK1 ϵ , siendo predominantemente expresadas en el cerebro (Gross, S.D. y Anderson, R.A. (1998) Cell Signal 10, 699-711), han sido implicadas en varios procesos cerebrales importantes, incluyendo, sin carácter limitativo: la señalización de la dopamina (fosforilación de DARPP-32), el ritmo circadiano (fosforilación de mPer) y la señalización de receptor cerebral (Desdouits, F., et al. (1995) Proc Natl Acad Sci U S A 92, 2682-5; Kloss, B., et al. (2001) Neuron 30, 699-706; Singh, T.J. et al. (1995) FEBS Lett 358, 267-72).

[0009] US6288089 se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson mediante inhibidores de la quinasa. US2003100514 se refiere a la inhibición de la hiperactividad de los fagocitos o linfocitos mediante la administración de un lignano. WO 0141768 describe el uso de himenialdisina o derivados para inhibir las quinastas dependientes de ciclina, GSK-3 y la caseína quinasa I. US6465493 enseña el uso de triarilimidazoles sustituidos con piridilo para inhibir TGF- β . WO2005/0011144 enseña métodos para la detección de agentes capaces de modular la fosforilación de la proteína tau.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que CK1 ϵ constitutivamente activa aumenta la formación de β -amiloide y que los inhibidores de CK1 pueden reducir la formación de péptido β -amiloide producido en células que expresan niveles endógenos de CK1 y que sobreexpresan CK1 ϵ constitutivamente activa. Significativamente, bajo condiciones en las cuales la inhibición de la actividad de CK1 reduce la formación de β -amiloide, no se observa inhibición de la escisión de Notch. Los experimentos demuestran que los efectos de CK1 se expresa al nivel del sitio de escisión por γ -secretasa. De ese modo, CK1 proporciona una diana farmacológica novedosa para los trastornos relacionados con A β , incluyendo la EA. La presente invención proporciona un método para identificar moduladores de la actividad de CK1, y/o expresión génica de CK1 que pueden ser utilizados para el tratamiento de trastornos relacionados con A β en pacientes humanos y veterinarios.

[0011] La presente solicitud se refiere al descubrimiento de que CK1 es una diana adecuada para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos caracterizados por una sobreproducción de péptido A β , a los que se refiere en conjunto en este documento como "trastornos relacionados con A β " y que incluyen, sin carácter limitativo, la EA. De ese modo, la invención se refiere a un método para identificar moduladores útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con A β mediante la reducción de la acumulación de péptido A β , incluyendo la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo: a) el análisis de la capacidad de un modulador candidato para inhibir la actividad de CK1 y/o inhibir la expresión génica de CK1 in vitro o in vivo y que puede incluir también b) el análisis de la capacidad de un modulador inhibidor identificado para revertir los efectos patológicos observados en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y/o en estudios clínicos con sujetos con enfermedad de Alzheimer.

[0012] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los métodos presentes se pueden utilizar

en un método (Método 1) para tratar, seguir o controlar los trastornos relacionados con A β , incluyendo la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo la administración a un sujeto en necesidad del mismo de un modulador de CK1 en una cantidad eficaz para inhibir o reducir la acumulación de péptido A β , preferiblemente un modulador de CK1 ϵ , en el cual dicho modulador, por ejemplo, inhibe la actividad enzimática de CK1 y/o inhibe la expresión génica de CK1 en dicho sujeto, o modifica la localización subcelular de CK1 o modula la estabilidad proteica de CK1, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los métodos siguientes:

1.1 El método 1 en el cual el trastorno relacionado con A β es cualquier enfermedad caracterizada por la acumulación de agregados de proteína anormales, especialmente en el cerebro, por ejemplo, placas de amiloide y ovillos neurofibrilares, por ejemplo, precipitados de proteínas tau o amiloides, por ejemplo, A β ;

1.2 El método 1 o 1.1 en el cual la enfermedad es seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de Down, trastornos de memoria y cognitivos, demencia, neuropatías amiloides, inflamación cerebral, trauma nervioso y cerebral, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral con amiloidosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad por priones y/o trastornos vasculares, neurológicos y/o neurodegenerativos relacionados con la expresión o acumulación anormal de proteínas tau o amiloides, por ejemplo, A β ;

1.3 Cualquiera de los métodos anteriores en los cuales la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer;

1.4 Cualquiera de los métodos anteriores en el cual el modulador es un inhibidor de CK1;

1.5 Cualquiera de los métodos anteriores en el cual el modulador es un derivado de indolin-2-ona, por ejemplo, IC261, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.6 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es un triarilimidazol, por ejemplo, D4476 o SB-431542 o SB-203580, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.7 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es un isoquinolina sulfonamida por ejemplo, Ack1-7 en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.8 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosil-bencimidazol (DRB) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.9 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es un derivado de pirroloazepina, por ejemplo, himenialdisina, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.10 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es un amino pirimidina-indol, por ejemplo, matairesinol, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.11 Cualquiera de los métodos anteriores 1 -1.4 en el cual el modulador es 5-iodotubercidin en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.12 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador es meridianin E en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

1.13 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador comprende una cualquiera o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, ribozimas, aptámeros de ARN y ARN bicatenario en el cual dichas sustancias están diseñadas para inhibir la expresión génica de CK1;

5 1.14 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4 en el cual el modulador comprende anticuerpos contra CK1 o fragmentos de los mismos;

1.15 El método 1.14 en el cual dichos anticuerpos pueden, por ejemplo, inhibir la actividad de quinasa de CK1, modificar la localización subcelular de CK1 o modular la estabilidad proteica de CK1;

10 1.16 Cualquiera de los métodos anteriores que comprende adicionalmente la administración de una cantidad eficaz de un inhibidor de acetilcolinesterasa;

1.17 El método 1.16 en el cual el inhibidor de acetilcolinesterasa es seleccionado de entre donepezilo (Aricept), rivastigmina (Exelon) y galantamina (Reminyl) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;

15 1.18 Cualquiera de los métodos anteriores 1-1.4, 1.16 o 1.17 que comprende la administración de una composición de acuerdo con cualquiera de las composiciones 1 a 1.17 de abajo.

1.19 Cualquiera de los métodos anteriores en el cual el modulador de CK1 modula específicamente a CK1ε.

20 1.20 Cualquiera de los métodos anteriores en el cual el modulador de CK1 es un compuesto capaz de inhibir la actividad de CK1 con una IC₅₀ de menos de 100 μM, por ejemplo, en el cual la actividad de CK1 se define como la actividad de enzima de CK1 de fosforilar un péptido a partir del sitio de fosforilación de CK1 en el residuo Ser-22 de la proteína β-caseína A2 (por ejemplo, Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Arg, Seq. Id No. 1), por ejemplo, como se describe en Agostinis P, et al. FEBS Lett. 18 de diciembre de 1989; 259(1): 75-8.

25 **[0013]** Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un método para el tratamiento de trastornos relacionados con Aβ, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo la administración a un sujeto que lo necesite de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un modulador de CK1, por ejemplo, un modulador como se describe en cualquiera de los métodos anteriores 1 a 1.15. En diversos modos de realización, dicha composición farmacéutica comprende cualquiera de los moduladores de CK1 tratados anteriormente.

30 **[0014]** Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en una composición farmacéutica (Composición 1) comprendiendo un modulador de CK1, por ejemplo, en una cantidad eficaz para el tratamiento de trastornos relacionados con Aβ, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, mediante la inhibición o reducción de la acumulación de péptido Aβ en un sujeto que lo necesite, en el cual dicho modulador, por ejemplo, puede inhibir la actividad enzimática de CK1 o modificar la estabilidad proteica o localización subcelular de CK1 y/o inhibir la expresión génica de CK1, en combinación o asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de las siguientes

40

composiciones:

- 5 1.1 La composición 1 en la cual el trastorno relacionado con A β es cualquier enfermedad caracterizada por la acumulación de agregados de proteína anormales, especialmente en el cerebro, por ejemplo, placas amiloides y ovillos neurofibrilares, por ejemplo, precipitados de proteínas tau o amiloides, por ejemplo, A β ;
- 10 1.2 La composición 1 o 1.1 en la cual la enfermedad es seleccionada de entre enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de Down, trastornos de memoria y cognitivos, demencia, neuropatías amiloides, inflamación cerebral, trauma nervioso y cerebral, amiloidosis vascular, hemorragia cerebral con amiloidosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad por priones y/o trastornos vasculares, neurológicos y/o neurodegenerativos relacionados con la expresión o acumulación anormal de proteínas tau o amiloides, por ejemplo, A β ;
- 15 1.3 Cualquiera de las composiciones anteriores, en la cual la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer;
- 1.4 Cualquiera de las composiciones anteriores en la cual el modulador es un inhibidor de CK1;
- 1.5 Cualquiera de las composiciones anteriores en la cual el modulador es un derivado de indolin-2-ona, por ejemplo, IC261, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 20 1.6 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador es un triarilimidazol, por ejemplo, D4476 o SB-431542 y SB-203580, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 1.7 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador es un isoquinolina sulfonamida por ejemplo, CK1-7 en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 25 1.8 Cualquiera de las composiciones 1-1.4 precedentes en la cual el modulador es 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosil-bencimidazol (DRB) en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 1.9 Cualquiera de las composiciones 1-1.4 precedentes en la cual el modulador es un derivado de pirroloazepina, por ejemplo, himenialdisina, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 30 1.10 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador es un amino pirimidina-indol, por ejemplo, matairesinol, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 1.11 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador es 5-iodotubercidin en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 35 1.12 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador es meridianin E en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable;
- 1.13 Cualquiera de las composiciones 1-1.4 precedentes en la cual el modulador comprende cualquiera una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, ribozimas, aptámeros de ARN y ARN bicatenario en la cual
- 40

dichas sustancias están diseñadas para inhibir la expresión génica de CK1;

1.14 Cualquiera de las composiciones precedentes 1-1.4 en la cual el modulador comprende anticuerpos contra CK1 o fragmentos de los mismos;

5 1.15 La composición 1.14 en la cual dichos anticuerpos pueden por ejemplo, inhibir la actividad de quinasa de CK1, modificar la localización subcelular de CK1 o modular la estabilidad proteica de CK1;

1.16 Cualquiera de las composiciones precedentes comprendiendo además una cantidad eficaz de un inhibidor de acetilcolinesterasa;

10 1.17 La composición 1.16 en la cual el inhibidor de acetilcolinesterasa es seleccionado de entre donepezilo, rivastigmina y galantamina, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable.

15 1.18 Cualquiera de las composiciones anteriores en la cual el modulador de CK1 es un compuesto capaz de inhibir la actividad de CK1 con una IC₅₀ de menos de 100 μM, por ejemplo, en la cual la actividad de CK1 se define como la actividad de enzima de CK1 de fosforilar un péptido a partir del sitio de fosforilación de CK1 en el residuo Ser-22 de la proteína β-caseína A2 (por ejemplo, Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Arg, Seq. Id No. 1), por ejemplo, como se describe en Agostinis P, et al. FEBS Lett. 18 de diciembre de 1989; 259(1): 75-8.

