

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 134**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004 E 11161614 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2380583**

54 Título: **Péptidos pequeños para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de fibrillogénesis de proteína beta-amiloide**

30 Prioridad:

18.12.2003 US 531406 P
17.03.2004 US 554342 P
30.09.2004 US 615614 P
16.12.2004 US 16706

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.01.2014

73 Titular/es:

PROTEOTECH INC. (100.0%)
12040, 115th Avenue N.E.
Kirkland, WA 98034-6931, US

72 Inventor/es:

CASTILLO, GERARDO M.;
LAKE, THOMAS P.;
NGUYEN, BETH P.;
SANDERS, VIRGINIA J. y
SNOW, ALAN D.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 437 134 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

Péptidos pequeños para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de fibrillogénesis de proteína beta-amiloide

5

Campo técnico

Esta invención se refiere a péptidos útiles para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de fibrillogénesis de proteína beta-amiloide

10

Antecedentes de la invención

Antecedentes adicionales para el uso terapéutico de fragmentos de péptidos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis se pueden encontrar en la patente de EE.UU. nº 7314724 presentada el 22 de agosto de 2001 y en la patente de EE.UU. nº 6933280 presentada el 24 de septiembre de 2001.

15

Proteína beta-amiloide como una diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) se caracteriza por el depósito y acumulación de un péptido de 39-43 aminoácidos denominado proteína beta-amiloide, A β o β /A4 (Glenner and Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120:885-890, 1984; Masters et al, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82:4245-4249, 1985; Husby et al, Bull. WHO 71:105-108,1993). La A β es derivada de proteínas precursoras más grandes denominadas proteínas precursoras beta-amiloide (o APPs) de las que hay diversas variantes alternativamente troceadas. Las formas más abundantes para las APP incluyen proteínas que consisten en 695, 751 y 770 aminoácidos (Kitaguchi et al, Nature 331:530-532, 1988; Ponte et al, Nature 331:525-527,1988; Tanzi et al, Nature 331:528-530, 1988). El péptido A β pequeño es un componente principal que constituye el núcleo de depósitos amiloides denominados "placas" en los cerebros de pacientes con AD. Además, la AD se caracteriza por la presencia de numerosos "enmarañamientos" neurofibrilares que consisten en filamentos helicoidales emparejados que se acumulan de forma anormal en el citoplasma neuronal (Grundke-Iqbal et al Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:4913-4917., 1986; Kosik et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:4044-4048, 1986; Lee et al, Science 251:675-678, 1991). El otro tipo principal de lesión encontrada en el cerebro de la Ad es la acumulación de amiloide en las paredes de los vasos sanguíneos, en los vasos tanto de las parénquimas como las meninges del cerebro que se sitúan fuera del cerebro. Los depósitos amiloides localizados en las paredes de los vasos sanguíneos se denominan angiopatía amiloide o congofílica cerebrovascular (Mandybur, J. Neuropath. Exp. Neurol. 45:79-90, 1986; Pardridge et al, J. Neurochem. 49:1394-1401, 1987). Las características distintivas patológicas de la AD, por lo tanto, son la presencia de "placas", "enmarañamientos" y depósitos amiloides cerebrovasculares.

20

25

30

35

Durante muchos años, ha habido una controversia científica continuada sobre la importancia del "amiloide" en la AD y de si las características de las "placas" y "enmarañamientos" de esta enfermedad eran la causa o meramente la consecuencia de la enfermedad. Unos estudios recientes indican que el amiloide es de hecho un factor causante de la AD y no debe ser considerado meramente como una consecuencia. La proteína A β de Alzheimer en cultivos celulares se ha mostrado que provoca la degeneración de células nerviosas en un período de tiempo corto (Pike et al, Br. Res. 563:311-314, 1991; J. Neurochem. 64:253-265, 1995). Unos estudios sugieren que es la estructura fibrilar, característica de todos los amiloides la que es principalmente responsable de los efectos neurológicos. La A β se ha encontrado también que es neurológica en cultivos troceados del hipocampo (Hadrian et al, Neurobiol. Aging 16:779-789, 1995) e induce la muerte de células nerviosas en ratones transgénicos (Games et al, Nature 373:523-527, 1995; Hsiao et al, Science 274:99-102, 1996). La inyección de A β en el cerebro de ratas provoca también dificultades de memoria y disfunción neuronal (Flood et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:3363-3366, 1991; Br. Res. 663:271-276, 1994). La evidencia convincente de que la A β amiloide está directamente involucrada en la patogénesis de la AD procede de estudios genéticos. Se descubrió que la producción aumentada de A β podría resultar de mutaciones en el gen que codifica su precursor, APP (Van Broeckhoven et al, Science 248:1120-1122, 1990; Murrell et al, Science 254:97-99, 1991; Haass et al, Nature Med. 1:1291-1296, 1995). La identificación de mutaciones en el gen de APP que provocaría la aparición temprana de la AD familiar es un argumento de peso de que la A β y el amiloide son centrales para el procedimiento patogénico subyacente en esta enfermedad. Se han descubierto ahora cuatro mutaciones que provocan las enfermedades descritas que demuestran la importancia de A β en causar la AD familiar (examinado por Hardy, Nature Gen. 1:233-234, 1992). Últimamente, unos estudios recientes sugieren que la reducción en el contenido de placa amiloide en ratones transgénicos de APP conduce a mejoras en las dificultades de comportamiento y pérdida de memoria (Chen et al, Nature 408:978-982, 2000; Janus et al, Nature 408:979-982, 2000; Morgan et al, Nature 408:982-985, 2000). Este es el argumento más fuerte hasta la fecha que implica que la reducción de contenido A β amiloide en el cerebro debía ser una diana central para el desarrollo de tratamientos nuevos y eficaces de la AD y trastornos relacionados.

40

45

50

55

60

Enfermedad de Alzheimer y población envejecida

La enfermedad de Alzheimer es la causa líder de demencia en la población de edad avanzada, afectando a un 5-

65

10% de la población por encima de la edad de 65 años (Jorm, A Guide to Understanding of Alzheimer's Disease and Related Disorders, New York University Press, New York, 1987). En la AD, las partes del cerebro esenciales para los procedimientos cognitivos como la memoria, atención, lenguaje y razonamiento se degeneran. En algunas formas hereditarias de la AD, la aparición es en una edad media, pero más comúnmente, los síntomas aparecen a partir de la mitad de los 60 en adelante. La AD afecta hoy día a 4-5 millones de estadounidenses con ligeramente más de la mitad de estas personas recibiendo cuidados en muchas diferentes instituciones de atención sanitaria. La prevalencia de la AD y otras demencias se duplica para 5 años más allá de 65 y unos estudios recientes indican que casi un 50% de todas las personas con una edad de 85 y de más edad tienen síntomas de AD (NIH Progress Report on AD, National Institute on Aging, 2000). Treinta y tres millones de personas de la población total de los Estados Unidos tienen una edad de 65 y más avanzada y esto ascenderá hasta 51 millones de personas en el año 2025 (NIH Progress Report on AD, National Institute on Aging, 2000). La carga económica anual de la AD en los estados unidos en términos de gastos de cuidados sanitarios y salarios perdidos tanto para pacientes como para sus cuidadores se estima en 80 a 100 miles de millones de dólares (NIH Progress Report on AD, National Institute on Aging, 2000).

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido que consiste en Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-NH₂.

El péptido puede estar compuesto por N- o D-aminoácidos. Uno o más de los aminoácidos pueden estar N-metilados.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un péptido del primer aspecto o un anticuerpo específico para dicho péptido para ser usado en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por la fibrillogénesis de Aβ.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido del primer aspecto o un anticuerpo específico para dicho péptido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada para la fibrillogénesis de Aβ.

La enfermedad puede ser la enfermedad de Alzheimer. El péptido o anticuerpo del segundo y tercer aspectos pueden comprender adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, el péptido o anticuerpo del segundo y tercer aspectos pueden ser formulados para una administración mediante una vía seleccionada entre oral, parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, anal y bucal. Preferentemente, es formulado para una administración nasal intranasal.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido del primer aspecto y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede comprender adicionalmente un compuesto activo complementario.

Se describen péptidos pequeños que demuestran una gran eficacia para inhibir y/o destruir fibrilas amiloides. También se describe el uso de algunos péptidos para la formación de imágenes de la ubicación de Aβ en el cuerpo con fines de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de fibrillogénesis de proteína β-amiloide (Aβ), así como el uso de algunos péptidos para detectar Aβ en muestras biológicas para fines de diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de fibrillogénesis de proteína beta-amiloide (Aβ). La "fibrillogénesis" como se usa en la presente memoria descriptiva, indica la unión clínica o patológica de beta-amiloide así misma para formar fibrilas y a veces beta-láminas, como es conocido por los expertos en la técnica.

Esta descripción se relaciona con compuestos y composiciones farmacéuticas de los mismos, que se pueden unir a proteína beta-amiloide (Aβ) y modular o moderar la agregación y/o fibrillogénesis de Aβ, para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades de Aβ como la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos que implican la acumulación y persistencia de Aβ. Estas enfermedades de Aβ incluyen, pero sin limitación, el amiloide asociado con la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down y diversas formas de amiloidosis cerebrales, como resultará familiar los que tienen conocimientos en la técnica.

Las descripción se refiere al descubrimiento nuevo y sorprendente de que ciertos péptidos son elementos de unión y rompedores de fibrilas de Aβ amiloides y, por lo tanto son útiles para la intervención terapéutica de la enfermedad de Alzheimer y trastornos de Aβ relacionados. Los péptidos seleccionados son elementos de unión de Aβ amiloide de la enfermedad de Alzheimer y, por lo tanto son útiles para la formación de imágenes y diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer y trastornos Aβ relacionados. Se describen métodos para tratar la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos Aβ que comprenden administrar a un sujeto paciente una dosis terapéuticamente eficaz de un péptido 6-9mero seleccionado.

En una realización, en la que preferentemente todos los aminoácidos indicados son Z-aminoácidos, excepto cuando se indique otra cosa (como mediante la indicación de péptidos de forma L con códigos de números "LP" prefijando

ciertos códigos de aminoácidos con "L-"), las composiciones farmacéuticas contienen preferentemente el péptido Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-NH₂. También están incluidos ciertos análogos, derivados, enantiómeros o fragmentos de la secuencia descrita en la presente memoria descriptiva, como se expone en detalle en la presente memoria descriptiva.

5 También se describe el uso de análogos N-metilados de los péptidos de la invención, que incluyen el uso de αN-metilación o L-aminoácidos (preferentemente aminoácidos metilados) exclusiva o parcialmente durante la síntesis de forma que los péptidos resultantes tendrán puramente enlaces de amidas αN-metiladas o parcialmente αN-metiladas o enlaces de amidas αN-metiladas y no αN-metiladas alternados. Los compuestos preferidos tienen enlaces de amidas modificadas de forma de que al menos uno de los enlaces de amidas en la cadena principal del péptido esté N-metilado, evitando en el propio péptido la formación de beta-láminas.

Se describen también compuestos miméticos (peptidomimético) como modelados a partir del péptido de la invención.

15 El término "mimético" incluye generalmente "isoésteres" como modificaciones de las cadenas principales de péptidos (es decir, miméticos de enlaces amidos) con amido-nitrógeno, amido-carbonilo o sustitución completa del enlace amido. El enlace amido puede ser ventajosamente sustituido con puentes de longitud similar conocidos por los expertos en la técnica como: -CH₂S-, -CH=CH-, -CH₂-NH-, -CSNH₂- o COCH₂.

20 Los miméticos pueden ser generados usando un programa de ordenador que pueda derivar un modelo de péptido virtual a partir de varias de las estructuras de péptidos descritas en la presente memoria descriptiva. Esto se puede hacer usando el programa de ordenador derivado del algoritmo SLATE. Véase Perkin, Mills and Dean, 1995 Journal of Computer Aided Molecular Design 9(6) p479-490; Mills et al. 2001 Journal of Computer Aided Molecular Design 15(1) p81-96; De Esch, IJ; et al 2001 Journal of Med Chem. 44(11) p1666-74; Mills Perkins and Dean 1997 Journal of Computer Aided Molecular Design 11(2) p175-92). Un ejemplo del programa derivado del algoritmo SLATE es Quasi by De Novo Pharmaceutical. Este programa superpone varias moléculas de péptidos activas pero aparentemente desiguales que son activas para llegar a la mayoría de las estructuras probables esenciales para la actividad (con una mínima restricción de energía). Esto se puede usar para generar un molde o sitio de unión diana con una posición prevista de átomos de unión de hidrógeno en un espacio tridimensional. Esto puede ser seguidamente usado para generar un mimético no péptido de los péptidos de ligandos originales. Estos programas de ordenador generadores de moléculas están actualmente disponibles en el comercio (por ejemplo, Skelgen and Skelgen II).

35 Un "mimético" de un compuesto se refiere también a un compuesto en el que las estructuras químicas del compuesto que son necesarias para la actividad funcional han sido sustituidas con otras estructuras químicas que emulan la conformación del compuesto o péptidos del mismo. El término "mimético", como se usa en la presente memoria descriptiva" está previsto también que incluya moléculas que emulan la estructura química de una estructura L- o D- peptídica y retienen las propiedades funcionales de una estructura L- o D-peptídica. Otras propuestas para diseñar análogos de péptidos, derivados y miméticos son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase P.S. Farmer, in Drug Design, E.J. Ariens, ed., Academic Press, New York, 1980, v. 10, pp. 119-143; Ball and Alewood, J. Mol. Recognition 3:55, 1990; Morgan and Gainer, Ann. Rep. Med. Chem. 24:243, 1989; and Freidinger, Trends Pharmacol. Sci. 10:270, 1989. Véase también Sawyer, "Peptidomimetic design and chemical approaches to peptide metabolism", in MD Taylor and GL Amidon, eds., in Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, Ch. 17, 1995; Smith et al, J. Am. Chem. Soc. 117:11113-11123, 1995; Smith et al, J. Am. Chem. Soc. 116:9947-9962, 1994; and Hirschman et al, J. Am. Chem. Soc. 115:12550-12568, 1993 .

50 El término "análogos" incluye variantes de la molécula de péptido llevadas a cabo, por ejemplo, mediante sustitución homóloga de uno o más residuos de aminoácidos, como se apreciará por los expertos en la técnica, inversión de la secuencia o sustitución parcial o completa de aminoácidos componentes con enantiómeros de composición idéntica (D- frente a L- aminoácidos). Los análogos incluyen también "sustitución de aminoácidos conservadoras" en las que un aminoácido es sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Ejemplos de aminoácidos de cadenas laterales similares son aminoácidos de cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), aminoácidos de cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), aminoácidos de cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), aminoácidos de cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, cerina, treonina, tirosina, cistina), aminoácidos de cadenas laterales ramificadas (por ejemplo, treonina, leucina, valina, isoleucina) y aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los análogos incluyen también "sustituciones de aminoácidos homólogos" en las que un aminoácido es sustituido con aminoácido homólogos, como la sustitución de fenilalanina con tirosina, piridilalanina o homofenilalanina y sustitución de leucina con valina o viceversa.

65 El término "derivado" incluye cambios químicos menores habituales para los expertos en la técnica en los que uno o más grupos reactivos en los péptidos de la invención has sido "derivados con péptidos" de forma que hay péptidos en los que una cadena lateral de aminoácido, cadena principal de péptido o terminación amino o carboxi ha sido derivada, como se expone adicionalmente en la presente memoria descriptiva.

En cualquiera de las estructuras o secuencias anteriores, la nomenclatura o representación simbólica de cualquiera de los aminoácidos individuales es proporcionada mediante la abreviatura estándar de tres letras para los aminoácidos precedida opcionalmente por D- o L- que representa las dos formas enantiómeras (imágenes especulares una de otra) de los aminoácidos individuales que constituyen la secuencia. Acetil y -amida en el N y C-terminal, respectivamente, están opcionalmente incluidos cuando estén presentes o se indique como preferido.

También se describen compuestos que incluyen los péptidos de la invención, partes de estos péptidos y sus nuevos análogos y derivados, para ser usados en el tratamiento en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos que implican la formación y persistencia de A β . Preferentemente, los trastornos son enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y otras A β amiloidosis. Normalmente, la composición farmacéutica incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, opcionalmente con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe el uso de píldoras, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina blandas y duras, pastillas, bolsitas, sobres, cápsulas vegetarianas, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables esterilizadas y polvos envasados esterilizados, que contienen un compuesto descrito para tratar pacientes con enfermedad de Alzheimer y otros A β amiloidosis. Por lo tanto, el uso de un compuesto descrito para una terapia o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado con A β amiloidosis está también contemplado.

