

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 424**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 49/08** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)  
**A61K 51/04** (2006.01)  
**A61K 38/03** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2008 E 08788479 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2195335**

54 Título: **Agente de diagnóstico**

30 Prioridad:

**30.08.2007 GB 0716885**

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

**02.01.2014**

73 Titular/es:

**UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY (100.0%)  
RESEARCH AFFAIRS P.O. BOX 17551 AL AIN  
ABU DHABI, AE**

72 Inventor/es:

**EL-AGNAF, OMAR**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 436 424 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Agente de diagnóstico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos capaces de reconocer y unirse a agregados de  $\alpha$ -sinucleína y al uso de los péptidos en el diagnóstico y control de enfermedades sinucleinopáticas (enfermedades de sinucleinopatía o sinucleinopatías), que son enfermedades neurodegenerativas que implican anomalías en una o más de las sinucleínas.

**Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos y sus derivados que son útiles para el diagnóstico y control de sinucleinopatías. Estas son enfermedades asociadas con anomalías en una o más de los sinucleínas e incluyen algunas afecciones neurodegenerativas importantes, por ejemplo enfermedad de Parkinson (PD), demencia con cuerpos de Lewy (DLB), enfermedad de Alzheimer (AD) y atrofia sistémica múltiple (MSA). Las sinucleínas también se expresan a niveles anormalmente altos en diversos tumores (por ejemplo, de mama, ovárico) en cáncer humano.

Las sinucleínas son una familia de proteínas pequeñas (~14 kDa) que se expresan a altos niveles en el tejido nervioso. Los tres miembros de la familia (sinucleína  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) son los productos de tres genes presentes en diferentes cromosomas. Las pruebas genéticas y bioquímicas convergentes sugieren que la deposición de agregados de  $\alpha$ -sinucleína insoluble o fibrillas es una etapa importante en el desarrollo de varias sinucleinopatías.

El primer indicio de la implicación de  $\alpha$ -sinucleína en la patogénesis de enfermedad vino del aislamiento de uno de sus fragmentos proteolíticos de amiloide purificado de cerebros con enfermedad de Alzheimer (AD). Este fragmento de  $\alpha$ -sinucleína, que representa aproximadamente el 10% del material insoluble en dodecil sulfato sódico (SDS), se nombró componente no A $\beta$  de amiloide de AD (NAC). La secuenciación de aminoácidos reveló que el NAC comprendía al menos 35 aminoácidos, aunque los restos N terminales no podían asignarse con certeza debido a la especificidad de la enzima usada en la secuenciación. Se mostró posteriormente que estos 35 aminoácidos correspondían a los restos 61-95 de un precursor de 140 aminoácidos (NACP). Se descubrió que el NACP era idéntico a la proteína llamada  $\alpha$ -sinucleína.

Se estableció una clara conexión genética con la PD cuando se mostró que se encontraban tres mutaciones diferentes en el gen de  $\alpha$ -sinucleína en formas heredadas raras de esta enfermedad. Se ha descubierto una mutación,  $\alpha$ -sinucleína (A53T), en ciertas familias italianas y griegas, y da como resultado sustitución de Ala53 a Thr. La otra mutación,  $\alpha$ -sinucleína (A30P), se ha encontrado en una familia de origen alemán, y da como resultado cambio de Ala30 a Pro, y la última mutación E46K se encontró en Parkinsonismo familiar y DLB. Además, las duplicaciones y triplicaciones genéticas en el locus del *SNCA* también se han presentado en casos familiares de PD lo que sugiere que el aumento de la dosificación génica de *SNCA*, que da como resultado simultáneamente un aumento de los niveles de proteína  $\alpha$ -sinucleína natural, también es patógeno. Las duplicaciones de *SNCA* se asemejan mucho a la PD idiopática con aparición en edad tardía, progresión lenta y ausencia de demencia y deterioro cognitivo. Como alternativa, las triplicaciones de *SNCA* dan como resultado PD de aparición temprana con progresión más rápida y demencia.

Adicionalmente, las lesiones del cerebro conocidas como "cuerpos de Lewy" y "neuritas de Lewy" constituyen las principales características patológicas en los cerebros de pacientes con PD y DLB. Estos cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy contienen agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Los estudios de microscopía inmunoelectrónica e inmunohistoquímica adicionales han mostrado que la  $\alpha$ -sinucleína también está asociada con lesiones patológicas en otras enfermedades neurodegenerativas, que implican en ocasiones células no neuronales, tales como las inclusiones citoplásmicas gliales halladas en MSA. Por lo tanto PD, AD, DLB y MSA se denominan de forma colectiva en el presente documento sinucleinopatías.

Se ha indicado recientemente que pueden crearse lesiones similares a las halladas en las enfermedades sinucleinopáticas humanas en animales transgénicos. Los animales transgénicos expresan altos niveles de proteína  $\alpha$ -sinucleína humana natural o mutante y desarrollan progresivamente muchas de las afecciones patológicas asociadas con las enfermedades sinucleinopáticas. Estos hallazgos implican la deposición de agregados de proteína  $\alpha$ -sinucleína en la patofisiología de las enfermedades sinucleinopáticas. Resulta interesante que las tres mutaciones de  $\alpha$ -sinucleína humana parecen acelerar el proceso de agregación.

El-Agnaf *et al* (2004) FASEB J. 18, 1315-1317 y la publicación de patente Internacional relacionada WO2004/009625 desvela péptidos del fragmento NAC de  $\alpha$ -sinucleína como inhibidores potenciales de la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. El documento WO2004/009625 menciona el uso de dichos péptidos en ensayos *in vitro* para detectar  $\alpha$ -sinucleína. El-Agnaf *et al* (2006) FASEB J. 20, 419-425 y las publicaciones de patente Internacional WO03/069332 y

WO99/50300 describen métodos para la detección de oligomerización de  $\alpha$ -sinucleína usando anticuerpos monoclonales.

La secuencia de aminoácidos completa de la  $\alpha$ -sinucleína natural humana se proporciona como SEC ID N°: 1.

5

### Sumario de la invención

Se han diseñado inhibidores peptídicos pequeños de la agregación y toxicidad de  $\alpha$ -sinucleína, y se han nombrado inhibidores de  $\alpha$ -sinucleína (ASI). Estos péptidos cortos contienen parte de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína correspondiente a los restos 69-72 de SEC ID N°: 1. La insolubilidad de estos péptidos se superó colocando restos hidrófilos, tales como arginina y glicina, en el extremo N terminal y glicina y arginina en el extremo C terminal de los péptidos sintéticos. Se descubrió que estos péptidos se unían a las formas monoméricas (libres) de  $\alpha$ -sinucleína y eran capaces de bloquear su ensamblaje tanto en agregados solubles tempranos (o aductos) como en agregados maduros (o fibrillas de sinucleína maduras).

10

15

Se desvela en el presente documento un péptido que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína natural humana (es decir los restos 61 a 95 de SEC ID N°: 1). La secuencia de la región de unión se proporciona posteriormente en su totalidad, y como SEC ID N°:2.

20

*Secuencia de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína:*

EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK TVEGAGSIAA ATGFV (SEC ID N° 2)

25

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los péptidos ASI derivados de la secuencia de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína de origen natural (restos de aminoácidos 61 a 95 de SEC ID N°: 1) se unen con mayor afinidad tanto a agregados solubles tempranos como a agregados maduros de  $\alpha$ -sinucleína que a  $\alpha$ -sinucleína libre "forma monomérica de  $\alpha$ -sinucleína". En consecuencia, un péptido que comprende o consiste esencialmente en secuencias de aminoácidos correspondientes a la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína puede usarse para detectar agregados de  $\alpha$ -sinucleína (o sus fragmentos tales como NAC). A no ser que se indique de otro modo, debería interpretarse que todas las referencias posteriores a agregados de  $\alpha$ -sinucleína también se aplican a agregados tanto solubles tempranos (de bajo y/o alto peso molecular de oligómeros solubles) como maduros de  $\alpha$ -sinucleína o sus fragmentos o derivados, incluyendo agregados que comprenden  $\alpha$ -sinucleína en complejo con cualquier otra proteína o proteínas.

35

Como resultado de la capacidad para unirse a los agregados de  $\alpha$ -sinucleína, un péptido de acuerdo con la invención es adecuado para su uso en el diagnóstico de enfermedades que implican  $\alpha$ -sinucleína. Puesto que el péptido de la invención es capaz de unirse a los agregados solubles (o aductos) de  $\alpha$ -sinucleína que están presentes en los estadios tempranos de enfermedades sinucleinopáticas, el péptido es particularmente adecuado para su uso en el diagnóstico temprano de dichas enfermedades. El péptido es útil para detectar agregados de  $\alpha$ -sinucleína "natural" (forma nativa), o formas mutadas, nitradas, fosforiladas, glicosiladas o truncadas o cualquier otra forma modificada de origen natural.

40

45

El péptido de la invención puede comprender adicionalmente un sustituyente para aumentar el transporte a través de la barrera hematoencefálica y/o aumentar la captación por células vivas. Además, el péptido de la invención puede marcarse para su uso como agente de formación de imágenes. Por ejemplo, puede introducirse un sustituyente adicional, preferentemente amino terminal, tal como ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris(ácido acético-t-butil éster)-10-acético (DOTA) para proporcionar un ligando para formar complejo con un agente de contraste tal como iones de gadolinio, para permitir la formación de imágenes por MRI de depósitos de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en los pacientes.

50

El péptido de la invención tiene por lo tanto excelentes propiedades como agente para su uso en el diagnóstico de enfermedades sinucleinopáticas tempranas o moderadas y para controlar la terapia de enfermedades sinucleinopáticas. En consecuencia, la presente invención proporciona:

55

- Un péptido que comprende:

i) la secuencia de aminoácidos DThr-DVal-DVal-DAla o DVal-DVal-DAla;

ii) un péptido de poli-D-Arginina unido al extremo N o C terminal de la secuencia de (i) por un resto de Glicina o N-metilglicina y/o cualquier otro espaciador; y

60

iii) un marcador detectable o un sustituyente capaz de formar complejo con un marcador detectable.

- Un péptido de la invención para su uso en el diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática que implica  $\alpha$ -sinucleína y/o un fragmento o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína.

- 5 - Un método para formar imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en un sujeto, comprendiendo dicho método detectar la unión de un péptido de la invención con agregados de  $\alpha$ -sinucleína; donde el método comprende administrar dicho péptido a dicho sujeto por medios no quirúrgicos. Opcionalmente los agregados de  $\alpha$ -sinucleína pueden estar presentes en un sujeto humano o animal; y/o dicho péptido puede detectarse por formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).
- 10 - Un método para controlar una enfermedad sinucleinopática que implica  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmento o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método administrar un péptido de la invención a un sujeto por medios no quirúrgicos y detectar la cantidad y/o tamaño de cualquier agregado de  $\alpha$ -sinucleína que se haya formado por  $\alpha$ -sinucleína solamente o por  $\alpha$ -sinucleína en complejo con cualquier otra proteína o proteínas.
- 15 - Un kit para formar imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho kit un péptido de la invención y medios no quirúrgicos para administrar el péptido a un sujeto.
- 15 - Un método *in vitro* para diagnosticar de una enfermedad sinucleinopática que implique  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmento o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína en un paciente que comprende:
- 20 (a) combinar *in vitro* una muestra de tejido y/o fluido biológico (por ejemplo, sangre, LCR, orina) del paciente con un péptido de la invención durante un tiempo y en condiciones eficaces para permitir la unión del péptido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes en dicha muestra; y
- 20 b) detectar de este modo la presencia o ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en dicha muestra, donde la presencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto tiene una enfermedad sinucleinopática y la ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto no tiene dicha enfermedad sinucleinopática.
- 25 - Un método *in vitro* para controlar la eficacia de un agente terapéutico que se ha administrado para el fin de tratar una enfermedad sinucleinopática que implica  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmento o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo el método analizar una muestra de un modelo animal con respecto a la presencia y cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína; de acuerdo con las siguientes etapas:
- 30 (a) combinar *in vitro* una muestra del sujeto con un péptido de la invención durante un tiempo y en condiciones eficaces para permitir la unión del péptido con agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes en la muestra; y
- 30 (b) detectar de este modo la presencia y cantidad de agregados de una  $\alpha$ -sinucleína en la muestra.
- 35 - Un método para controlar la eficacia de un agente terapéutico que se ha administrado para el fin de tratar una enfermedad sinucleinopática que implica  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmento o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo el método formar imágenes del cerebro de un modelo animal con respecto a la presencia y cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método detectar la unión de un péptido de la invención con agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

40

#### Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 ilustra la estructura de un reactivo de formación de imágenes ejemplar de la invención (Agente de formación de imágenes 1). El reactivo de formación de imágenes contiene tres dominios: el dominio de unión  $\alpha$ -sinucleína es la secuencia retroinversa en la sección media del reactivo; el dominio de transporte es la poliamina o poli D-arginina en el extremo C terminal; y el agente de contraste es el ión de gadolinio en el extremo N terminal.

50 La Figura 2 muestra que los péptidos OR1 a 4 (respectivamente) de la invención se unen más eficazmente con agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados que  $\alpha$ -sinucleína no agregada, nueva, en un intervalo de concentraciones de  $\alpha$ -sinucleína cuando la  $\alpha$ -sinucleína recubre placas de microtitulación y se añade solución peptídica a los pocillos.

55 La Figura 3 A-E muestra que los péptidos OR1 a 5 (respectivamente) de la invención se unen más eficazmente a agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados que  $\alpha$ -sinucleína no agregada, nueva, en un intervalo de concentraciones de péptido cuando la  $\alpha$ -sinucleína recubre placas de microtitulación a 200 pmol/pocillo y se añade solución peptídica a los pocillos.

La Figura 4 A y B muestra que el péptido se une más eficazmente a agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados que  $\alpha$ -sinucleína no agregada, nueva, en un intervalo de concentraciones de  $\alpha$ -sinucleína cuando los péptidos recubren placas de microtitulación y se añade solución de  $\alpha$ -sinucleína a los pocillos.

60 La Figura 5 muestra que los péptidos de la invención se unen más eficazmente a agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados generados por envejecimiento (agregados insolubles), o por tratamiento con dopamina o nitración (agregados solubles) que  $\alpha$ -sinucleína no agregada, nueva, en un intervalo de concentraciones de  $\alpha$ -sinucleína cuando la  $\alpha$ -sinucleína recubre placas de microtitulación y se añade solución peptídica a los pocillos.

Figura 6 las microfotografías de EM muestran unión de los péptidos de la invención (OR5 y OR7) con agregados preformados (fibrillas amiloides maduras) de  $\alpha$ -sinucleína usando el sistema de ensayo de inmuno-oro.

La Figura 7 muestra que los péptidos de la invención no se unen al componente principal de agregados proteicos en enfermedad de Alzheimer (A $\beta$ ) en formas no agregadas, envejecidas, agregadas o nuevas, en un intervalo de concentraciones peptídicas cuando los péptidos recubren placas de microtitulación y se añade solución de A $\beta$  a los pocillos. Se obtuvieron resultados similares para otros agregados polipeptídicos, tales como péptido de demencia Británica (ABri) (datos no mostrados).

La Figura 8 muestra que los péptidos de la invención se captan eficazmente por la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Se obtuvieron resultados similares para la línea celular de neuroblastoma humano M17 (datos no mostrados).

La Figura 9 muestra eliminación de péptido OR5 de las células a lo largo del tiempo.

La Figura 10 muestra que los péptidos de la invención no muestran citotoxicidad para líneas celulares de neuroblastoma humano.

La Figura 11 muestra transferencias puntuales que demuestran la unión de péptido biotinilado OR5 con oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína.

La Figura 12 demuestra que los Cuerpos de Lewy (LB) en el cerebro post mórtem están marcados por el péptido OR5 de la invención.

La Figura 13 muestra que los péptidos se unen a agregados de  $\alpha$ -sinucleína en un modelo celular.

La Figura 14A muestra un ejemplo de un mapa de T1. La Figura 14B muestra la formación de imágenes por MRI del cerebro después de inyección iv de péptido OR7.

## 20 Descripción de las secuencias mencionadas en el presente documento

SEC ID N°: 1 corresponde a la secuencia completa de  $\alpha$ -sinucleína natural humana. SEC ID N°: 2 corresponde a la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína. Las SEC ID N°: 3 a 7 corresponden a secuencias peptídicas desveladas en el presente documento.

### 25 Descripción detallada de la invención

#### Agregados de $\alpha$ -sinucleína

A no ser que se indique de otro modo, la expresión agregados de  $\alpha$ -sinucleína pretende abarcar tanto agregados solubles tempranos (aductos y oligómeros solubles de bajo y/o alto peso molecular) como agregados insolubles maduros (o fibrillas amiloides maduras) de  $\alpha$ -sinucleína, y cualquier fragmento o derivado de los mismos. Se considera que los agregados comprenden cualquier conformación o acumulación anómala de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína, y también puede comprender otros componentes tales como ubiquitina, proteína de neurofilamentos y cristalina alfa B.