20 **[0015]** Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un método para diagnosticar sujetos que sufran un trastorno relacionado con Aβ, incluyendo enfermedad de Alzheimer, que puedan ser candidatos adecuados para el tratamiento con moduladores de CK1 comprendiendo niveles de detección de esta proteína en una muestra biológica de dicho sujeto en el cual los sujetos con niveles incrementados en comparación con controles normales serían candidatos adecuados para el tratamiento con moduladores de CK1.

25 **[0016]** Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un método para diagnosticar un sujeto que sufra un trastorno relacionado con Aβ, incluyendo enfermedad de Alzheimer, que pueda ser un candidato adecuado para el tratamiento con moduladores de CK1 comprendiendo el análisis de niveles de ARNm de esta proteína en una muestra biológica de dicho sujeto en el cual un sujeto con niveles incrementados en comparación con
30 controles normales sería candidato adecuado para tratamiento con moduladores de CK1.

[0017] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un método para tratar trastornos relacionados con Aβ, incluyendo enfermedad de Alzheimer, comprendiendo: (a) el análisis de los niveles de ARNm y/o de proteína de CK1 en un sujeto; y b) la administración a un sujeto con niveles incrementados de ARNm y/o de proteína de
35 CK1, en comparación con controles, de un modulador de CK1 en una cantidad suficiente para tratar los efectos patológicos del trastorno relacionado con Aβ, por ejemplo, en una cantidad suficiente para reducir la formación de placas Aβ, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los Métodos 1-1.20 anteriores.

40 **[0018]** Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden identificar mediante métodos y kits de ensayo comprendiendo los componentes necesarios para

detectar la expresión de los polinucleótidos que codifican CK1 o polipéptidos reguladores relacionados, o sustratos de CK1, o niveles de CK1 o polipéptidos reguladores relacionados, o sustratos de CK1, o niveles de CK1 o polipéptidos reguladores relacionados, o sustratos de CK1 o fragmentos del mismo, en muestras de tejido corporal derivadas de un paciente, dichos kits comprendiendo, por ejemplo, anticuerpos que se unen a dichos polipéptidos o sustratos, o a fragmentos de los mismos, o sondas de oligonucleótidos que hibridan con dichos polinucleótidos. En un modo de realización preferido, dichos kits también comprenden instrucciones que detallan los procesos mediante los cuales se van a utilizar los componentes del kit.

[0019] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en el uso un modulador de CK1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la mejora de un trastorno relacionado con A β , incluyendo la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, en el cual el modulador es como se expone en cualquiera de los Métodos 1-1.20 o en el cual el medicamento es una composición de acuerdo con cualquiera de las composiciones 1-1.18.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Se considera que la invención descrita en este documento no está limitada a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos, ya que éstos pueden variar. También se entiende que la terminología utilizada en este documento es para el propósito de describir modos de realización concretos solamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

[0021] A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos utilizados en este documento tienen los mismos significados que entiende normalmente un experto común en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en este documento se puede utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

[0022] En la práctica de la presente invención, se pueden utilizar muchas técnicas convencionales en biología molecular. Estas técnicas son muy conocidas y se explican en, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Volúmenes I, II y III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II, 1985 (D. N. Glover ed.); Oligonucleotide Synthesis, 1984 (M. L. Gait ed.); Nucleic Acid Hybridization, 1985, (Hames y Higgins); Transcription and Translation, 1984 (Hames y Higgins eds.); Animal Cell Culture, 1986 (R. I. Freshney ed.); Immobilized Cells and Enzymes, 1986 (IRL Press); Perbal, 1984, A Practical Guide to Molecular Cloning; the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987 (J. H. Miller y M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory); y Methods in Enzymology Vol. 154 y Vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente).

[0023] Tal como se utilizan en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/a" y "el/la" incluyen la referencia al plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De ese modo, por ejemplo, la referencia al "anticuerpo" es una referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, etc.

[0024] Los términos "A β ", "péptido A β ", " β amiloide " y similares son sinónimos y se refieren a uno o más componentes de péptido de alrededor de 38-43 aminoácidos derivados de la proteína precursora beta amiloide (β -APP), como se ha descrito anteriormente.

[0025] El término "CK1" se refiere al polipéptido Caseína Quinasa 1 (Desjardins PR et al, 1972 Dec 50(12):1249-59; Matsumura S. y Takeda M. Biochim Biophys Acta. 1972 Nov 10;289(1):237-41; Gross SD y Anderson RA. Cell Signal. 1998 Nov;10(10):699-711). El término se refiere a cualquiera y todas las formas de este polipéptido incluyendo, sin carácter limitativo, homólogos, formas parciales, isoformas, formas precursoras, el polipéptido de longitud completa, proteínas de fusión que contienen la secuencia de CK1 o fragmentos de cualquiera de los anteriores, de humano o de cualquier otra especie. De hecho, muchas isoformas de CK1 han sido identificadas e incluyen, sin carácter limitativo, las isoformas α , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ϵ 1, ϵ 2, ϵ 3. CK1 y sus diferentes isoformas son familiares para un experto en la técnica y se han revelado; véase, por ejemplo; GenBank Accession Numbers P48729, P48730, BC006490, P49674, Q9Y6M4, P78368, Q9HCP0 (del 16 de octubre de 2006), Patentes estadounidenses 6,555,328; 6,800,283; 6,060,296; Fish et al. J. Biol. Chem. 270:14875-14883, 1995; Guo et al. Int. J. Mol. Med. 10:227-230, 2002; Kusuda et al. Genomics 32:140-143, 1996 las cuales están todas incorporadas mediante referencia en este documento en su totalidad. También se considera que el término se refiere a CK1 aislado de las fuentes naturales de cualquier especie como genotecas de ADN genómico así como células huésped diseñadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión, o producidas por síntesis química mediante, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automatizados o una combinación de dichos métodos. Los métodos para aislar y preparar dichos polipéptidos son bien entendidos en la técnica.

[0026] Las palabras "tratamiento" y "tratar" se deben entender en consecuencia como abarcando profilaxis y tratamiento o mejora de los síntomas de la enfermedad así como tratamiento de la causa de la enfermedad.

[0027] Los "efectos patológicos de trastornos relacionados con $A\beta$ ", los "síntomas de trastornos relacionados con $A\beta$ " y términos similares se refieren a, sin carácter limitativo, disfunción de la memoria (que pueden ir desde falta de memoria leve a pérdida de memoria severa y debilitante), neurodegeneración, la formación y/o presencia de placas seniles y/o ovillos neurofibrilares y pérdida de células neuronales.

[0028] La capacidad de una sustancia para "modular" CK1 (por ejemplo, un modulador de CK1) se refiere a, sin carácter limitativo, la capacidad de una sustancia para inhibir la actividad enzimática de CK1, o modular la localización subcelular de la proteína o alterar la estabilidad de la proteína (por ejemplo, por medio de modificación post-traducciona como fosforilación, glicosilación, etc) y/o inhibir la expresión génica de CK1. Dicha modulación también podría implicar la afectación de la capacidad de otras proteínas de interactuar con CK1, por ejemplo, proteínas reguladoras relacionadas o proteínas que son modificadas por CK1 y/o sustratos de CK1.

[0029] "Secuencia de ácido nucleico", como se usa en este documento, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido, y fragmentos o partes de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario, y representa la cadena sentido o antisentido. "Polinucleótido" tal como se utiliza en este documento, se refiere a ADN o ARN.

[0030] El término "ARN bicatenario" como se usa en este documento se entiende que abarca cualquiera y todas las técnicas convencionales de silenciamiento génico mediado por ARNi. Dichas técnicas son familiares para un experto en la técnica y pueden incluir, sin carácter limitativo, el uso de ARNs, ARNs_i y ARNs_h para realizar un knockdown de expresión génica.

[0031] El término "antisentido", como se usa en este documento, se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. El término "cadena antisentido" se utiliza en referencia a una cadena de ácido nucleico que es complementaria a la cadena "sentido". Las moléculas antisentido pueden ser producidas por cualquier método, incluyendo síntesis al ligar el gen(es) de interés en una orientación inversa a un promotor vírico que permite la síntesis de una cadena complementaria. Una vez introducida en una célula, esta cadena transcrita combina secuencias naturales producidas por la célula para formar dúplexes. Estos dúplexes bloquean entonces la transcripción o la traducción siguiente. La designación "negativo" se utiliza a veces en referencia a la cadena antisentido, y "positivo" se utiliza a veces en referencia a la cadena sentido.

[0032] Tal como se considera en este documento, los oligonucleótidos antisentido, el ADN de triple hélice, los aptámeros de ARN, las ribozimas y el ARN bicatenario están "dirigidos a una secuencia de ácido nucleico de CK1" de manera que la secuencia de nucleótidos de CK1 elegida producirá una inhibición génica específica de la expresión génica de CK1. Por ejemplo, el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de CK1 se puede utilizar para diseñar una molécula antisentido que da una hibridación más fuerte al ARNm. Del mismo modo, las ribozimas pueden ser sintetizadas para que reconozcan secuencias de nucleótidos específicas de CK1 y escindirla (Cech. J. Amer. Med Assn. 260:3030 (1988)). Las técnicas para el diseño de dichas moléculas para su uso en la inhibición diana de la expresión génica son muy conocidos para un experto en la técnica.

[0033] El término "muestra" como se usa en este documento, se utiliza en su sentido más amplio. Una muestra biológica de un sujeto puede comprender sangre, orina u otro material biológico con la cual se pueden analizar los niveles de proteína, la actividad o la expresión génica de CK1. Una muestra biológica puede incluir material neuronal tal como biopsias cerebrales y especialmente biopsias corticales o neocorticales (por ejemplo, circunvolución frontal media (área de Brodmann 8); circunvolución frontal inferior (área de Brodmann 44); circunvolución del cíngulo anterior (área de Brodmann 32); circunvoluciones temporales superior, media e inferior (áreas de Brodmann 22, 21 y 20, respectivamente); la corteza entorrinal (área de Brodmann 36/28); el lóbulo parietal inferior (área de Brodmann 7) y la corteza visual primaria (área de Brodmann 17)) o una muestra no neuronal tal como células sanguíneas, fluido cefalorraquídeo o biopsias cutáneas (como se describe, por ejemplo, para el péptido A β en Joachim CL et al., Nature, 21 de septiembre de 1989; 341(6239):226-30) de los cuales el ARN total puede ser purificado para perfiles de expresión génica mediante tecnologías de microarrays chips de cristal convencionales, tales como chips Affymetrix, RT-PCR u otros métodos convencionales.