Se proporcionan composiciones usadas para administrar a un sujeto una dosis terapéutica de un compuesto descrito seleccionado que inhibe el depósito de A β amiloide o la A β amiloidosis en trastornos en los que se produce un depósito de A β amiloide. Los compuestos descritos pueden ser usados terapéuticamente para tratar amiloidosis o pueden ser usados profilácticamente en un sujeto susceptible a la A β amiloidosis. Los compuestos están basados, al menos en parte, en A β amiloide de unión directa en el cerebro o en la circulación periférica, y midiendo la formación de fibrilas de A β amiloide y/o provocando la disolución de fibrilas de A β amiloide previamente formadas. El secuestro periférico de A β por los péptidos de la invención se cree que da lugar al desplazamiento de A β desde el cerebro hasta la circulación periférica, inhibiendo así la formación de fibrilas de A β amiloide del cerebro y/o provocando la disolución de las fibrilas de A β amiloide del cerebro previamente formados.

Se proporcionan métodos para detectar la presencia o ausencia de péptidos A β en una muestra biológica. Estos métodos incluyen poner en contacto una muestra biológica con un compuesto seleccionado, en que el compuesto es marcado con una sustancia detectable, por ejemplo, con un radionucleótido, compuesto fosforescente, compuesto fluorescente, proteína fluorescente, compuesto paramagnético, queladores metálicos o enzima, todos los cuales son fácilmente detectables en diversos ensayos y medios de diagnósticos conocidos por los expertos en la técnica y detectar seguidamente la sustancia detectable unida a A β péptidos en la muestra biológica.

Se describen en la presente memoria descriptiva métodos de formación de imágenes para la presencia o ausencia de péptidos A β en el cuerpo o tejidos biológicos. Estos métodos incluyen poner en contacto péptidos A β en el cuerpo con un compuesto, en que el compuesto es marcado con una sustancia detectable, por ejemplo, con un radionucleótido, compuesto fosforescente, compuesto fluorescente, proteína fluorescente, compuesto paramagnético, quelador metálico o enzima y detectar la sustancia detectable unida a péptidos A β en el cuerpo o tejidos biológicos.

Se presenta el uso de anticuerpos anti-idiotípicos para los péptidos de la invención, análogos, derivados o fragmentos de los mismos, como elementos de unión potentes de A β e inhibidores de la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de A β amiloide, en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis A β . La expresión "anticuerpos anti-idiotípicos" se refiere a los anticuerpos (A) surgidos contra o que reconocen específicamente las regiones Fab de otros anticuerpos (B) y las regiones Fab de anticuerpos B, reconocen uno de los péptidos de la invención. El resultado es que los anticuerpos anti-idiotípicos A para los péptidos de la invención tienen regiones Fab que emulan el péptido, en términos de reactividad. Unión amiloide y propiedades de rotura de amiloides.

Se presenta el uso de anticuerpos que reconocen compuestos para un marcado *in vivo*, por ejemplo, con un radionucleótido, para utilizar la radioformación de imágenes para diagnósticos *in vivo* y/o para un diagnóstico *in vitro*.

Una amiloidosis A β importante para los que se dirigen los agentes terapéuticos descritos es la enfermedad de Alzheimer. Una cantidad terapéuticamente eficaz preferida de compuesto descrito es una dosificación en el intervalo de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal/por día y, más preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 100 μ g a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día.

Un agente farmacéutico que contiene un compuesto descrito seleccionado puede ser ventajosamente proporcionado mediante inyección o infusión o gotas nasales o pulverización nasal o administración oral. En cualquiera de las estructuras o secuencias anteriores, la nomenclatura o representación simbólica de cualquiera o de la totalidad de

los aminoácidos individuales puede ser proporcionada mediante la abreviatura estándar de tres letras para el aminoácido o el código de letra única estándar para el aminoácido o a veces ambos en casos apropiados

Breve descripción de los dibujos

5 Los siguientes dibujos son ilustrativos de realizaciones de la invención y no está previsto que limiten el alcance de la invención.

La figura 1 son secuencias de péptidos y dibujos para los péptidos DP68 y DP74.

10 La figura 2 es un espectro de CD de Ab42 + polilisina y DP-065 a través de DP-072 a (1:2).

La figura 3 es un espectro de CD de de Ab42 + DP-065 a través de DP-072 a (1:0,1, 1:1, 1:2, 1:5).

15 La figura 4 es un resumen de la respuesta a la dosis de CD de Ab42 +/- DP-065 para DP-072.

La figura 5 es un resumen de tio T de Ab42 + DP-065 -72 (1:0,1, 1:1, 1:2, 1:5) y polilisina.

20 La figura 6 es un resumen es un sumario para la clasificación de valores de tio T 65-72.

La figura 7 A y B son espectros de CD que muestran los efectos de 0,2 mg/ml de péptido DP-074 sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 (es decir, Aβ42 +/- DP-074) o DP-074 solamente.

25 La figura 8 es un gráfico que muestra un resumen de comparación del efecto de 0,2 mg/ml de péptidos DP-065 con LP-081 y polilisina, sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 25 μM según se valoró mediante CD-. Se muestra la elipticidad de residuos molares de Aβ42 a 218 nm en el eje y, que representan la señal asociada con la estructura secundaria de láminas beta. La pérdida de elipticidad a 218 nm comparada con la señal de fibrilas de Aβ42 solamente indica la capacidad de los péptidos para reducir la estructura secundaria de láminas beta.

30 Las figuras 9A y B son espectros de CD que muestran los efectos dependientes de la dosis de péptido DP-074 sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 (es decir, Aβ42 +/- DP-074) o DP-074 solamente.

35 La figura 10 es un gráfico que muestra un resumen de comparación del efecto dependiente de la dosis de péptidos DP-065 respecto a LP-081 sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 25 μM según se valoró mediante CD. Se muestra la elipticidad de residuos molares de Aβ42 a 218 nm en el eje y, que representa la señal inversamente relacionada con la estructura secundaria de láminas beta.

40 La figura 11 es un gráfico que muestra un resumen ordenado de comparación del efecto de péptidos 6-9meros sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 25 μM según se valoró mediante espectropolarimetría CD. Se muestra el porcentaje de rotura de fibrilas de Aβ42 según se valoró mediante la pérdida de elipticidad a 218 nm, que representa la señal que está inversamente relacionada con la estructura secundaria de láminas beta.

45 La figura 12 es un gráfico que muestra un resumen ordenado de comparación del efecto de péptidos 6-9meros sobre la estructura secundaria de láminas beta de fibrilas amiloides Aβ42 25 μM según se valoró mediante fluorometría de tioflavina T. Se muestra el porcentaje de rotura de fibrilas de Aβ42 por diversos péptidos 6-9meros a una relación de péptidos Aβ42:6-9meros de 1:2.

50 La figura 13 es un gráfico que muestra un resumen ordenado de comparación de la eficacia de unión de péptidos 6-9meros sobre sustrato Aβ42 unido según se valoró mediante mediciones de LC/MS de péptidos no unidos después de un período de equilibrio de 2 horas. Se muestra el porcentaje de diversos péptidos 6-9meros sin unir a fibrilas de Aβ42 después de 2 horas de incubación.

55 La figura 14 es un gráfico que demuestra la estabilidad del péptido DP-068 en suero humano en un período de incubación de 32 horas según se valoró mediante LC/MS.

La figura 15 es un gráfico que demuestra la estabilidad de péptido DP-074 en suero humano en un período de incubación de 32 horas, según se valoró mediante LC/MS.

60

Mejor modo de llevar a cabo la invención

EJEMPLO 1

65 Preparación de péptidos

Los péptidos descritos en la presente memoria descriptiva fueron producidos en formas de los aminoácidos L y D. El péptido DP-068 es según la invención. En los siguientes ejemplos, el DP-068 es referido por tener una "amida" N-terminal. Se apreciará a partir de la figura 1 que esta amida es -NH₂. Además, fueron ensamblados péptidos truncados y análogos de péptidos para ser usados como péptidos terapéuticos potenciales para el tratamiento de fibrillogénesis de A β en la enfermedad de Alzheimer y trastornos relacionados. Estos péptidos son sintetizados preferentemente de forma convencional. Por ejemplo, los L- y D- péptidos fueron sintetizados en sintetizadores de péptidos conocidos por los expertos en la técnica como el sintetizador de péptidos múltiple Advanced ChemTech Model 396 (Louisville, KY), usando un protocolo automatizado establecido por el fabricante para una síntesis a escala de 0,025 mmoles. Se realizaron acoplamientos dobles en todos los ciclos usando hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU)/N,N-diisopropiletilamina (DIEA)/HOBt/FMOC-AA en un exceso de 4 veces durante 30 minutos, seguido de DIC/HOBt/FMOC-AA en un exceso de cuatro veces durante 45 minutos.

El péptido seguidamente se desprotegió y se retiró de la resina mediante tratamiento con TFA/agua (95% /5%) durante 3 horas y seguidamente se precipitó con éter frío. El sólido resultante seguidamente se sedimentó mediante centrifugación (2400 rpm x 10 min) y el éter se desechó. Seguidamente el sólido se volvió a poner en suspensión en éter y se volvió a centrifugar por segunda vez, después de lo cual el éter se separó por decantación por segunda vez. El sólido se disolvió en ácido acético al 10% y se liofilizó hasta sequedad (~30 mg para péptidos de 12 aminoácidos; 18 mg para péptidos de 7 aminoácidos). El péptido en bruto se purificó mediante HPLC preparativa usando instrumentos conocidos por los expertos en la técnica, como una serie HP110 con detector de hilera de diodos, con una columna C18 Vidac (21 x 250 mm) usando un gradiente de acetonitrilo de 15%-40% durante 80 minutos (a un caudal de 5 ml/min). La fracción primaria seguidamente se recogió y se volvió a analizar en cuanto a la pureza usando HPLC analítica para asegurar un pico simétrico único a todas las longitudes de onda. La confirmación de las estructuras y secuencias se basó en una comparación de pesos moleculares previstos, con pesos moleculares obtenidos mediante espectroscopía de masas ESI. Estos análisis se realizaron usando instrumentos conocidos por los expertos en la técnica, como un espectrómetro de masas de pulverización iónica de cuádruplo triple Sciex API IIIIE o ESI Agilent MSD-SL. Se sintetizaron péptidos 12-13meros con las siguientes secuencias, que empleaban todos preferentemente D-aminoácidos, excepto cuando se indicó otra cosa:

Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (DP-001),

Arg-Gln-Val-Phe-Gln-Val-Ala-Tyr-Ile-Ile-Ile-Lys-Ala (DP-002),

Tyr-eu-Ser-Lys-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Ala-Leu-Gly (DP-003),

Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-004),

Ala-Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-005),

Asp-Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-006),

His-Gln-Thr-Trp-Thr-Arg-Asn-Leu-Gln-Val-Thr-Leu (DP-007),

Ile-Ser-Asn-Val-Phe-Val-Gln-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser (DP-008),

Arg-Gly-Leu-Val-Phe-His-Thr-Gly-Thr-Lys-Asn-Ser-Phe (DP-009),

Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (DP-010),

Val-Arg-Trp-Gly-Met-Gln-Gln-Ile-Gln-Leu-Val-Val (DP-011),

Ala-Pro-Val-Asn-Val-Thr-Ala-Ser-Val-Gln-Ile-Gln (DP-012),

Thr-Arg-Ile-Ser-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Arg-Lys-Arg (DP-013),

Ala-Lys-Ile-Ile-Ile-Tyr-Ala-Val-Gln-Phe-Val-Gln-Arg (DP-014),

Gly-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu-Tyr (DP-015),

Met-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-His-Ala-Leu-Phe-Leu-Thr (DP-016),

Gly-Trp-Arg-Val-Ser-Val-Arg-His-Trp-Gln-Gly-Ala (DP-017),

Gly-Met-Ile-Val-Ala-Val-Arg-His-Trp-Arg-Gly-Asp (DP-018),

L-Arg-L-Lys-L-Arg-L-Leu-L-Gln-L-Val-L-Gln-L-Leu-L-Ser-L-Ile-L-Arg-L-Thr (DP-019), y

Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Pro-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-050).

5 Además se sintetizaron péptidos 6-9meros que incluyen iA β 5 (LP-025) y piA β 5 (LP-081) con las siguientes secuencias y/o modificaciones:

10 L-Leu-L-Pro-L-Phe-L-Phe-L-Asp (LP-025), Ala-Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val (DP-026), Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val-Ser (DP-027), Gln-Trp-His-Arg-Val-Ser-Val (DP-028), Trp-His-Arg-Val-Ser-Val-Arg (DP-029), His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-030), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-031), Asp-Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val (DP-032), Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala (DP-033), Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala-Val (DP-034), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile (DP-035), His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-036), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-037), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly (DP-038), Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg (DP-039), Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu (DP-040), Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val (DP-041), Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe (DP-042), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-043), Gly-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-044), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly (DP-045), Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys (DP-046), Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys-Ser (DP-047), Val-Leu-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu (DP-048), Leu-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu-Tyr (DP-049), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-051), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-052), His-Arg-Pro-Ala-Val-Ile-Met (DP-053), His-Arg-Val-Pro-Val-Ile-Met (DP-054), His-Arg-Val-Ala-Val-Pro-Met (DP-055), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-056), Leu-Pro-Phe-Val-Leu-Arg (DP-057), Arg-Arg-Pro-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-058), Thr-Arg-Ile-Ser-Leu-Gln-Val (DP-059), Ser-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Arg (DP-060), Gln-Val-Gln-Leu-Arg-Lys-Arg (DP-061), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-062), Arg-Val-Ser-Val-Arg (DP-063), His-Pro-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-064), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-amida (DP-065), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-amida (DP-066), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-amida (DP-067), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-amida (DP-068), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-069), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met-amida (DP-070), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg (DP-071), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-072), Acetyl-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-073), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-074), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-075), Acetyl-Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-076), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys (DP-077), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys-amida (DP-078), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-079), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-080), and Acetyl-L-Leu-L-Pro-L-Phe-L-Asp-L-amida (LP-081). D- indica D-aminoácidos y L- indica L-aminoácidos.

30 EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Rotura de estructura secundaria de láminas beta de fibrilas de Alzheimer mediante péptidos 12-13meros según se ensayó mediante espectropolarimetría CD

35 Se registraron espectros de dicroísmo circular (CD) de A β 42 en presencia o ausencia de péptidos sintéticos indicados en el ejemplo 1 a 25°C en un espectropolarímetro JASCO-810 usando una cubeta de cuarzo con longitud de trayectoria de 0,5 mm y sobre el intervalo de 190-260 nm. El instrumento fue calibrado con una solución acuosa de ácido (+)- canforsulfónico. El instrumento seguidamente se ajustó para recoger datos a una anchura de banda de 5 mm, tiempo de respuesta de 32 segundos, modulación de datos de 0,5 nm y una velocidad de exploración de 10 nm/min. Cada espectro de CD era una media de 5 espectros, tomados cada uno a partir de una solución duplicada por separado. Los resultados de CD se expresaron por elipticidad de residuo molar (MRE) de A β 42, después de la sustracción del espectro del disolvente de fondo y/o el espectro de péptido del ensayo. Para este estudio, se incubó A β 42 fibrilar (0,1 mg/ml) en TPBSF (10% de TFE, NaF 150 nM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4) fue incubado durante 3 días a 37°C en presencia y ausencia de diversos péptidos 12-13meros a una relación p/p de A β 42:péptido de 1:2, antes de registrar los espectros de CD. El porcentaje de rotura de estructura en láminas β se determinó calculando el porcentaje de pérdida de elipticidad negativa a 218 nm en comparación con A β 42 solo, después de que se sustrajeran los correspondientes datos en blanco.

50 Los rompedores de estructura secundaria en láminas beta A β 42 entre análogos de péptidos 12-13meros se clasifican en orden de eficacia, según se valora mediante espectropolarimetría CD. Otros péptidos que son también eficaces no se incluyen en esta lista. Los péptidos preferidos, incluidos en orden de eficacia son

55 Ala-Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-005), Asp-Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-006), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-004), Gly-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu-Tyr (DP-015), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Pro-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-050), Gly-Trp-Arg-Val-Ser-Val-Arg-His-Trp-Gln-Gly-Ala (DP-017), Tyr-eu-Ser-Lys-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Ala-Leu-Gly (DP-003), Gly-Met-Ile-Val-Ala-Val-Arg-His-Trp-Arg-Gly-Asp (DP-018), L-Arg-L-Lys-L-Arg-L-Leu-L-Gln-L-Val-L-Gln-L-Leu-L-Ser-L-Ile-L-Arg-L-Thr (DP-019), Met-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-His-Ala-Leu-Phe-Leu-Thr (DP-016), Thr-Arg-Ile-Ser-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Arg-Lys-Arg (DP-013), Arg-Gln-Val-Phe-Gln-Val-Ala-Tyr-Ile-Ile-Ile-Lys-Ala (DP-002), Arg-Gly-Leu-Val-Phe-His-Thr-Gly-Thr-Lys-Asn-Ser-Phe (DP-009), Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (DP-010), Val-Arg-Trp-Gly-Met-Gln-Gln-Ile-Gln-Leu-Val-Val (DP-011), Ala-Pro-Val-Asn-Val-Thr-Ala-Ser-Val-Gln-Ile-Gln (DP-012), Ala-Lys-Ile-Ile-Ile-Tyr-Ala-Val-Gln-Phe-Val-Gln-Arg (DP-014), and Ile-Ser-Asn-Val-Phe-Val-Gln-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser (DP-008). DP-005, DP-006, DP-004 y DP-015 muestran >75% de rotura de A β 42 fibrilar, mientras que DP-050, DP-017 y DP-003 muestran >50% de rotura de fibrilas de A β 42.