A no ser que se indique de otro modo, se pretende que la expresión  $\alpha$ -sinucleína libre se refiera a monómeros de  $\alpha$ -sinucleína solubles en una conformación natural.

#### 40 Péptido

La presente invención proporciona un péptido que comprende:

- i) la secuencia de aminoácidos DThr-DVal-DVal-DAla o DVal-DVal-DAla;
- ii) un péptido de poli-D-Arginina ligado al extremo N o C terminal de la secuencia de (i) por un resto de Glicina o N-metilglicina y/o cualquier otro espaciador; y
- iii) un marcador detectable o un sustituyente capaz de formar complejo con un marcador detectable.

En consecuencia, la presente invención proporciona un péptido que se une a  $\alpha$ -sinucleína, y en particular a agregados de  $\alpha$ -sinucleína. El péptido comprende un dominio de unión a agregado de  $\alpha$ -sinucleína que comprende una secuencia peptídica de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína (restos 61 a 95 de SEC ID N°: 1) y un marcador detectable. El péptido comprende un dominio de transporte para facilitar el transporte del péptido a través de la barrera hematoencefálica y/o captación del péptido por células vivas. Los péptidos de la invención son útiles en la detección de agregados de  $\alpha$ -sinucleína y son útiles en el diagnóstico de enfermedades sinucleinopáticas, incluyendo PD, DLB y MSA.

La secuencia de restos de aminoácidos contiguos de la secuencia correspondiente a los restos de aminoácidos 61 a 95 de SEC ID N°: 1 está unida en el extremo N terminal y/o C terminal de la secuencia con uno o más restos de aminoácidos adicionales que son más hidrófilos que el resto de aminoácido con el que está unido ese final de la secuencia en la secuencia nativa de  $\alpha$ -sinucleína natural humana. Pueden usarse opcionalmente restos de glicina (Gly) como enlazadores/espaciadores entre la secuencia de unión y los restos de aminoácidos adicionales.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden incluir derivados N sustituidos. El sustituyente puede ser, por ejemplo, un grupo de hidroxilo o etilo pero es más preferentemente un grupo de metilo. Por lo tanto los ejemplos de derivados o análogos de péptidos de acuerdo con la invención incluyen derivados N metilados de los péptidos.

Dichos derivados N metilados incluyen derivados en los que parte de o toda la secuencia son restos de aminoácidos N metilados. Se prefiere que la sustitución sea en la posición  $\alpha$ .

5 Los péptidos de la invención comprenden aminoácidos D. El orden de la secuencia de aminoácidos D puede invertirse en comparación con la sección de la secuencia de  $\alpha$ -sinucleína en la que se basa. Por ejemplo un derivado peptídico basado en aminoácidos D con una secuencia basada en los restos 69 a 71 de  $\alpha$ -sinucleína (GAVV) podría tener una secuencia de GAVV o VVAG.

10 Los péptidos de acuerdo con la invención se adaptan para facilitar su entrada en células, o a través de barreras biológicas (tales como la barrera hematoencefálica). Puesto que las sinucleinopatías habitualmente implican actividad patológica de las sinucleínas en el cerebro, facilitar la entrada de péptidos o derivados peptídicos de la invención en este tejido es altamente deseable.

#### 15 *Dominios de transporte*

Los dominios de transporte pueden comprender o consistir en cualquier compuesto o sustituyente que facilite el transporte del péptido a través de la barrera hematoencefálica y/o captación del péptido por células vivas. Se han desarrollado métodos para el suministro de proteínas exógenas en células vivas y a través de la barrera hematoencefálica con la ayuda de péptidos vehículo permeables a membrana tales como Tat-(48-60) de VIH-1, cubierta (35-49) de virus cabaña (Flock House Virus) (FHV), Antennapedia-(43-58) de *Drosophila* y péptidos Básicos tales como péptidos de octa y hexa arginina. Hibridando genética o químicamente estos péptidos vehículos, se ha conseguido el suministro intracelular eficaz de diversos oligopéptidos y proteínas. La eficacia de dichos enfoques se ilustra por el ejemplo de la proteína de fusión Tat- $\beta$ -galactosidasa, que tiene una masa molecular de hasta 120 kDa. La expresión de esta proteína de fusión en ratones da como resultado el suministro de la proteína de fusión biológicamente activa a todos los tejidos, incluyendo el cerebro. Por lo tanto los péptidos o derivados peptídicos de la invención pueden adaptarse para aumentar su biodisponibilidad en células o tejidos por la incorporación de dichos péptidos vehículo.

30 Este enfoque, usando péptidos vehículo para mejorar la disponibilidad de péptidos, derivados peptídicos y análogos peptídicos de la invención es particularmente adecuado para permitir la incorporación en tejidos o células de moléculas que contengan aminoácidos no naturales (por ejemplo aminoácidos D o aminoácidos N metilados) o derivados no peptídicos.

35 En los péptidos de la invención el dominio de transporte es una poliarginina que comprende, por ejemplo, 6 restos de arginina (poliarginina[ $r_6$ ]).

El dominio de transporte puede estar presente en el extremo N terminal o en el extremo C terminal del péptido de unión a agregado de  $\alpha$ -sinucleína.

40 El dominio de transporte puede estar unido al péptido por cualquier método adecuado, por ejemplo, por reticulación química. Se conocen bien en la técnica agentes reticuladores adecuados. Uno de dichos métodos se describe en el Ejemplo 1.

#### 45 *Marcador detectable*

El péptido de unión a agregado de  $\alpha$ -sinucleína de la invención se marca para facilitar la formación de imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. El péptido puede, por ejemplo, incluir un marcador detectable en el extremo C terminal y/o en el N terminal. En una realización preferida, el marcador detectable está presente en el extremo N terminal. El marcador detectable es típicamente uno que permite la detección del péptido cuando está unido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Los agregados de  $\alpha$ -sinucleína pueden estar presentes en el cerebro de un mamífero vivo o en una muestra de cerebro post mórtem. Los marcadores útiles incluyen radiomarcadores y agentes de contraste, preferentemente unos adecuados para su uso en seres humanos.

55 Los radiomarcadores adecuados incluyen  $^{18}\text{F}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  y  $^{188}\text{Re}$ . Los agentes de contraste adecuados incluyen iones de tierras raras tales como gadolinio (Gd), disprosio y hierro. Otros ejemplos de dichos agentes de contraste incluyen varios agentes magnéticos, agentes paramagnéticos y agentes ferromagnéticos o superparamagnéticos, tales como partículas.

60 Otros marcadores que pueden usarse incluyen marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos por resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables por un explorador de tomografía de emisión de positrones ("PET"), quimioluminiscentes tales como luciferina y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. También pueden emplearse emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance.

65 Los péptidos de la invención pueden marcarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los péptidos pueden

yodarse usando 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicourilo o cloramina T.

Pueden usarse quelados (por ejemplo, quelados de EDTA, DTPA y NTS) para unirse (y reducir la toxicidad) de algunas sustancias paramagnéticas (por ejemplo Fe<sup>+3</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Gd<sup>+3</sup>). Los péptidos pueden marcarse con iones de gadolinio, por ejemplo, conjugando un quelado de Gd de bajo peso molecular tal como ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris(ácido acético-*t*-butil éster)-10-acético (DOTA) o ácido dietilen triamin pentaacético (DTPA) al péptido. En consecuencia, en una realización un agente de la invención puede comprender el péptido Gly-X-DVal-DVal-DAla-Gly, donde X es ausente o DThr, una señal de transporte y un quelado de bajo peso molecular, tal como DOTA. En una realización de la invención, el marcador detectable puede ser uno que sea adecuado para detección por microscopía, tal como microscopía electrónica, microscopía confocal o microscopía óptica. El marcador detectable puede, por ejemplo, ser biotina, un compuesto fluorescente, tal como proteína verde fluorescente, o un marcador peptídico, tal como un marcado de his, myc o flag.

### Métodos de formación de imágenes

Los péptidos de la invención que comprenden un marcador detectable son útiles en métodos de formación de imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. En consecuencia, la presente invención proporciona un método para formar imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método detectar la unión de un péptido de la invención con agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

La presencia o ausencia de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína puede detectarse en el cerebro *in vivo* usando cualquier técnica de formación de imágenes adecuada. En dichas realizaciones, el método puede comprender además administrar un agente de la invención a un sujeto. El sujeto es típicamente un mamífero, preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un animal experimental y, en particular, un modelo de animal experimental de enfermedad sinucleinopática. Se conocen modelos animales de, por ejemplo, PD en la técnica e incluyen ratones transgénicos y *Drosophila* transgénica.

Las técnicas de formación de imágenes adecuadas incluyen tomografía de emisión de positrones (PET), gamma-escintigrafía, formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), formación de imágenes por resonancia magnética funcional (fMRI), magnetoencefalografía (MEG) y tomografía computarizada por emisión de fotón individual (SPECT). La MRI es un método preferido porque la resolución espacial y la relación de señal y ruido proporcionada por MRI (30  $\mu$ m) es adecuada para detectar depósitos de agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

La formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) usa NMR para visualizar características internas de un sujeto vivo, y es útil para pronóstico, diagnóstico, tratamiento y cirugía. La MRI puede usarse sin compuestos indicadores radiactivos para un beneficio evidente. Se resumen algunas técnicas de MRI en la solicitud de patente europea publicada EP-A-0 502 814. Generalmente, las diferencias relacionadas con las constantes de tiempo de relajación T1 y T2 de protones de agua en diferentes ambientes se usan para generar una imagen. Sin embargo, estas diferencias pueden ser insuficientes para proporcionar imágenes de alta resolución definidas. Las diferencias en estas constantes de tiempo de relación se potencian por agentes de contraste.

La presencia o ausencia de los agregados de  $\alpha$ -sinucleína también pueden detectarse *in vitro*, por ejemplo, en experimentos diseñados para identificar agentes que inhiban la formación y deposición de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Los agentes de la invención también pueden usarse para detectar agregados de  $\alpha$ -sinucleína en secciones cerebrales de animales experimentales o en secciones cerebrales post mórtem de un sujeto humano. En dichas realizaciones, el método de formación de imágenes puede ser microscopía, tal como microscopía electrónica, microscopía confocal o microscopía óptica.

Los péptidos de la invención pueden usarse en métodos para diagnosticar sinucleinopatías. En una realización preferida, los péptidos de la invención son útiles en el diagnóstico de PD, DLB y MSA. El diagnóstico de sinucleinopatías en estadio leve o moderado es actualmente difícil porque se basa en perfiles psiquiátricos complejos. El uso de un péptido marcado de la invención como un agente de formación de imágenes por MRI permitirá que se realice un diagnóstico decisivo en estadios tempranos de la enfermedad, cuando pueda instituirse terapia protectora antes de que se haya producido destrucción generalizada del cerebro. A medida que aparezcan varios productos terapéuticos mediante ensayos para el fin de librar el cerebro de depósitos de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, la formación de imágenes (en particular, MRI) usando un agente de formación de imágenes que comprende un péptido de la invención proporcionará un modo de seguir la eficacia de la terapia.

En una realización, la invención proporciona un método para diagnosticar enfermedad sinucleinopática en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia o ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, donde la presencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto tiene enfermedad sinucleinopática. La ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto no tiene enfermedad sinucleinopática.

Las imágenes obtenidas de un sujeto pueden compararse con imágenes tomadas de sujetos de control que no tienen enfermedad sinucleinopática y/o con imágenes de otros sujetos que se sabe que tienen sinucleinopatías para

conseguir o confirmar un diagnóstico.

5 Un método para diagnosticar enfermedad sinucleinopática de la invención típicamente comprende administrar un péptido marcado de forma detectable de la invención a un sujeto; formar imágenes del cerebro de dicho sujeto para detectar cualquiera de dichos péptidos unidos a agregados de  $\alpha$ -sinucleína; y determinar la presencia o ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Se administra un péptido de la invención a un sujeto que necesite diagnóstico en una cantidad suficiente para unirse a cualquier agregado de  $\alpha$ -sinucleína y detectarse por técnicas de formación de imágenes, tales como MRI.

10 La invención también proporciona métodos para controlar el estado de la enfermedad sinucleinopática en un sujeto. Los métodos pueden, por lo tanto, usarse para determinar la progresión de enfermedad. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para controlar el crecimiento de depósitos de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro de un sujeto. El método también puede usarse para controlar la eficacia de la terapia y/o evaluar la eficacia de nuevos tratamientos de enfermedad sinucleinopática. Un sujeto puede ensayarse habitualmente, por ejemplo, mensualmente, cada seis meses o anualmente, para controlar la progresión de la enfermedad dentro del sujeto.

15 Por lo tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona un método para controlar la enfermedad sinucleinopática en un sujeto, comprendiendo el método determinar la presencia o ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro del sujeto detectando la unión de un agente de la invención con los agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Las imágenes se comparan típicamente con una o más imágenes tomadas del mismo sujeto en un punto temporal anterior.

25 El número y/o tamaño de agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes en el cerebro de un sujeto se correlaciona con progresión de enfermedad sinucleinopática. Un aumento del número y/o tamaño de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica una progresión de la enfermedad. Por el contrario, una reducción del número o tamaño de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica regresión de la enfermedad. Cuando no se observa cambio en el número y/o tamaño de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, la enfermedad está en un estado estacionario. Cuando el método de control es determinar la eficacia de un tratamiento para enfermedad sinucleinopática, el mantenimiento de un estado estacionario o una reducción en el número o tamaño de agregados de  $\alpha$ -sinucleína típicamente indica que el tratamiento es exitoso.

30 Los niveles de agregados de  $\alpha$ -sinucleína pueden compararse con patrones para determinar el estado de la enfermedad sinucleinopática.

#### **Formulación y administración del péptido para uso en métodos de diagnóstico**

35 La formulación de un péptido de la invención dependerá de factores tales como la naturaleza del péptido y la afección para diagnosticar. Puede administrarse o suministrarse cualquiera de dichos péptidos en una diversidad de formas de dosificación. Puede administrarse o suministrarse por medios quirúrgicos o no quirúrgicos. De acuerdo con la invención se administra por medios no quirúrgicos. Los medios no quirúrgicos de administración incluyen, por ejemplo, administración por vía oral (por ejemplo, como comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables), por vía tópica, por vía transdérmica o por técnicas de infusión o inhalación. El péptido también puede administrarse o suministrarse como supositorios. Un médico podrá determinar la vía requerida de administración o suministro para cada paciente particular.

45 El péptido puede administrarse directamente al sitio de un depósito de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, por ejemplo, un cuerpo de Lewy, típicamente por inyección en un vaso sanguíneo que provee al cerebro o en el propio cerebro.

50 Típicamente el péptido se formula con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención y un diluyente o vehículo farmacéuticamente eficaz.

55 El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el compuesto activo, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes por ejemplo sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o de calcio y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones farmacéuticas pueden fabricarse de manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezclado, granulado, compresión, recubrimiento de azúcar o recubrimiento de película.

60 Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

65 Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato



sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el compuesto activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo agua estéril, aceite de oliva, etil oleato, glicoles, por ejemplo propilenglicol, y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

5 Las soluciones para administración intravenosa o infusiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o preferentemente pueden estar en forma de soluciones salinas estériles, acuosas, isotónicas.

10 La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la sustancia usada; la edad, peso y condición del paciente para tratar, la vía de administración; y el método de diagnóstico para usar. De nuevo, un médico podrá determinar la vía requerida de administración y dosificación para cualquier paciente particular.

### 15 Kits

La invención también proporciona kits para llevar a cabo los métodos de diagnóstico y control de la invención. El kit puede comprender un péptido de la invención y medios no quirúrgicos para administrar el péptido a un sujeto. Pueden incluirse también instrucciones para usar el kit para controlar o diagnosticar la enfermedad sinucleinopática.

20 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención.

### Ejemplo 1:

#### Síntesis y purificación de péptidos retroinversos que incorporan marcador detectable

25 Se realizaron síntesis de péptidos usando una metodología de Fmoc/tBu optimizado para secuencias amiloides (El-Agnaf *et al.*, (2000) BBRC, Vol. 273: págs. 1003-1007). Se usó HATU (2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato) como agente de acoplamiento para aminoácidos protegidos por Fmoc en resina de PEG-PS y se realizó acoplamiento doble sobre las secuencias de unión de  $\alpha$ -sinucleína durante la síntesis. Se incorporó un marcador de  $\epsilon$ -biotina-Lys en el extremo C terminal de las secuencias de unión a  $\alpha$ -sinucleína para facilitar la detección de los péptidos en sistemas experimentales. Se incorporaron poli D-arginina [ $r_6$ ] o poliaminas en los extremos C o N terminal de los péptidos como un vehículo permeable a membrana para ayudar a suministrar en células vivas y a través de la barrera hematoencefálica (BBB). Se acopló [ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-1,4,7-tris (ácido acético-t-butil éster)-10-acético] (DOTA) al extremo N terminal por acoplamiento doble usando HATU. El DOTA se incorpora para formar complejo con gadolinio (Gd), que es un agente de contraste de MRI. Los péptidos modificados se liberaron y se desprotegeron, y después se purificaron en una columna preparatoria de Phenomenix C4 usando HPLC de fase inversa. La pureza se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF (datos no mostrados). Finalmente, la sal de Gd de DOTA-péptidos se preparó mediante incubación durante una noche con un exceso molar de 3 veces de tricloruro de Gd en agua, y el pH se ajustó a 7,0.