[0034] Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas intactas así como fragmentos de las mismos, tales como Fa, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse al determinante epitópico. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos CK1 se pueden preparar usando polipéptidos intactos o fragmentos que contengan pequeños péptidos de interés como el antígeno inmunizante. Los polipéptidos o péptidos utilizados para inmunizar un animal pueden ser derivarse de la traducción de ARN o sintetizarse químicamente, y pueden ser conjugados con una proteína portadora, si se desea. Los portadores comúnmente utilizados que están químicamente acoplados a péptidos incluyen albúmina y tiroglobulina de suero bovino. El péptido acoplado se utiliza entonces

para inmunizar a un animal (por ejemplo, un ratón, una rata o un conejo).

[0035] El término "anticuerpo humanizado", como se usa en este documento, se refiere a moléculas de anticuerpo en las cuales los aminoácidos han sido sustituidos en las regiones de unión del no antígeno con el fin de parecerse más a un anticuerpo humano, mientras que todavía retienen la capacidad de unión original.

[0036] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de fármaco (por ejemplo, modulador de CK1) suficiente para tratar un trastorno relacionado con A β . Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de CK1 puede ser una cantidad para evitar la acumulación patológica de péptido A β que se observa en la enfermedad de Alzheimer.

[0037] Los "reguladores moleculares de la actividad de CK1", las "proteínas reguladoras relacionadas", los "polipéptidos reguladores relacionados" y términos similares, como se utilizan en este documento, se refieren a polipéptidos implicados en la regulación de CK1 que pueden ser identificados por un experto en la técnica mediante métodos convencionales tal como se describe en este documento.

[0038] Un "trastorno relacionado con A β " como se define en este documento incluye, sin carácter limitativo, cualquier trastorno físico o mental caracterizado por un nivel anormal de péptidos A β (de cualquier tamaño) en comparación con los niveles de controles sanos. Dichos trastornos incluyen, sin carácter limitativo, cualquiera y todas las formas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo la enfermedad de Alzheimer de inicio precoz, la demencia de inicio tardío, y la enfermedad de Alzheimer Familiar (EAF), el deterioro cognitivo leve así como cualquier otro trastorno mediado o afectado por la producción anormal de A β tal como la hemorragia cerebral hereditaria (angiopatía amiloide cerebral) o el síndrome de Down.

[0039] "Sujeto" se refiere a cualquier organismo humano o no humano.

[0040] La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la sobreexpresión de CK1 ϵ constitutivamente activa conduce a un aumento de la producción de péptidos A β . Esta observación ha llevado al descubrimiento adicional de que varios inhibidores de CK1 estructuralmente disímiles reducen significativamente la producción de péptidos A β endógenos. Por lo tanto, CK1 es una diana farmacológica útil para el desarrollo de terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, un estado de la enfermedad que antes no se conocía que implicase proteínas CK1.

[0041] La invención se refiere a un método para identificar moduladores útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con A β mediante la reducción de la acumulación de péptido A β , incluyendo, sin carácter limitativo, la enfermedad de Alzheimer, comprendiendo: a) el análisis de la capacidad de un modulador candidato para modular la actividad de CK1 y/o modular la expresión génica de CK1 in vitro o in vivo y que puede incluir también b) el análisis de la capacidad de un modulador identificado para revertir los efectos patológicos observados en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y/o en estudios clínicos con sujetos con enfermedad de Alzheimer. En un aspecto particular, dicho modulador puede inhibir la actividad de CK1 y/o inhibir la expresión génica de CK1.

[0042] Los ensayos de cribado convencionales pueden ser utilizados para identificar moduladores (por ejemplo, inhibidores) de la actividad de quinasa de CK1 y/o la expresión génica de CK1. Los niveles de actividad de CK1 pueden ser analizados en un sujeto usando una muestra biológica del

sujeto mediante métodos de ensayo de actividad enzimática convencionales. Por ejemplo, la actividad de CK1 puede ser analizada mediante una enzima de CK1 recombinante purificada (por ejemplo, producida utilizando la tecnología baculovirus convencional) y un péptido sintético (Asp-Asp-Asp-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Arg) (Id. Sec. N° 1) que está basado en el sitio de fosforilación de CK1 en el residuo Ser-22 de la proteína β -caseína A2 como sustrato, por ejemplo, como se describe en Agostinis P, et al. FEBS Lett. 18 de diciembre de 1989; 259(1):75-8. Este péptido es útil para identificar la actividad de CK1 específica, ya que se sabe que está fosforilada por CK1 pero no por otras quinasas Ser-Thr típicas tales como la caseína quinasa-2 (CK-2), PKA y PKC. La fosforilación por medio de CK1 se produce en Ser-6 de este péptido (correspondiente a Ser-22 de la proteína β -caseína A2), Thr-8 no estando afectada. K_m del péptido es más alta (1 mM) que de la proteína β -caseína A2 (40 μ M), mientras que V_{max} es bastante comparable (Agostinis P, et al. FEBS Lett. 18 de diciembre de 1989; 259(1) :75-8). La actividad enzimática de CK1 se puede medir después de 30 minutos de incubación a 37°C con tanto la enzima recombinante (CK1) como el sustrato peptídico en presencia de ATP radiomarcado. Esta actividad puede entonces ser reevaluada en presencia de concentraciones incrementadas de compuestos a ensayar, utilizando opcionalmente un conocido inhibidor de CK1 como control positivo. Los valores de IC_{50} de estos compuestos puede ser estimados a partir de las curvas dosis-respuesta; los compuestos que dan una inhibición de rango micromolar (menos de 100 μ M) serían de interés particular para un ensayo adicional, teniendo en cuenta que K_m del péptido es mayor que de la proteína nativa.

[0043] La expresión génica de CK1 (por ejemplo, niveles de ARNm) también se puede determinar mediante métodos familiares para un experto en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el análisis Northern convencional, PCR en tiempo real o microarrays disponibles de forma comercial. Además, la modulación por un compuesto de ensayo (por ejemplo, inhibición) de CK1 y/o niveles de proteína reguladora relacionada y/o sustratos de CK1 se pueden detectar con un ensayo basado en anticuerpos ELISA o ensayo de reacción de marcaje fluorescente. Estas técnicas están fácilmente disponibles para cribado de alto rendimiento y son familiares para un experto en la técnica. Los datos obtenidos de estos estudios pueden ser utilizados para identificar esos moduladores con utilidad terapéutica para el tratamiento de un trastorno relacionado con A β . Por ejemplo, posibles moduladores útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer podrían entonces analizarse más en modelos animales vivos convencionales de la enfermedad de Alzheimer y/o en ensayos clínicos con seres humanos con enfermedad de Alzheimer de acuerdo con métodos convencionales para evaluar la capacidad de dicho modulador para prevenir o mejorar los efectos patológicos de la enfermedad de Alzheimer in vivo.

[0044] Los moduladores candidatos para el análisis de acuerdo con los métodos revelados en este documento incluyen compuestos químicos conocidos para inhibir CK1, así como compuestos cuyos efectos sobre esta proteína a cualquier nivel aún tienen que ser caracterizados. Los compuestos que se sabe que poseen actividad moduladora podrían analizarse directamente en modelos animales familiares para un experto en la técnica o en ensayos clínicos.

[0045] Se considera en este documento que cualquier compuesto con actividad inhibidora de CK1, y no necesariamente sólo aquellos compuestos que inhiben específicamente sólo CK1, pueden ser agentes terapéuticos útiles. Por ejemplo, los inhibidores de CK1 mixtos (por ejemplo, compuestos que

pueden inhibir algunas isoformas de CK1 pero no otras) pueden ser útiles en la presente invención.

[0046] Los inhibidores de CK1 incluyen, sin carácter limitativo, compuestos que tienen con frecuencia al menos un anillo de imidazol (es decir, un compuesto heterocíclico que contiene dos átomos de nitrógeno en un anillo de cinco elementos) o un anillo de pirrolina (es decir, un compuesto heterocíclico que contiene un átomo de nitrógeno en un anillo de cinco elementos). En algunos casos, el anillo de cinco elementos que contiene uno o dos átomos de nitrógeno está fusionado o sustituido con al menos un anillo de seis elementos que carece de átomos de nitrógeno (benceno), o que contiene un átomo de nitrógeno (piridina) o que contiene dos átomos de nitrógeno (pirimidina).

[0047] Inhibidores de CK1 conocidos, incluyendo inhibidores específicos de CK1, útiles en la presente invención incluyen, sin carácter limitativo,

a. IC261: (3E)-3-[(2,4,6-trimetoxifenil)metilideno]-1H-indol-2-ona en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, revelado en Behrend et al., *Oncogene* 19: 5303-5313 (2000), Mashhoon et al., *J Biol Chem* 275: 20052-20060 (2000) y disponible de Calbiochem;

b. Triarilimidazoles, por ejemplo, como se describe en US 6.465.593 (incorporado en este documento por referencia); por ejemplo, D4476: 4-(4-(2,3-dihidrobenzo[1,4]dioxin-6-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Rena et al. *EMBO Reports* 5:60-65 (2004) y disponible de Calbiochem, y/o SB-431542: 4-(4-(benzo[1,3]dioxol-5-il)-5-piridin-2-il-1H-imidazol-2-il)benzamida, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Inman et al., *Molecular Pharmacology* 62:65-74 (2002) y disponible de Sigma-Aldrich Chemical Co.; o SB-203580: 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil) 1H-imidazol en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo como se revela en Godl, K. et al *PNAS USA* 23 de diciembre de 2003;100(26):15434-9 y disponible de Biosource Internacional;

c. CK1-7: revelado en Chijiwa et al., *J Biol Chem* 264: 4924-4927 (1989);

d. A3: N-(2-aminoetil)-5-cloronaftaleno-1-sulfonamida, en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, sal HC1; revelado en Inagaki, M., et al. 1986. *Mol. Pharmacol.* 29: 577. Turner, E.J.H., et al. 2003. *Br. J. Haematol.* 120: 894, y disponible de Calbiochem;

e. 5,6-dicloro-1-beta-D-ribofuranosil-bencimidazol (DRB) en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Meggio F. et al. *Eur J Biochem.* 12 de enero de 1990, 187(1):89-94, y disponible de Calbiochem;

f. Derivados de pirroloazepina, por ejemplo, himenialdisina, en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Meijer L, et al. *Chem Biol. Ene* 2000; 7(1):51-63 y disponible de BIOMOL International;

g. Amino pirimidina-indoles, por ejemplo, matairesinol, en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Yokoyama, T et al. *Biol Pharm Bull.* Mar 2003; 26(3):371-4 y disponible de Cayman Chemical;

h. 5-iodotubercidin en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Massillon, D., *Biochem J.* 1 de abril de 1994;299 (Pt 1): 123-8 y disponible de

BIOMOL Internacional; y

i. Bromado 3-(2-aminopirimidinas)-indoles, por ejemplo, meridianins, por ejemplo, Meridianin E, en formas libre o de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, como se revela en Gompel, M. et al. Bioorg Med Chem Lett. 5 de abril de 2004; 14(7):1703-7.