65 EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Rotura de fibrilas de A β de Alzheimer mediante péptidos 12-13meros según se valoró mediante fluorometría de tioflavina T.

5 Diversos péptidos sintetizados como se indican en el ejemplo 1 fueron ensayados en cuanto a la actividad de rompedora de A β amiloide potencial usando una diversidad de ensayos *in vitro*. Uno de estos ensayos, fluorometría de tioflavina T, que mide la cantidad de fibrilas amiloides (LeVine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995; Naiki and Nakakuki, Lab. Invest., 74:374-383, 1996; Castillo et al, J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997) fue usado para identificar péptidos sintéticos capaces de romper fibrilas amiloides A β 42. Para
10 estos estudios, se incubaron 0,1 mg/ml de A β 42 (Bachem Inc) en tubos de microcentrifugadora a 37°C durante 3 días (por triplicado solos o bien en presencia de 0,2 mg/ml de péptido a una relación en peso de A β : péptido de 1:2) en TPBSF (10% de TFE, NaF 150 mM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4). Se tomaron partes alícuotas de 50 μ l para un análisis en el día 3 y se añadieron partes alícuotas de 200 μ l de tioflavina T 125 μ M en NaPO₄ 62 mM (pH 6,0) para proporcionar una concentración final de tioflavina T de 100 μ M y 62 mM de NaPO₄. Se midió la emisión de fluorescencia a 480 nm en un fluorómetro de microplaca de 96 pocillos (Labsystem) a una longitud de onda de excitación de 450 nm. Para todas las determinaciones, cualquier fluorescencia proporcionada por los péptidos en presencia del reactivo de tioflavina T fue siempre sustraída de todas las lecturas pertinentes. Estudios previos han indicado que las concentraciones crecientes de A β 42 fibrilar proporcionan un aumento proporcional de la fluorescencia en presencia de tioflavina T 100 μ M descartando la presencia de cualquier efecto de filtros internos desproporcionados a esta concentración de tioflavina T (Castillo et al J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997).

Rompedores de tioflavina T que se unen a A β 42 a partir de análogos de péptidos de entre 12-13 aminoácidos, clasificados en orden de eficacia. Los péptidos en orden de eficacia, según se determinó mediante fluorometría de tioflavina T, incluyen, pero sin limitación

25 Val-Arg-Trp-Gly-Met-Gln-Gln-Ile-Gln-Leu-Val-Val (DP-011), Gly-Met-Ile-Val-Ala-Val-Arg-His-Trp-Arg-Gly-Asp (DP-018), His-Gln-Thr-Trp-Thr-Arg-Asn-Leu-Gln-Val-Thr-Leu (DP-007), Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr (DP-001), Ile-Ser-Asn-Val-Phe-Val-Gln-Arg-Leu-Ser-Leu-Ser (DP-008), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Pro-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-050), Asp-Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-006), Gly-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys-Ser-Leu-Tyr (DP-015), Gly-Asn-Ser-Thr-Ile-Ser-Ile-Arg-Ala-Pro-Val-Tyr (DP-010), Arg-Gly-Leu-Val-Phe-His-Thr-Gly-Thr-Lys-Asn-Ser-Phe (DP-009), Ala-Pro-Val-Asn-Val-Thr-Ala-Ser-Val-Gln-Ile-Gln (DP-012), Tyr-eu-Ser-Lys-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Ala-Leu-Gly (DP-003), Ala-Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-005), and Ala-Lys-Ile-Ile-Ile-Tyr-Ala-Val-Gln-Phe-Val-Gln-Arg (DP-014). DP-017 y DP-011 demuestran una rotura >80% de fibrilas de A β 42, DP-018 y DP-007 demuestran una rotura >60% de fibrilas A β 42, mientras que DP-001, DP-008, DP-050, DP-006 y
35 DP-015 demuestran una rotura >40% de fibrilas de A β 42.

EJEMPLO 2

Rotura de estructuras secundaria de láminas de fibrilas β de Alzheimer ensayados mediante espectropolarimetría CD

40 La espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD) es otra técnica *in vitro* usada para determinar la eficacia de un péptido dado para romper la estructura secundaria de láminas β de fibrilas de A β . Los espectros de CD de A β 42 en presencia o ausencia de péptidos sintéticos se registraron a 25°C en un espectropolarímetro JASCO-810 usando una cubeta de cuarzo con longitud de trayectoria de 0,5 mM y sobre el intervalo de 190-260 nm. El instrumento fue calibrado con una solución acuosa de ácido (+)-canforsulfónico. El instrumento fue seguidamente ajustado para recoger datos a una anchura de banda de 5 nm, tiempo de respuesta de 32 segundos, ondulación de datos de 0,5 nm y una velocidad de exploración de 10 nm/min. Cada espectro de CD fue una media de 5 espectros, tomados cada uno a partir de una solución duplicada por separado. Los resultados de CD fueron expresados como elipticidad de residuo molar (MRE) de A β 42, después de la sustracción del espectro del disolvente de fondo y/o espectro de péptido de ensayo. Para este estudio, se incubó A β 42 fibrilar (0,1 mg/ml) en TPBSF (10% de TFE, NaF 150 mM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4) durante 3 días a 37°C en presencia y ausencia de diversos péptidos a una relación p/p de A β 42: péptido de 1:2, antes de registrar los espectros de CD. El porcentaje de rotura de estructura de lámina beta se determinó calculando el porcentaje de pérdida de elipticidad negativa a 218 nm en comparación con A β 42 solo después de que sustrajeran los correspondientes valores en blanco.

La figura 11 muestra que los rompedores de estructura en láminas beta de A β 42 entre péptidos 6-9meros y análogos, clasificados en orden de eficacia según se valoró mediante espectropolarimetría de CD. Los péptidos preferidos en orden de eficacia incluyen, pero sin limitación, Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-amida (DP-068), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-080), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-074), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-072), Acetyl- Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-073), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-069), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-079), Acetyl- Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-076), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-051), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg (DP-071), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-075), His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-036), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-037), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-056), Thr-

Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys-amida (DP-078), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile (DP-035), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-031), Ala, His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe (DP-042), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-043), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-amida (DP-066), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met-amida (DP-070), and His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-030). El DP068 demuestra una rotura de >90 de estructura de láminas β de A β 42, mientras que DP-080, DP-074, DP-072, DP-073, DP-069, DP-079, DP-076, DP-051, DP-071 y DP-075 demuestran todos una rotura de >60% de estructura de láminas de A β 42 β (figura 11).

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

10 Rotura de fibrilas de A β de Alzheimer mediante péptidos 6-9meros según se valoró mediante fluorometría de tioflavina T.

La fluorometría de tioflavina T, que mide la cantidad de fibrilas amiloides (LeVine III, Protein Sci. 2:404-410, 1993; Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 2:1-6, 1995; Naiki and Nakakuki, Lab. Invest., 74:374-383, 1996; Castillo et al, J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997) se usó también para determinar la eficacia de péptidos 6-9meros en la rotura de fibrilas amiloides de A β 42. Para estos estudios, se incubó 0,1 mg/ml de A β 42 (Bachem Inc) en tubos de microcentrifugadora a 37°C durante 3 días (por triplicado), solos o bien en presencia de 0,2 mg/ml de péptido (a una relación en peso de A β : péptido de 1:2) en TPBSF (10% de TFE, NaF 150 mM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4). Se tomaron partes alícuotas de 50 μ l para un análisis en el día 3 y se añadieron partes alícuotas de 200 μ l de tioflavina 125 μ M en NaPO₄ 62 mM (pH 6,0) proporcionando una concentración final de tioflavina T de 100 μ M y 62 mM de NaPO₄. Se midió la emisión de fluorescencia a 480 nM en un fluorómetro de microplaca de 96 pocillos (Labsystem) a una longitud de onda de excitación de 450 nm. Para todas las determinaciones, cualquier fluorescencia proporcionadas por los péptidos en presencia del reactivo de tioflavina T se sustrajeron siempre de todas las lecturas pertinentes. Unos estudios previos han indicado que las concentraciones crecientes de A β 42 fibrilar proporcionan un aumento proporcional de la fluorescencia en presencia de tioflavina T 100 μ M, descartando la presencia de cualesquiera efectos de filtro internos desproporcionados a esta concentración de tioflavina T (Castillo et al J. Neurochem. 69:2452-2465, 1997).

La figura 12 muestra las roturas de la unión de tioflavina T a A β 42 a partir de péptidos 6-9meros y análogos, clasificadas en orden de eficacia. Los péptidos preferidos en orden de eficacia incluyen, pero sin limitación Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-080), Acetyl-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-073), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-074), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-079), Acetyl-Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-076), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-051), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys-amida (DP-078), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-amida (DP-075), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly (DP-045), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-037), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-052), His-Pro-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-064), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys (DP-077), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-056), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-031), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile (DP-035), His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-030), Thr-Arg-Ile-Ser-Leu-Gln-Val (DP-059), Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe (DP-042), Ser-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Arg (DP-060), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-043), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-062), Leu-Pro-Phe-Val-Leu-Arg (DP-057) y Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys (DP-046). DP-080, DP-073, DP-074, DP-079, DP-076 y DP-051 demostraron todos una inhibición/rotura > 75% de fibrilas de A β 42, mientras que DP-078 y DP-075 demostraron una inhibición/rotura > 50% de fibrilas de A β 42.

EJEMPLO 3

45 Unión de péptidos 6-9meros a fibrilas de A β 42 de Alzheimer

Se determinó la capacidad de diversos péptidos para unirse a A β 42 unido a sustrato mediante un ensayo de unión en fase sólida junto con una determinación de fracciones de péptido sin unir usando cromatografía líquida a presión elevada unida a un detector selectivo de masa (HPLC/MSD; sistema Agilent 1100 HPLC). Los péptidos fueron resueltos en HPLC usando una columna Synergi-Max RP (2 x 0,4 cm; 2 μ m) a partir de phenomenex con un caudal de 1 ml/min y un gradiente de 0-60% de acetonitrilo en agua, que contenía 1% de ácido fórmico durante 5,5 minutos. Los péptidos fueron detectados a medida que salían de la columna usando MSD SL (Agilent). El MSD tenía los siguientes ajustes: verificación de iones positivo en modo de exploración de 200-1200 Da; voltaje fragmentador 150; caudal secador 13 l/min de N₂; presión nebulizadora 3,10 bares; temperatura del gas secador 350°C y voltaje de capilaridad 3500 voltios;

El ensayo de unión en fase sólida se realizó como sigue: partes alícuotas de 10 μ g de A β 42 se unieron a membrana PVDF en la parte inferior de una microplaca de 96 pocillos (disponible en la entidad Millipore) según las instrucciones del fabricante. La placa se dejó secar y se aplicaron partes alícuotas de 150 μ l de 0,1 mg/ml de péptidos 6-9meros en cada pocillo. Cada péptido 6-9mero fue aplicado por triplicado en los pocillos que contenían A β 42 (pocillos del ensayo) y por triplicado en los pocillos que no contenían A β 42 (pocillos en blanco). Las placas que contenían 16 péptidos 6-meros diferentes se incubaron a 37°C durante 2 horas. El péptido sin unir en cada pocillo fue seguidamente transferido a viales de HPLC/MSD para un análisis con los ajustes anteriormente indicados. Los péptidos recuperados de los pocillos sin A β 42 fueron tomados como los péptidos totales, mientras que los péptidos

recuperados con pocillos con A β 42 fueron tomados como los péptidos de unión total. Seguidamente se representaron gráficamente los porcentajes de diversos péptidos unidos después de 2 horas de incubación (figura 13).

5 La figura 13 muestra los elementos de unión de A β 42 a partir de péptidos 6-9meros y análogos, clasificados en orden de eficacia. Los péptidos preferidos en orden de eficacia incluyen, pero sin limitación, His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met (DP-036), Trp-His-Arg-Val-Ala-Val-Ile-amida (DP-066), His-Pro-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-064), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-080), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-072), Acetyl-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-073), Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly-Lys (DP-046), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-069), Gly-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-044), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida (DP-074), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-amida (DP-067), His-Arg-Val-Pro-Val-Ile-Met (DP-054), His-Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp (DP-030), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg (DP-056), His-Arg-Pro-Ala-Val-Ile-Met (DP-053), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met-amida (DP-070), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-amida (DP-068), Ala-His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe (DP-042), His-Gly-Arg-Leu-Val-Phe-Met (DP-043), Arg-Val-Ser-Val-Arg-Trp-Gly (DP-031), Phe-Leu-Ala-His-Gly-Arg-Leu (DP-040), Trp-His-Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-amida (DP-079), Thr-Leu-Phe-Leu-Ala-Arg-Lys-amida (DP-078), Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly (DP-037), Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala (DP-033), Asp-Gly-Arg-Trp-His-Arg-Val (DP-032), Ala-Gly-Gln-Trp-His-Arg-Val (DP-026), Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Gly (DP-045) y Arg-Trp-His-Arg-Val-Ala-Val (DP-034). DP-036 y DP-066 demostraron una unión > 40% a A β 42 unido a sustrato, mientras que DP-064 y DP-080 demostraron una unión >30% y DP-0072 y DP-073 demostraron una unión > 20% (figura 13).

20

EJEMPLO 4

Rotura de estructura secundaria de láminas de fibrilas β de Alzheimer mediante péptidos 6-9meros según se valoró mediante espectropolarimetría CD

25

La espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD) es otra técnica *in vitro* usada para determinar la eficacia de un péptido dado para romper la estructura secundaria de láminas de fibrilas β de A β . Se registraron espectros de CD de A β 42 en presencia o ausencia de péptidos 6-9meros sintéticos a 25°C en un espectropolarímetro JASCO-810 usando una cubeta de cuarzo con una longitud de trayectoria de 0,5 mm y sobre el intervalo de 190-260 nm. El instrumento fue calibrado con una solución acuosa de ácido (+)-canforsulfónico. El instrumento fue seguidamente ajustado para recoger datos a una anchura de banda de 5 nm, tiempo de respuesta de 32 segundo, ondulación de datos de 0,5 nm y velocidad de exploración de 10 nm/min. Cada espectro de CD fue una media de 5 espectros, tomados cada uno a partir de una solución duplicada por separado. Los resultados de CD fueron expresados como elipticidad de residuo molar (MRE) de A β 42, después de la sustracción del espectro del disolvente de fondo y/o el espectro del péptido del ensayo. Para este estudio, se incubó A β 42 fibrilar (0,1 mg/ml) en TPBSF (10% de TFE, NaF 150 mM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4) durante 3 días a 37°C en presencia y ausencia de diversos péptidos 6-9meros a una relación p/p de A β 42 2: péptido de 1:2, antes de registrar los espectros de CD.

35

Los espectros de CD de A β 42 solo, A β 42 más péptido 6-9mero y péptido 6-9mero solo se representan en la figura 7, con un resumen global en la figura 8.

40

La figura 7 muestra el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 después de 3 días de incubación (línea continua). Tanto la elipticidad negativa a 218 nm como la elipticidad positiva a 195 nm indican la presencia de estructura secundaria de láminas beta. También en la figura 7 está el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 en presencia de 0,2 mg/ml de DP-074 después de 3 días de incubación (línea de puntos) con una corrección para el espectro de péptido DP-074. La pérdida significativa de elipticidad negativa a 218 nm en presencia de DP-074 indica una pérdida de estructura de láminas beta en A β 42. La figura 7 muestra el espectro de CD de 0,2 mg/ml de DP-074 solo (línea de puntos) con elipticidades positivas y máximos a aproximadamente 200 nm que indican un enrollamiento al azar invertido congruente con un péptido de aminoácidos, con muy poca estructura de láminas beta. También se muestra en la figura 7 por motivos de comparación el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 después de 3 días de incubación (línea continua).

45

La figura 8 muestra las elipticidades de 0,1 mg/ml de A β 42 a 218 nm en presencia de 0,2 mg/ml de diversos péptidos 6-9meros después de 3 días de incubación y después de la corrección para las elipticidades CD de diversos péptidos. Los péptidos ensayados en este caso son DP-065 a LP-081 y polilisina. Debe apreciarse que los péptidos DP-065, DP-067 y LP-081 provocaron un aumento de la elipticidad negativa a 218 nm, indicando que estos péptidos sorprendentemente favorecen la formación de estructura de láminas beta de A β 42. Se hace referencia a la figura 11 para la clasificación de la eficacia de diversos péptidos 6-9meros.