40 Se produjeron los siguientes péptidos:

- (OR1) Gd-DOTA rGtvvaGK (biotina)-rrrrr
- (OR2) Gd-DOTA rGvvaGK (biotina)-rrrrr
- 45 (OR3) Gd-DOTA rrrrrrGtvvaGK (biotina)-r
- (OR4) Gd-DOTA rrrrrrGvvaGK (biotina)-r
- (OR5) Gd DOTA-r- Sar-vva-Sar -K (biotina)-rrrrr
- (OR6) Gd DOTA-r- Sar-vva-Sar -K (biotina) - butdiamina
- 50 (OR7) Gd-DOT-A-r- Sar-vva-Sar -K (biotina)-pentdiamina

Las secuencias de unión a  $\alpha$ -sinucleína están subrayadas. Las minúsculas indican aminoácidos en configuración D, es decir, esta es la secuencia retroinversa de la región de unión de  $\alpha$ -sinucleína. Por lo tanto, por ejemplo, GtvvaG en OR1 corresponde a la secuencia GAVVTG en  $\alpha$ -sinucleína natural (restos 68 a 73 de SEC ID N° 1). Se incorpora sarcosina (Sar) en lugar de Gly en los péptidos OR5, 6 y 7. La sarcosina es N-metilglicina y añade a la resistencia proteolítica, solubilidad y permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BBB).

### Preparación de $\alpha$ -sinucleína:

60 Se expresó  $\alpha$ -sinucleína humana recombinante en *Escherichia coli* y se purificó por FPLC como se ha descrito previamente por los inventores (El-Agnaf, *et al.*, 1998). La pureza de la proteína  $\alpha$ -sinucleína se confirmó por HPLC, SDS-PAGE y espectroscopia de masas.

### Preparación de fibrillas amiloides de $\alpha$ -sinucleína:

65 Se disolvió  $\alpha$ -sinucleína recombinante en solución salina tamponada con fosfato convencional, pH 7,4 (PBS) a 50  $\mu$ M y se incubó a 37 °C durante hasta 7 días en un Eppendorf Thermomixer con mezclado continuo (1.000 rpm). La

formación de fibrillas amiloides se controló por ensayo de unión de Th-T y también se confirmó por microscopía electrónica (datos no mostrados).

5 Se produjeron agregados solubles de  $\alpha$ -sinucleína por nitración y por tratamiento con dopamina. La nitración se realiza como sigue: se disuelven 0,7 mg/ml de  $\alpha$ -sinucleína liofilizada en 700  $\mu$ l de agua. Se induce nitración de 1 % TNM en etanol de  $\alpha$ -sinucleína añadiendo una alícuota de 50  $\mu$ l de tetranitrometano 1 % en etanol hasta 500  $\mu$ l de solución proteica 1 mg/ml. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. El procedimiento se repitió con adición de otra alícuota de 50  $\mu$ l de solución de TNM 1 % en las mismas condiciones. Después de 10 minutos, se añadió urea a una concentración final de 2 M y esta mezcla proteica se dializó con cuatro cambios de tampón apropiado a pH 7,8 para retirar completamente el TNM que no había reaccionado. La nitración de  $\alpha$ -sinucleína se confirmó por inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal específico para  $\alpha$ -sinucleína nitrada (datos no mostrados).

15 Se realizó tratamiento con dopamina como sigue: se mezclan dopamina y  $\alpha$ -sinucleína a una relación 1:1 en agua (típicamente  $\alpha$ -sinucleína 50  $\mu$ M: dopamina 50  $\mu$ M), después se incubaba a 37 °C durante hasta 8 días en un Eppendorf Thermomixer con mezclado continuo (1.400 rpm). La formación de oligómeros de  $\alpha$ -sinucleína se confirmó por transferencia de western y ensayo de ELISA oligomérico específico, mientras que la formación de fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína se controló por ensayo de unión de Th-T y se confirmó por EM (datos no mostrados).

## 20 **Ejemplo 2: Unión de péptidos con agregados de $\alpha$ -sinucleína recubiertos**

### ***Ensayos de ELISA***

25 Se recubrió una placa de microtitulación con diversas concentraciones de soluciones de  $\alpha$ -sinucleína nueva, o agregada (20-200 pmol/pocillo) para secar durante una noche a 37 °C. Se fijó a continuación  $\alpha$ -sinucleína agregada a la placa de microtitulación. La  $\alpha$ -sinucleína agregada se produjo por envejecimiento, tratamiento con dopamina o nitración como se indica en las figuras. Después de lavar con PBS que contenía Tween-20 0,05 % (PBST) y bloquear con tampón de bloqueo (PBS que contenía gelatina 2,5 % y Tween-20 0,05 %), se añadieron los péptidos biotinilados (200 pmol/pocillo en PBS) o proteína BSA (control negativo) y se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente (TA).

35 La unión de péptidos con  $\alpha$ -sinucleína se cuantificó usando avidina ligada a enzima. Brevemente, las placas se lavaron tres veces con PBST antes de la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de peroxidasa de extravidina diluida a 1:5000 en tampón de bloqueo. Las placas se lavaron después tres veces con PBST antes de la adición de sustrato de peroxidasa de TMB. Las placas se dejaron durante 15 minutos a TA para que se desarrollara el color. La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de ácido sulfúrico 0,5 M y las placas se leyeron a 450 nm en un espectrofotómetro. Todos los péptidos mostraron concentración dependiente de la unión con  $\alpha$ -sinucleína de recubrimiento, mientras que se observó unión muy baja con proteína BSA de recubrimiento para todos los péptidos (Figura 2). Los péptidos OR1 y 2 han mostrado alta unión con  $\alpha$ -sinucleína de recubrimiento tanto nueva como agregada (Figura 2A, B), mientras que, en las mismas condiciones, los péptidos OR3 y 4 mostraron unión más específica con la  $\alpha$ -sinucleína agregada (Figura 2C, D).

45 El efecto de la concentración del péptido en la unión con una concentración fija de  $\alpha$ -sinucleína se ensayó recubriendo placas de microtitulación como anteriormente con 100 o 200 pmol/pocillo de  $\alpha$ -sinucleína. Los péptidos OR1 y 2 mostraron más unión con la  $\alpha$ -sinucleína agregada que con la nueva a 100 pmol/pocillo de  $\alpha$ -sinucleína (Figura 3A, B). La menor concentración de unión detectada para ambos péptidos fue de 10 pmol/pocillo. Los péptidos OR3 a 5 mostraron unión altamente específica con  $\alpha$ -sinucleína agregada a 200 pmol/pocillo de  $\alpha$ -sinucleína (Figuras 3C, D, E). La menor concentración de unión detectada para los tres péptidos fue de 10 pmol/pocillo. Las propiedades de unión de los péptidos 6 y 7 con  $\alpha$ -sinucleína de recubrimiento nueva o envejecida también se ensayaron. La unión para los péptidos 6 y 7 fue detectable cuando se usó  $\alpha$ -sinucleína agregada para recubrir a 500 pmol/pocillo (datos no mostrados).

55 El péptido OR5 mostró unión altamente específica con todas las formas de  $\alpha$ -sinucleína agregada (Figura 5) con especificidad particularmente alta para  $\alpha$ -sinucleína tratada con dopamina. La menor concentración de unión detectada para  $\alpha$ -sinucleína tratada con dopamina fue de 1 pmol/pocillo. La  $\alpha$ -sinucleína tratada con dopamina y nitrada son aproximaciones fisiológicas de los agregados solubles (o aductos) presentes durante los estadios tempranos de las enfermedades sinucleinopáticas. En consecuencia estos datos confirman que los péptidos de la invención tienen propiedades adecuadas para la detección y diagnóstico tempranos de dichas enfermedades.

60 En los experimentos de control se recubrieron placas de microtitulación con diversas concentraciones de otras proteínas asociadas con la formación de fibrillas amiloides en enfermedades neurodegenerativas, en particular, el componente principal de los agregados proteicos en enfermedad de Alzheimer ( $A\beta$ ), el péptido de la demencia británica (ABri). Se demostró que los péptidos de la invención no tenían afinidad por  $A\beta$  (Figura 7) o ABri (datos no mostrados).

**Ensayos de inmuno-oro**

Se colocaron rejillas de cobre en 50  $\mu$ l de  $\alpha$ -sinucleína agregada 50  $\mu$ M durante 1 hora y después se lavaron en 50  $\mu$ l de PBS durante 2 minutos antes de colocarse en 50  $\mu$ l de tampón de bloqueo (Vector) durante 1 hora 30 minutos. Las rejillas se lavaron 5 veces con PBS (5 minutos cada vez) y después se empararon en péptido 5 0,1  $\mu$ g/ml (en tampón de bloqueo) o solamente tampón de bloqueo (control negativo) durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron después 5 veces con PBS (5 minutos cada vez) y se empaparon en 50  $\mu$ l de marcador de estreptavidina-oro (1:50) en tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron de nuevo 5 veces con PBS (5 minutos cada vez) y se empaparon en 50  $\mu$ l de acetato de uranilo (2 % en agua destilada) durante 1 minuto a temperatura ambiente antes de observarse bajo un microscopio electrónico de transmisión. Los resultados indican que los péptidos OR5 y OR7 se unen a agregados de  $\alpha$ -sinucleína preformados (Figura 6). No se detectó señal de oro en la rejilla de control negativo lo que indica que no hay unión no específica de marcador de estreptavidina-oro.

**Ejemplo 3: Unión de péptidos de recubrimiento con agregados de  $\alpha$ -sinucleína libres**

Se recubrió una placa de microtitulación con péptidos (100 pmol/pocillo) para secar durante una noche a 37 °C. Los péptidos se fijaron después a la placa de microtitulación. Después de lavar con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (PBS) y bloquear con tampón de bloqueo (PBS que contenía gelatina 2,5% y Tween 20 0,05 %), se añadieron diversas concentraciones (0,001-200 pmol/pocillo) de solución de  $\alpha$ -sinucleína nueva o agregada (producida por envejecimiento) o proteína BSA (control negativo) y se incubaron durante 1,5 horas a TA.

La unión de  $\alpha$ -sinucleína con los péptidos se cuantificó usando anticuerpo ligado a enzima específico para  $\alpha$ -sinucleína. Brevemente, las placas se lavaron tres veces con PBST antes de la adición del anticuerpo de  $\alpha$ -sinucleína de conejo policlonal FL-140 a 1:1000 (en PBS). Las placas se lavaron después tres veces con PBST antes de la adición de sustrato de peroxidasa de TMB. Las placas se dejaron durante 15 minutos a TA para que se desarrollara el color. La reacción se detuvo mediante adición de 100  $\mu$ l/pocillo de ácido sulfúrico 0,5 M y las placas se leyeron a 450 nm en un espectrofotómetro.

Los péptidos OR4 (Figura 4A) y 5 (Figura 4B) capturaron más de la sinucleína agregada que de la nueva. Estos resultados confirman que los péptidos de la invención son más específicos para fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína que  $\alpha$ -sinucleína monomérica.

**Ejemplo 4: Capacidad de los péptidos de la invención para entrar en células neuronales vivas**

Se cultivaron células de neuroblastoma SH-SY5Y o M17 en 15 ml de medio en matraces confluentes antes de dividir cada suspensión en placas de Petri y permitir que las células crecieran en cubreobjetos ( $\sim 5 \times 10^3$ /placa) hasta el día siguiente. Después las células se incubaron con diferentes péptidos a 50  $\mu$ M en medio de cultivo (volumen total = 2 ml). Se incluyó un péptido idéntico al péptido OR1 pero sin la poli D-arginina [r<sub>6</sub>] como un control. Después de 15 minutos de incubación con péptidos respectivos, las células se lavaron 3 veces con PBS. Se añadieron 2 ml de solución de fijación (paraformaldehído 4 % en PBS) a las células que se incubaron después durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el tampón de fijación y se añadieron 2 ml de tampón de permeabilización (Triton-X-100 0,2 % en PBS) a las células durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se retiraron. Se añadieron 2 ml de tampón de bloqueo, se dejaron durante 1 hora a TA y después se retiraron antes de la adición de FITC 1:100 [fluoresceína marcada con avidina] (Vector Labs) en tampón de bloqueo. Las células se incubaron durante 1 hora y después se lavaron dos veces con PBS 0,05 % Tween. Los cubreobjetos se retiraron y se sembraron en placas con la superficie que portaba las células hacia abajo en un portaobjetos de vidrio, con la adición de una gota de medio de montaje (Dako Cytomation). Las células se visualizaron después bajo microscopio confocal.

Se observaron péptidos marcados con fluorescencia de la invención como una señal fluorescente en todas las células SH-SY5Y vivas (Figura 8) y se descubrió que se distribuían en todas las células, mientras que las células tratadas con el péptido de control no mostraron señal fluorescente en ninguna célula viva. Los péptidos 1 a 5 se observaron como señales fluorescentes en células vivas después de 30 minutos de incubación; los péptidos 6 y 7 se observaron en células vivas después de 2 y 4 horas de incubación respectivamente. Se obtuvieron resultados similares para las células M17 (datos no mostrados). Por lo tanto los péptidos de la invención tienen la capacidad de cruzar membranas celulares y entrar en células neuronales vivas.

**Ejemplo 5: eliminación celular de péptidos**

Se ensayó la capacidad de las células de eliminar los péptidos después de que hubieran entrado en las células. Se incubaron células con los péptidos durante 30 minutos a 37 °C para dejar que captaran los péptidos. Después se reemplazó el medio celular por medio nuevo sin péptidos y se incubó durante un periodo de hasta 24 horas. Las células habían eliminado los péptidos ya a los 5 minutos, y en 1 hora las células habían conseguido eliminar los péptidos completamente (Figura 9). Curiosamente, después de 4 horas las células mostraron de nuevo alguna

captación de los péptidos, que se eliminaron de nuevo dentro de un periodo de 24 horas.

#### **Ejemplo 6: evaluación de la citotoxicidad de péptidos de la invención**

- 5 La citotoxicidad de los péptidos sobre la línea celular de neuroblastoma humano M17 se ha evaluado usando un ensayo de MTT convencional. El ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], descrito por primera vez por Mosmann (J Immunol Methods. 1983; 65(1-2): p 55-63), se basa en la capacidad de una enzima deshidrogenasa mitocondrial procedente de las células viables para escindir los anillos de tetrazolio del tinte MTT de color amarillo pálido y formar cristales de formazán de color azul oscuro ante los que son muy impermeables las
- 10 membranas celulares, produciéndose de esta manera su acumulación dentro de las células sanas. La solubilización de las células por la adición de un detergente da como resultado la liberación de los cristales que están solubilizados. El número de células supervivientes es directamente proporcional al nivel de producto de formazán creado. Después se cuantifica el color mediante un ensayo colorimétrico sencillo en un espectrofotómetro.
- 15 Como se muestra en la Figura 10, nueve de los péptidos OR1 a 4 mostraron alguna citotoxicidad significativa hacia las células M17 después del tratamiento con una concentración 1-50  $\mu$ M de los péptidos durante un periodo de hasta 48 horas. Se obtuvieron resultados similares con los péptidos OR5 a 7 (datos no mostrados) y para todos los péptidos con la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano.

#### **Ejemplo 7: confirmación de la unión de péptidos biotinilados a oligómeros amiloides de $\alpha$ -sinucleína por transferencia puntual**

- 25 La unión de los péptidos a la  $\alpha$ -sinucleína oligomérica también se ensayó usando transferencia puntual. Se aplicaron puntualmente  $\alpha$ -sinucleína monomérica (solución de  $\alpha$ -sinucleína nueva) y  $\alpha$ -sinucleína oligomérica ( $\alpha$ -sinucleína tratada con dopamina) en una membrana de nitrocelulosa. Después de secar las muestras a temperatura ambiente durante 2 horas, las membranas se bloquearon y después se añadieron el MAb 211 anti- $\alpha$ -sinucleína o péptidos biotinilados a las membranas y se incubaron durante 1,5 h a temperatura ambiente. Después de un lavado suave, las membranas se trataron con extravidina-peroxidasa o anti-ratón-peroxidasa, según fue apropiado. La unión de 211 y los péptidos se detectó usando reactivos ECL (Pierce). Como se muestra en la Figura 11, los péptidos
- 30 biotinilados se unen específicamente a las formas oligoméricas pero no monoméricas de la  $\alpha$ -sinucleína.