5 Se considera en este documento que posibles moduladores de CK1 pueden ser un metabolito de un compuesto revelado en este documento. Se considera también que un modulador de CK1 puede ser sustituido químicamente para optimizar la actividad del modulador, por ejemplo, para mejorar la solubilidad, para mejorar la liberación través de la barrera hematoencefálica, para mejorar la lipofilidad y/o para reducir la toxicidad celular. Las modificaciones químicas de este tipo se pueden
10 lograr de acuerdo con métodos convencionales familiares para un experto en la técnica.

[0048] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con A β incluyendo la enfermedad de Alzheimer que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un modulador de CK1 eficaz para
15 inhibir la acumulación de A β . Dichos moduladores incluyen anticuerpos dirigidos al polipéptido de CK1 o fragmentos del mismo. En ciertos modos de realización, la composición farmacéutica comprende anticuerpos que son altamente selectivos para polipéptidos de CK1 humanos o partes de polipéptidos de CK1 humanos. Los anticuerpos contra CK1 pueden causar la agregación de la proteína en un sujeto y así inhibir o reducir la actividad de la quinasa. Dichos anticuerpos también
20 pueden inhibir o disminuir la actividad de CK1, por ejemplo, mediante la interacción directa con sitios activos o mediante el bloqueo del acceso de los sustratos a los sitios activos. Los anticuerpos de CK1 también pueden usarse para inhibir la actividad de CK1 mediante la prevención de interacciones proteína-proteína que puede estar involucrada en la regulación de CK1 y ser necesaria para la actividad de la quinasa. Los anticuerpos de CK1 también podrían afectar la localización subcelular de
25 CK1 al afectar, por ejemplo, la difusión celular o el acceso a compartimentos celulares específicos. Los anticuerpos con actividad inhibidora tal como se describe en este documento pueden ser producidos e identificados de acuerdo con ensayos estándar familiares para un experto en la técnica.

[0049] Los anticuerpos de CK1 también se pueden usar en forma de diagnóstico en conjunción con los métodos de tratamiento descritos en este documento. Por ejemplo, se podría usar esos
30 anticuerpos de acuerdo con los métodos convencionales para cuantificar niveles de CK1 en un sujeto; niveles incrementados podrían indicar un trastorno relacionado con A β o disposición al mismo, de modo que el paciente podría entonces ser tratado con un inhibidor de CK1, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los métodos 1-1.20 anteriores. Además, por ejemplo, diferentes niveles de CK1 podrían ser indicativos de diversas formas clínicas o gravedad de la enfermedad de Alzheimer. Dicha
35 información también puede ser útil para identificar subgrupos de pacientes que pueden o no responder al tratamiento con terapias convencionales y para los que una terapia concreta puede estar contraindicada y/o se prefiere un tratamiento con un modulador de CK1. De ese modo, se considera en este documento que cuantificar el nivel de mensaje de CK1 en un sujeto sería útil para el diagnóstico y determinación de la terapia apropiada; sujetos con niveles incrementados de ARNm de
40 esta proteína en comparación con individuos de control apropiados serían considerados candidatos aptos para tratamiento con inhibidores de CK1.

[0050] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en un kit diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido de CK1 o un fragmento del mismo;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- 5 (c) un polipéptido de CK1, o un fragmento del mismo, o
- (d) un anticuerpo contra un polipéptido de CK1.

Se apreciará que cualquier dicho kit, (a), (b), (c) o (d) puede comprender un componente sustancial. También se considera que dicho kit podría comprender componentes (a)-(d) diseñados para detectar niveles de proteínas reguladoras relacionadas de CK1 o proteínas modificadas por CK1 y/o sustratos

10 de CK1 como se trata en este documento.

[0051] Del mismo modo, se considera en este documento que controlar los niveles de proteína o la actividad de quinasa de CK1 y/o detectar la expresión génica de ACK1 (niveles de ARNm) puede utilizarse como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado, por ejemplo, de acuerdo con cualquiera de los métodos 1-1.20

15 anteriores. Por ejemplo, los pacientes de Alzheimer que se están sometiendo a terapia convencional pueden ser evaluados y se pueden identificar los pacientes en los cuales los niveles, actividad y/o niveles de expresión génica de CK1 son superiores a los deseados (es decir, niveles mayores que los niveles de los pacientes de control). A partir de estos datos, puede ajustarse el régimen de dosificación del paciente y/o puede modificarse el tipo de fármaco administrado. Se considera en este

20 documento que el control de los niveles de CK1 de los pacientes como ha descrito anteriormente puede proporcionar una evaluación cuantitativa del estado físico y/o mental de un paciente.

[0052] Los factores a considerar para optimizar una terapia para un paciente incluyen el trastorno concreto que se está tratando, el mamífero concreto a tratar, el trastorno clínico del paciente individual, el sitio de liberación del compuesto activo, el tipo concreto de compuesto activo, el método

25 de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto activo a administrar se regirá por dichas consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para el tratamiento de un trastorno relacionado con A β , preferiblemente enfermedad de Alzheimer.

[0053] Los anticuerpos adecuados contra CK1 o proteínas reguladoras relacionadas o sustratos se pueden obtener a partir de una fuente comercial o producir de acuerdo con métodos convencionales. Por ejemplo, se describen en este documento métodos para la producción de anticuerpos capaces de reconocer específicamente uno o más epítopos génicos expresados diferencialmente. Dichos anticuerpos pueden incluir, sin carácter limitativo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab,

35 fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores.

[0054] Para la producción de anticuerpos contra los polipéptidos de CK1 tratados en este documento, por ejemplo, diversos animales huéspedes se pueden inmunizar mediante una inyección con los polipéptidos, o una parte de los mismos. Dichos animales huéspedes pueden incluir, sin carácter

40 limitativo, conejos, ratones y ratas. Se pueden utilizar varios adyuvantes para aumentar la respuesta

inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, sin carácter limitativo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de la lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos

5 potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

[0055] Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de sueros de animales inmunizados con un antígeno, tales como producto de gen diana, o un derivado funcional antigénico del mismo. Para la producción de anticuerpos policlonales, los animales huéspedes tales como los descritos anteriormente, se pueden inmunizar mediante una

10 inyección con los polipéptidos, o una parte de los mismos, suplementada con adyuvantes como también se ha descrito anteriormente.

[0056] Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos contra un antígeno concreto, pueden obtenerse mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por medio de líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, sin

15 carácter limitativo, la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, *Nature* 256: 495-497; y la Patente estadounidense N° 4.376.110), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030) y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina

20 incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de la misma. El hibridoma que produce el mAb puede ser cultivado in vitro o in vivo. La producción de títulos elevados de mAbs in vivo hace que éste sea el método de producción preferido actualmente.

[0057] Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984,

25 *Nature*, 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature*, 314:452-454) mediante splicing de los genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual partes diferentes se derivan de especies animales diferentes, tales como los que tienen una región variable o hipervariable derivada de un mAb murino y una región constante de

30 inmunoglobulina humana.

[0058] Alternativamente, se pueden adaptar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente estadounidense N° 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423-426; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward et al., 1989, *Nature* 334:544-546) para producir anticuerpos de cadena sencilla de genes expresados diferencialmente. Los anticuerpos de

35 cadena sencilla se forman mediante la unión de los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla.

[0059] Más preferiblemente, las técnicas útiles para la producción de "anticuerpos humanizados" pueden ser adaptadas para producir anticuerpos contra los polipéptidos, fragmentos, derivados y equivalentes funcionales revelados en este documento. Dichas técnicas se revelan en las patentes

40 estadounidense N° 5.932.448, 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101, 5.910.771, 5.569.825,

5.625.126, 5.633.425, 5.789.650, 5.545.580, 5.661.016 y 5.770.429.

[0060] Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden ser generados mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, sin carácter limitativo: los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por la digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse mediante la reducción de los puentes de disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab (Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281) para permitir una rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

[0061] La detección de los anticuerpos descritos en este documento puede lograrse mediante ELISA estándar, análisis FACS y técnicas estándar de imagen utilizados in vitro o in vivo. La detección puede facilitarse al acoplar (es decir, vincular físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, (3-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[0062] Particularmente preferido, por la facilidad de detección, es el ensayo de tipo sándwich, del cual existen un número de variaciones. Por ejemplo, en un ensayo típico directo, se inmoviliza el anticuerpo no marcado sobre un sustrato sólido y la muestra a ensayar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un período adecuado de incubación, durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo binario antígeno-anticuerpo, un segundo anticuerpo, marcado con una molécula reportera capaz de inducir una señal detectable, se añade e incuba, permitiendo tiempo suficiente para la formación de un complejo ternario de anticuerpo marcado anticuerpo-antígeno. Cualquier material sin reaccionar se lava, y la presencia del antígeno se determina mediante la observación de una señal, o se puede cuantificar mediante comparación con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de antígeno. Las variaciones en el ensayo directo incluyen el ensayo simultáneo, en el cual tanto la muestra como el anticuerpo se añaden de forma simultánea al anticuerpo unido, o un ensayo inverso en el cual el anticuerpo marcado y la muestra a ser analizados primero se combinan, se incuban y se añaden al anticuerpo unido de superficie no marcada. Estas técnicas son muy conocidas por los expertos en la técnica, y la posibilidad de hayan pequeñas variaciones resulta evidente. Tal como se utiliza en este documento, "ensayo de tipo sándwich" pretende abarcar todas las variaciones en la técnica básica de dos sitios. Para los inmunoensayos, el único factor limitante es que el anticuerpo marcado sea un anticuerpo que es específico para el polipéptido de CK1 o la proteína reguladora relacionada, el sustrato o fragmentos del mismo.

[0063] Las moléculas reporteras más comúnmente utilizadas son moléculas que contienen enzimas, fluoróforo o radionúclido. En el caso de un inmunoensayo enzimático, una enzima se conjuga al

segundo anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído o periodato. Sin embargo, como será fácilmente reconocido, existe una amplia variedad de técnicas de ligación diferentes, que son muy conocidas para el experto en la técnica. Enzimas comúnmente utilizadas incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras. Los sustratos a ser utilizados con las enzimas específicas son generalmente elegidos para la producción, tras la hidrólisis por medio de la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Por ejemplo, p-nitrofenil fosfato es adecuado para su uso con conjugados de fosfatasa alcalina; para conjugados de peroxidasa, se utilizan comúnmente 1,2-fenilendiamina o toluidina. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que producen un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos mencionados anteriormente. Una solución que contiene el sustrato apropiado se añade entonces al complejo terciario. El sustrato reacciona con la enzima unida al segundo anticuerpo, dando una señal visual cualitativa, que también se puede cuantificar, normalmente espectrofotométricamente, para dar una evaluación de la cantidad de polipéptido.