55

EJEMPLO 5

Rotura dependiente de la dosis de estructura secundaria de láminas beta de fibrilas de Alzheimer mediante péptidos 6-9meros según se valoró mediante espectropolarimetría CD

60

La espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD) es otra técnica *in vitro* usada para determinar la eficacia de un

65

péptido dado para romper la estructura secundaria de láminas b de fibrilas. Los espectros de CD de A β 42 en presencia o ausencia de péptidos 6-9meros sintéticos fueron registrados a 25°C en un espectropolarímetro JASCO-810 usando una cubeta de cuarzo de longitud de trayectoria de 0,5 mM y sobre el intervalo de 190-260 nm. El instrumento fue calibrado con una solución acuosa de ácido (+)- canforsulfónico. El instrumento fue seguidamente ajustado para recoger datos a una anchura de banda de 5 nm, tiempo de respuesta de 32 segundos, ondulación de datos de 0,5 nm y velocidad de exploración de 10 nm/min. Cada espectro de CD fue una media de 5 espectros, tomados cada uno a partir de una solución duplicada por separado. Los resultados de CD fueron expresados como elipticidad de residuo molar (MRE) de A β 42, después de la sustracción del espectro del disolvente de fondo y/o espectro de péptido del ensayo. Para este estudio se incubó A β 42 fibrilar (0,1 mg/ml) en TPDSF (10% de TFE, NaF 150 nM, HNaPO₄ 50 mM, pH 7,4) durante 3 días a 37°C en presencia y ausencia de diversos péptidos a relaciones de A β 42: péptido de 1:0,1, 1:1, 1:2 y 1:10 antes de registrar los espectros de CD.

Los espectros de CD de A β 42 solo, A β 42 más péptido 6-9mero y péptido solo se presentan en la figura 9, con un sumario global en la figura 10.

La figura 9 muestra en el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 después de 3 días de incubación (azul). Tanto la elipticidad negativa a 218 nm como la elipticidad positiva a 195 nm indican la presencia de Estructura de láminas beta en A β 42. También en la figura 9 está el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 en presencia de 0,01, 0,1, 0,2 y 0,5 mg/ml de péptido DP-074 después de 3 días de incubación (con corrección para el espectro de péptido DP-074). La pérdida significativa de elipticidad negativa a 218 nm indica una pérdida de estructura de láminas beta en A β 42. El efecto dependiente de la dosis es observado solamente a 0,2 mg/ml y valores inferiores. A 0,5 mg/ml de péptido DP-074, la tendencia se detiene e invierte su transcurso. Esto es debido quizás a la concentración muy elevada de péptido del ensayo que provoca una absorción significativa de la luz entrante. La figura 9 muestra el espectro de CD de 0,01, 0,1, 0,2 y 0,5 mg/ml de péptido DP-074 solo con elipticidades positivas máximas a aproximadamente 200 nm, indicando un enrollamiento al azar invertido congruente con un péptido de D-aminoácido con muy poca estructura de láminas beta. También en la figura 9 está para fines de comparación el espectro de CD de 0,1 mg/ml de A β 42 después de 3 días de incubación (azul).

EJEMPLO 6

Estabilidad de péptidos en suero humano

Una característica deseable de cualquier candidato potencial de agente terapéutico o fármaco es la capacidad de resistir la degradación por enzimas en la sangre, para tener tiempo suficiente para alcanzar su diana. Uno de los ensayos *in vitro* usados para determinar la estabilidad de los péptidos descritos en la presente memoria descriptiva es incubando estos péptidos en suero humano y determinar el nivel de los péptidos intactos (y degradación posible) a diversos valores del tiempo. Se añadieron partes alícuotas de 50 μ l de diversos péptidos a 700 μ l de suero humano (en muestras por triplicado. Se tomaron partes alícuotas de 100 μ l a las 0, 2, 4, 6, 14 y 32 horas, seguido inmediatamente de la adición de 200 μ l de etanol (o 20 μ l de ácido trifluoroacético o 300 μ l de metanol) y se centrifugaron a 14.000 x g (Eppendorf) durante 10 minutos. El nivel de péptidos intactos en la materia sobrenadante se determinó seguidamente usando LC/MS (Agilent HPLC/MS SL 1100 Series). El MS verificó cada péptido a medida que salía de la HPLC usando una verificación de iones positivos de modo SIM a masas correspondientes a iones de péptidos de carga única, doble y triple. El pico en los cromatogramas iónicos resultantes fue integrado para obtener la abundancia de iones totales en cada muestra. La media de determinaciones por triplicado de la abundancia de iones totales para cada valor de tiempo de incubación de suero fue seguidamente representado gráficamente como una función del tiempo de incubación de suero. La mayoría de las enzimas degradantes de péptidos en el cuerpo reconocen los péptidos naturales preparados a partir de los L-aminoácidos. Como los péptidos consisten en D-aminoácidos, su degradación en fluidos biológicos probablemente se retrasará como se demuestra en este ejemplo y en las figuras siguientes.

La figura 14 muestra el nivel de péptido DP-068 en suero humano como una función del tiempo durante un período de incubación de 32 horas. El péptido DP-068 consiste en todos los D-aminoácidos, como se muestra en la figura 14, y es resistente a la degradación en suero hasta las 32 horas inclusive.

La figura 15 muestra el nivel de péptido DP-074 en suero humano como una función del tiempo durante un período de incubación de 32 horas. El péptido DP-074 consiste en todos los D-aminoácidos, como se muestra en la figura 15, y es resistente a la degradación en el suero hasta las 32 horas inclusive.

Otros datos se ilustran como sigue:

La figura 1 muestra secuencias de péptidos y los dibujos 5-13meros DP-068 y DP-074.

La figura 2 muestra espectros de CD de A β 42 más polilisina y DP-065 a través de DP-072 a una concentración p/p de A β 42/péptido de (1:2)

La figura 3 muestra espectros de CD de A β 42 más DP-065 a través de DP-072 a (1:0,1, 1:1, 1:2, 1:5), con la figura 4 como resumen de la respuesta a la dosis CD de A β 42 +/- DP-065 respecto a DP-072.

5 La figura 5 es un resumen de tio T de A β 42 +/- DP65-72 (1:0,1, 1:1, 1:2, 1:5) y lisina, con la figura 6 como resumen de tio T con valores de 65/72

Aspectos y utilizaciones adicionales

10 Una aplicación terapéutica es usar péptidos de la invención como agentes de unión o secuestradores de A β , inhibidores de la formación de fibrilas amiloides A β , inhibidores del depósito de fibrilas amiloides A β , inhibidores de la acumulación y/o persistencia de fibrilas amiloides A β en enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down y otros trastornos amiloides que implican fibrillogénesis de A β .

15 Un "péptido" se refiere a dos o más aminoácidos conjuntamente conectados por enlaces péptidos como es conocido por los expertos en la técnica. Los péptidos preferidos son los descritos en la presente memoria descriptiva, pero pueden incluir también ventajosamente péptidos que tienen una identidad de al menos 70% y, más preferentemente, de 80-90% respecto a un péptido descrito. "% de identidad" como se usa en la presente memoria descriptiva para péptidos, significa los mismos aminoácidos en el mismo lugar. Por tanto, dos péptidos de 10 aminoácidos son un 20 90% idénticos si la yuxtaposición de uno respecto a otro muestra que la colocación y la identidad de cada aminoácido es idéntica excepto para un aminoácido. Si un péptido de 10 aminoácidos es yuxtapuesto a otro péptido de diez aminoácidos y la colocación y la identidad de los aminoácidos es idéntica, excepto para dos aminoácidos, entonces los dos péptidos de 10 aminoácidos tienen una identidad de 80% uno respecto a otro.

25 Los péptidos descritos se producen mediante procedimientos sintéticos químicos. La síntesis química de péptidos es un sector en rápida evolución en la técnica y los métodos de síntesis de métodos en fase sólida están bien descritos en las siguientes referencias: : Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85:2149-2154, 1963; Merrifield, Science 232:341-347, 1986; Fields, Int.J.Polypeptide Prot. Res. 35, 161, 1990. Los péptidos descritos pueden ser utilizados también como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamiento y diagnósticos para enfermedades 30 humanas.

La vía de administración incluye oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intraarticular, intranasal, intratecal, intradérmica, transdérmica o mediante inhalación. Una dosis eficaz de cada uno de los péptidos descritos en la presente memoria descriptiva como agentes terapéuticos potenciales para ser usados en el 35 tratamiento de amiloidosis de A β en la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos es de aproximadamente 1 μ g a 500 mg/kg de peso corporal, por administración única, que puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica. La dosificación depende de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de terapia concurrente, si la hay, y frecuencia del tratamiento. Otros límites superiores de los intervalos de dosificaciones eficaces son 100 mg/kg de peso corporal, 50 mg/kg de peso corporal, 25 mg/kg de peso corporal y 10 mg/kg de peso corporal.

40 Como se usan en la presente memoria descriptiva, los polipéptidos pueden consistir en L-aminoácidos o D-aminoácidos o una mezcla de ambas formas. Los aminoácidos en la naturaleza consisten en L-aminoácidos. Sin embargo, la sustitución con D-aminoácidos generalmente demuestra una biodisponibilidad mejorada debido a la menor degradación en fluidos biológicos (como el plasma) y una penetración mejorada a través de la barrera sanguínea del cerebro. Los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a la que se encuentra en 45 un péptido descrito, pero en los que la totalidad o parte de los L-aminoácidos han sido sustituidos con D-aminoácidos son una parte del desarrollo descrito de agentes terapéuticos para tratar la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis A β .

50 Como SE usa en la presente memoria descriptiva, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. En una realización, el vehículo es adecuado para una administración parenteral. Preferentemente, el vehículo es adecuado para una administración en el sistema nervioso central (por ejemplo, por vía intraespinal o intracerebral). Alternativamente, el 55 vehículo puede ser adecuado para una administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. En otra realización, el vehículo es adecuado para una administración oral. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas esterilizadas y polvos esterilizados para una preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables esterilizadas. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en lo que se refiere a cualesquiera medios o agentes convencionales sean compatibles con el compuesto activo, su uso en las composiciones farmacéuticas está 60 contemplado. Pueden ser incorporados también compuestos complementariamente activos en las composiciones.

65 Como se usa en la presente memoria descriptiva, "amiloidosis A β " se refiere a enfermedades amiloides que implican la formación depósito, acumulación y/o persistencia de A β (es decir, proteína β -amiloide), que incluye, pero sin limitación, A β que contiene 39-43 aminoácidos de longitud, pero, más preferentemente A β 1-40 o A β 1-42 y mezclas o fragmentos de los mismos.

5 “Amiloidosis A β ” y “enfermedades de fibrilógenesis de A β ” incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, formas de amiloidosis familiar, amiloidosis cerebrovascular y hemorragia cerebral, angiopatía amiloide de cistatina C, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo Dutch), hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo islandés) y miositis de cuerpos de inclusión.

Aplicaciones terapéuticas

10 Los péptidos de la invención, los fragmentos, análogos y derivados de los mismos son usados como agentes terapéuticos inhibidores amiloides. Los péptidos de la invención, sus fragmentos, análogos y derivados pueden ser sintetizados por lo tanto utilizando técnicas estándar (por ejemplo, usando un sintetizador automatizado). En una realización preferida, los péptidos específicos de la invención, sus fragmentos, análogos o derivados pueden ser usados por lo tanto para unir o secuestrar A β amiloide, inhibir la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de A β amiloide en un paciente dado. Análogamente, en otra realización preferida, los anticuerpos anti-idiotípicos preparados contra los péptidos de la invención, sus fragmentos, análogos o derivados, (como se describe con anterioridad) pueden ser proporcionados a un paciente humano como agentes de unión A β o anticuerpos secuestrantes potenciales, que pueden romper o inhibir la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de A β amiloide en el paciente dado.

20 Una formulación para ser usada en el tratamiento de amiloidosis A β comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un péptido de la invención, un fragmento, análogo o derivado del mismo, un anticuerpo anti-idiotípico o un fragmento de anticuerpo anti-idiotípico que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente otros anticuerpos o conjugados. Para una administración parenteral, las formulaciones preferidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas esterilizadas, que pueden contener agentes o excipientes auxiliares que son conocidos en la técnica. Las formulaciones de anticuerpos anti-idiotípicos pueden ser administradas usando modos convencionales de administración que incluyen, pero sin limitación, tópica, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, oral, intralinfática, intramuscular o intralumbar. La administración intravenosa es preferida. Las formulaciones farmacéuticas como comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gelatina blandas y duras, pastillas, bolsitas, sellos, cápsulas vegetarianas, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, bolsas de té, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), supositorios, soluciones inyectables esterilizadas, polvos envasados esterilizados pueden ser preparados según método rutinarios y son conocidos en la técnica. La administración de esta composición puede ser por vías orales o diversas parenterales como las vías subcutánea, intravenosa, intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdermal, anal o bucal. La administración parenteral puede ser mediante inyección de bolos o mediante perfusión gradual a los largo del tiempo. Los modos preferidos de administración de las formulaciones de péptidos de la invención, sus fragmentos análogos o derivados es mediante administración oral, intravenosa o aplicación intranasal.

40 Los péptidos de la invención, sus fragmentos análogos y derivados pueden ser administrados en la forma de una formulación farmacéutica por cualquier medio que consiga su finalidad prevista, por ejemplo, para tratar patologías como la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades amiloides A β , u otras patologías relacionadas. Las formulaciones terapéuticas pueden ser una diversidad de formas de dosificación, dependiendo la forma preferida del modo de administración y la aplicación terapéutica. La dosificación óptima, longitud, duración y modos de administración para un paciente individual pueden ser fácilmente determinados mediante protocolos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica.

50 Debe entenderse que la dosificación del péptido de la invención, su fragmento, análogo y derivado administrados *in vivo* o *in vitro* dependerán de la edad, sexo, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente (si lo hay), frecuencia del tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. La dosificación más preferida será adaptada al sujeto individual, como es comprendido y determinable por un experto en la técnica, sin una experimentación excesiva.

55 Un régimen típico para prevenir, suprimir o tratar patologías, como amiloidosis de enfermedad de Alzheimer comprende la administración de una cantidad eficaz de un péptido de la invención, fragmento, análogo o derivado del mismo, administrado durante un período de uno a varios días hasta incluir entre una semana y aproximadamente 72 meses.

60 La dosis total requerida para cada tratamiento puede ser administrada en dosis múltiples o en una dosis única. Un péptido de la invención, fragmento, análogo o derivado del mismo puede ser administrado solo o en combinación con otros agentes terapéuticos dirigidos a las patologías, como enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades amiloides A β , como se describe en la presente memoria descriptiva.

65 Las cantidades eficaces de un péptido de la invención, fragmento, análogo o derivado del mismo, son de aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal y, preferentemente, de aproximadamente 10 μ g a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal como 0,05, 0,07, 0,09, 0,1, 0,5, 0,7, 0,9, 1,

2, 5, 10, 20, 35, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido de la invención o un anticuerpo anti-idiotípico pueden incluir soluciones adecuadas para una administración por vía intravenosa, subcutánea, dermal, nasal, oral, mucosal, rectal o mediante inyección o por vía oral y pueden contener de aproximadamente 0,01 a 99 %, preferentemente de aproximadamente 20 a 75 por ciento de componente activo (es decir o anticuerpo) junto con el excipiente. Las composiciones farmacéuticas para una administración oral incluyen píldoras, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina duras y blandas, pastillas, bolsitas, sellos, cápsulas vegetARIANAS, gotas líquidas, elixires, suspensiones, emulsiones soluciones y jarabes.

El péptido de la invención, fragmento, análogo y derivado del mismo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis A β del sistema nervioso central puede ser modificado para que atraviese la barrera sanguínea del cerebro. Diversas modificaciones son conocidas en la técnica para aumentar el transporte a través de la barrera sanguínea del cerebro (para exámenes de estas modificaciones, véase, por ejemplo Pardridge W.M. (1994) Trends in Biotechnol. 12:239-245; Van Bree, J. et al (1993) Pharm World Sci. 15:2-9; y Pardridge W.M. (1992) Pharmacol. Toxicol. 71:3-10). Una propuesta aumenta la lipofilicidad (log T del péptido mediante enlace covalente del amino o carboxilo terminal a un grupo ácido graso o acilo (como acetilo). Otra propuesta es conjugar el péptido a una proteína que normalmente experimenta una transcitosis mediada por absorción o transcitosis mediada por receptores a través de la barrera sanguínea del cerebro. Estas proteínas incluyen ligandos para receptores endoteliales de capilaridad cerebral como un anticuerpo monoclonal para el receptor de transferrina, histonas, biotina, folato, niacina, ácido pantoténico o glicopéptidos. Otra propuesta es unir el péptido a un compuesto con carga positiva elevada como lisina, polilisina, arginina, poliarginina, péptido de glicina-arginina, putrescina, espermidina, espermina, etc., todos los cuales se conoce que facilitan el cruzamiento a través de la barrera sanguínea del cerebro, presumiblemente uniéndose a un receptor.

Otra propuesta para mejorar el transporte por la barrera sanguínea del cerebro de péptidos es la encapsulación en un vector portador como liposoma o microesferas polímeras, preferentemente con carga positiva por la misma razón anteriormente descrita. El vector portador puede ser modificado también para receptores dianas de transporte por la barrera sanguínea del cerebro, como el receptor de transferrina, uniendo el péptido, por ejemplo, a un anticuerpo contra el receptor de transferrina.