#### **Ejemplo 8: investigación de la unión de los péptidos a agregados de $\alpha$ -sinucleína nativos en cerebro**

##### ***ELISA***

- 35 Usando un anticuerpo específico para las fibrillas de  $\alpha$ -sinucleína (anti-FILA - donación de Poul Jensen, University of Aarhus, Dinamarca), el inventor ha desarrollado un ELISA para cuantificar agregados de  $\alpha$ -sinucleína nativa en lisados de cerebro humano. Se homogeneizaron muestras de cerebro post mórtem congeladas de corteza cerebral frontal, de pacientes de control, con EA y DCL en tampón de lisis que consistía en un detergente suave y un cóctel
- 40 de inhibidores de proteasa. Las muestras se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes. Se midió la concentración total de proteína en las muestras y después se ajustó a 3 mg/ml antes del análisis por el ELISA. Las muestras cerebrales se aplicaron como un recubrimiento sobre una placa de microtitulación para la incubación durante una noche a 37 °C, y después del lavado, seguido por el bloqueo, se añadió anti-FILA a los pocillos y la mezcla se incubó durante 2 horas. La unión de anti-FILA a los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en las muestras de
- 45 cerebro se cuantificó por anticuerpo anti-conejo marcado con HRP. El anti-FILA proporcionó una señal fuerte en la mayoría de las muestras de DCL y únicamente en muy pocas muestras de EA en comparación con las medidas en las muestras de cerebro de control.

- 50 Los péptidos de la invención ensayados usando este método ELISA demostrarán su unión a los agregados de la  $\alpha$ -sinucleína nativa en cerebros humanos de pacientes con DCL.

##### ***Inmunohistoquímica***

- 55 La unión de los péptidos se investigó usando secciones de 5 mm en parafina de cerebros EP y DCL post mórtem fijados con formalina, o secciones de criostato de los cerebros frescos congelados. Las secciones primero se sometieron a inmunotinción con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína (MAb 211 o FL-140) como control y después se compararon en el microscopio con secciones sucesivas incubadas con los péptidos ensayados, y peroxidasa-avidina, para determinar si los Cuerpos de Lewy (CL) en el cerebro post mórtem se marcan por los péptidos.
- 60 Se sumergieron secciones cerebrales en agua y se pusieron en portaobjetos, y después se incubaron en xileno durante 5 min. Se cambió el xileno y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos más, antes de detener la actividad peroxidasa endógena por incubación con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol a temperatura ambiente durante 30 min. Después, los portaobjetos se lavaron con lo siguiente: etanol al 100 % 5 min, etanol al 100 % 5 min, etanol al 90 % 5 min, etanol al 70 % 5 min, ácido fórmico 5 min, etanol al 70 % 5 min, agua destilada (3 cambios) 5
- 65 min y PBS 5 min. Los portaobjetos se incubaron en tampón de bloqueo (Vector Labs) durante 90 min a 37 °C y se

lavarón en PBS durante 5 min. Se añadió anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína FL-140 en tampón de bloqueo y se incubó durante una noche a 4 °C, antes del lavado con PBS (3 cambios durante 5 min). Después se añadió anticuerpo de cabra anti-conejo-FITC (1:100 en tampón de bloqueo) y se incubó durante 1 hora a 37 °C, antes del lavado con PBS (3 cambios durante 5 min). Después se montaron los portaobjetos para la visualización con un microscopio de fluorescencia; el F1-140 mostró tinción específica en los CL (véase la Fig. 12A).

Después se evaluó la unión de los péptidos en secciones de criostato de 5 mm de cerebros EP post mórtem congelados. Los portaobjetos se incubaron en tampón de bloqueo (Vector Labs) y se lavaron en PBS. Se añadió péptido OR5 (0,05 mg/ml) en tampón de bloqueo y se incubó durante una noche a 4 °C, antes del lavado con PBS. Después se añadió avidina-FITC (1:100 en tampón de bloqueo) y se incubó durante 1 hora a 37 °C, antes del lavado con PBS. Después se montaron portaobjetos y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. El péptido OR5 mostró tinción específica en los CL como se muestra en la Fig. 12B. los resultados demuestran que OR 5 se une específicamente a los CL en secciones cerebrales EP post mórtem.

### 15 **Ejemplo 9: investigación de la unión de compuestos OR biotinilados a agregados de $\alpha$ -sinucleína en modelos celulares**

Este ejemplo utiliza el sistema SH-SY5Y regulado por TET-off inducible del Dr. Kostas Vekrellis (Foundation For Biomedical Research Academy of Athens). Se ha mostrado que estas células transfectadas producen agregados tanto solubles como insolubles de  $\alpha$ -sinucleína. La unión de los compuestos OR a los agregados de  $\alpha$ -sinucleína se investigó en este modelo celular.

Se cultivaron células que expresaban A53T en cubreobjetos en medio sin doxiciclina y se diferenciaron durante 7 días añadiendo ácido retinoico a una concentración 10  $\mu$ M. El día 6, las células se trataron con MG132 1  $\mu$ M en medio que contenía ácido retinoico durante 24 horas. Se añadieron al medio OR5, 6 y 7 biotinilados a una concentración 5  $\mu$ M durante 1, 2 y 4 horas, respectivamente, a 37 °C.

Después se cambió el medio para las células con medio nuevo sin péptidos y después se incubaron durante otros 15 min para que las células eliminaran los péptidos no unidos a los agregados de  $\alpha$ -sinucleína. Las células se fijaron y después se trataron con Triton X al 0,2 % en PBS durante 15 minutos a TA, y después del lavado con PBS, se añadió el tampón de bloqueo, BSA al 0,5%.

Las células se tiñeron con anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína (MAb 211 o FL-140 (Santa Cruz Biotechnology)), y con Estreptavidina-FITC (Sigma). Se detectaron agregados de  $\alpha$ -sinucleína después de la tinción con anticuerpo anti-ratón-TRITC (Sigma) o anticuerpo anti-conejo-TRITC (Jackson ImmunoResearch Inc.) según fue apropiado.

La formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína se investigó en las células diferenciadas usando microscopía de fluorescencia. Los dos anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína mostraron tinción dispersa de pequeños agregados de  $\alpha$ -sinucleína; se forman unos pocos agregados en la región perinuclear (Fig. 13A y 13B). Sin embargo, en las células indiferenciadas, la  $\alpha$ -sinucleína estaba distribuida de forma difusa a lo largo de todo el citoplasma (datos no mostrados). También se investigó la tinción de los compuestos OR biotinilados a los agregados de  $\alpha$ -sinucleína en las células. Los resultados indican que los péptidos OR5, 6 y 7 se unen a agregados de  $\alpha$ -sinucleína formados dentro de las células (Fig. 13A y 13B). Curiosamente, los agregados de  $\alpha$ -sinucleína se tenían conjuntamente con el anticuerpo para  $\alpha$ -sinucleína y los compuestos OR biotinilados. No se detectó señal en las células de control negativo (datos no mostrados), lo que indica que no hay unión no específica de estreptavidina-FITC o anticuerpo anti-ratón-TRITC y anticuerpo anti-conejo-TRITC a agregados de  $\alpha$ -sinucleína. La colocalización de los compuestos OR biotinilados con anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína en las células indica su unión a los mismos agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

### 50 **Ejemplo 10: investigación microscópica de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y farmacocinética de los compuestos principales en ratones normales**

En ratones normales se inyectaron por vía intravenosa 100  $\mu$ g/100  $\mu$ l de péptido OR6 y 50  $\mu$ g/200  $\mu$ l de péptido 5 o solución de PBS (n = 2 para cada grupo). Los animales en los que se inyectó OR6 se sacrificaron después de 5, 15, 30 y 60 min, mientras que los ratones en los que se inyectó OR5 se sacrificaron después de 5, 10, 15, 20 y 30 min. Se retiraron los cerebros enteros, riñones e hígados. Los tejidos se fijaron en formaldehído al 10 % en tampón fosfato (PB) durante una noche a temperatura ambiente (TA) y al día siguiente se transfirieron a sacarosa al 30 % en PB y se incubaron durante otra noche a 4 °C. Después, los cerebros se cortaron en secciones congeladas de 70 mm usando un criostato. Los cortes cerebrales se lavaron con PBS antes de incubarse con peróxido de hidrógeno al 3 % (en etanol al 50 %) durante 30 min a TA. Después del lavado con PBS, las secciones se incubaron con Extravidina peroxidasa (1:500 en PBS que contenía Triton al 0,3 %) y se incubaron durante 1 hora a TA, antes del lavado con PBS (2 cambios durante 5 min) y el último lavado en PB. Se aplicó DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina) durante 15 min, antes de lavar 3 veces en PB durante 5 min. Las secciones se pusieron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se dejaron secar durante una noche. Al día siguiente, los portaobjetos se hidrataron en agua durante 3 min y después se deshidrataron durante 5 min en cada uno de: etanol al 50 %, etanol al 70 %, etanol al 95 %, etanol

al 100 % (2 veces) y xileno (2 veces). Los portaobjetos después se montaron en DPX-xileno para la visualización con el microscopio.

#### *Péptido OR5*

5 Los resultados farmacocinéticos derivados de los datos inmunohistoquímicos sugieren que 5 min después de inyectar OR5 en los ratones, se observó un patrón débil y difuso de tinción a lo largo del tálamo, el mesencéfalo y el cerebelo. Diez minutos después de la inyección, la tinción se había extendido al interior del hipocampo, el puente de Varolio así como el tálamo. Después de este momento, la tinción cerebelar se localizó en la periferia del cerebelo.  
10 Quince minutos después de la inyección, apareció tinción de OR5 en el tronco encefálico incluyendo el mesencéfalo y el puente de Varolio, así como el tálamo. La tinción en estas áreas se mantuvo hasta 30 min después de la inyección. Además, en este momento la tinción en el cerebelo se había extendido a lo largo de todas las regiones cerebelares incluyendo su interior.

#### 15 ***Péptidos OR6 y OR7***

Los resultados farmacocinéticos para el péptido OR6 sugieren que el péptido atravesaba la BHE y se teñía con bastante intensidad en el mesencéfalo 5 min después de la inyección. También se observó una tinción débil pero específica en el hipotálamo, tálamo y la periferia del cerebelo tanto 5 como 15 min después de la inyección. La tinción del péptido 6 en el cerebelo alcanza su máximo 30 min después de la inyección y tiñe todo el interior y la periferia del cerebelo, de forma similar al patrón de tinción cerebelar observado con el péptido 5. Treinta minutos después de la inyección, la tinción en el tálamo y el mesencéfalo se vuelve más fuerte y también se observó tinción en el hipocampo. La tinción en el hipocampo y el mesencéfalo observada 30 min después de la inyección se mantiene 1 hora después de la inyección y adicionalmente se observó tinción en el hipotálamo. Sin embargo, la tinción en el cerebelo empezó a ser más débil en este momento, posiblemente debido a la eliminación del péptido 6 de esta región. Se obtuvieron resultados similares para el péptido OR7.

#### ***Conclusión***

30 Los tres péptidos atraviesan la BHE y durante el transcurso del tiempo parecen localizarse en diversas regiones del cerebro. Se observó tinción del péptido OR5 en el tálamo, mesencéfalo, tronco encefálico e hipocampo, mientras que OR6 y 7 preferentemente se teñían en el hipotálamo, mientras que presentaban una tinción más fuerte en el tálamo, mesencéfalo así como en el hipocampo. Por otra parte, los tres péptidos mostraron patrones de tinción cerebelar similares con el tiempo, pero, 1 hora después de la inyección, el péptido 6 podría haberse eliminado del cerebelo, como se sugiere por la tinción más débil observada. Ciertos experimentos previos también han sugerido que el péptido OR5 podría eliminarse del cerebelo después de una hora. La mayor tinción vista con OR6 y 7 puede atribuirse a la mayor dosis del péptido inyectada en los ratones.

#### 40 **Ejemplo 11: investigación por MRI de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) de los compuestos principales**

Al extremo N de los compuestos principales se une gadolinio (Gd), un agente de contraste paramagnético usado en la formación de imágenes MRI. El Gd acorta T1, T2 y T2\*. Esto da como resultado una elevación de la intensidad de las imágenes ponderadas en T1 y una reducción de las imágenes ponderadas en T2/T2\*.

45 Para confirmar que los compuestos están unidos a Gd, se comparó un tubo que contenía agua con un tubo que contenía una solución de un compuesto particular (a 82,2  $\mu$ M) disuelto en agua. Por ejemplo, el péptido OR7 proporcionó un aumento de señal en una imagen ponderada en T1 como resultado del contenido de Gd en el compuesto. Se obtuvieron resultados similares para los péptidos OR5 y OR6.

50 Después se ensayaron los péptidos OR5, 6 y 7 en ratones de control C57BL6 normales y ratas wistar usando MRI para investigar su permeabilidad BHE y biodistribución en el cerebro.

#### ***Seguimiento de bolo (T2/T2\*)***

55 El Gd, inyectado por vía intravenosa a través de un catéter, puede visualizarse por MRI durante el primer paso de un bolo de Gd a través del cerebro como una reducción de la señal. Si el Gd se escapa al interior del tejido cerebral, se espera un aumento de la señal secundaria. La dosis de Gd normal administrada a roedores para los experimentos de seguimiento de bolo es de 0,2 mmol Gd/kg. Sin embargo, todos los experimentos se realizaron con bajas concentraciones de Gd (es decir, menores de 0,2 mmol Gd/kg).

#### ***Creación de mapas de T1***

65 Se crearon mapas de T1 antes y después de la inyección intravenosa. Comparando los valores de T1 en los mapas es posible evaluar la distribución de los compuestos que aparecen en las imágenes a lo largo de todo el cerebro y la presencia de Gd en ciertas regiones. El tiempo de registro para un mapa de T1 fue 40 min. La Figura 14A muestra

un ejemplo de un mapa de T1. Los valores de T1 se representan por diferentes valores de gris. Se usaron dos sistemas para los experimentos: sistemas de MRI de alto campo de Bruker Biospin, un Pharmascan 70/16 y un BioSpec 94/20 USR con un campo magnético, respectivamente, de 7 T y 9,4 T. Los animales se anestesiaron con el anestésico de inhalación isoflurano que se administró con una mezcla de gases 1:2 de O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>.

5 El procesamiento posterior de los datos se realizó con un software de imágenes Bruker Para Vision 4.0, rutinas Matlab autoescritas y Amira 4.0 (Mercury computer systems, Inc.).

**Péptido OR 7**

10 Para la formación de imágenes MRI *in vivo*, en ratas normales se inyectaron por vía intravenosa 2 mg de OR7 en 0,1 ml de PBS para proporcionar 0,0012 mmol de Gd (más de 40 veces menos que la concentración de Gd usada normalmente).

15 Después de la inyección del bolo del compuesto, no se observó el primer paso, probablemente debido al bajo volumen y/o concentración, pero se detectó un aumento de la señal que demostraba que OR7 había atravesado la BHE. La figura 14B representa la región de interés mostrada a la derecha del gráfico (el cerebro entero); también se observó el mismo perfil de tiempo para regiones más pequeñas.

20 Para el experimento de seguimiento de bolo, se seleccionaron posiciones específicas en el cerebro ya que solo es posible un único modo de corte. Esto limitó la información espacial de lo que estaba ocurriendo en las otras regiones. Después se tomaron estas imágenes anatómicas del bolo en múltiples cortes (ponderado en T2) para detectar fugas más focales de Gd. En estas imágenes no se vieron manchas de Gd (debido a la menor intensidad).

25 Los datos de seguimiento de bolo sugieren claramente una retención de OR7 en el cerebro después de la inyección de una alta dosificación que contiene (0,0012 mmol Gd y 2 mg de péptido) en una rata.

**Péptido OR6**

30 En este experimento se realizó el mapa de T1 pero no el seguimiento de bolo. T1 se midió antes de la inyección y el ratón se retiró del imán. Después, al ratón se le inyectó solución de OR6 (0,3 mg que contenían 0,18 µmol de Gd) disuelta en 0,15 ml de solución salina; la solución se inyectó lentamente de forma directa en la vena sin el uso de un catéter de larga distancia (para esto se necesita un menor volumen). El ratón se puso de nuevo en el imán y se midió otra vez el valor de T1.

35 En la tabla mostrada a continuación se presentan los valores medios de T1 para 3 regiones en el cerebro: Putamen Caudado (CPu), Hipocampo (Hippo) y núcleo Mesencéfálico Profundo (DpMe). El putamen caudado se segmentó porque es una región grande en la parte frontal del cerebro; el hipocampo es una región importante que está localizada cerca de los ventrículos.

40 En la Tabla 2, se presentan los valores de T1 para el ratón ensayado. B = antes de la inyección, A = 15 min después de la inyección (la duración del registro es 40 min) y A3d = 3 días después de la inyección. Los valores de T1 se redujeron significativamente en todas las regiones después de la inyección con solución de OR6, y después de 3 días las señales se recuperaron hasta los valores normales.

45

**Tabla 2**

OR6	B	A	A3d
CPu	1747	1008	1705
Hippo	1771	1045	1752
DpMe	1630	940	1532

**Péptido OR5**

50 En dos ratones se inyectaron 0,20 ml y 0,15 ml de solución de OR5 a 0,4 mg/ml que contenía 0,165 µmol y 0,124 µmol de Gd respectivamente. En el primer ratón, fue visible un primer paso después de la inyección así como un aumento de la señal posteriormente, lo que significa que cuando se inyectaba OR5 atravesaba la BHE.