[0064] Alternativamente, los compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, pueden acoplarse químicamente a anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activa mediante iluminación con luz de una longitud de onda determinada, el anticuerpo marcado con fluorocromo absorbe la energía de la luz, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido por la emisión de la luz en una longitud de onda característica más larga. La emisión aparece como un color característico visualmente detectable con un microscopio óptico. Las técnicas de inmunofluorescencia y de EIA están muy consolidadas en la técnica y se prefieren particularmente para el presente método. Sin embargo, también se pueden emplear otras moléculas reporteras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes. Será evidente para el experto en la técnica cómo variar el procedimiento para satisfacer el uso requerido.

[0065] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear en composiciones farmacéuticas que pueden comprender también sustancias que inhiben la expresión de CK1 a nivel del ácido nucleico. Dichas moléculas incluyen ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ARN y/o ARN bicatenario dirigidos a una secuencia de nucleótidos apropiada de ácido nucleico de CK1. Estas moléculas inhibitoras pueden ser creadas mediante técnicas convencionales por uno de los expertos en la técnica sin carga o experimentación indebida. Por ejemplo, la modificación (por ejemplo, inhibición) de la expresión génica se puede obtener mediante el diseño de moléculas, ADN o ARN antisentido, para las regiones de control de los genes que codifican los polipéptidos tratados en este documento, es decir, para promotores, amplificadores e intrones. Por ejemplo, se pueden utilizar oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio. No obstante, todas las regiones del gen se pueden utilizar para diseñar una molécula antisentido con el fin de crear aquellas que dan la hibridación más fuerte al ARNm y dichos oligonucleótidos antisentido adecuados se pueden producir e identificar por medio de procedimientos de ensayo estándar familiares para un experto en la técnica.

[0066] Del mismo modo, la inhibición de la expresión de la expresión génica se puede conseguir usando metodología de apareamiento de bases de "triple hélice". El apareamiento de triple hélice es útil ya que utiliza metodología de apareamiento de bases de "triple hélice". El apareamiento de triple

hélice es útil porque provoca la inhibición de la capacidad de la doble hélice de abrirse de forma suficiente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras. Los avances terapéuticos recientes que utilizan ADN triplex se han descrito en la literatura (Gee, J. E. et al. (1994) En: Huber, B.E. y B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y.). Estas moléculas también pueden ser diseñadas para bloquear la traducción de ARNm al prevenir que la transcripción se una a los ribosomas.

[0067] Las ribozimas, moléculas de ARN enzimáticas, también se pueden utilizar para inhibir la expresión génica mediante la catalización de la escisión específica del ARN. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula ribozima para dirigirse de forma complementaria al ARN, seguido de escisión endonucleolítica. Ejemplos que se pueden usar incluyen moléculas ribozimas con motivos de "cabeza de martillo" u "horquilla" diseñados que pueden ser diseñados para catalizar específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de genes, por ejemplo, el gen CK1.

[0068] Los sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de cualquier posible diana de ARN se identifican inicialmente al escanear la molécula diana en busca de sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, secuencias cortas de ARN de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contienen el sitio de escisión se pueden evaluar para analizar las características estructurales secundarias que pueden dejar inoperable al oligonucleótido. La idoneidad de las dianas candidatas también se puede evaluar analizando la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios mediante ensayos de protección de ribonucleasa.

[0069] Los métodos de ribozimas incluyen la exposición de una célula a ribozimas o la inducción de la expresión en una célula de dichas pequeñas moléculas ribozimas de ARN (Grassi y Marini, 1996, Annals of Medicine 28: 499-510; Gibson, 1996, Cancer and Metastasis Reviews 15: 287-299). La expresión intracelular de las ribozimas de martillo y horquilla dirigidas al ARNm que corresponden a al menos uno de los genes tratados en este documento se puede utilizar para inhibir la proteína codificada por el gen.

[0070] Las ribozimas se pueden enviar directamente a las células, en forma de oligonucleótidos de ARN que incorporan secuencias de ribozimas, o introducir en la célula como un vector de expresión que codifica el ARN ribozimal deseado. Las ribozimas se pueden expresar rutinariamente in vivo en número suficiente para ser catalíticamente eficaz en la escisión del ARNm, y de este modo en la modificación de la abundancia de ARNm en una célula (Cotten et al., 1989 EMBO J. 8:3861-3866). En concreto, una secuencia de ADN que codifica ribozimas, diseñada de acuerdo con las normas convencionales bien conocidas y sintetizada, por ejemplo, por medio de química de fosforamidita estándar, se puede ligar en un sitio de enzima de restricción en el tallo y el bucle anticodón de un gen que codifica un ARNt, que entonces se puede transformar y expresar en una célula de interés por medio de una rutina de métodos de la técnica. Preferiblemente, un promotor inducible (por ejemplo, un elemento de respuesta a glucocorticoide o tetraciclina) se introduce también en esta construcción para que la expresión de ribozima se pueda controlar de forma selectiva. Para uso de saturación, se puede utilizar un promotor alta y constitutivamente activo. Los genes ADNt (es decir, genes que codifican ADNt) son útiles en esta aplicación debido a su pequeño tamaño, alta velocidad de

transcripción y expresión ubicua en diferentes tipos de tejidos.

[0071] Por lo tanto, las ribozimas se pueden diseñar de forma rutinaria para escindir virtualmente cualquier secuencia de ARNm, y una célula se puede transformar rutinariamente con codificación de ADN para dichas secuencias de ribozimas de manera que se exprese una cantidad controlable y catalíticamente eficaz de la ribozima. En consecuencia, la abundancia de prácticamente cualquier especie de ARN en una célula puede ser modificada o perturbada.

[0072] Las secuencias de ribozimas se pueden modificar de esencialmente la misma manera como se describe para nucleótidos antisentido, por ejemplo, la secuencia de ribozimas puede comprender una fracción de base modificada.

[0073] Los aptámeros de ARN también pueden ser introducidos o expresados en una célula para modificar la abundancia o actividad de ARN. Los aptámeros de ARN son ligandos específicos de ARN para proteínas, como para ARN Tat y Rev (Good et al., 1997, Gene Therapy 4: 45-54) que pueden inhibir específicamente su traducción.

[0074] La inhibición específica de genes de la expresión génica también se puede lograr mediante tecnologías ARNi convencionales. Numerosas referencias que describen dichas tecnologías existen e incluyen, por ejemplo, WO 99/32619; Miller et al. Cell Mol Neurobiol 25:1195-207 (2005); Lu et al. Adv Genet 54:117-42 (2005).

[0075] Las moléculas antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ARN y ribozimas se pueden preparar por medio de cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ácido nucleico. Estos incluyen técnicas para sintetizar oligonucleótidos químicamente tales como síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN se pueden generar por transcripción in vitro e in vivo de las secuencias de ADN que codifican los genes de los polipéptidos tratados en este documento. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar a una amplia variedad de vectores con promotores de ARN polimerasa adecuados tales como T7 o SP6. Alternativamente, construcciones de ADNc que sintetizan ARN antisentido constitutiva o induciblemente se pueden introducir en líneas celulares, células o tejidos.

[0076] Los vectores se pueden introducir en células o tejidos mediante muchos medios disponibles y se pueden utilizar in vivo, in vitro o ex vivo. Para la terapia ex vivo, se pueden introducir vectores en células madre extraídas del paciente y propagadas de forma clonacional para un trasplante autólogo de vuelta en ese mismo paciente. La liberación por transfección y por inyecciones de liposoma se puede conseguir utilizando métodos que son muy conocidos en la técnica.

[0077] Como antecedentes, además de los métodos descritos anteriormente para la inhibición de la expresión génica de CK1, se considera en este documento que se podrían identificar y emplear moléculas pequeñas u otros productos naturales para inhibir la transcripción in vivo de los polipéptidos tratados en este documento, incluyendo, sin carácter limitativo, CK1. Por ejemplo, un experto en la técnica podría establecer un ensayo para CK1 que se puede aplicar fácilmente a muestras de medios de cultivo de una línea celular utilizando métodos convencionales. Utilizando este ensayo, las líneas celulares serían evaluadas para encontrar las que expresan CK1 y serían cultivadas en, por ejemplo, placas de 96 pocillos. Cuanto más cerca la regulación de CK1 en la línea celular esté de la expresión en el tejido in vivo, más probable será que pequeños modificadores moleculares de expresión de CK1 en las líneas celulares también modifiquen CK1 in vivo. Una

comparación de los efectos de algunos modificadores conocidos de expresión génica, por ejemplo, dexametasona, éster de forbol, en las líneas de células permitirá la selección de la línea celular más adecuada para su uso. La evaluación consistiría entonces simplemente en el cultivo de las células durante una longitud de tiempo establecida con un compuesto diferente añadido a cada pocillo y luego el análisis de la actividad de CK1/nivel de ARNm.

[0078] Con el fin de facilitar la detección de CK1 en el ensayo descrito anteriormente, luciferasa u otra proteína fluorescente disponible comercialmente se podría fusionar genéticamente como una proteína marcadora adecuada para el promotor de CK1. Las secuencias aguas arriba del ATG de CK1, es decir, el promotor de CK1, puede ser identificado a partir de datos de secuencia genómica mediante el uso de la secuencia de la secuencia de CK1 humano GenBank GI: 33873527 (por ejemplo, a 8 de septiembre de 2006) para BLAST contra la secuencia genómica NCBI. Dos pares de cebadores de PCR anidados para amplificar un fragmento de 2kb o más largo de ADN genómico humano se pueden diseñar y probar fácilmente. El fragmento del promotor se puede insertar fácilmente en cualquier vector de gen promotor menos reportero diseñado para expresión en células humanas (por ejemplo, vector de proteína fluorescente amplificado pECFP-1, pEGFP-1 o pEYFP menos promotor Clontech). La evaluación podría consistir entonces en cultivar las células durante un periodo de tiempo apropiado con un compuesto diferente añadido a cada pocillo y luego analizar la actividad del gen reportero. Compuestos prometedores se ensayarían entonces para analizar los efectos sobre la actividad de CK1 y/o nivel de ARNm in vivo utilizando, por ejemplo, un modelo in vivo de la enfermedad de Alzheimer. Detalles adicionales del método tales como tiempo de cultivo adecuado, condiciones de cultivo, ensayos de reportero y otras metodologías que pueden utilizarse para identificar pequeñas moléculas u otros productos naturales útiles para inhibir la transcripción de CK1 in vivo serían familiares para un experto en la técnica.

[0079] Además, el ADNc y/o proteína de CK1 puede ser utilizado para identificar otras proteínas que pueden ser modificadas por CK1 in vivo, por ejemplo, en tejidos del sistema nervioso. Las proteínas identificadas de esta manera pueden ser utilizadas para exámenes farmacológicos, por ejemplo, para tratar la enfermedad de Alzheimer. Para identificar los genes que se encuentran aguas abajo o aguas arriba (especialmente relevante en el caso de modificación post-traducciona) de CK1, se considera, por ejemplo, que se podría utilizar un inhibidor, sacrificar los animales, eliminar tejido apropiado y aislar el ARN total de esas células y emplear tecnologías microarray estándar para identificar los niveles de mensaje que están alterados con respecto a un animal de control (animales a los cuales no se les ha administrado fármaco).