Otra aproximación es administrar conjuntamente el péptido con agentes que permeabilizan la barrera sanguínea del cerebro, como bradiquinina o un agonista de bradiquinina.

El fármaco permeable a la barrera sanguínea del cerebro es una característica deseable de los fármacos para el sistema nervioso central en general. Sin embargo, las realizaciones descritas no tienen que cumplir necesariamente los requisitos de permeabilidad por la barrera sanguínea del cerebro con el fin de cumplir las finalidades previstas (es decir, tratamiento eficaz de la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis). El secuestro principal de A β por los péptidos de la invención, sus fragmentos, análogos y derivados y anticuerpos anti-idiotípicos dará lugar al desplazamiento de A β desde el cerebro hasta la circulación periférica, agotando la A β cerebral, inhibiendo la formación de fibrilas amiloides de A β en el cerebro y/o provocando la disolución de fibrilas de A β amiloide cerebral. Esto es debido, como se demostró en los estudios previos, al hecho de que la A β atraviesa libremente la barrera sanguínea del cerebro (Poduslo et al., Neurobiol. Dis. 4:27-34, 1997; Ghilardi et al., Neuroreport 17:2607-11, 1996; Pluta et al., Neuroreport 7:1261-51996, 1996; Zlokovic, Neurobiol Dis. 4:23-6, 1996).

El péptido de la invención, fragmento, análogo y derivado del mismo para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis A β del sistema nervioso central puede ser administrado de diversas formas. Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, la administración sistémica, administración parenteral (es decir, A través de las vías intraperitoneal, intravenosa, perioral, subcutánea, intramuscular, intraarterial, intradermal, intramuscular, intranasal epidural u oral. En una realización preferida, el compuesto del grupo de secuencias A, B o C, su fragmento, análogo o derivado puede ser directamente administrado al fluido cerebro espinal a través de inyección intraventricular. En una realización específica, puede ser deseable administrar un péptido de la invención, su fragmento, análogo y derivado localmente a la zona o tejido que necesita el tratamiento: esto se puede conseguir, por ejemplo, y sin carácter limitativo, mediante infusión local durante una cirugía por aplicación tópica, por inyección, por infusión, usando una cánula con una bomba osmótica por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante.

Todavía, en otra realización de un péptido de la invención, fragmento, análogo o derivado del mismo, puede ser administrado en un sistema de liberación controlada, como una bomba osmótica bien calibrada. Todavía, en otra realización, puede ser colocado un sistema de liberación controlada en las proximidades del agente terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo así solamente una fracción de la dosis sistémica.

Todavía, en otro aspecto, los compuestos peptidomiméticos modelados a partir de los péptidos de la invención identificados como A β de unión u otras proteínas amiloides, sirven como potentes inhibidores de la formación, depósito, acumulación y/o persistencia de amiloides en la enfermedad de Alzheimer y otras amiloidosis A β . La

modelación peptidomimética se realiza mediante procedimientos estándar conocidos por los expertos en la técnica. Estos compuestos peptidomiméticos pueden ser administrados con formulaciones, dosificaciones, frecuencias, longitudes y vías como se indicó anteriormente, para los fines terapéuticos de tratar la amiloidosis A β .

5 Aplicaciones de diagnóstico

En los métodos descritos la A β amiloide puede ponerse en contacto con un péptido descrito *in vitro* o *in vivo*. La expresión "ponerse en contacto" está destinada a abarcar tanto la incubación del péptido como los anticuerpos anti-idiotípicos con la preparación de A β amiloide *in vitro* y el suministro del péptido y los anticuerpos anti-idiotípicos a un sitio *in vivo* mientras está presente la A β amiloide. Como los péptidos y los anticuerpos anti-idiotípicos interaccionan con la A β amiloide, pueden ser usados para detectar A β amiloide, tanto *in vitro* como *in vivo*. Consecuentemente, los compuestos pueden ser usados como agentes de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de A β amiloide en una muestra biológica o *in vivo* en un sujeto. Además de ello, la detección de A β amiloide usando los compuestos puede ser usada para diagnosticar amiloidosis A β en un sujeto.

En una realización, se usa un compuesto *in vitro* para detectar y cuantificar A β amiloide en una muestra (como fluido cerebro espinal de un paciente de AD, paciente que se sospecha que tiene AD, una persona con un historial familiar de AD o un adulto normal). Para ayudar a la detección, el compuesto puede ser modificado con un sustrato detectable. La A β amiloide en la muestra puede ser inmovilizado y el compuesto con la sustancia detectable se pone en contacto con la A β amiloide inmovilizado o muestra, como en secciones de tejidos. El compuesto sin unir restante es retirado y el compuesto unido a A β puede ser detectado. Alternativamente, el compuesto sin unir que es inversamente proporcional al compuesto unido y, por tanto, la cantidad de A β en la muestra puede ser detectada por diversos medios, como espectrometría de masas y otras determinaciones espectrométricas que incluyen fluorescencia, fosforescencia y absorbancia de diversas longitudes de onda desde UV hasta infrarrojos, disminuyendo hasta radioondas como la de RMN. Por ejemplo, la sustancia detectable puede ser biotina (es decir, un péptido biotinilado con terminación amino de la invención) puede ser detectado usando avidina marcada con enzima. La enzima, a su vez, cuando es posteriormente expuesta a un sustrato apropiado, reaccionará con el sustrato de forma que se produzca un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Las enzimas que pueden ser usadas para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero sin limitación malato deshidrogenasa, nucleasa estafilococal, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol de levadura deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rabanillo, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección se puede realizar mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromógeno para la enzima. La detección se puede realizar mediante métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromógeno para la enzima. La detección se puede realizar también mediante una comparación visual del alcance de la reacción enzimática de un sustrato con patrones análogamente producidos (véase Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; Ausubel et al, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, N.Y. 1987, 1992).

Los compuestos descritos seleccionados, pueden ser usados también para detectar de forma cuantitativa o cualitativa A β amiloide en una muestra biológica. Esto se puede realizar mediante técnicas de inmunofluorescencia empleando un compuesto descrito marcado por fluorescencia acoplado a una detección microscópica de luz, citométrica de flujo o fluorométrica.

La detección se puede realizar usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, mediante radiomarcado del compuesto. Una buena descripción de este ensayo se puede encontrar en *Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology*, by Work et al, North Holland Publishing Company, NY (1978), con referencia particular al capítulo titulado "An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques" por Chard. El isótopo radioactivo puede ser detectado por medios como el uso de un contador gamma, un contador de centelleo o mediante auto-radiografía.

Está contemplado también marcar el compuesto con un compuesto fluorescente. Cuando el compuesto marcado por fluorescencia es expuesto a luz a una longitud de onda apropiada, su presencia puede ser seguidamente detectada debido a la fluorescencia. Entre los compuestos marcadores fluorescentes más comúnmente usados están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, haloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina, que están disponibles en el comercio, por ejemplo, en la entidad (Eugene, Oregon, U.S.A.).

Los compuestos pueden ser también detectablemente marcados acoplándolos a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del compuesto etiquetado por quimioluminiscencia es seguidamente determinada detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Análogamente, puede ser usado un compuesto bioluminiscente para marcar el compuesto. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta

la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente es determinada mediante la detección de la presencia de luminiscencia. Compuestos biluminiscentes importantes para los fines de marcado son luciferina, compuestos fosforados y aequorina.

- 5 Los compuestos pueden ser usados también de forma histológica, como en microscopía de inmunofluorescencia inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de A β amiloide. La toma de una muestra histológica de un paciente y la provisión de un compuesto marcado como una muestra se puede realizar mediante detección *in situ*. El compuesto es preferentemente proporcionado aplicando o sobreponiendo el compuesto marcado o fragmento) a una muestra biológica. Mediante el uso de este procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia de A β amiloide sino también su distribución en el tejido examinado. Por tanto, los expertos en la técnica apreciarán que cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (como procedimientos de tinción) pueden ser modificados con el fin de conseguir esta detección *in situ*.

- 15 Los compuestos que interaccionan con A β , o sus derivados, se describen también en la presente memoria descriptiva. Los compuestos pueden ser usados para un cierto número de aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas importantes, como se describe en la presente memoria descriptiva. En un aspecto, pueden ser utilizados péptidos que se unen a A β para un análisis de transferencia de ligandos (usando técnicas de transferencia de ligandos estándar conocidas por los expertos en la técnica) para detectar la presencia de fragmentos de proteína A β amiloide en tejidos humanos y en tejidos de otras especies. El análisis de transferencia de ligandos puede ser usado también para determinar el tamaño aparente de cada fragmento de proteína amiloide. Además, la transferencia de ligando seguida de densitometría de exploración (conocida por los expertos en la técnica) puede ser usada para cuantificar y comparar niveles de cada uno de los péptidos en las muestras de tejidos, fluidos biológicos o biopsias obtenidas de individuos con enfermedades específicas (como enfermedades amiloides) en comparación con muestras de tejidos, fluidos biológicos o biopsias obtenidas de individuos normales o testigos. Los fluidos biológicos incluyen, pero sin limitación, sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, esputo, saliva, orina y heces.

- En otra realización se usa un compuesto *in vivo* para detectar y, si se desea, cuantificar el depósito de A β amiloide en un sujeto, por ejemplo, para ayudar en el diagnóstico de amiloidosis A β en el sujeto. Para ayudar a la detección, el compuesto puede ser modificado con una sustancia detectable, preferentemente ^{99m}Tc o yodo radioactivo. Los métodos para marcar compuestos péptidos con tecnecio son conocidos en la técnica. Puede ser escogido un grupo modificador que proporcione un sitio en el que se pueda introducir un grupo quelante para ^{99m}Tc , como un derivado de ácido cítrico, que tiene un grupo amino libre. También se proporcionan péptidos de la invención marcados con yodo radioactivo a través de su aminoácido aromático, que está ya presente o es incorporado, para los fines de marcado. Cualquiera de los diversos isotópicos de yodo radioactivo puede ser incorporado para crear un agente de diagnóstico. Preferentemente, puede ser usado ^{123}I (semivida = 13,2 horas) para escintigrafía corporal completa, ^{124}I (semivida = 4 días) para ^{18}F para tomografía de emisión de positrones (PET), ^{125}I (semivida = 60 días) para estudios de trastornos metabólicos y ^{131}I (semivida = 8 días) para un recuento corporal completo y estudios de formación de imágenes de baja resolución retardados.

40 Listado de secuencias

- <110> PROTEOTECH, INC
 <120> PÉPTIDOS PEQUEÑOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y OTROS TRASTORNOS DE FIBRILOGÉNESIS DE PROTEÍNA BETA-AMILOIDE
 45 <130> P40769EP2/NJL
 <150> US11/016,706
 <151> 16-12-2004
 <150> US60/615,614
 <151> 30-09-2004
 50 <150> US60/554,342
 <151> 17-03-2004
 <150> US60/531,406
 <151> 18-12-2003
 <160> 89
 55 <170> PatentIn ver. 3.2
 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60 <400> 1
 Arg Lys Arg Leu Gln Val Gln Leu Ser Ile Arg Thr
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 65 <213> Mus musculus

<400> 2
 Lys Ala Phe Asp Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 Arg Gln Val Phe Gln Val Ala Tyr Ile Ile Ile Lys Ala
 1 5 10
 <210> 4
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 His Gln Thr Trp Thr Arg Asn Leu Gln Val Thr Leu
 1 5 10
 15 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 20 Ile Ser Asn Val Phe Val Gln Arg Leu Ser Leu Ser
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 6
 Ala Ser Pro Pro Ser Val Lys Val Trp Gln Asp Ala
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Arg Gly Leu Val Phe His Thr Gly Thr Lys Asn Ser Phe
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Tyr Leu Ser Lys Gly Arg Leu Val Phe Ala Leu Gly
 1 5 10
 <210> 9
 40 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Asn Asp Gly Lys Trp His Thr Val Val Phe Gly His
 1 5 10
 45 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 50 Gly Asn Ser Thr Ile Ser Ile Arg Ala Pro Val Tyr
 1 5 10
 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <400> 11
 Thr Leu Phe Leu Ala His Gly Arg Leu Val Phe Met
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 12
 His Pro Asp Asp Phe Val Phe Tyr Val Gly Gly Tyr
 1 5 10
 5 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 13
 Trp Leu Tyr Val Asp Asp Gln Leu Gln Leu Val Lys
 1 5 10
 10 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14
 Val Gln Ser Arg Gln His Ser Arg Ala Gly Gln Trp
 1 5 10
 15 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15
 Ala Gly Gln Trp His Arg Val Ser Val Arg Trp Gly
 1 5 10
 20 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Val Arg Trp Gly Met Gln Gln Ile Gln Leu Val Val
 1 5 10
 25 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 17
 Thr Trp Ser Gln Lys Ala Leu His His Arg Val Pro
 1 5 10
 30 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Asp Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val Ile Met Gly
 1 5 10
 35 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19
 Ala Pro Val Asn Val Thr Ala Ser Val Gln Ile Gln
 1 5 10
 40 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 20
 Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg
 1 5 10
 45 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 21
 Ala Tyr Ser Phe Ile Val Lys Ile Glu Arg Val Gly
 1 5 10
 50 <210> 22
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 22
 Glu Asp Ser Leu Ile Ser Arg Arg Ala Tyr Phe Asn
 1 5 10
 5 <210> 23
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 23
 Arg Ala Tyr Phe Asn Gly Gln Ser Phe Ile Ala Ser
 1 5 10
 10 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24
 His Lys Lys Leu Lys Ile Arg Ser Gln Glu Lys Tyr
 1 5 10
 15 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25
 Ala Pro Gly Arg Ala Val Lys Asn Val Gln Ile Thr
 1 5 10
 20 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26
 Val Ile Arg Asp Ser Asn Val Val Gln Leu Asp Val
 1 5 10
 25 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27
 Gly Lys Asn Thr Gly Asp His Phe Val Leu Tyr Met
 1 5 10
 30 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 28
 Ala Val Ser Ile Asp Arg Thr Leu Gln Phe Gly His
 1 5 10
 35 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 Arg Leu Val Ser Tyr Asn Gly Ile Ile Phe Phe Leu Lys
 1 5 10
 40 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 30
 Ala Ser Lys Ala Ile Gln Val Phe Leu Leu Ala Gly
 1 5 10
 45 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 31
 His Gln Asn Met Gly Ser Val Asn Val Ser Val Gly
 1 5 10

ES 2 437 134 T3

<210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5 <400> 32
 Leu Val Leu Phe Leu Asn His Gly His Phe Val Ala
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 33
 Gly Gly Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Ser Lys Leu
 1 5 10
 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 34
 Leu Arg Thr Pro Thr Gln Met Val Gly Val Thr Pro
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 35
 Ser Gly Thr Leu Ala Leu Ser Lys Gln Gly Lys Ala
 1 5 10
 25 <210> 36
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 30 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40
 <210> 37
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 37
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40
 <210> 38
 <211> 416
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 38

ES 2 437 134 T3

Val₁ Val Arg Leu Asn₅ Asp Thr Val Gly Val₁₀ Thr Lys Lys Cys Ser Glu₁₅
 Asp Trp Lys Leu₂₀ Val Arg Ser Ala Ser₂₅ Phe Ser Arg Gly Gly₃₀ Gln Leu
 Ser Phe Thr₃₅ Asp Leu Gly Leu Pro₄₀ Pro Thr Asp His Leu₄₅ Gln Ala Ser
 Phe Gly₅₀ Phe Gln Thr Phe Gln₅₅ Pro Ser Gly Ile Leu₆₀ Leu Asp His Gln
 Thr Trp Thr Arg Asn₇₀ Leu Gln Val Thr Leu Glu₇₅ Asp Gly Tyr Ile Glu₈₀
 Leu Ser Thr Ser₈₅ Asp Ser Gly Gly Pro Ile₉₀ Phe Lys Ser Pro Gln Thr₉₅
 Tyr Met Asp Gly₁₀₀ Leu Leu His Tyr Val₁₀₅ Ser Val Ile Ser Asp Asn Ser
 Gly Leu Arg₁₁₅ Leu Leu Ile Asp Asp₁₂₀ Gln Leu Leu Arg Asn Ser Lys Arg
 Leu Lys His Ile Ser Ser₁₃₅ Ser Arg Gln Ser Leu Arg₁₄₀ Leu Gly Gly Ser
 Asn Phe Glu Gly Cys Ile₁₅₀ Ser Asn Val Phe Val₁₅₅ Gln Arg Leu Ser Leu
 Ser Pro Glu Val₁₆₅ Leu Asp Leu Thr Ser Asn Ser₁₇₀ Leu Lys Arg Asp Val₁₇₅
 Ser Leu Gly Gly₁₈₀ Cys Ser Leu Asn Lys₁₈₅ Pro Pro Phe Leu Met Leu Leu
 Lys Gly Ser₁₉₅ Thr Arg Phe Asn Lys₂₀₀ Thr Lys Thr Phe Arg Ile Asn Gln
 Leu Leu Gln Asp Thr Pro Val₂₁₅ Ala Ser Pro Arg Ser₂₂₀ Val Lys Val Trp
 Gln Asp Ala Cys Ser Pro₂₃₀ Leu Pro Lys Thr Gln Ala Asn His Gly Ala₂₄₀
 Leu Gln Phe Gly Asp Ile Pro Thr Ser His₂₅₀ Leu Leu Phe Lys Leu Pro₂₅₅
 Gln Glu Leu Leu Lys Pro Arg Ser Gln Phe Ala Val Asp Met₂₇₀ Gln Thr
 Thr Ser Ser₂₇₅ Arg Gly Leu Val Phe His Thr Gly Thr Lys Asn Ser Phe
 Met Ala Leu Tyr Leu Ser Lys₂₉₅ Gly Arg Leu Val Phe Ala Leu Gly Thr
 Asp Gly Lys Lys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Glu₃₁₅ Lys Cys Asn Asp Gly₃₂₀
 Lys Trp His Thr Val Val Phe Gly His Asp Gly Glu Lys Gly Arg Leu
 Val Val Asp Gly₃₄₀ Leu Arg Ala Arg Glu Gly Ser Leu Pro Gly Asn Ser
 Thr Ile Ser Ile Arg Ala Pro Val Tyr Leu Gly Ser Pro₃₆₅ Pro Ser Gly
 Lys Pro Lys Ser Leu Pro Thr₃₇₅ Asn Ser Phe Val Gly₃₈₀ Cys Leu Lys Asn
 Phe Gln Leu Asp Ser Lys₃₉₀ Pro Leu Tyr Thr Pro Ser Ser Ser Phe Gly
 Val Ser Ser Cys Leu Gly Gly Pro Leu Glu₄₁₀ Lys Gly Ile Tyr Phe Ser
 405 415