55 También se evaluó el segundo ratón y se creó un mapa de T1 como se ha indicado anteriormente para OR6.

La Tabla 3 presenta los valores de T1 para el segundo ratón. (B = antes de la inyección, A = 15 min después de la inyección (la duración del registro fue 40 min)). Después de la inyección, hubo una ligera reducción de los valores de T1 en las tres regiones segmentadas, lo que sugiere que el Gd queda retenido en estas áreas. La reducción de la

señal era muy pequeña, lo cual es coherente con la pequeña cantidad de Gd que se administró.

**Tabla 3**

	A	B
CPu	1930	1894
Hippo	1979	1923
DpMe	1612	1599

5 El experimento se repitió para OR5 con una menor concentración. Se inyectó una solución que comprendía 0,5 mg/ml de OR5 en un tercer ratón con 0,30 ml (0,150 mg de OR5 y 0,0618  $\mu$ mol de Gd) y en un cuarto ratón se inyectaron 0,1 ml de solución (0,050 mg de péptido 5 y 0,0206  $\mu$ mol de Gd). Los resultados se muestran en la Tabla 4. Para el ratón 4, se registraron dos mapas de T1 sucesivos después de las inyecciones para observar la evolución de los valores de T1 en el tiempo. El registro del segundo mapa (A2) se inició 55 min después de la inyección.

10

**Tabla 4**

Nº de ratones	3		4		
	B	A	B	A1	A2
CPu	1694	1673	1640	1627	1633
Hippo	1783	1759	1787	1786	1781
DpMe	1514	1462	1457	1460	1479

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> UNIVERSIDAD DE LOS EMIRATOS ÁRABES  
 <120> AGENTE DE DIAGNÓSTICO  
 <130> N.100673A  
 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens
- 25 <400> 1



ES 2 436 424 T3

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys  
 20 25 30  
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val  
 35 40 45  
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr  
 50 55 60  
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys  
 65 70 75 80  
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys  
 85 90 95  
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile  
 100 105 110  
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro  
 115 120 125  
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala  
 130 135 140

<210> 2  
 <211> 35  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr  
 20 25 30  
 Gly Phe Val  
 35

10  
 <210> 3  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

Gly Gly Ala Val Val Thr Gly  
 1 5

20  
 <210> 4  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 4

Gly Ala Val Val  
 1

ES 2 436 424 T3

<210> 5  
<211> 5  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
  
<400> 5

Ala Val Val Thr Gly  
1 5

10  
<210> 6  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15  
<400> 6

Val Val Thr Gly  
1

20 <210> 7  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25 <400> 7

Val Thr Gly  
1

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende:
- 5 i) la secuencia de aminoácidos DThr-DVal-DVal-DAla o DVal-DVal-DAla;  
 ii) un péptido de poli-D-Arginina unido al extremo N o C de la secuencia de (i) por un resto de glicina o N-metilglicina y/o cualquier otro espaciador; y  
 iii) un marcador detectable o un sustituyente capaz de formar un complejo con un marcador detectable.
- 10 2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sustituyente capaz de formar un complejo con un marcador detectable es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris(éster *t*-butílico de ácido acético)-10-acético (DOTA) unido al extremo N del péptido.
- 15 3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el marcador detectable es un agente de contraste.
4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, donde el agente de contraste comprende iones de gadolinio.
5. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, representado por una cualquiera de las fórmulas (I) a (VI):
- 20 (I) DOTA-DArg-Nmetilglicina-DVal-DVal-DAla-N-metilglicina-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]  
 (II) DOTA-DArg-Nmetilglicina-DThr-DVal-DVal-DAla-Nmetilglicina-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]  
 (III) DOTA-DArg-Glicina-DVal-DVal-DAla-Glicina-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]  
 (IV) DOTA-DArg-Glicina-DThr-DVal-DVal-DAla-Glicina-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]  
 25 (V) DOTA-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]-Glicina-DVal-DVal-DAla-Glicina-DArg  
 (VI) DOTA-poli-D-Arginina[r<sub>6</sub>]-Glicina-DThr-DVal-DVal-DAla-Glicina-DArg  
 (VII) DOTA-DArg-Nmetilglicina-DVal-DVal-DAla-N-metilglicina-butadiamina  
 (VIII) DOTA-DArg-Nmetilglicina-DVal-DVal-DAla-N-metilglicina-pentadiamina
- 30 6. Un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 adaptado para facilitar su entrada en células biológicas, o a través de barreras biológicas, opcionalmente donde el péptido está adaptado por la adición de un péptido de soporte al que es permeable la membrana seleccionado entre Tat-(48-60) de VIH, cubierta (35-49) del virus cabaña (FHV), Antennapedia-(43-58) de *Drosophila* (43-58), péptidos básicos o poliaminas.
- 35 7. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para el uso en el diagnóstico de una enfermedad sinucleinopática en la que está implicada la  $\alpha$ -sinucleína y/o uno o más fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína.
8. Un método para formar imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en un sujeto, comprendiendo dicho método detectar la unión de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a agregados de  $\alpha$ -sinucleína, donde el método comprende administrar dicho péptido a dicho sujeto por medios no quirúrgicos.
- 40 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde los agregados de  $\alpha$ -sinucleína están presentes en un sujeto humano o animal; y/o dicho péptido se detecta por imágenes de resonancia magnética (MRI).
- 45 10. Un método *in vitro* para diagnosticar una enfermedad sinucleinopática en la que está implicada la  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método las etapas de
- (a) combinar *in vitro* una muestra de tejido y/o fluido biológico (por ejemplo, sangre, LCR, orina) del paciente con un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 durante un tiempo y en condiciones  
 50 eficaces para permitir la unión del péptido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes en dicha muestra; y  
 (b) detectar de esta manera la presencia o ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en dicha muestra, donde la presencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto tiene una enfermedad sinucleinopática y la ausencia de agregados de  $\alpha$ -sinucleína indica que el sujeto no tiene dicha enfermedad sinucleinopática.
- 55 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además:
- (c) cuantificar la cantidad de péptido unido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína en dicha muestra; y que opcionalmente comprende además:
- 60 (d) combinar una muestra adquirida posteriormente de tejido del paciente con una cantidad de péptido durante un tiempo y en condiciones eficaces para permitir la unión de los agregados del péptido de  $\alpha$ -sinucleína presentes en la muestra adquirida posteriormente;
- (e) cuantificar la cantidad de péptido unido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra adquirida posteriormente;
- (f) comparar la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra de la etapa (c) con la cantidad de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra de la etapa (e); y
- 65 (g) determinar de esta forma si se ha alterado el estado del paciente, donde una cantidad de  $\alpha$ -sinucleína en la

muestra de la etapa (e) mayor que en la muestra de la etapa (c) indica que el estado del paciente ha empeorado, y donde una cantidad de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra de la etapa (c) mayor que en la muestra de la etapa (e) indica que el estado del paciente ha mejorado.

- 5 12. Un método para controlar una enfermedad sinucleinopática en la que está implicada la  $\alpha$ -sinucleína y/o uno o más fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método administrar un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a un sujeto por medios no quirúrgicos y detectar la cantidad y/o el tamaño de cualquier agregado de  $\alpha$ -sinucleína que se haya formado por la  $\alpha$ -sinucleína sola o por  $\alpha$ -sinucleína complejada con cualquier otra proteína.
- 10 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho sujeto se somete a terapia para tratar dicha enfermedad sinucleinopática y dicho método es para controlar la eficacia de dicha terapia.
- 15 14. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como en la reivindicación 7, o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la enfermedad sinucleinopática es enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA), demencia de cuerpos de Lewy (DCL) o atrofia multisistémica (AMS).
- 20 15. El método de la reivindicación 10 u 11, donde el marcador del péptido comprende un radiomarcador, un marcador enzimático, un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente o un marcador antigénico; opcionalmente donde la presencia del péptido unido a  $\alpha$ -sinucleína soluble y/o agregados de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra se detecta por autorradiografía, tomografía de emisión de positrones, formación de imágenes por resonancia magnética nuclear, un contador gamma o un contador de centelleo.
- 25 16. Un método *in vitro* para controlar la eficacia de un agente terapéutico que se ha administrado para tratar una enfermedad sinucleinopática en la que está implicada la  $\alpha$ -sinucleína y/o uno o más fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo el método analizar una muestra de un modelo animal con respecto a la presencia y cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína; de acuerdo con las siguientes etapas:
- 30 (a) combinar *in vitro* una muestra del sujeto con un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 durante un tiempo y en condiciones eficaces para permitir la unión del péptido a agregados de  $\alpha$ -sinucleína presentes en la muestra; y  
(b) detectar de esta manera la presencia y cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en la muestra.
- 35 17. Un método para controlar la eficacia de un agente terapéutico que se ha administrado para tratar una enfermedad sinucleinopática en la que están implicados  $\alpha$ -sinucleína y/o fragmentos de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo el método obtener imágenes del cerebro de un modelo animal no humano con respecto a la presencia y cantidad de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho método detectar la unión de un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a agregados de  $\alpha$ -sinucleína.
- 40 18. Un kit para formar imágenes de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, comprendiendo dicho kit un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y medios no quirúrgicos para administrar el péptido a un sujeto.

Fig.1.

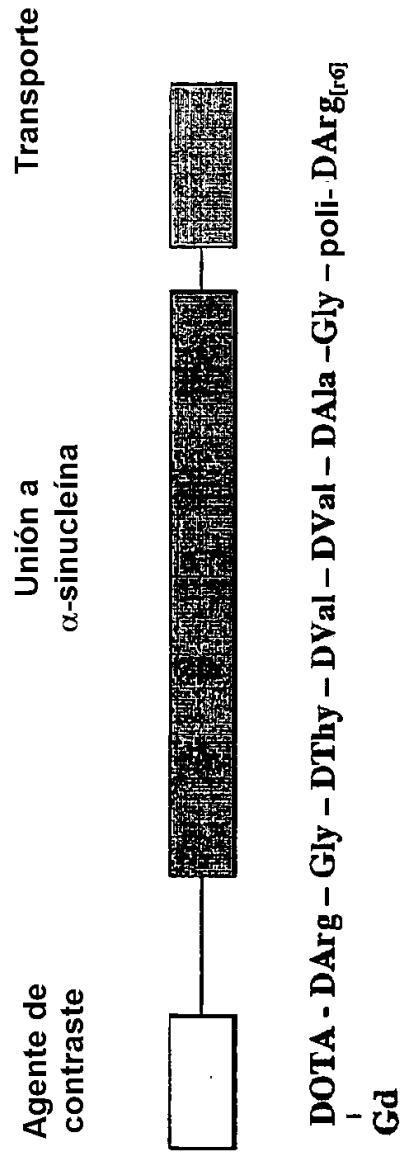


Fig.2A.

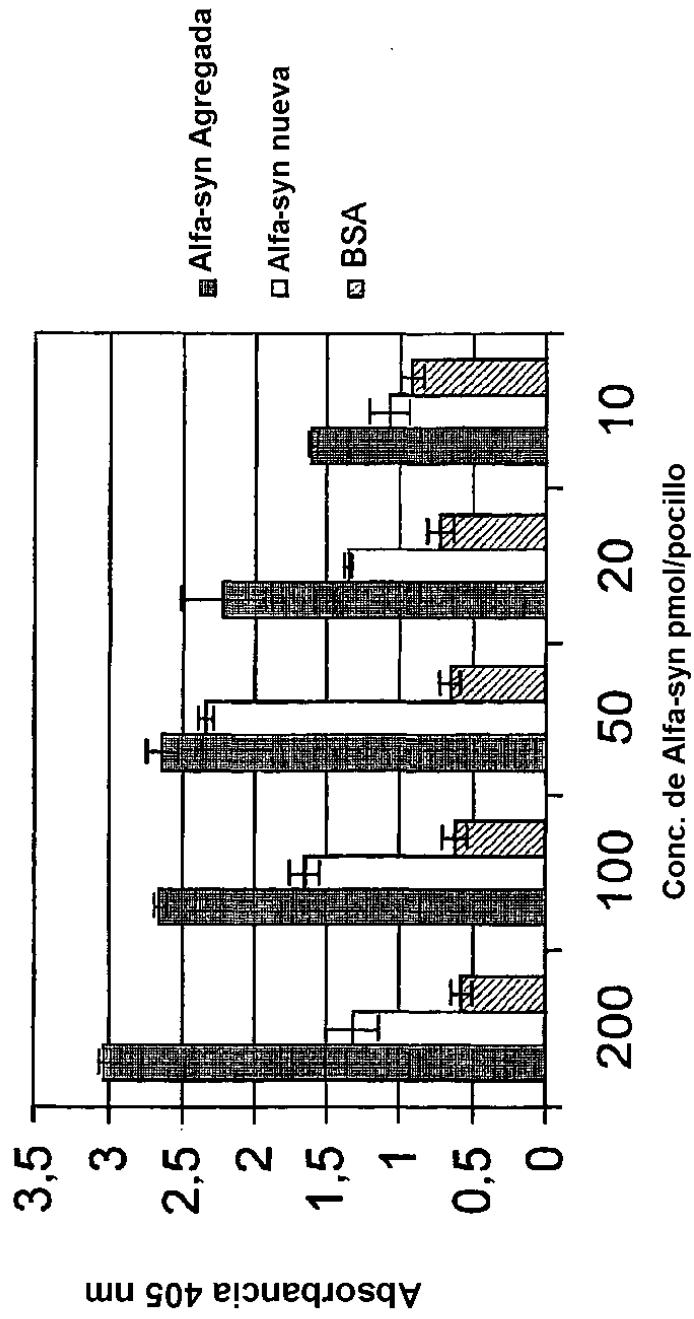


Fig.2B.

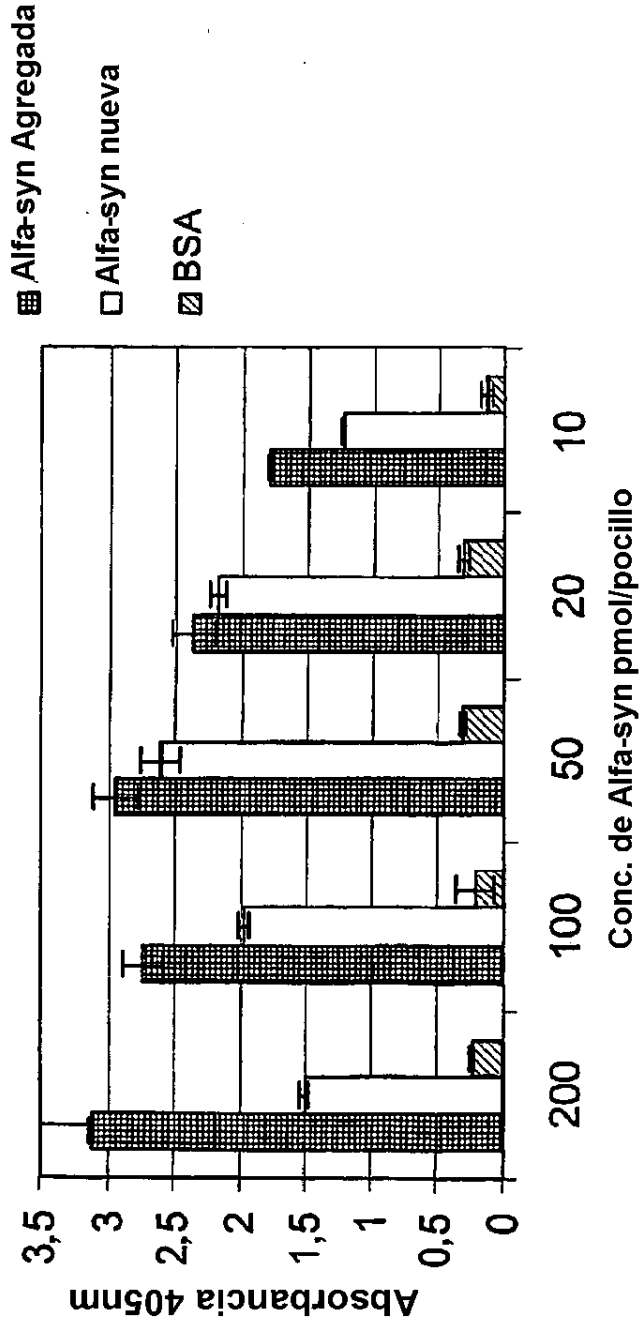


Fig.2C.