[0080] A partir del conocimiento de que la sobreexpresión de CK1 induce un aumento en la producción de péptidos A β , se pueden utilizar ensayos convencionales in vitro o in vivo para identificar posibles genes que, por ejemplo, lleven a la sobreexpresión de CK1 o a un aumento de la estabilidad de CK1. Estas proteínas reguladoras relacionadas codificadas por los genes así identificados pueden ser utilizadas para examinar fármacos que podrían ser agentes terapéuticos potentes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se podría utilizar un ensayo de gen reportero convencional en el cual la región promotora de CK1 se coloca aguas arriba de un gen reportero (por ejemplo, Luciferasa, LacZ), el constructo se transfecta en una célula adecuada (por ejemplo, una HEK293, una CHO o una línea celular Hela) y mediante técnicas convencionales, las

células se pueden entonces examinar para analizar un gen aguas arriba que provoca la activación del promotor de CK1 por medio de la detección de la expresión del gen reportero.

[0081] Se considera en este documento que se puede inhibir la función y/o expresión de un gen para una proteína reguladora relacionada o proteína modificada por CK1 o sustrato de CK1 como una manera de tratar un trastorno relacionado con A β , por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, mediante el diseño, por ejemplo, de anticuerpos contra esas proteínas y/o el diseño de oligonucleótidos antisentido, ADN de triple hélice, ribozimas y aptámeros de ARN inhibidores dirigidos a los genes de dichas proteínas de acuerdo con métodos convencionales. También se consideran composiciones farmacéuticas que comprenden dichas sustancias inhibitoras para el tratamiento de dichos trastornos.

[0082] Como antecedentes, las composiciones farmacéuticas reveladas en este documento útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con A β , incluyendo la enfermedad de Alzheimer, se administrarán a un paciente en dosis terapéuticamente eficaces para tratar los síntomas de estos trastornos. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de fármaco (por ejemplo, modulador de CK1) suficiente para tratar un trastorno relacionado con A β . Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de CK1 puede ser una cantidad mostrada para disminuir o prevenir la acumulación patológica de péptido A β que se ve en la enfermedad de Alzheimer y/o que puede disminuir o prevenir los efectos patológicos de dicha acumulación. Las mejoras en el estado físico y/o mental de un individuo que sufre la enfermedad de Alzheimer se pueden medir con técnicas y combinaciones de técnicas familiares para un experto en la técnica, incluyendo, sin carácter limitativo, evaluación CDR (Clinical Dementia Rating o clasificación de demencia clínica), mini-examen del estado mental (MMSE, por sus siglas en inglés), examen mini-cog, así como tomografía por emisión de positrones (PET), resonancia magnética (RM) y tomografía computarizada (CT). Más exámenes de diagnóstico pueden incluir pruebas de fluidos biológicos y tejidos para diversos marcadores y actividades bioquímicos.

[0083] Preferiblemente, los compuestos identificados de acuerdo con la invención que pueden ser para uso en los métodos de tratamiento descritos en este documento son inhibidores de CK1. Se considera en este documento que esta clase de compuestos puede abarcar compuestos estructuralmente disímiles e incluye, sin carácter limitativo, los inhibidores de CK1 (a)-(i) tratados anteriormente. Otros inhibidores de CK1 adecuados serían evidentes para un experto en la técnica. También se considera que los inhibidores de CK1 pueden actuar sobre cualquiera o todas las isoformas de CK1, por ejemplo, enzimas monoméricas de CK α , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ϵ 1, ϵ 2 y ϵ 3.

[0084] Se pueden utilizar moduladores de CK1 en los métodos revelados en este documento como un único agente terapéutico, pero se considera en este documento que también se pueden utilizar en combinación con o para la coadministración con otros agentes activos. Por ejemplo, cualquier uno o más moduladores de CK1 pueden ser administrados de forma simultánea, secuencial o contemporánea con medicamentos convencionales que se ha probado que son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Estos medicamentos incluyen inhibidores de la colinesterasa tales como Razadyne® (anteriormente conocido como Reminyl®) (galantamina), Exelon® (rivastigmina), Aricept® (donepezilo) y Cognex® (tacrina), así como Namenda® (memantina) un antagonista de N-metil D-aspartato (NMDA). De forma adicional, medicamentos que aún no han

sido aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, pero que se ha demostrado recientemente que afectan los niveles de A β , se pueden utilizar en combinación con o para co-administración con moduladores de CK1 tratados y considerados en este documento. Estos medicamentos incluyen fármacos como Gleevec (diana(s) no identificada), moduladores/inhibidores de GSK3 β (por ejemplo, LiCl, kenpaullone) y moduladores/inhibidores de CDK5 (por ejemplo, roscovitina).

[0085] Como antecedentes, los inhibidores identificados por los presentes métodos se pueden emplear con el fin de proporcionar

(i) un modulador de CK1 para su uso en el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno según lo dispuesto anteriormente, o en un método de tratamiento según lo dispuesto anteriormente;

(ii) el uso de un modulador de CK1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno según lo dispuesto anteriormente, o la fabricación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento según lo dispuesto anteriormente, y

(iii) una composición farmacéutica que comprende un modulador de CK1 en combinación o asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno según lo dispuesto anteriormente, o para su uso en un método de tratamiento según lo dispuesto anteriormente.

[0086] Las sustancias moduladoras identificadas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables.

[0087] Por lo tanto, los compuestos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular para administración por inhalación o insuflación (ya sea a través la boca o la nariz) o administración tópica, oral, bucal, parenteral o rectal.

[0088] Para administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tener la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, microcristalina, celulosa o fosfato de hidrógeno de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio) o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por métodos muy conocidos en la técnica. Los preparados líquidos para administración oral pueden tener la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichos preparados líquidos se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites

vegetales fraccionados) y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Los preparados pueden contener también sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según proceda.

5 **[0089]** Los preparados para administración oral pueden ser adecuadamente formulados para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

[0090] Para administración bucal, las composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional.

10 **[0091]** Para administración por inhalación, los compuestos identificados de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de spray de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para liberar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan
15 una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuado tal como lactosa o almidón.

[0092] Los compuestos se pueden formular para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones,
20 soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos y estéril, antes de su uso.

25 **[0093]** Los compuestos también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

30 **[0094]** Además de las formulaciones descritas previamente, los compuestos se pueden formular también como una depósito con preparación. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. De ese modo, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados solubles en poca cantidad, por ejemplo, como una sal soluble en poca cantidad.

35 **[0095]** Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede por ejemplo comprender hojas de metal o plástico, tales como un blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración.

40 **[0096]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso incluyen composiciones en las cuales los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito destinado. La determinación de una dosis eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la

técnica.

[0097] Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo de células, por ejemplo, de células adecuadas, o en modelos animales. El modelo animal también se puede usar para determinar el rango de concentración y la vía de administración apropiados. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un rango de concentración de plasma en circulación que incluye la IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas). Dicha información se puede utilizar entonces para determinar dosis útiles y vías de administración en seres humanos.

[0098] Con respecto a una dosis terapéuticamente eficaz de un modulador de CK1, la eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50% de la población). El ratio de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse en forma de ratio, LD50/ED50. Se prefieren composiciones farmacéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios animales se utilizan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en dichas composiciones está preferiblemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

[0099] La dosificación exacta será determinada por el médico, a la luz de los factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o para mantener el efecto deseado. Los factores que se pueden tomar en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, la salud general del sujeto, la edad, el peso y el sexo del sujeto, la dieta, el tiempo y frecuencia de administración, la combinación(es) de fármacos, las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Se pueden administrar composiciones farmacéuticas de acción prolongada cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas, dependiendo de la vida media y la tasa de aclaramiento de la formulación particular.

[0100] Las dosis empleadas variarán por supuesto dependiendo, por ejemplo de la enfermedad o trastorno concreto a ser tratado, el modulador de CK1 concreto utilizado, el modo de administración y la terapia deseada. Los moduladores de CK1 se pueden administrar por cualquier vía adecuada, incluyendo por vía oral, parenteral, transdérmica o por inhalación, pero se administran preferiblemente por vía oral. En general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades como se ha expuesto anteriormente, en administración oral en dosis del orden de desde aproximadamente 0,01 a 10,0 mg/kg (todos los pesos se dan como el equivalente del modulador de CK1 en forma libre, aunque el modulador se puede proporcionar en forma libre o de sal farmacéuticamente aceptable). En mamíferos más grandes, por ejemplo seres humanos, una dosis diaria indicada para administración oral estará en consecuencia en el intervalo de aproximadamente 0,75 a 750 mg, por ejemplo, 50-500 mg, administrada una vez convenientemente o en dosis divididas 2 a 4 veces al día, o en forma de liberación sostenida. Las

formas de dosificación de unidad para administración oral así por ejemplo pueden comprender de aproximadamente 0,2 a 250 mg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,2 o 2,0 a 50, 75, 100 o 200 mg de modulador de CK1, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para ello.

- 5 **[0101]** Los siguientes ejemplos ilustran más a fondo la presente invención y no están destinados a limitar la invención.

EJEMPLOS

[0102] Materiales y métodos pertinentes a los ejemplos descritos en este documento se proporcionan a continuación:

10 **Métodos**

[0103] Plásmidos: ADNc de longitud completa correspondientes a las cuatro isoformas de CK1 se subclonaron a partir de una genoteca de ADNc oligonucleótido-dT de rata utilizando PCR estándar y técnicas moleculares en el plásmido pCDNA 3.1 / Myc-6His A+ (Invitrogen). Los constructos constitutivamente activos de CK1 se derivan de ADNc de longitud completa por PCR y se clonan en el plásmido pCDNA 3.1 / Myc-6His A+ (Invitrogen). Los fragmentos de ADN subclonados se comprueban sistemáticamente por secuenciación de acuerdo con métodos convencionales. CK1 α se trunca en el aminoácido 279; CK1 δ se trunca en el aminoácido 271; CK1 ϵ se trunca en el aminoácido 271; CK1 γ se trunca en el aminoácido 307. C99 que sobre-expresa plásmido se construye mediante la sub-clonación en el plásmido pCDN4 de un fragmento de ADN APP que codifica la cola C-terminal unida a la membrana de APP producida después de la escisión por β -secretasa.

[0104] Anticuerpos: Myc 9E10 (Covance), Notch 1 escindida (Val1744) (Cell Signaling Technology), Beta CTF y APP (CT695 policlonal) (Zymed), Beta-actina (Cell Signaling Technology).

[0105] Inhibidores de la quinasa: CKI-7 (Japón), IC-261 (Calbiochem), D4476 (Calbiochem), DAPT (Calbiochem), Gleevec (Sequoia Sciences, Reino Unido), L-685, 458 (disponible comercialmente en EMD Biosciences). Los stocks se preparan en sulfóxido de dimetilo (Sigma Aldrich) de acuerdo con los métodos convencionales.