<210> 39
 <211> 964
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 39

5

ES 2 437 134 T3

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

ES 2 437 134 T3

			245					250						255			
Gly	Phe	Ser	Asn 260	Gly	Pro	Val	His	Leu 265	Glu	Asp	Thr	Leu	Lys 270	Lys	Ala		
Gln	Ile	Asn 275	Asp	Ala	Lys	Tyr	Arg 280	Glu	Ile	Ser	Ile	Ile 285	Tyr	His	Asn		
Asp	Lys 290	Lys	Met	Ile	Leu	Val 295	Val	Asp	Arg	Arg	His 300	Val	Lys	Ser	Thr		
Asp 305	Asn	Glu	Lys	Lys	Lys 310	Ile	Pro	Phe	Thr	Asp 315	Ile	Tyr	Ile	Gly	Gly 320		
Ala	Pro	Gln	Glu	Val 325	Leu	Gln	Ser	Arg	Thr 330	Leu	Arg	Ala	His	Leu 335	Pro		
Leu	Asp	Ile	Asn 340	Phe	Arg	Gly	Cys	Met 345	Lys	Gly	Ile	Gln	Phe 350	Gln	Lys		
Lys	Asp	Phe 355	Asn	Leu	Leu	Glu	Gln 360	Thr	Glu	Thr	Leu	Gly 365	Val	Gly	Tyr		
Gly	Cys 370	Pro	Glu	Asp	Ser	Leu 375	Ile	Ser	Arg	Arg	Ala 380	Tyr	Phe	Asn	Gly		
Gln 385	Ser	Phe	Ile	Ala	Ser 390	Ile	Gln	Lys	Ile	Ser 395	Phe	Phe	Asp	Gly	Phe 400		
Glu	Gly	Gly	Phe	Asn 405	Phe	Arg	Thr	Leu	Gln 410	Pro	Asn	Gly	Leu	Leu 415	Phe		
Tyr	Tyr	Thr	Ser 420	Gly	Ser	Asp	Val	Phe 425	Ser	Ile	Ser	Leu	Asp 430	Asn	Gly		
Thr	Val	Val 435	Met	Asp	Val	Lys	Gly 440	Ile	Lys	Val	Met	Ser 445	Thr	Asp	Lys		
Gln	Tyr 450	His	Asp	Gly	Leu	Pro 455	His	Phe	Val	Val	Thr 460	Ser	Ile	Ser	Asp		
Thr 465	Arg	Tyr	Glu	Leu	Val 470	Val	Asp	Lys	Ser	Arg 475	Leu	Arg	Gly	Lys	Asn 480		
Pro	Thr	Lys	Gly	Lys 485	Ala	Glu	Gln	Thr	Gln 490	Thr	Thr	Glu	Lys	Lys 495	Phe		
Tyr	Phe	Gly	Gly 500	Ser	Pro	Ile	Ser	Pro 505	Gln	Tyr	Ala	Asn	Phe 510	Thr	Gly		
Cys	Ile	Ser 515	Asn	Ala	Tyr	Phe	Thr 520	Arg	Leu	Asp	Arg	Asp 525	Val	Glu	Val		
Glu	Ala 530	Phe	Gln	Arg	Tyr	Ser 535	Glu	Lys	Val	His	Thr 540	Ser	Leu	Tyr	Glu		
Cys 545	Pro	Ile	Glu	Ser	Ser 550	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu 555	His	Lys	Lys	Gly	Lys 560		
Asn	Ser	Ser	Lys	Pro 565	Lys	Thr	Asn	Lys	Gln 570	Gly	Glu	Lys	Ser	Lys 575	Asp		
Ala	Pro	Ser	Trp 580	Asp	Pro	Ile	Gly	Leu 585	Lys	Phe	Leu	Glu	Gln 590	Lys	Ala		
Pro	Arg	Asp 595	Ser	His	Cys	His	Leu 600	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg 605	Ala	Ile	Glu		

ES 2 437 134 T3

His Ala Tyr Gln Tyr Gly Gly Thr Ala Asn Ser Arg Gln Glu Phe Glu
610 615 620
His Glu Gln Gly Asp Phe Gly Glu Lys Ser Gln Phe Ser Ile Arg Leu
625 630 635 640
Lys Thr Arg Ser Ser His Gly Met Ile Phe Tyr Val Ser Asp Gln Glu
645 650 655
Glu Asn Asp Phe Met Thr Leu Phe Leu Ala His Gly Arg Leu Val Phe
660 665 670
Met Phe Asn Val Gly His Lys Lys Leu Lys Ile Arg Ser Gln Glu Lys
675 680 685
Tyr Asn Asp Gly Leu Trp His Asp Val Ile Phe Ile Arg Glu Lys Ser
690 695 700
Ser Gly Arg Leu Val Ile Asp Gly Leu Arg Val Leu Glu Glu Arg Leu
705 710 715 720
Pro Pro Ser Gly Ala Ala Trp Lys Ile Lys Gly Pro Ile Tyr Leu Gly
725 730 735
Gly Val Ala Pro Gly Arg Ala Val Lys Asn Val Gln Ile Thr Ser Val
740 745 750
Tyr Ser Phe Ser Gly Cys Leu Gly Asn Leu Gln Leu Asn Gly Ala Ser
755 760 765
Ile Thr Ser Ala Ser Gln Thr Phe Ser Val Thr Pro Cys Phe Glu Gly
770 775 780
Pro Met Glu Thr Gly Thr Tyr Phe Ser Thr Glu Gly Gly Tyr Val Val
785 790 795 800
Leu Asp Glu Ser Phe Asn Ile Gly Leu Lys Phe Glu Ile Ala Phe Glu
805 810 815
Val Arg Pro Arg Ser Ser Ser Gly Thr Leu Val His Gly His Ser Val
820 825 830
Asn Gly Glu Tyr Leu Asn Val His Met Arg Asn Gly Gln Val Ile Val
835 840 845
Lys Val Asn Asn Gly Val Arg Asp Phe Ser Thr Ser Val Thr Pro Lys
850 855 860
Gln Asn Leu Cys Asp Gly Arg Trp His Arg Ile Thr Val Ile Arg Asp
865 870 875 880
Ser Asn Val Val Gln Leu Asp Val Asp Ser Glu Val Asn His Val Val
885 890 895
Gly Pro Leu Asn Pro Lys Pro Val Asp His Arg Glu Pro Val Phe Val
900 905 910
Gly Gly Val Pro Glu Ser Leu Leu Thr Pro Arg Leu Ala Pro Ser Lys
915 920 925
Pro Phe Thr Gly Cys Ile Arg His Phe Val Ile Asp Ser Arg Pro Val
930 935 940
Ser Phe Ser Lys Ala Ala Leu Val Ser Gly Ala Val Ser Ile Asn Ser
945 950 955 960

Cys Pro Thr Ala

<210> 40

<211> 956

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 40

ES 2 437 134 T3

Thr Ala Leu Lys Phe His Ile Gln Ser Pro Val Pro Ala Pro Glu Pro
 1 5 10 15
 Gly Lys Asn Thr Gly Asp His Phe Val Leu Tyr Met Gly Ser Arg Gln
 20 25 30
 Ala Thr Gly Asp Tyr Met Gly Val Ser Leu Arg Asn Gln Lys Val His
 35 40 45
 Trp Val Tyr Arg Leu Gly Lys Ala Gly Pro Thr Thr Leu Ser Ile Asp
 50 55 60
 Glu Asn Ile Gly Glu Gln Phe Ala Ala Val Ser Ile Asp Arg Thr Leu
 65 70 75 80
 Gln Phe Gly His Met Ser Val Thr Val Glu Lys Gln Met Val His Glu
 85 90 95
 Ile Lys Gly Asp Thr Val Ala Pro Gly Ser Glu Gly Leu Leu Asn Leu
 100 105 110
 His Pro Asp Asp Phe Val Phe Tyr Val Gly Gly Tyr Pro Ser Asn Phe
 115 120 125
 Thr Pro Pro Glu Pro Leu Arg Phe Pro Gly Tyr Leu Gly Cys Ile Glu
 130 135 140
 Met Glu Thr Leu Asn Glu Glu Val Val Ser Leu Tyr Asn Phe Glu Gln
 145 150 155 160
 Thr Phe Met Leu Asp Thr Ala Val Asp Lys Pro Cys Ala Arg Ser Lys
 165 170 175
 Ala Thr Gly Asp Pro Trp Leu Thr Asp Gly Ser Tyr Leu Asp Gly Ser
 180 185 190
 Gly Phe Ala Arg Ile Ser Phe Glu Lys Gln Phe Ser Asn Thr Lys Arg
 195 200 205
 Phe Asp Gln Glu Leu Arg Leu Val Ser Tyr Asn Gly Ile Ile Phe Phe
 210 215 220
 Leu Lys Gln Glu Ser Gln Phe Leu Cys Leu Ala Val Gln Glu Gly Thr
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Phe Tyr Asp Phe Gly Ser Gly Leu Lys Lys Ala Asp Pro
 245 250 255
 Leu Gln Pro Pro Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ser Lys Ala Ile Gln Val
 260 265 270
 Phe Leu Leu Ala Gly Asn Arg Lys Arg Val Leu Val Arg Val Glu Arg
 275 280 285
 Ala Thr Val Phe Ser Val Asp Gln Asp Asn Met Leu Glu Met Ala Asp
 290 295 300
 Ala Tyr Tyr Leu Gly Gly Val Pro Pro Glu Gln Leu Pro Leu Ser Leu
 305 310 315 320

ES 2 437 134 T3

Arg Gln Leu Phe Pro Ser Gly Gly Ser Val Arg Gly Cys Ile Lys Gly
 325 330 335
 Ile Lys Ala Leu Gly Lys Tyr Val Asp Leu Lys Arg Leu Asn Thr Thr
 340 345 350
 Gly Ile Ser Phe Gly Cys Thr Ala Asp Leu Leu Val Gly Arg Thr Met
 355 360 365
 Thr Phe His Gly His Gly Phe Leu Pro Leu Ala Leu Pro Asp Val Ala
 370 375 380
 Pro Ile Thr Glu Val Val Tyr Ser Gly Phe Gly Phe Arg Gly Thr Gln
 385 390 395 400
 Asp Asn Asn Leu Leu Tyr Tyr Arg Thr Ser Pro Asp Gly Pro Tyr Gln
 405 410 415
 Val Ser Leu Arg Glu Gly His Val Thr Leu Arg Phe Met Asn Gln Glu
 420 425 430
 Val Glu Thr Gln Arg Val Phe Ala Asp Gly Ala Pro His Tyr Val Ala
 435 440 445
 Phe Tyr Ser Asn Val Thr Gly Val Trp Leu Tyr Val Asp Asp Gln Leu
 450 455 460
 Gln Leu Val Lys Ser His Glu Arg Thr Thr Pro Met Leu Gln Leu Gln
 465 470 475 480
 Pro Glu Glu Pro Ser Arg Leu Leu Leu Gly Gly Leu Pro Val Ser Gly
 485 490 495
 Thr Phe His Asn Phe Ser Gly Cys Ile Ser Asn Val Phe Val Gln Arg
 500 505 510
 Leu Arg Gly Pro Gln Arg Val Phe Asp Leu His Gln Asn Met Gly Ser
 515 520 525
 Val Asn Val Ser Val Gly Cys Thr Pro Ala Gln Leu Ile Glu Thr Ser
 530 535 540
 Arg Ala Thr Ala Gln Lys Val Ser Arg Arg Ser Arg Gln Pro Ser Gln
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Cys Thr Thr Pro Trp Leu Pro Gly Thr Ile Gln Asp Ala
 565 570 575
 Tyr Gln Phe Gly Gly Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Gln Phe Val Gly Ile
 580 585 590
 Ser Pro Ser His Arg Asn Arg Leu His Leu Ser Met Leu Val Arg Pro
 595 600 605
 His Ala Ala Ser Gln Gly Leu Leu Leu Ser Thr Ala Pro Met Ser Gly
 610 615 620
 Arg Ser Pro Ser Leu Val Leu Phe Leu Asn His Gly His Phe Val Ala
 625 630 635 640
 Gln Thr Glu Gly Pro Gly Pro Arg Leu Gln Val Gln Ser Arg Gln His
 645 650 655
 Ser Arg Ala Gly Gln Trp His Arg Val Ser Val Arg Trp Gly Met Gln
 660 665 670
 Gln Ile Gln Leu Val Val Asp Gly Ser Gln Thr Trp Ser Gln Lys Ala
 675 680 685

ES 2 437 134 T3

Leu His His Arg Val Pro Arg Ala Glu Arg Pro Gln Pro Tyr Thr Leu
 690 695 700
 Ser Val Gly Gly Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Ser Lys Leu Pro Val
 705 710 715 720
 Ser Val Gly Phe Ser Gly Cys Leu Lys Lys Leu Gln Leu Asp Lys Gln
 725 730 735
 Pro Leu Arg Thr Pro Thr Gln Met Val Gly Val Thr Pro Cys Val Ser
 740 745 750
 Gly Pro Leu Glu Asp Gly Leu Phe Phe Pro Gly Ser Glu Gly Val Val
 755 760 765
 Thr Leu Glu Leu Pro Lys Ala Lys Met Pro Tyr Val Ser Leu Glu Leu
 770 775 780
 Glu Met Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Leu Ile Phe His Leu Gly Gln
 785 790 795 800
 Ala Leu Ala Thr Pro Tyr Met Gln Leu Lys Val Leu Thr Glu Gln Val
 805 810 815
 Leu Leu Gln Ala Asn Asp Gly Ala Gly Glu Phe Ser Thr Trp Val Thr
 820 825 830
 Tyr Pro Lys Leu Cys Asp Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val Ile Met
 835 840 845
 Gly Arg Asp Thr Leu Arg Leu Glu Val Asp Thr Gln Ser Asn His Thr
 850 855 860
 Thr Gly Arg Leu Pro Glu Ser Leu Ala Gly Ser Pro Ala Leu Leu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Ser Leu Pro Lys Ser Ser Thr Ala Arg Pro Glu Leu Pro Ala
 885 890 895
 Tyr Arg Gly Cys Leu Arg Lys Leu Leu Ile Asn Gly Ala Pro Val Asn
 900 905 910
 Val Thr Ala Ser Val Gln Ile Gln Gly Ala Val Gly Met Arg Gly Cys
 915 920 925
 Pro Ser Gly Thr Leu Ala Leu Ser Lys Gln Gly Lys Ala Leu Thr Gln
 930 935 940
 Arg His Ala Lys Pro Ser Val Ser Pro Leu Leu His
 945 950 955
 <210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 41
 Lys Pro Arg Leu Gln Phe Ser Leu Asp Ile Gln Thr
 1 5 10
 <210> 42
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 42
 Arg Asn Arg Leu His Leu Ser Met Leu Val Arg Pro
 1 5 10
 <210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 Ala Ser Phe Gly Phe Gln Thr Phe Gln Pro Ser Gly
 1 5 10
 20 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 Phe Lys Leu Pro Gln Glu Leu Leu Lys Pro Arg Ser
 1 5 10
 25