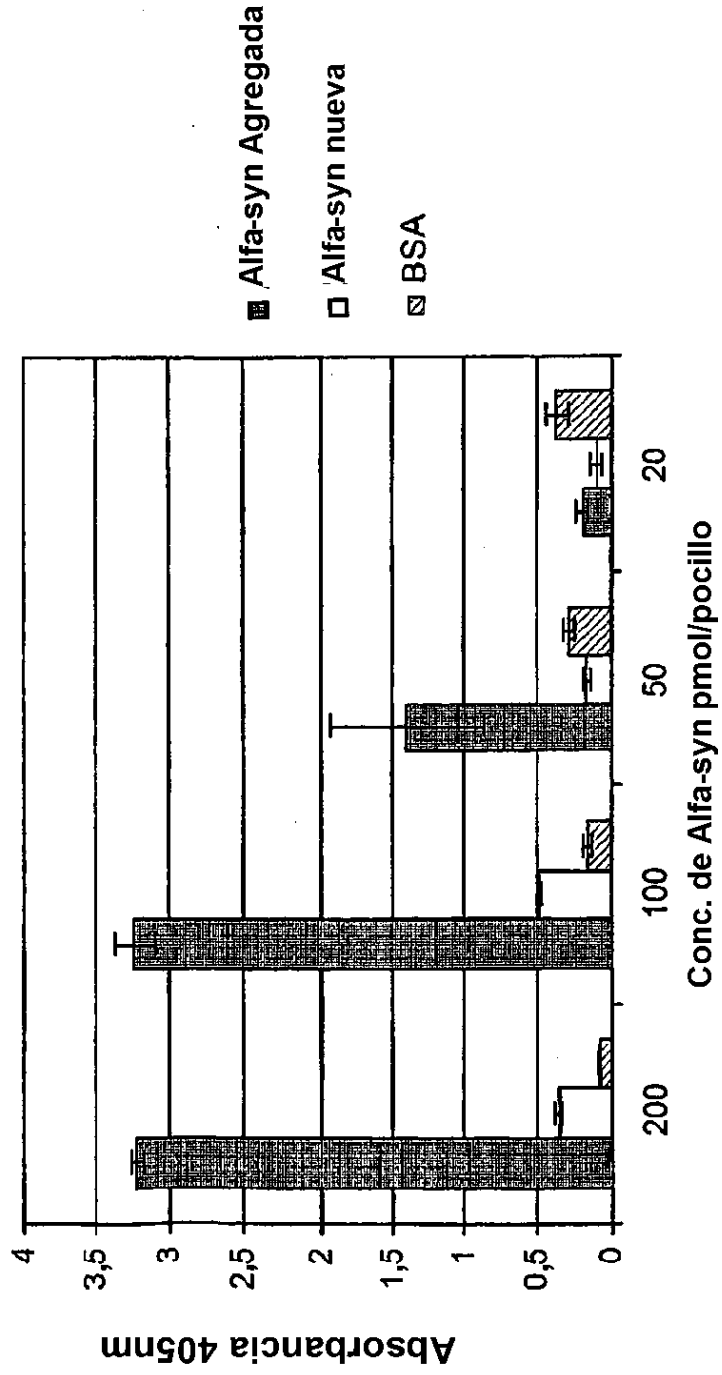




Fig.2D.

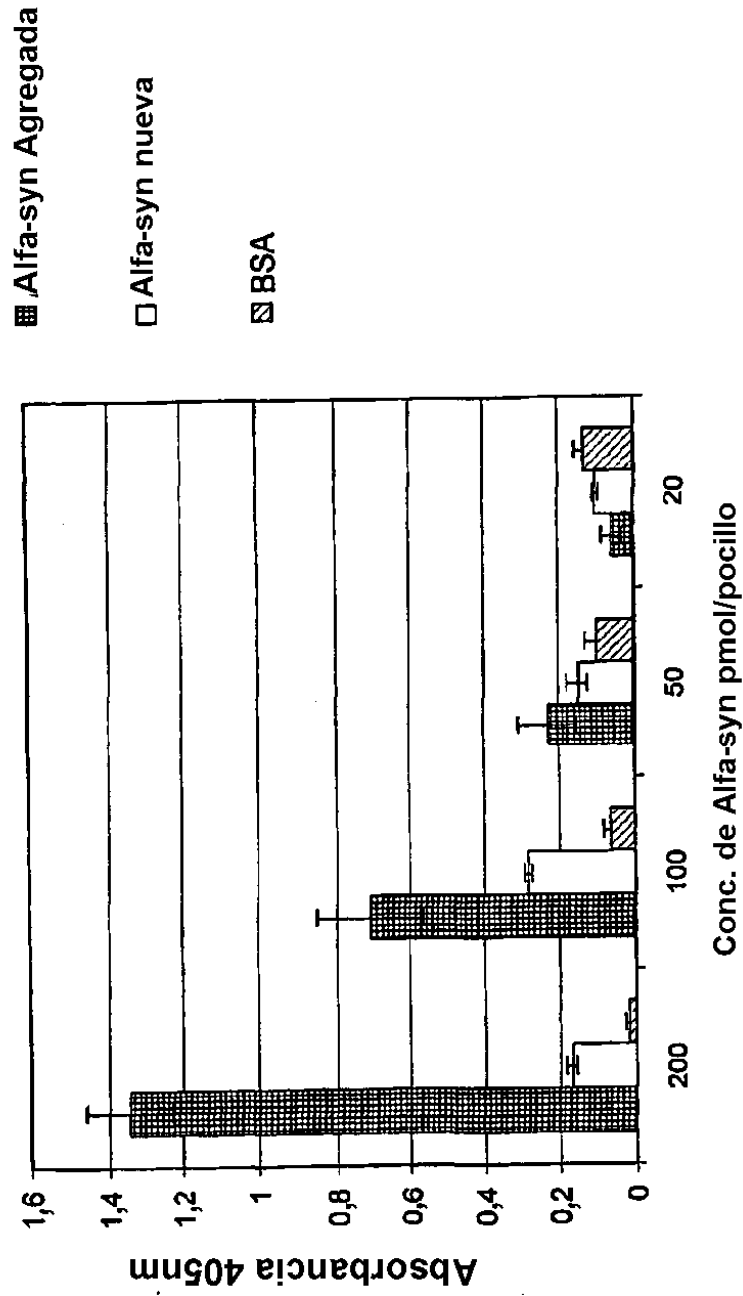


Fig.3A.

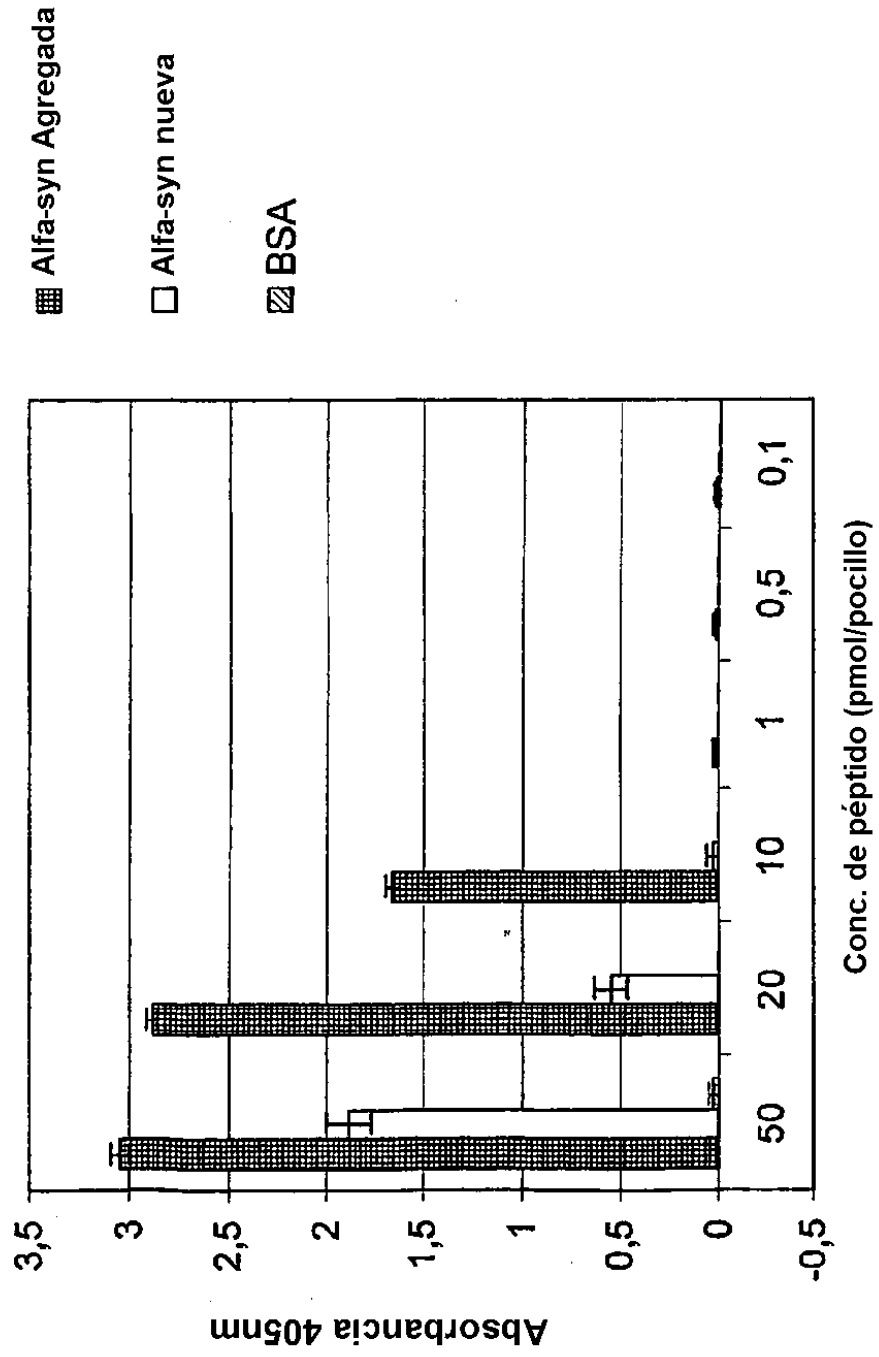


Fig.3B.

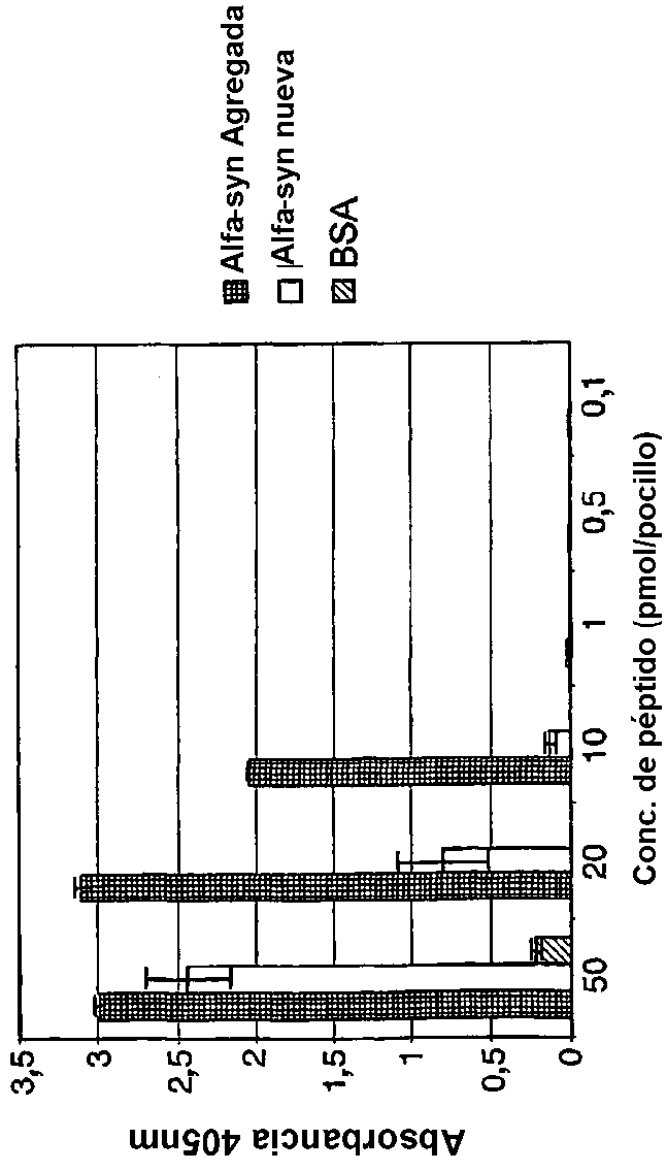


Fig.3C.

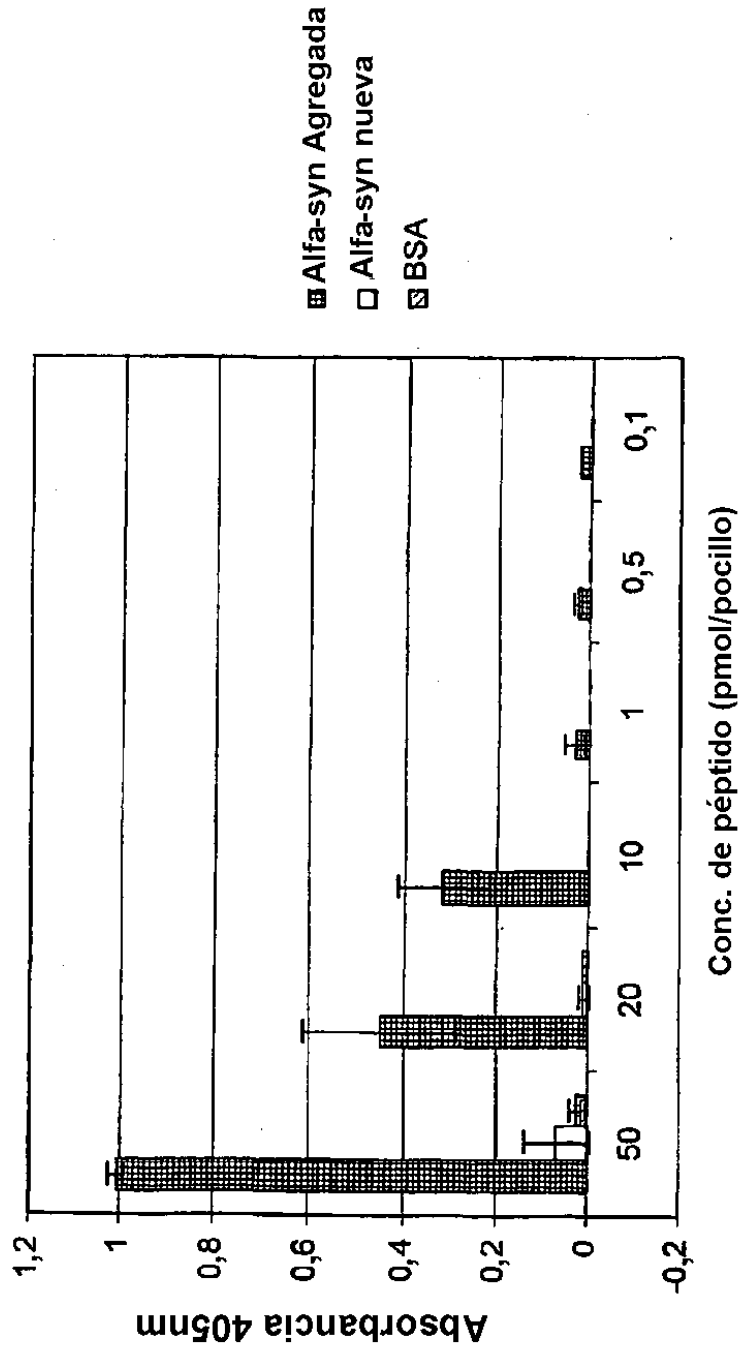


Fig.3D.

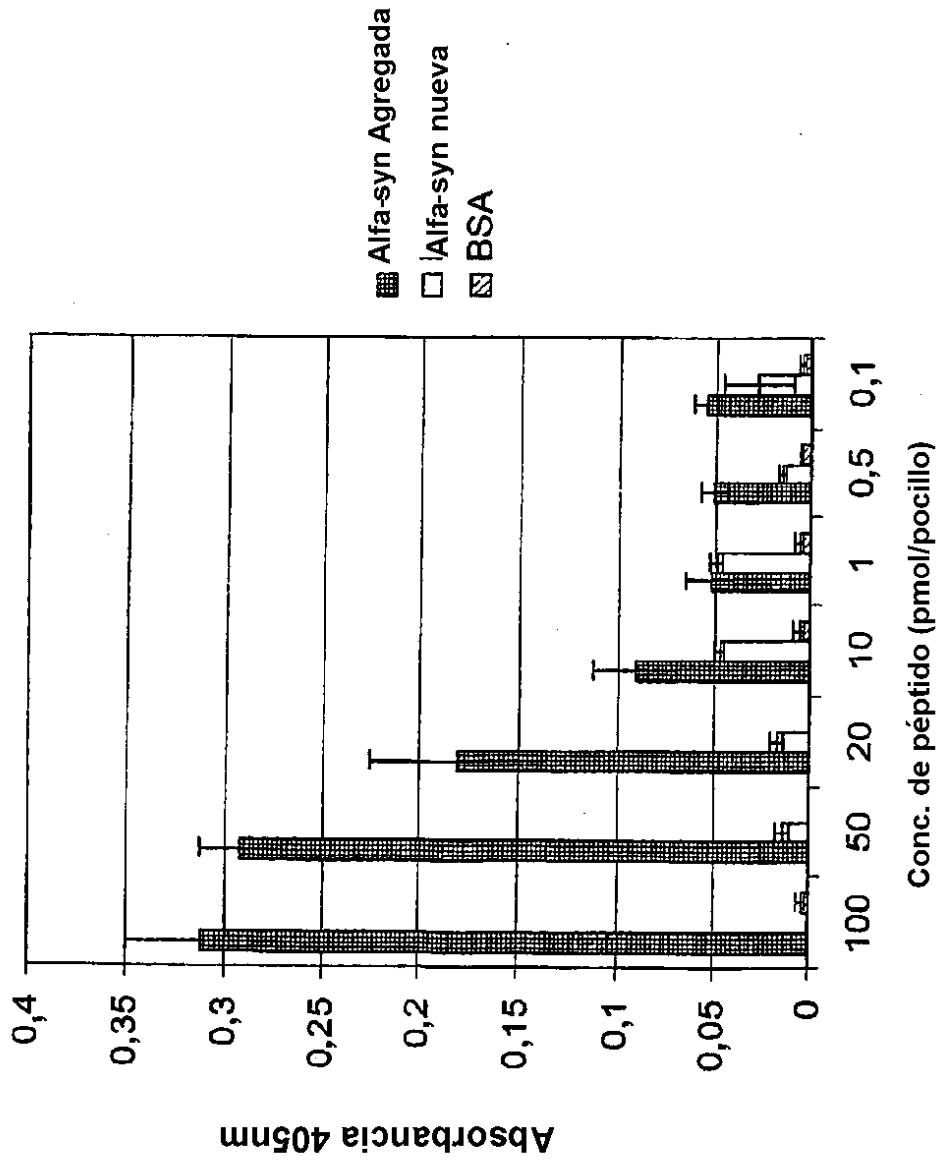


Fig.3E.