[0106] Cultivo de células: Las células transfectadas N2A-APP₆₉₅ se cultivan como se ha informado (Xu, H., et al., (1998) Nat Med 4, 447-51). Las células N2A-APP₆₉₅ se colocan en placas de 12 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo en medio DMEM/Opti-MEM conteniendo 5% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) siguiendo las instrucciones del fabricante (American Type Culture Collection). = Para los experimentos de tiempo transcurrido, las células se exponen a fármacos durante 1-24 h.

[0107] Transfección: La transfección de las células N2A-APP₆₉₅ se lleva a cabo por métodos estándar. Las células se cultivan a una confluencia del 60% y luego se transfectan con constructos relevantes con FuGENE6 de acuerdo con el protocolo de fabricante (Roche Applied Bioscience). Después de la transfección, las células se recubren con 100 μ l de tampón RIPA, se incuban durante 30 min en hielo y se centrifugan a 13.000 rpm 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogen y se envían a cuantificación BCA (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cantidades iguales de extractos celulares se cargan en geles de acrilamida Bis-Tris de 4-12% (Invitrogen) con tampón MES y se someten a análisis western blot usando anticuerpos apropiados. Para ensayos de

inmunoprecipitación, los medios se incuban con anticuerpo 4G8 (Signet) para detectar A β y β APP de longitud completa. Se añaden fármacos a cultivos de células en medio fresco (suero bovino fetal 0,5%); medios y células se recogen en el momento oportuno.

[0108] Cuantificación A β : Después de la inmovilización de A β total (anticuerpo monoclonal cubierto específico para el N-terminal de A β) de medios, las determinaciones de péptidos A β 40/42 se realizan mediante ELISA de tipo sándwich (BioSource International) utilizando anticuerpos policlonales de conejo específicos para el C-terminal de A β 40 o A β 42. En todos los casos, los niveles de A β se normalizan a niveles de proteína totales.

[0109] Inmunoprecipitación/Análisis Western: La inmunodetección se lleva a cabo como se ha descrito anteriormente en Xu, H., et al., (1998) Nat Med 4, 447-51 y utilizando métodos estándar con la excepción de que el análisis Western blot utiliza membranas de difluoruro de poli-vinilideno (PVDF) (Invitrogen, Life Technologies) en tampón fosfato salino (PBS) que contiene glutaraldehído 0,2% (Sigma) durante 45 min, después de electrotransferencia como se describe en Netzer, WJ et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 14 de octubre de 2003; 100(21):12444-9.

[0110] Ensayos de Transfección de mNotch Δ E y de Escisión Notch-1 en células N2A-APP₆₉₅: las células N2A que sobreexpresan de manera estable el mutante sueco APP son transfectadas transitoriamente para que sobreexpresen mNotchE (Notch-1 truncado, que carece de la mayor parte del dominio extracelular de Notch (Kopan, R., et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 1683-8). Los cultivos se preincuban con los diferentes inhibidores durante 3 horas. mNotch Δ E se detecta en lisados celulares por medio de análisis western blot utilizando el anticuerpo Notch 1 escindido (NICD) disponible a partir de señalización celular.

Ejemplo 1

El análisis *in-silico* revela sitios de fosforilación consenso de CK1 conservado en APP, BACE y γ -secretasa

[0111] Las secuencias de aminoácidos de humano, de rata y de ratón correspondientes a las proteínas relacionadas con la EA (APP, BACE, PS1, PS2, Aph-1, PEN2 y Nicastrin) se analizan para detectar la presencia de sitios de fosforilación putativos de CK1 utilizando diferentes herramientas computacionales familiares para un experto en la técnica (por ejemplo, ELM-motifs, NetPhos 2.0). Este análisis *in silico* de los dominios intracelulares de APP, BACE, PS1, PS2, Aph-1, PEN2 y Nicastrin revela la presencia de numerosos sitios de fosforilación putativos conservados, en particular en PS 1 y PS2 (datos no mostrados).

[0112] Curiosamente, el mismo análisis *in silico* de las dos quinasas que han sido implicadas en la EA (Cdk5/p35 y GSK3- β) revela la presencia de numerosos sitios de fosforilación putativos conservados en secuencias de humano, de rata y de ratón. De hecho, hemos encontrado 7 sitios putativos en Cdk5, 15 en p35 y 24 en GSK3- β (datos no mostrados).

Ejemplo 2

La sobreexpresión de CK1 ϵ constitutivamente activa lleva a un aumento en la producción de péptidos A β

[0113] Hemos probado la capacidad de las cuatro isoformas de CK1, concretamente CK1 α , CK1 β , CK1 δ y CK1 ϵ , para regular el procesamiento de APP mediante sobre-expresión de cada una de las

isoformas constitutivamente activas. Los mutantes constitutivamente activos se generan mediante el truncamiento de la región auto-inhibidora C-terminal de cada isoforma y se comprueban los niveles de expresión después de la transfección transitoria en células N2A que expresan de manera estable APP (células N2A-APP₆₉₅) y los datos se normalizan a partir de esos niveles. Los datos indican que sólo Sk1ε-271 es capaz de inducir un aumento sustancial en la producción de péptido Aβ. Un ligero efecto se observa también para CK1δ-271 (datos no mostrados).

[0114] Después, comparamos el efecto de la sobre-expresión de CK1ε constitutivamente activa (CK1-271) en comparación con CK1ε de larga duración (CK1ε-FL) en células N2A que expresan de manera estable APP (células N2A-APP₆₉₅). Los datos indican que CK1ε-271 inducen un aumento de los niveles de Aβ-40 y Aβ-42 del 105% y 109%, respectivamente (datos no mostrados). En contraste, CK1ε de longitud completa está débilmente activa, produciendo un aumento de niveles de péptido Aβ40 y Aβ42 del 42% y 31%, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados, confirmados por inmunoprecipitación de péptido Aβ y análisis Western Blot (datos no mostrados), indican que la actividad de CK1, es necesaria para la regulación del péptido Aβ.

Ejemplo 3

Efecto de los inhibidores de CK1 en la producción de péptido Aβ después de la sobre-expresión de CK1ε constitutivamente activa en células N2A-APP₆₉₅

[0115] Examinamos el efecto del inhibidor IC261 de CK1 selectivo en la producción de péptidos Aβ40 y Aβ42 en células N2A-APP₆₉₅ que expresan transitoriamente CK1ε-271. Las células N2A que expresan de manera estable APP-695 se transfectan transitoriamente con CK1ε-271. 48 horas después de la transfección, las células se incuban en ausencia o presencia de concentraciones incrementadas de inhibidor de CK1 IC261. Los sobrenadantes celulares se recogen después de 3 horas de incubación y se someten a ensayos ELISA de Aβ40/Aβ42. Los resultados indican que la incubación con IC261 durante tres horas causa una dramática reducción en la concentración de péptido Aβ40 y Aβ42. El efecto de IC261 está cerca del máximo de 5μM. IC261 tuvo un efecto dependiente del tiempo, con períodos más largos de exposición a IC261 dando lugar a una mayor reducción de concentración de péptido Aβ40 y Aβ42. Con el fin de excluir los efectos no específicos de IC261, otros dos inhibidores de CK1, CKI-7 y D4476 fueron examinados. Ambos inhibidores causan una reducción significativa y dependiente de la dosis en la producción de Aβ40 y Aβ42 en células que sobreexpresan CK1ε-271 (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Regulación mediante inhibidores de CK1 de producción de péptido Aβ endógeno

[0116] Después, se investigó el efecto de las tres clases diferentes de inhibidores de CK1 CKI-7, IC-261 y D4476 (Chijiwa, T., et al (1989) J Biol Chem 264, 4924-7; Mashhoon, N., et al. (2000) J Biol Chem 275, 20052-60; Rena, G., et al. (2004) EMBO Rep 5, 60-5) en la producción de péptido Aβ en células N2A que expresan APP-695. Los datos indican que la producción de péptido Aβ40 y Aβ42 se reduce después de 3 horas de incubación con cada uno de los tres inhibidores (datos no mostrados). La reducción se mide utilizando dos métodos diferentes: ELISA de tipo sándwich y análisis Western Blot después de inmunoprecipitación (datos no mostrados). Observamos las siguientes disminuciones tras la incubación con 50 μM durante tres horas: IC261, disminución del 48% y 52,4% en péptidos Aβ40 y Aβ42 respectivamente, D4476, disminución del 42% y 54,1% en péptidos Aβ40 y Aβ42,

respectivamente, y CKI-7, disminución del 14,8% y 24% en péptidos A β 40 y A β 42, respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que CK1 endógeno, bajo condiciones basales, participa en la regulación de la producción de péptido A β .

5 **[0117]** Para excluir la posibilidad de que los efectos inhibitorios en la producción de péptidos A β se deban a la toxicidad celular, investigamos los efectos de los fármacos en la viabilidad celular. Los medios se recogieron y se ensayaron para analizar el nivel de lactato deshidrogenasa, una enzima citosólica estable liberada tras la lisis celular, utilizando un kit CytoTox96 no radiactivo (Promega). Los valores obtenidos a partir de las células tratadas con el fármaco se comparan con los valores obtenidos con DMSO y células no tratadas. No se observa toxicidad para CKI-7, incluso después de
10 24 horas de incubación y para la concentración más alta probada (50 μ M). Se observa una ligera toxicidad (menos de 1 vez) para D4476, sólo para la dosis más alta probada (50 μ M) y sólo después de 24 horas de incubación. No se observa efecto de toxicidad con IC261 después de 12 horas de incubación.

15 **[0118]** El compuesto D4476 ha sido descrito recientemente como un inhibidor de CK1 y se describe que es más potente y más *selectivo in vitro* que los otros dos (Rena, G., et al. (2004) EMBO Rep 5, 60-5.). Sin embargo, se requiere una concentración de 50 μ M para observar un efecto sobre la actividad de CK1 en líneas celulares (Rena, G., et al. (2004) EMBO Rep 5, 60-5), lo que sugiere que la permeabilidad celular puede ser limitante. La concentración de 50 μ M usada en estos experimentos es comparable con nuestros resultados obtenidos utilizando células N2A-APP₆₉₅.

20 **[0119]** De forma significativa, usando la notación en cadena SMILE para el compuesto D4476, hemos identificado un compuesto muy similar a D4476, concretamente, SB-431542, lo que demuestra propiedades muy comparables en la formación de péptido A β para tanto D4476 como SB-431542 (Sigma Aldrich) (datos no mostrados).