<210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 45
 Lys Asn Ser Phe Met Ala Leu Tyr Leu Ser Lys Gly
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus
 <400> 46
 Leu His Val Phe Tyr Asp Phe Gly Phe Ser Asn Gly
 1 5 10
 <210> 47
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 47
 Val Leu Val Arg Val Glu Arg Ala Thr Val Phe Ser
 1 5 10
 <210> 48
 <211> 12
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <400> 48
 Phe Leu Pro Leu Ala Leu Pro Asp Val Ala Pro Ile
 1 5 10
 25 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 49
 Gly Pro Leu Pro Ser Tyr Leu Gln Phe Val Gly Ile
 1 5 10
 30 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 50
 Asp Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val Ile Met Gly
 1 5 10
 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Mus musculus
 <400> 51
 Ser Val Gln Ile Gln Gly Ala Val Gly Met Arg Gly
 1 5 10
 <210> 52
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 52
 Leu Pro Phe Phe Asp
 1 5
 50 <210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 60 <223> /replace=""

<400> 53
 Arg Lys Arg Leu Gln Val Gln Tyr
 1 5
 <210> 54
 <211> 8
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 10 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 54
 Lys Arg Leu Gln Val Gln Leu Tyr
 1 5
 15 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 25 <400> 55
 Arg Leu Gln Val Gln Leu Ser Tyr
 1 5
 <210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 35 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 56
 Leu Gln Val Gln Leu Ser Ile Tyr
 1 5
 <210> 57
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 45 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 57
 Gln Val Gln Leu Ser Ile Arg Tyr
 1 5
 50 <210> 58
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 60 <223> /replace=""
 <400> 58
 Val Gln Leu Ser Ile Arg Thr Tyr
 1 5

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 59
 Arg Gln val Phe Gln val Ala
 1 5
 <210> 60
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 60
 Gln val Phe Gln val Ala Tyr
 1 5
 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 61
 val Phe Gln val Ala Tyr Ile
 1 5
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 62
 Phe Gln val Ala Tyr Ile Ile
 1 5
 <210> 63
 <211> 7
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 63
 Gln val Ala Tyr Ile Ile Ile
 1 5
 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <400> 64
 val Ala Tyr Ile Ile Ile Lys
 1 5
 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 55 <400> 65
 Ala Tyr Ile Ile Ile Lys Ala
 1 5
 <210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 5 <223> /replace=""
 <400> 66
 Tyr Leu Ser Lys Gly Arg Leu Tyr
 1 5
 <210> 67
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 15 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 67
 Leu Ser Lys Gly Arg Leu Val Tyr
 1 5
 20 <210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 30 <400> 68
 Ser Lys Gly Arg Leu Val Phe Tyr
 1 5
 <210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 40 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 69
 Lys Gly Arg Leu Val Phe Ala Tyr
 1 5
 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 50 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 70
 Gly Arg Leu Val Phe Ala Leu Tyr
 1 5
 55 <210> 71
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>

<221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 71
 5 Arg Leu Val Phe Ala Leu Gly Tyr
 1 5
 <210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 15 <223> /replace=""
 <400> 72
 Thr Leu Phe Leu Ala His Gly Tyr
 1 5
 <210> 73
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 25 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 73
 Leu Phe Leu Ala His Gly Arg Tyr
 1 5
 30 <210> 74
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 40 <400> 74
 Phe Leu Ala His Gly Arg Leu Tyr
 1 5
 <210> 75
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220> .
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <<221> VARIANT
 50 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 75
 Leu Ala His Gly Arg Leu Val Tyr
 1 5
 <210> 76
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 60 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)

<223> /replace=""
 <400> 76
 Ala His Gly Arg Leu Val Phe Tyr
 1 5
 5 <210> 77
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 10 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 77
 His Gly Arg Leu Val Phe Met Tyr
 1 5
 15 <210> 78
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 25 <223> /replace=""
 <400> 78
 Ala Gly Gln Trp His Arg Val Tyr
 1 5
 30 <210> 79
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 35 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 79
 Gly Gln Trp His Arg Val Ser Tyr
 1 5
 40 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 50 <400> 80
 Gln Trp His Arg Val Ser Val Tyr
 1 5
 <210> 81
 <211> 8
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 60 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 81

Trp His Arg Val Ser Val Arg Tyr
 1 5
 <210> 82
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 10 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 82
 His Arg Val Ser Val Arg Trp Tyr
 1 5
 <210> 83
 15 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 20 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 83
 Arg Val Ser Val Arg Trp Gly Tyr
 25 1 5
 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 35 <223> /replace=""
 <400> 84
 Asp Gly Arg Trp His Arg Val Tyr
 1 5
 <210> 85
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 45 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 85
 Gly Arg Trp His Arg Val Ala Tyr
 50 1 5
 <210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 60 <400> 86
 Arg Trp His Arg Val Ala Val Tyr
 1 5
 <210> 87

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 10 <400> 87
 Trp His Arg Val Ala Val Ile Tyr
 1 5
 <210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <221> VARIANT
 20 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 88
 His Arg Val Ala Val Ile Met Tyr
 1 5
 <210> 89
 25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
 30 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (8)..(8)
 <223> /replace=""
 <400> 89
 Arg Val Ala Val Ile Met Gly Tyr
 35 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido, que consiste en Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-NH₂.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, en que el péptido está compuesto por L- o D-aminoácidos.
3. El péptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que uno o más de los aminoácidos están N-metilados.
- 10 4. Un péptido que consiste en Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-NH₂ o un anticuerpo específico para un péptido de este tipo para ser usado en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por fibrillogénesis de Aβ.
5. El péptido o anticuerpo de la reivindicación 4, en que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.
- 15 6. El péptido o anticuerpo de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el péptido está compuesto por L- o D-aminoácidos.
7. El péptido o anticuerpo de las reivindicaciones 4, 5 ó 6, en que uno o más de los aminoácidos están N-metilados.
- 20 8. El péptido o anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende adicionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 9. El péptido o anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que se formula para una administración mediante una vía seleccionada del grupo que consiste en oral, aerosol nasal, lavado, inyección subcutánea, inyección interperitoneal, inyección intramuscular, inyección parenteral e infusión.
- 30 10. El péptido o anticuerpo de la reivindicación 9, que se formula como un aerosol nasal.
11. Uso de un péptido que consiste en Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-NH₂ o un anticuerpo específico para un péptido de este tipo péptido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por fibrillogénesis de Aβ.
12. El uso de la reivindicación 11, modificado mediante las características de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.
- 35 13. Una composición farmacéutica, que comprende un péptido como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente un compuesto complementariamente activo.

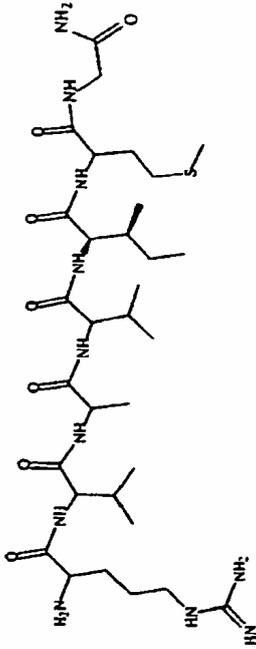
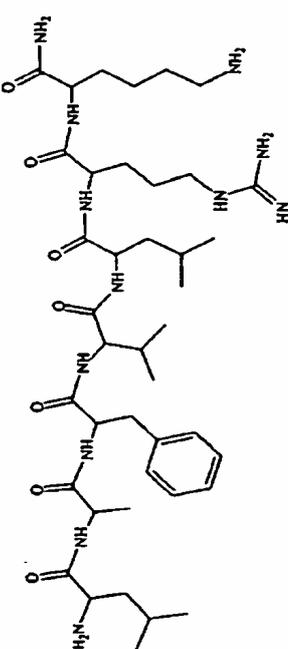
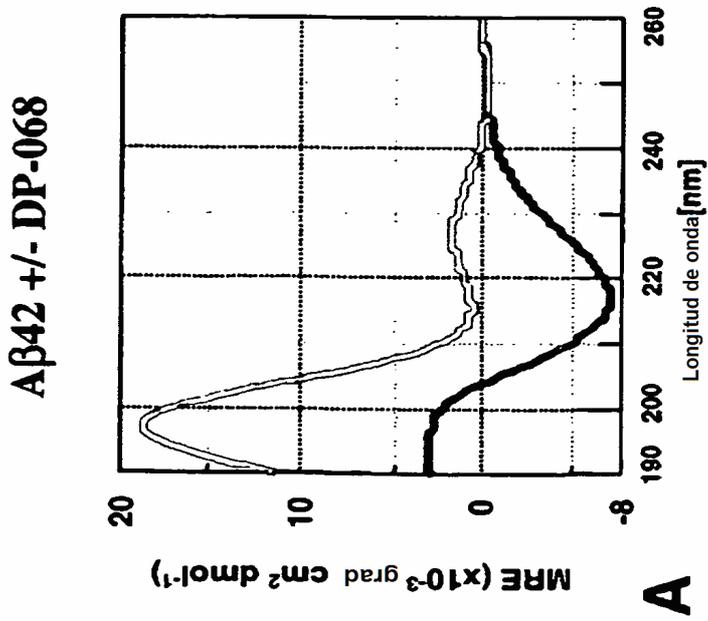
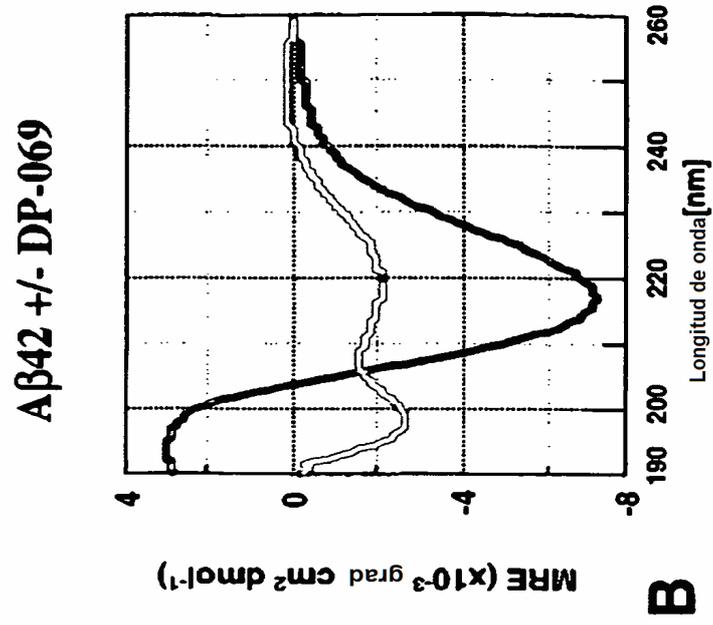
SEQ ID NO	Estructura	Fórmula	PM
<p style="text-align: center;">DP-068</p>	<p style="text-align: center;">  Arg-Val-Ala-Val-Ile-Met-Gly-amida </p>	<p style="text-align: center;">C₃₂H₆₁N₁₁O₇S</p>	<p style="text-align: center;">743,98</p>
<p style="text-align: center;">DP-074</p>	<p style="text-align: center;">  Leu-Ala-Phe-Val-Leu-Arg-Lys-amida </p>	<p style="text-align: center;">C₄₁H₇₂N₁₂O₇</p>	<p style="text-align: center;">845,10</p>

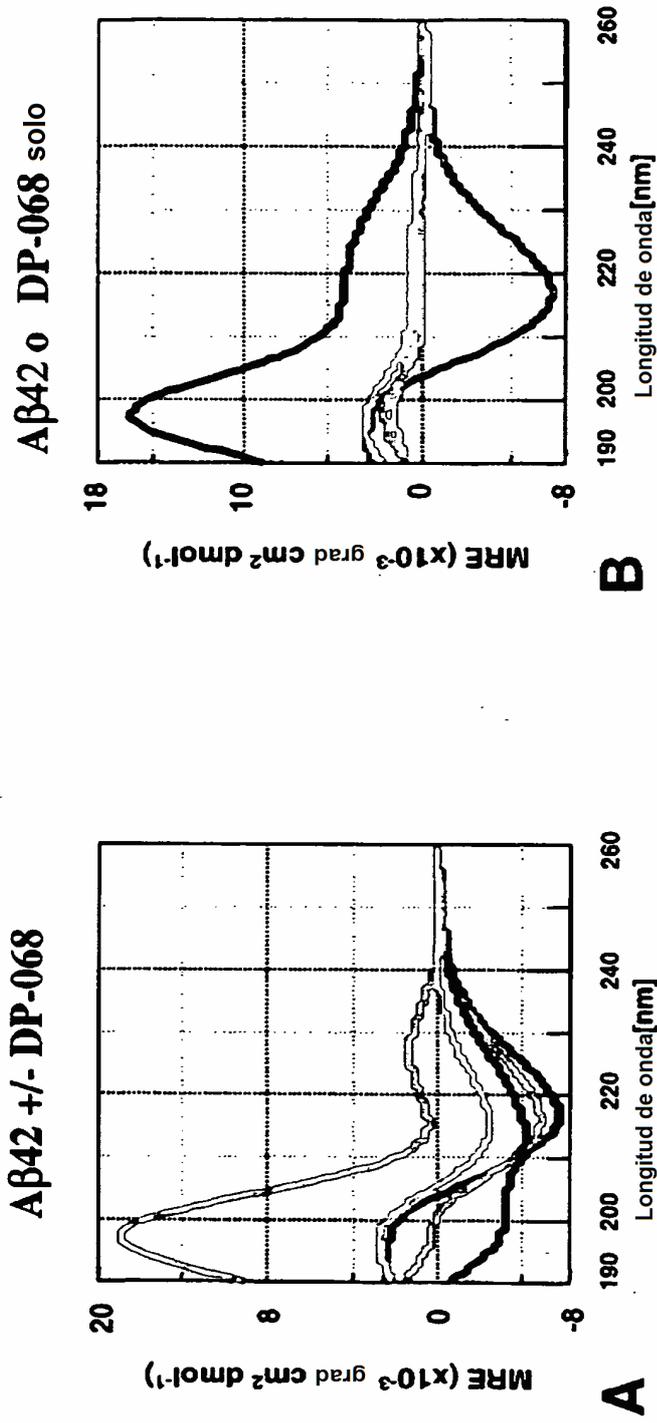
Figura 1



Ab42 solo (0,1mg/ml)
Ab42+DP-068 (1:2) p/p

Ab42 solo (0,1mg/ml)
Ab42+DP-069 (1:2) p/p

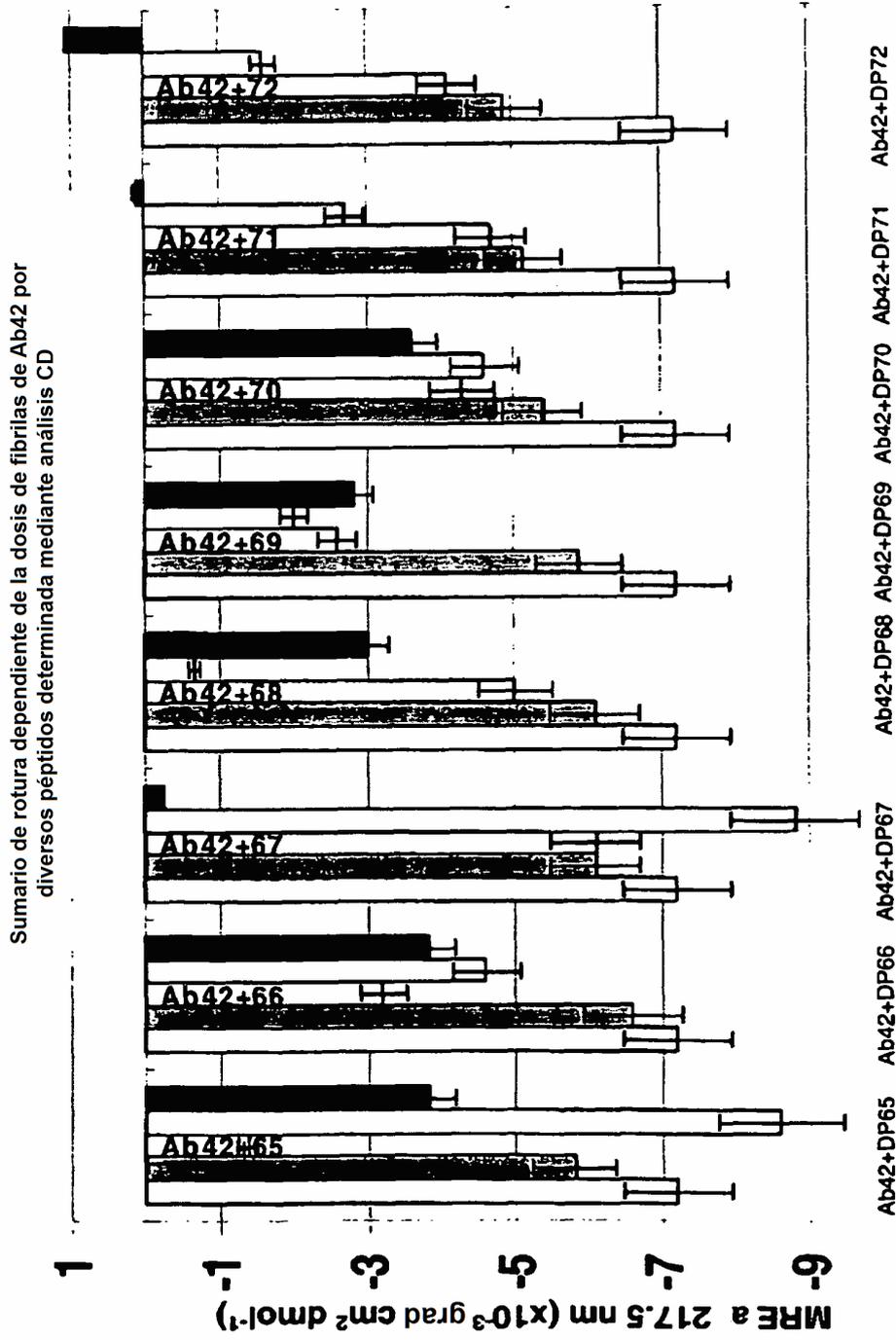
Figura 2



Ab42 solo (0,1mg/ml)
DP-068 (0,01 mg/ml)
DP-068 (0,1 mg/ml)
DP-068 (0,2 mg/ml)
DP-068 (0,5 mg/ml)