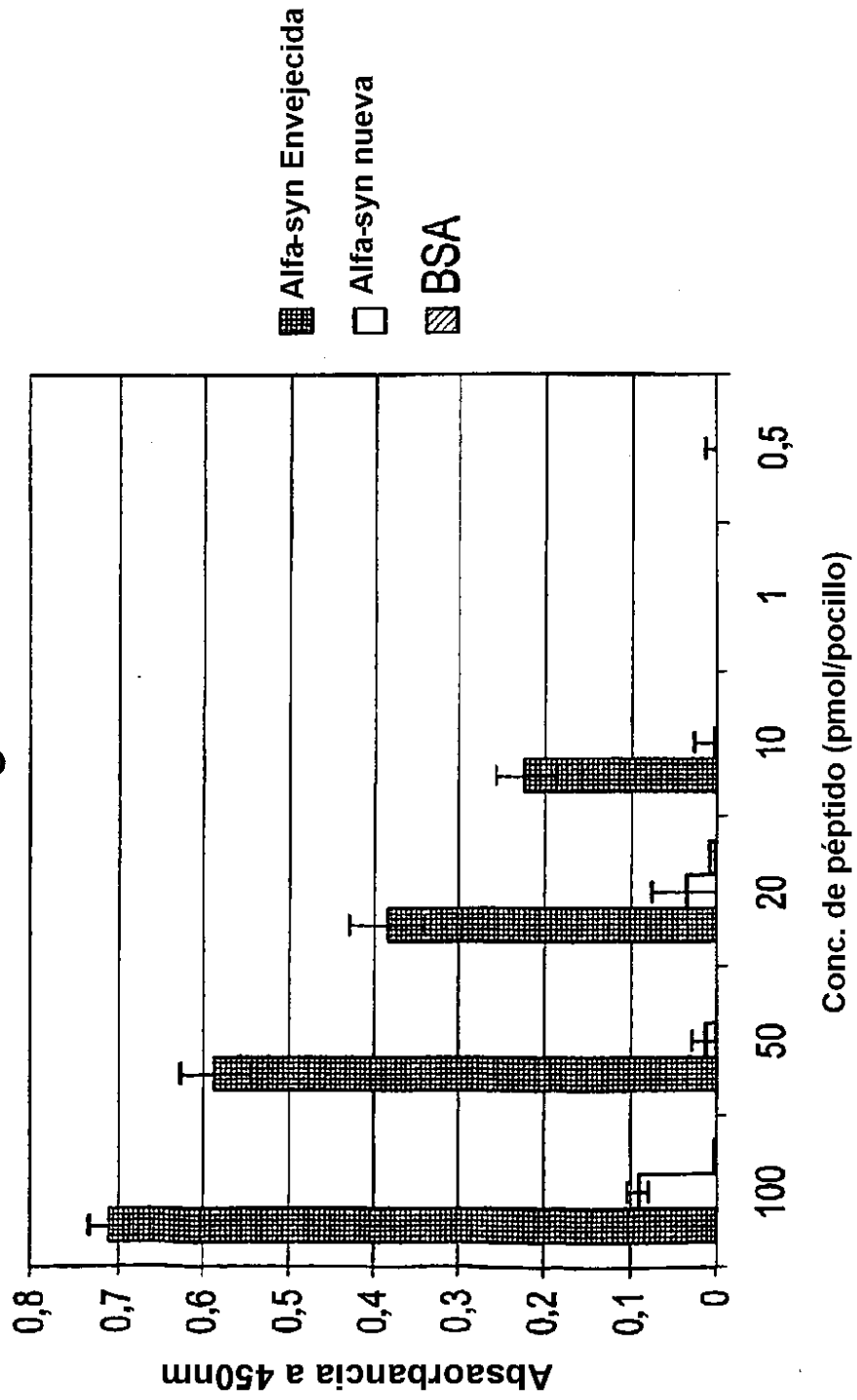


Fig.4A.

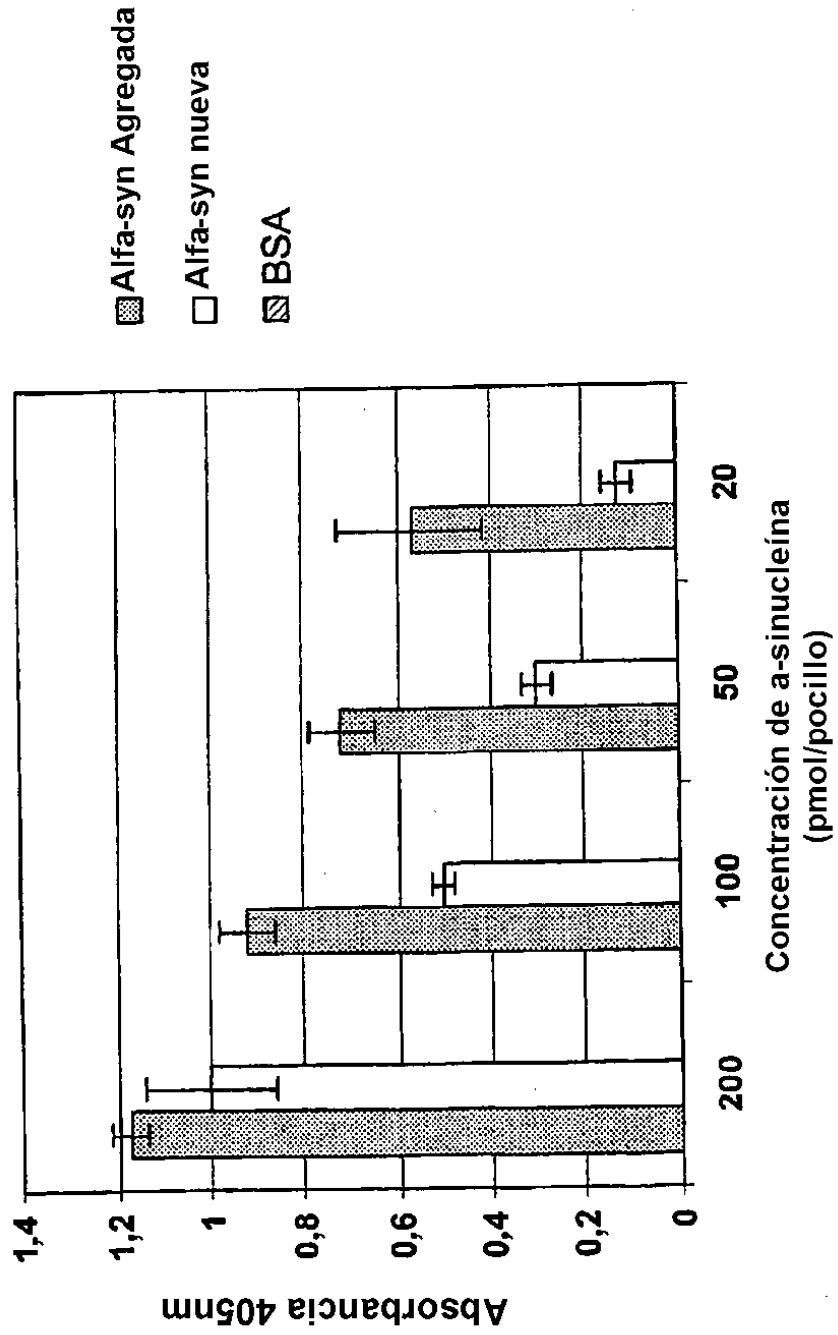


Fig.4B.

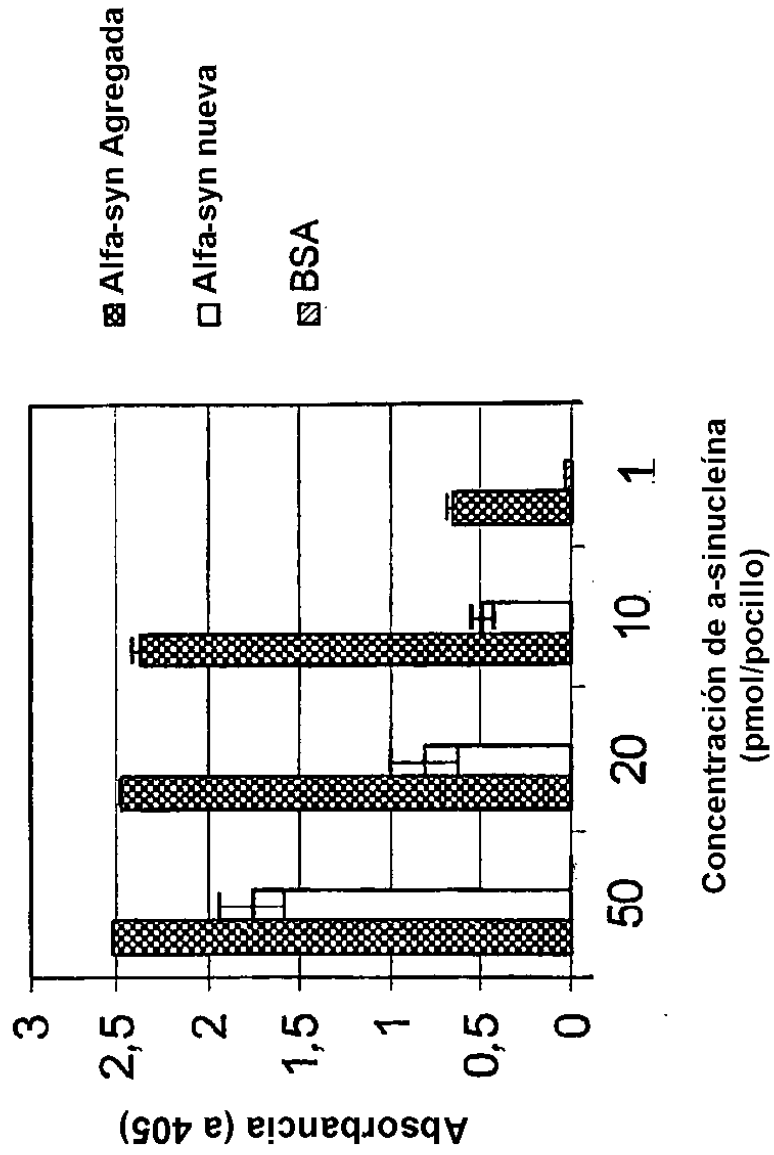




Fig.5.

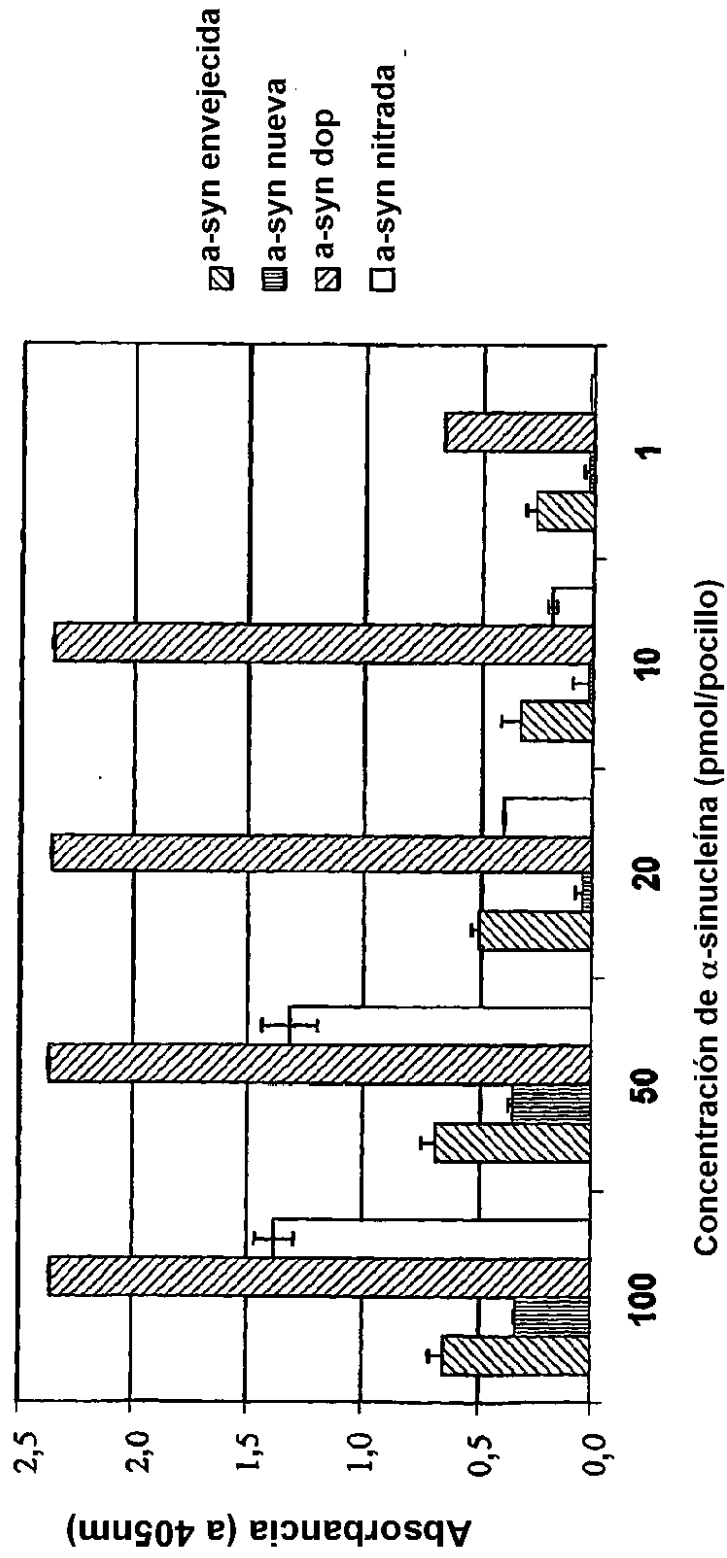


Fig.6.

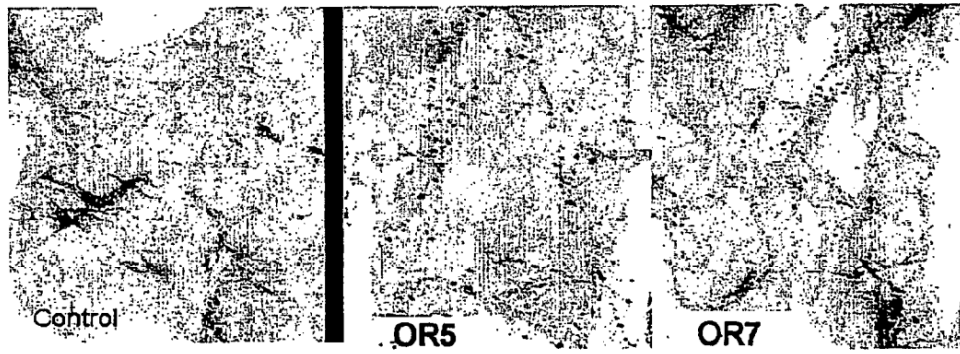


Fig.7.