Ejemplo 5

25 **Efecto del inhibidor de CK1 D4476 en los niveles de APP, β CTF y A β**

[0120] Se comparan los efectos de D4476 en los niveles de péptido APP, β CTF y AP40 en células N2A-APP₆₉₅. Se incuban células N2A durante 3 horas con concentraciones de 0, 1, 5 o 50 μ M de D4476. Los extractos celulares se someten a análisis Western Blot usando anticuerpos β CTF o APP, o a ensayos ELISA de A β 40. Las células N2A se transfectan transitoriamente con APP-C99 que
30 contiene plásmido. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incuban con diversas concentraciones de D4476 durante 3 horas. Los lisados celulares se analizan por medio de SDS-PAGE y análisis Western Blot o por medio de ensayo ELISA de A β 40. Los datos de al menos tres experimentos (media \pm S.E.M.) se comparan (Prism) con las condiciones de control (sin fármaco).

[0121] Los resultados indican que la inhibición de CK1 con D4476 (50 μ M) aumenta significativamente
35 los niveles de β CTF y reduce considerablemente la producción de péptido A β bajo condiciones en las cuales no tuvo ningún efecto en el nivel de expresión de APP. Estos resultados sugieren claramente que la actividad de CK1 regula la formación de péptido A β al nivel de sitio de escisión por γ -secretasa de APP y es necesaria para la producción de péptido A β . Esta conclusión está apoyada por experimentos en los cuales APP-C99 se expresa en lugar de la proteína APP de longitud completa.
40 D4476 inhibió la descomposición de C99 y, en consecuencia, disminuyó la producción de péptidos A β dependiendo de la dosis. Estos efectos son evidentes con tan poco como 5 μ M de D4476 (datos no

mostrados).

Ejemplo 6

La escisión de Notch no se ve afectada por inhibidores de CK1

[0122] Varias proteína quinasas y proteína fosfatasa se han implicado en la progresión de la enfermedad de Alzheimer y en especial en la regulación de la formación de β -amiloide. Estas incluyen las proteínas quinasas PKA, PKC, GSK3- β y CDK5 y las proteínas fosfatasa PP1/PP2A y PP2B. Los primeros estudios demuestran que la activación de PKA y PKC o la inhibición de PP1/PP2A y PP2B causan una reducción dramática en la formación de β -amiloide y/o un aumento en la cantidad del producto de escisión por α -secretasa sAPP α . Desafortunadamente, estos efectos se asocian con un aumento de riesgo cancerígeno. En efecto, un efecto secundario importante de los inhibidores de γ -secretasa que se han desarrollado para el tratamiento de la EA es la inhibición de la escisión de Notch, una proteína transmembrana de tipo I que sirve como un sustrato de γ -secretasa; la inhibición de CDK5 (por Roscovitina) y la inhibición de GSK3 (por Kenpaullone) están al menos parcialmente asociadas con la inhibición de la escisión de Notch. Por lo tanto, nuestros datos que sugieren que los inhibidores de CK1 pueden reducir la reducción de péptido A β y pueden regular Tau sin afectar la escisión de Notch, indican que los inhibidores de CK1 son candidatos robustos para la terapia de Alzheimer. Por lo tanto, investigamos el efecto de los inhibidores de CK1 en el procesamiento de Notch. Brevemente, las células N2A transfectadas transitoriamente con ADNc mNotch Δ E-myc truncado de forma N-terminal que contiene plásmido se incuban con concentraciones de 1,10 μ M de DAPT, concentraciones de 1, 10 μ M de L-685,458, concentraciones de 5, 50 μ M de D4476 o concentraciones de 1, 10 μ M de Gleevec durante 3 horas. Los lisados celulares se analizan mediante análisis SDS-PAGE convencional y Western Blot utilizando anticuerpos anti-Notch (producto de escisión de NICD), anti-A β , anti-myc y anti-actina. Los datos de al menos tres experimentos (media \pm SEM) se comparan (Prism) con las condiciones de control (sin fármaco). (**, P <0,01; prueba t de estudiante unilateral, nivel de significación del 95%). Los resultados indican que en las células N2A que sobre-expresan Notch, hay una inhibición total de la escisión Notch mediante DAPT. En contraste, la escisión de Notch no se ve afectada por D4476, IC261 o CKI-7 (datos no mostrados), prestando más interés a la posibilidad de desarrollar inhibidores de CK1 y en particular de CK1 ϵ para el tratamiento de la EA.

[0123] Tomados en conjunto, los datos descritos en este documento demuestran que CK1 ϵ constitutivamente activa aumenta la formación de β -amiloide y distintas clases de inhibidores de CK1 pueden reducir la formación de péptido β -amiloide producido tanto en células N2A-APP₆₉₅ que expresan niveles endógenos de CK1, así como que sobre-expresan CK1 ϵ constitutivamente activa. Significativamente, bajo condiciones en las cuales la inhibición de la actividad de CK1 reduce la formación de β -amiloide, no se observa inhibición de escisión de Notch. La actividad de CK1 puede posiblemente regular la formación de péptido A β al nivel de sitio de escisión por γ -secretasa de APP. Las observaciones de que inhibidores de CK1 estructuralmente no relacionados pueden disminuir significativamente la producción de péptido A β reducen en gran medida la posibilidad de que esos inhibidores actúen a través de una diana común distinta a CK1. Esta conclusión se ve también apoyada por el hecho de que CK1 constitutivamente activa conduce a un aumento de la formación de péptido A β y confirma el requerimiento de la actividad de CK1 para la regulación de la actividad de γ -

secretasa.

Ejemplo 7

Reguladores moleculares de actividad de CK1 como nuevas dianas de fármacos contra la EA

[0124] Está consolidado que la fosforilación de CK1 ϵ en su región carboxi-terminal se asocia con la inhibición de la actividad enzimática de CK1 ϵ . Por el contrario, la desfosforilación de CK1 ϵ por calcineurina (o PP2B) conduce a una activación de la actividad de CK1. La naturaleza de la vía(s) de transducción de señal responsable de la fosforilación de CK1 ϵ que conduce a una supresión de la actividad CK1 y responsable de la activación de la cascada de PP2B/CK1 se mantiene para ser caracterizada. Un mecanismo conocido para la activación de la vía PP2B/CK1 implica una cascada de mGluR / Gq / PLC-IP3-Ca²⁺ + de grupo I glutamato. Una vez se descubre el mecanismo por el cual SK1 ϵ regula la producción de A β , será de interés para estudiar más a fondo la regulación específica de las tres isoformas diferentes de CK1 ϵ , concretamente, CK1 ϵ 1, CK1 ϵ 2 y CK1 ϵ 3, cada una derivando de la expresión de un gen distinto. La región utilizada para probar el impacto de CK1 ϵ constitutivamente activa en la formación de péptido A β (aminoácidos 271N-terminales) es 100% idéntica entre las tres isoformas; por esta razón, el presente estudio sólo se centra en una de las tres isoformas (CK1 ϵ 1). Sin embargo, existen diferencias en sus regiones C-terminal y esto podría dar lugar a diferencias en la regulación de la actividad de la quinasa basadas en el hecho de que la región C-terminal es la región reguladora. Por lo tanto, la identificación de dichos reguladores moleculares de la actividad de CK1 puede proporcionar nuevas dianas para el desarrollo de fármacos contra el Alzheimer. Varias estrategias pueden ser empleadas para elucidar esas moléculas reguladoras, tales como estudios de fosforilación, estudios de inmunoprecipitación y estudios de fraccionamiento de membrana para identificar esos reguladores de CK1 que representan nuevas dianas terapéuticas. Por ejemplo, se podría llevar a cabo un tipo de perfiles de quinasa de experimento al examinar un gran panel de quinasas para analizar su capacidad para fosforilar in vitro CK1. Las quinasas encontradas pueden ser analizadas por su papel regulador de CK1 al modular su actividad (o nivel de expresión) en líneas celulares y al analizar la actividad de CK1 in vitro después de la inmunoprecipitación. Una vez confirmado, estas quinasas pueden ser examinadas para analizar su capacidad para influenciar la producción de péptidos A β . El mismo tipo de experimento podría llevarse a cabo para identificar las fosfatasa que regulan CK1. Otra posibilidad sería buscar proteínas de unión a CK1 y examinar candidatos identificados para analizar su capacidad para regular la actividad de CK1 en diferentes sistemas tales como in vitro o en líneas celulares. Podrían identificarse proteínas de unión a CK1 por medio de análisis de espectrometría de masas después de la inmunoprecipitación de CK1, SDS-PAGE y tinción Coomassie. Cualquier otro método que podría ayudar a identificar las interacciones proteína-proteína como el sistema de dos híbridos en levadura, sistema de dos híbridos en mamífero, GST pull-down, también se podría utilizar para identificar reguladores de CK1.

Ejemplo 8

Sustratos de CK1 como nuevas dianas de fármacos contra la EA

[0125] La identidad del sustrato(s) por el cual CK1 regula la formación de β -amiloide se mantiene para ser caracterizada. Se considera además en este documento que la identificación de dicho sustrato(s) puede proporcionar nuevas dianas para el desarrollo de fármacos contra la EA. Varias

estrategias pueden ser empleadas tales como estudios de fosforilación, estudios de inmunoprecipitación y estudios de fraccionamiento de membrana para identificar estas nuevas dianas. Por ejemplo, los estudios de fosforilación pueden incluir análisis de electroforesis en gel de 2D. En resumen, las fracciones de membrana que contienen APP se purifican, se marcan radiactivamente al llevar a cabo la fosforilación de CK1 in vitro y después se analizan por medio de electroforesis en gel de 2D. El perfil obtenido se compara con un perfil realizado en las mismas condiciones experimentales, con la excepción del paso de fosforilación de CK1. Las diferencias en los perfiles pueden revelar proteínas diana de CK1. Estas dianas putativas se identifican mediante análisis de espectrometría de masas y su papel en la generación de péptido A β se analiza al modular su expresión en un sistema celular, por ejemplo, en células N2A-APP₆₉₅. Resultados similares pueden ser obtenidos de proteínas co-immunoprecipitadas APP.

5

10

15

20

25

30

35

Reivindicaciones

1. Un método para identificar moduladores útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con beta-amiloide (A β) a través de la reducción de la acumulación de péptido A β , comprendiendo el análisis, in vitro, de la capacidad de un modulador candidato para inhibir la actividad de CK1 y el análisis de la capacidad de un modulador candidato para reducir la acumulación de péptido A β .
2. El método de la reivindicación 1 en el cual dicho método comprende además el análisis de la capacidad de un modulador inhibidor de CK1 identificado para revertir los efectos patológicos observados en un modelo animal no humano de un trastorno relacionado con A β y/o en estudios clínicos con sujetos con un trastorno relacionado con A β .
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el cual la actividad de CK1 es la expresión génica de CK1.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3 en el cual dicho método comprende además el análisis de la capacidad de un modulador inhibidor identificado para revertir los efectos patológicos observados en modelos animales de un trastorno relacionado con A β y/o en estudios clínicos con los sujetos con un trastorno relacionado con A β .
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-4 en el cual dicho trastorno relacionado con A β es la enfermedad de Alzheimer.