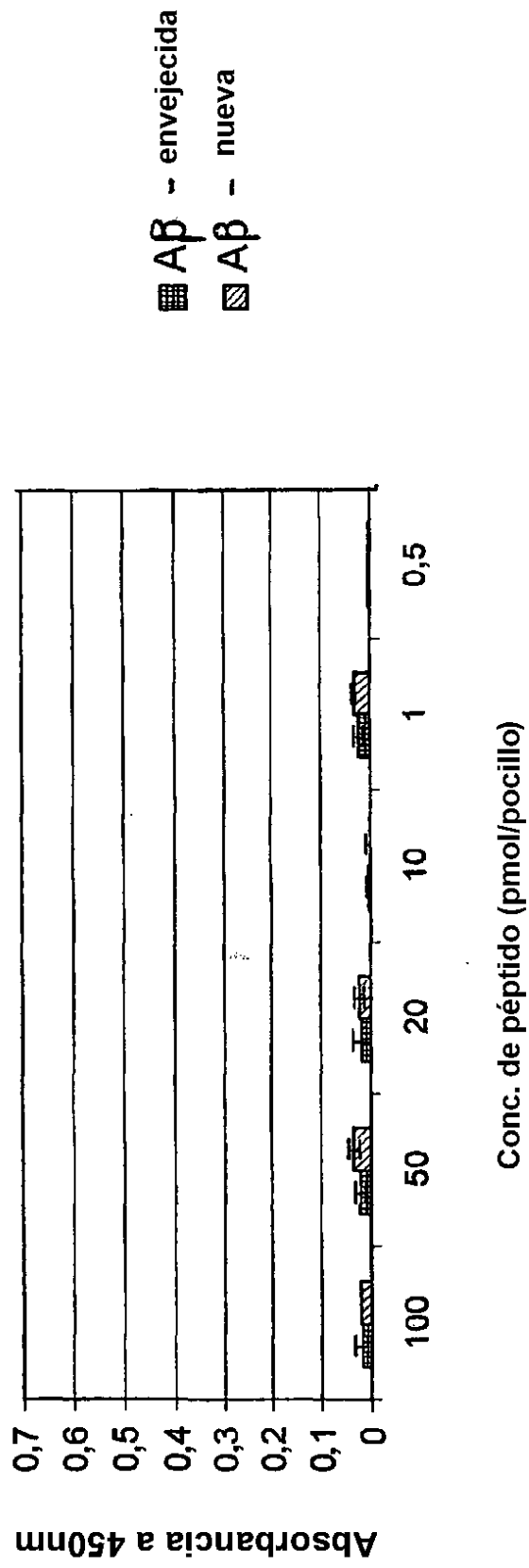


Fig.8.

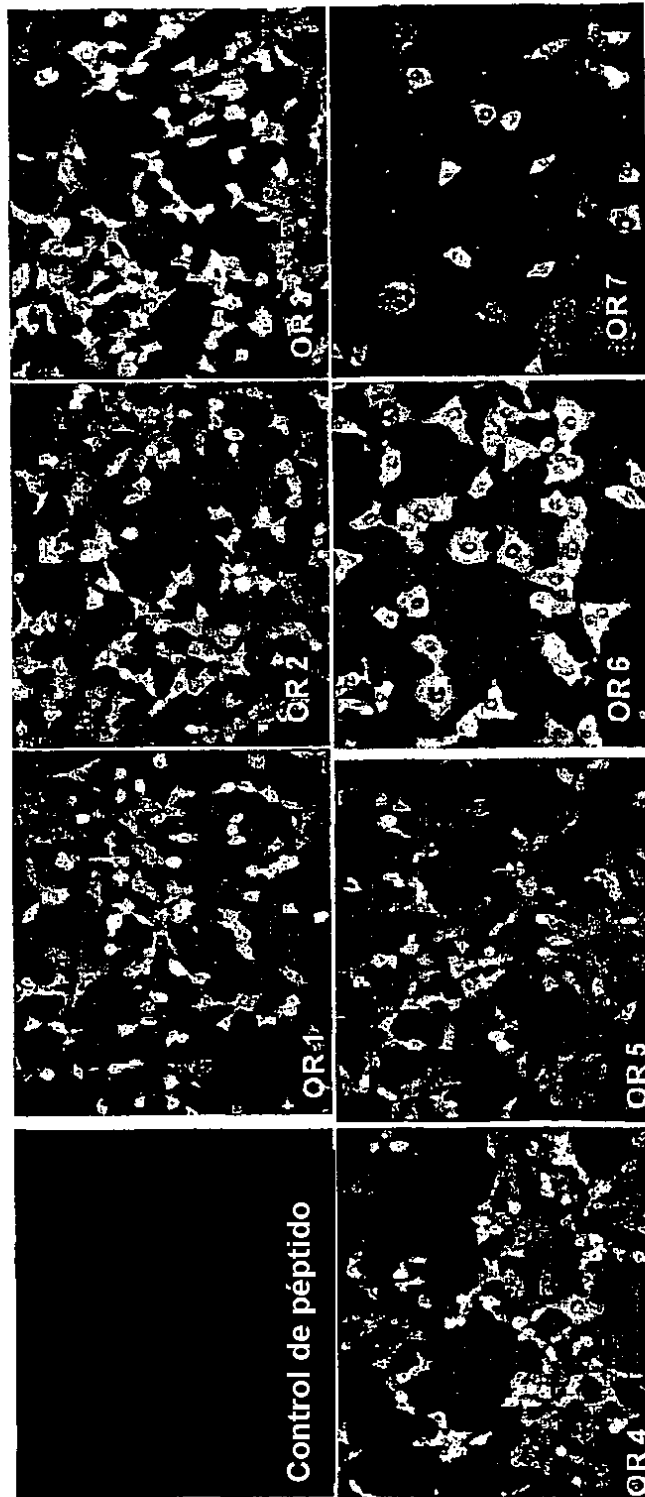


Fig.9.

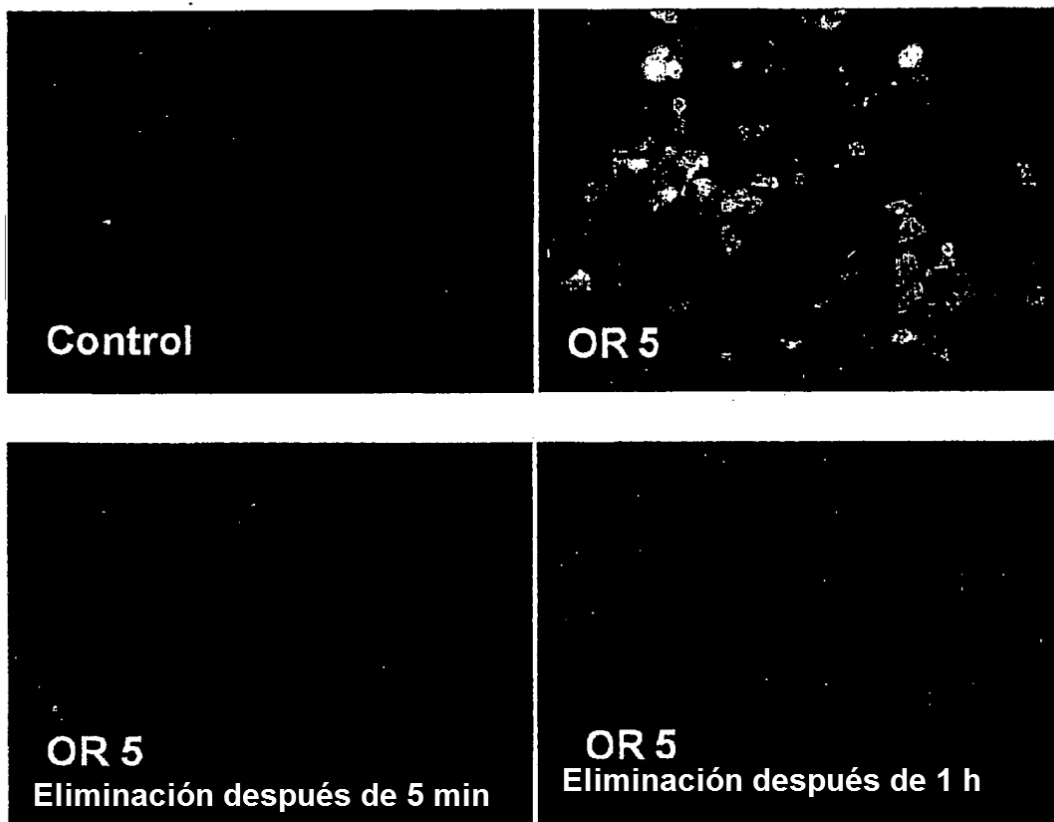


Fig.10.

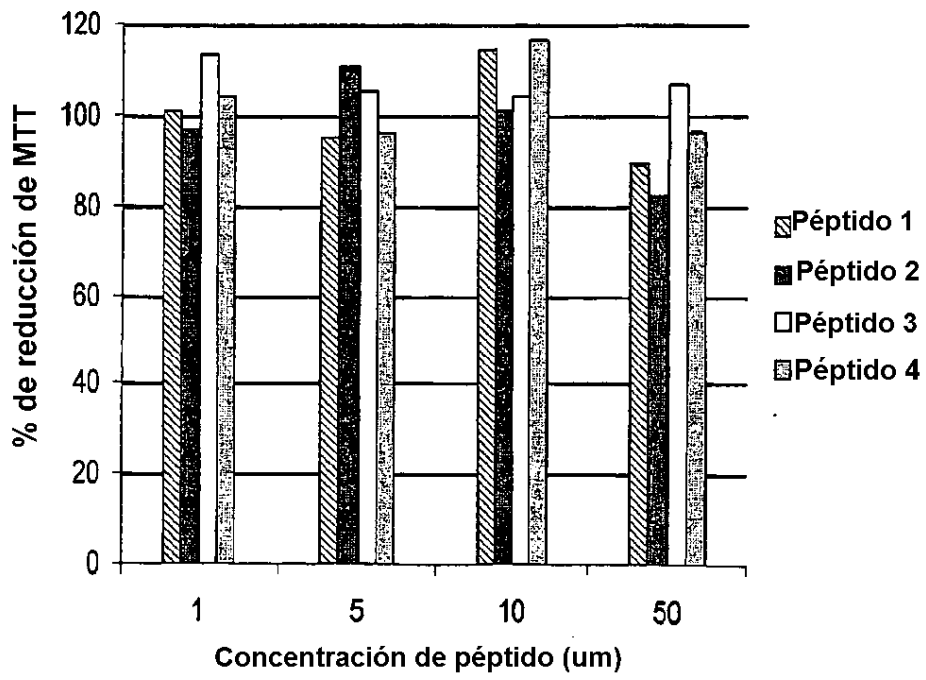


Fig.11.

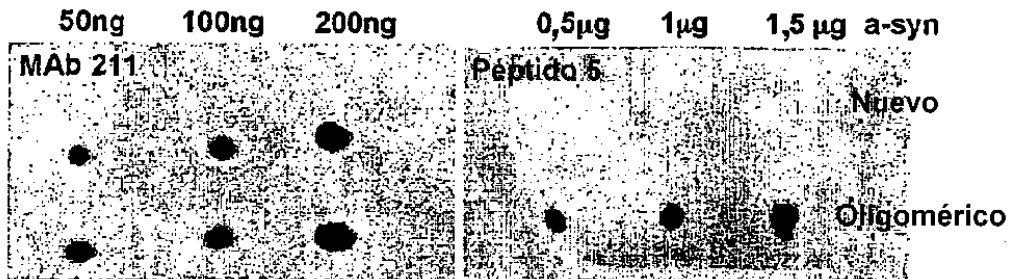


Fig.12A.

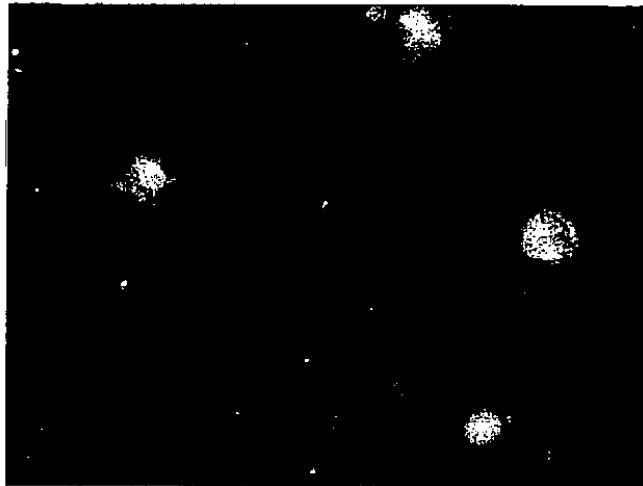


Fig.12B.

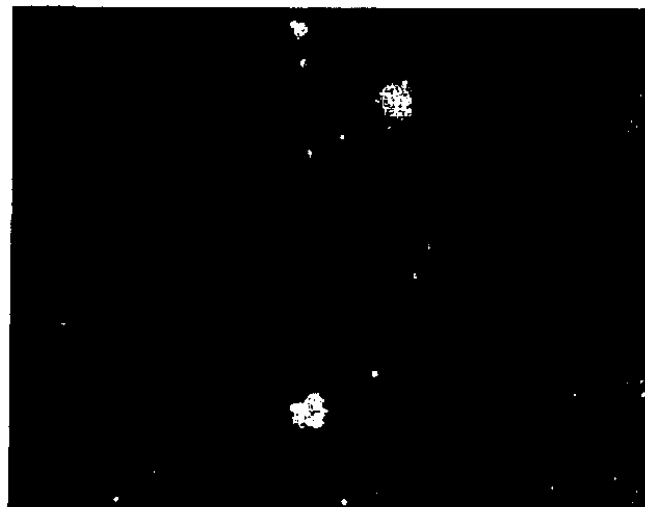


Fig.13A.

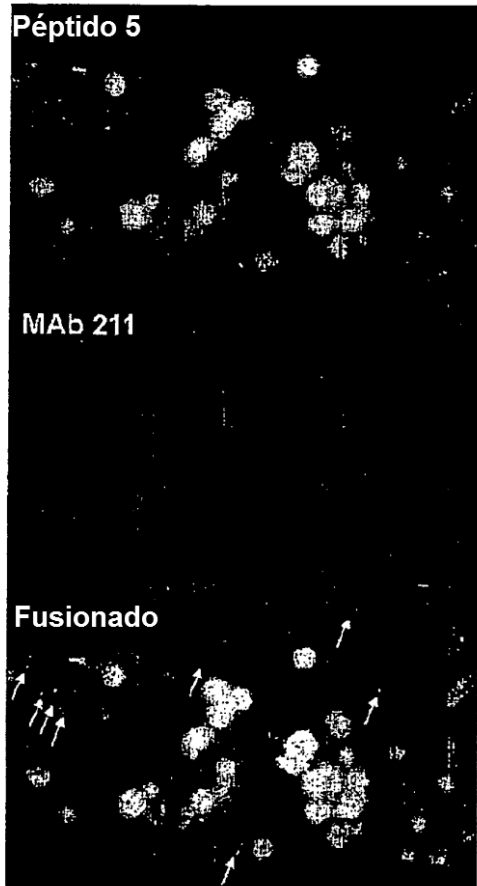


Fig.13B.





Fig.14A.

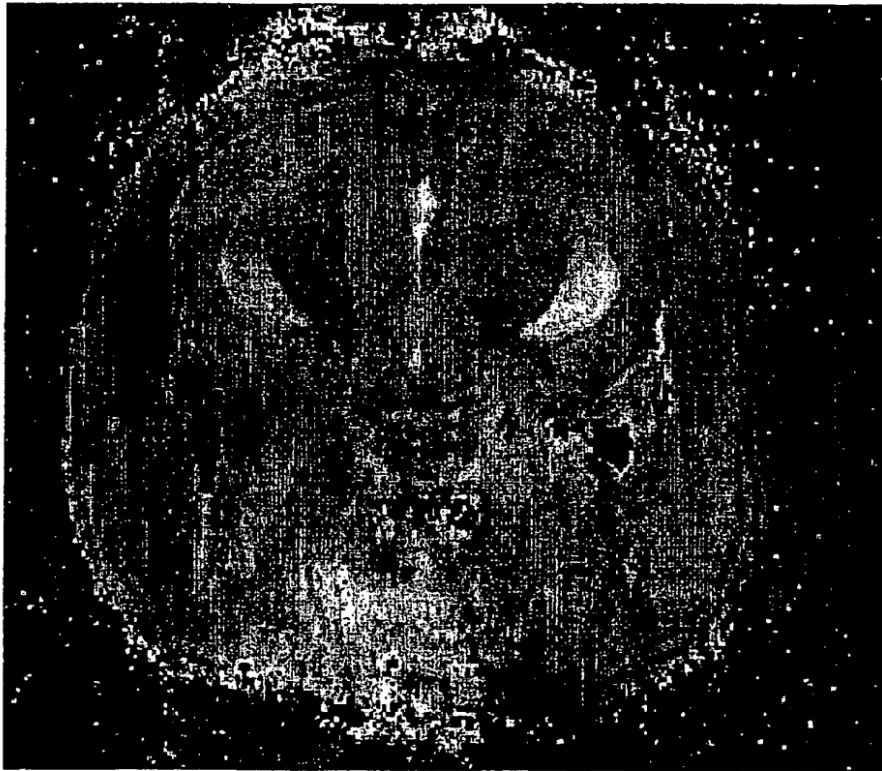


Fig.14B.