Ab42 solo (0.1mg/ml)
Ab42+DP-068 (1:0.1) p/p
Ab42+DP-068 (1:1) p/p
Ab42+DP-068 (1:2) p/p
Ab42+DP-068 (1:5) p/p

Figura 3



-11

Figura 4

Inhibición de unión de Troflavina T a 0,1 mg/ml de fibrillas de Ab42 por diversos péptidos de una manera dependiente de la dosis

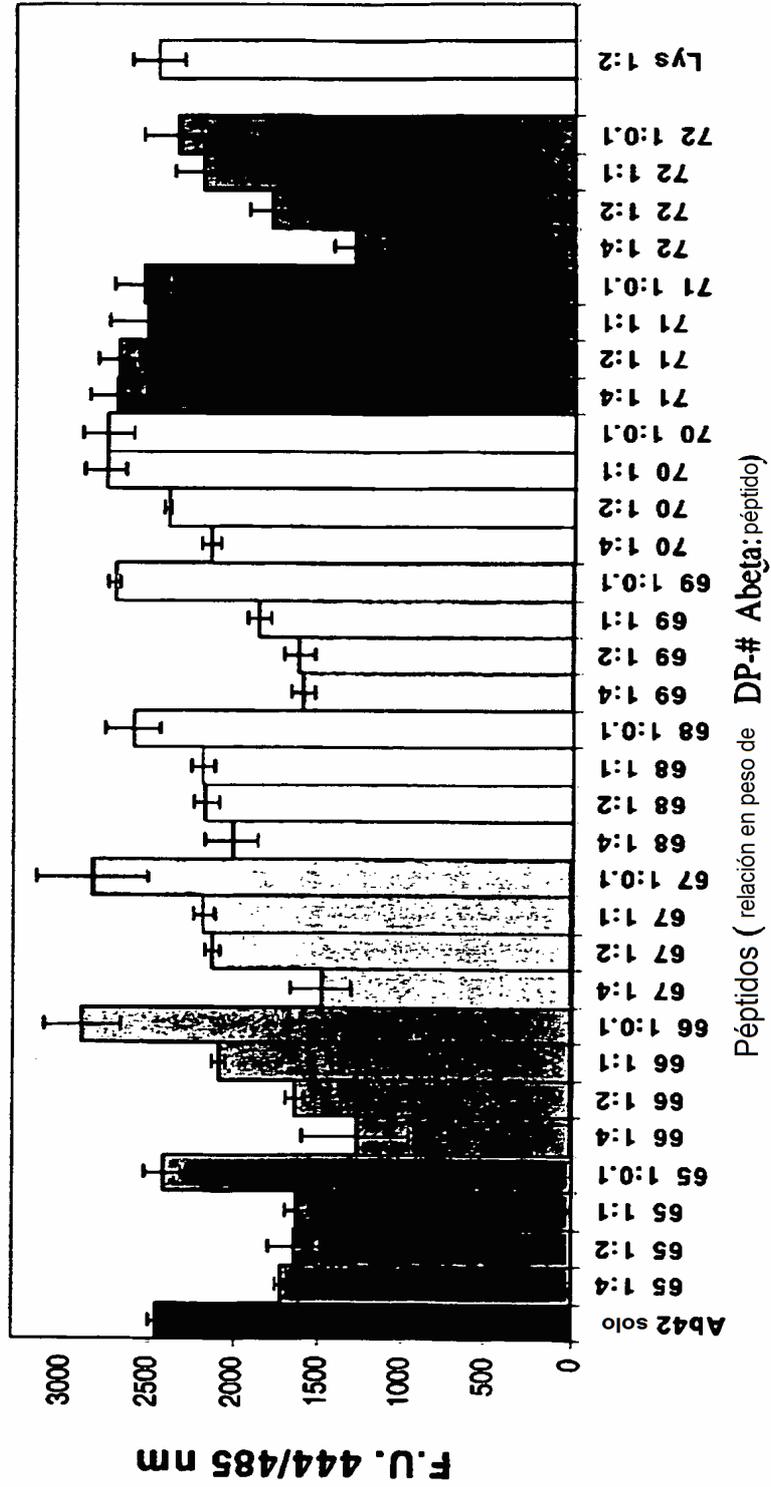


Figura 5

Orden de clasificación de péptidos a Abeta
basado en % Inhibición de Tio T

	Tio T	
	<u>1:2 p/p</u>	<u>1:1 p/p</u>
DP-072 (WHLAFVLR)	32,6	32,2
DP-071 (TLFLAR)	15,3	14,6
DP-070 (HGRLVFM-amida)	18,7	0,0
DP-067 (RVAVIM-amida)	19,2	12,2
DP-069 (LAFVLR-amida)	18,2	11,1
DP-066 (WHRVAVI-amida)	13,5	13,0
DP-068 (RVAVIMG-amida)	11,5	12,8
DP-065 (WHRVAVIM-amida)	9,6	14,0

Figura 6

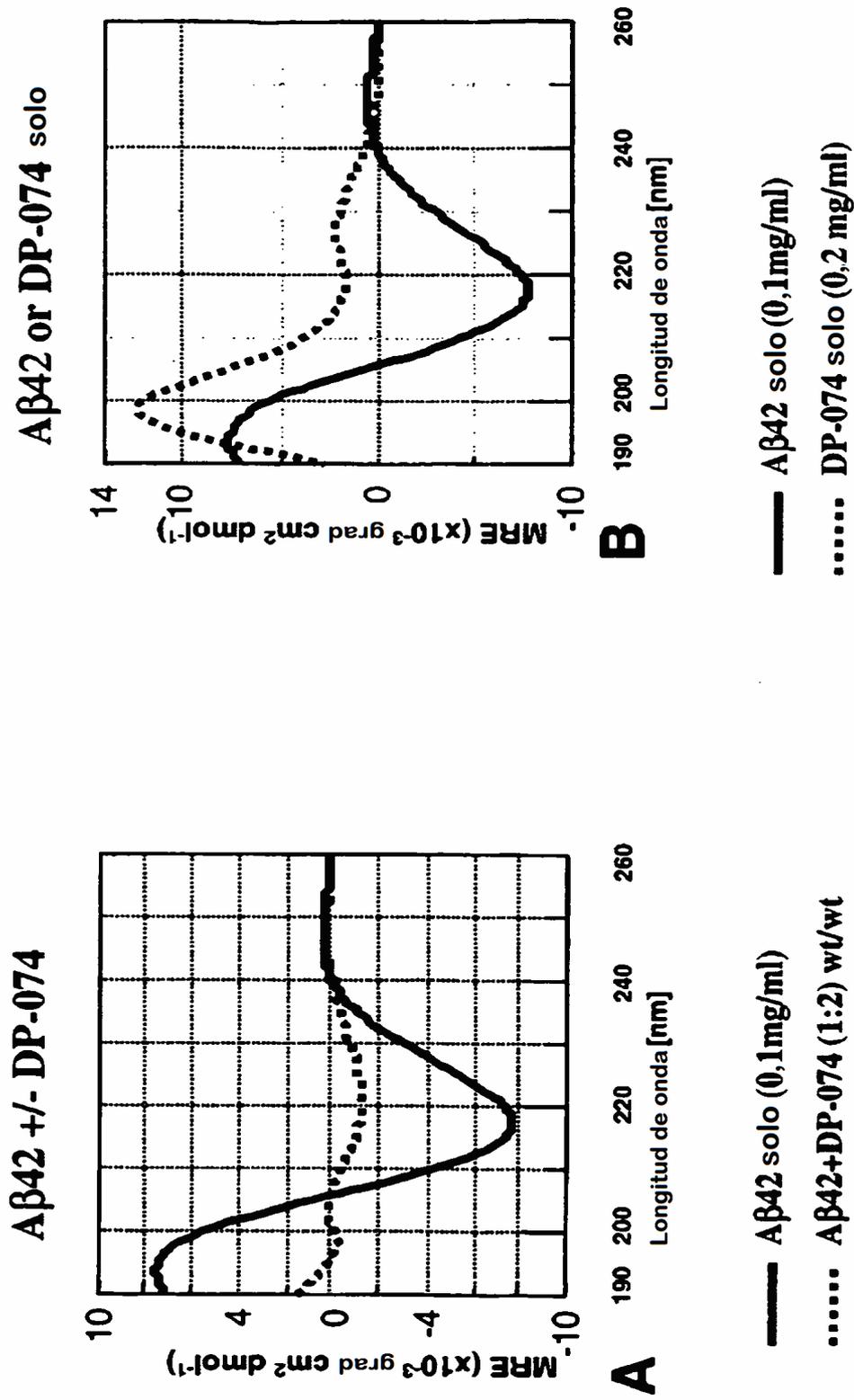


Figura 7

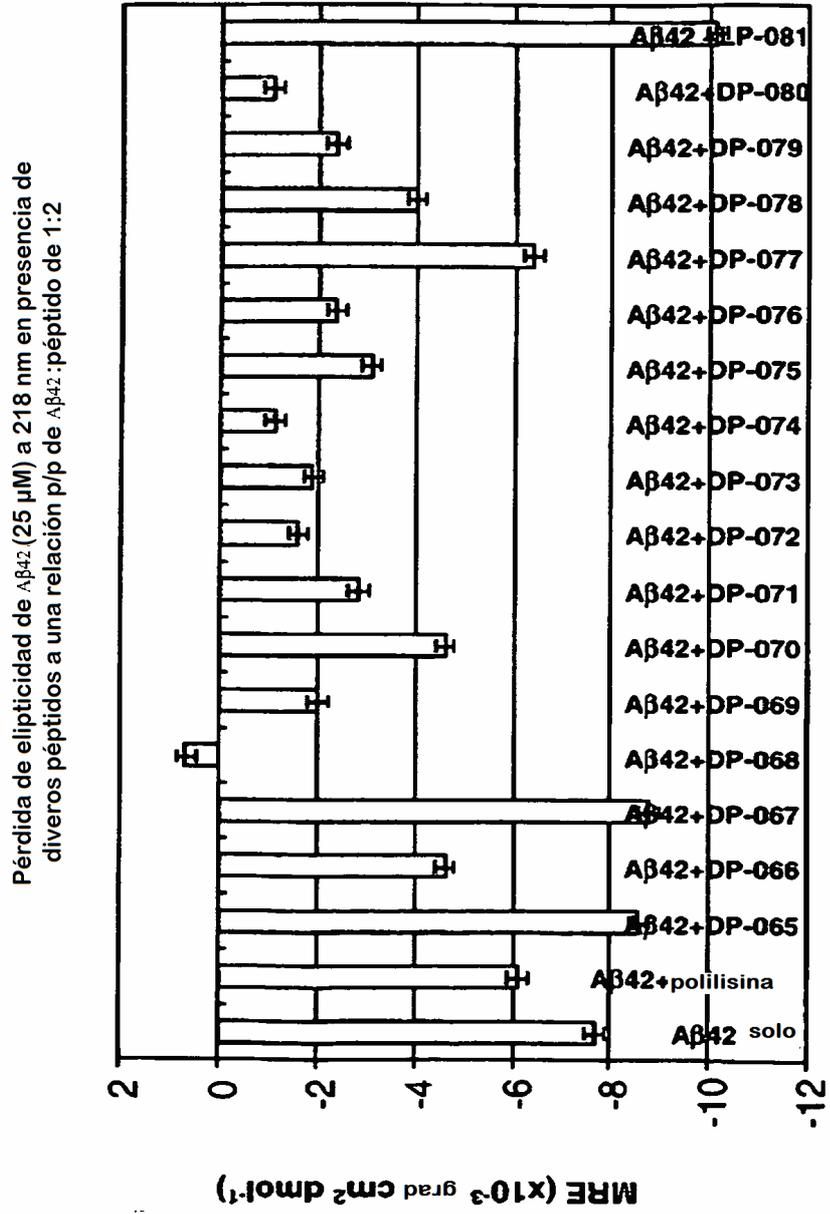


Figura 8

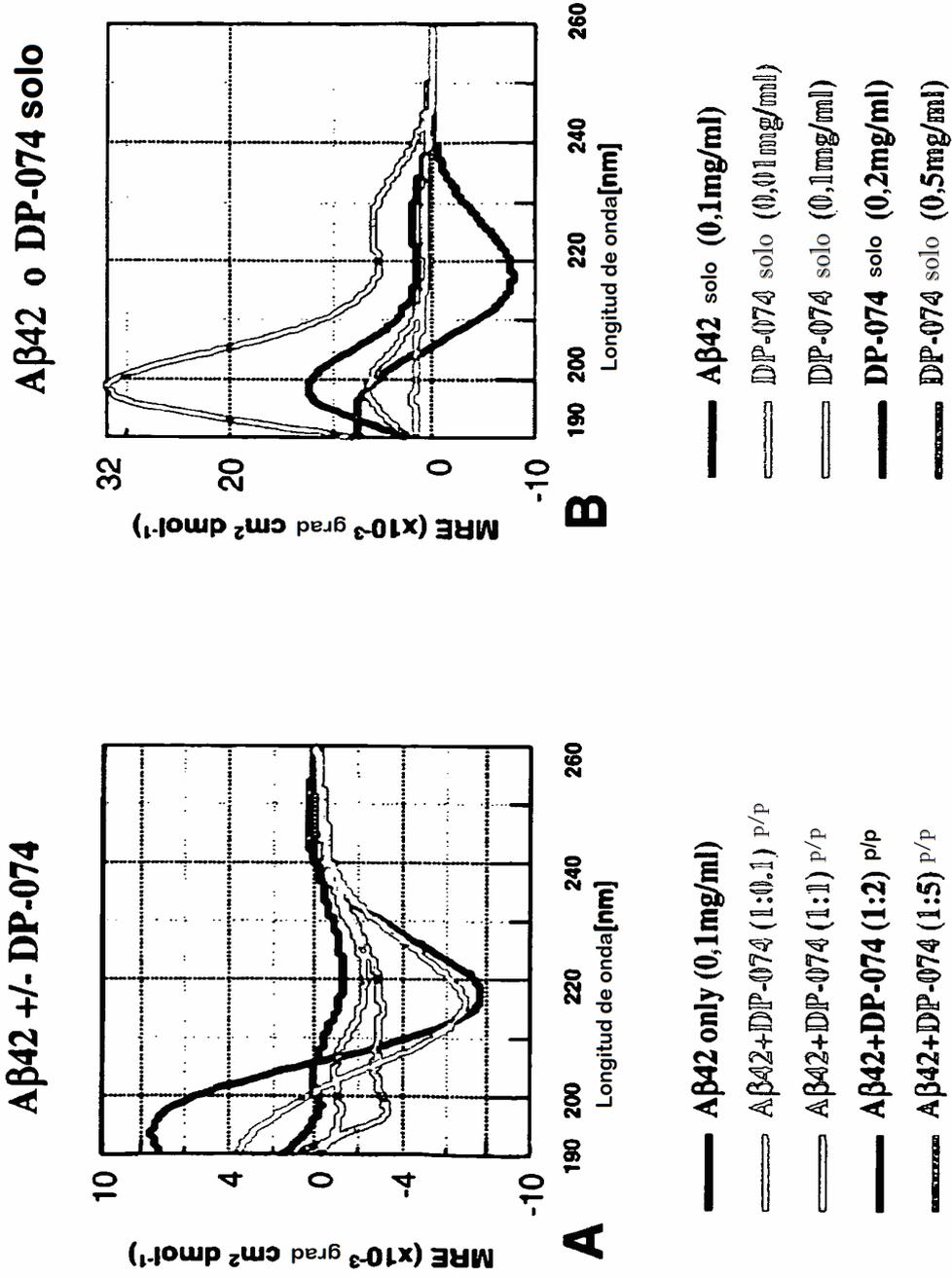


Figura 9

Pérdida de elipticidad de Aβ42 a 218 nm en presencia de diversos péptidos a relaciones p/p de Aβ42:péptido de 1:0,1, 1:1, 1:2, 1:5

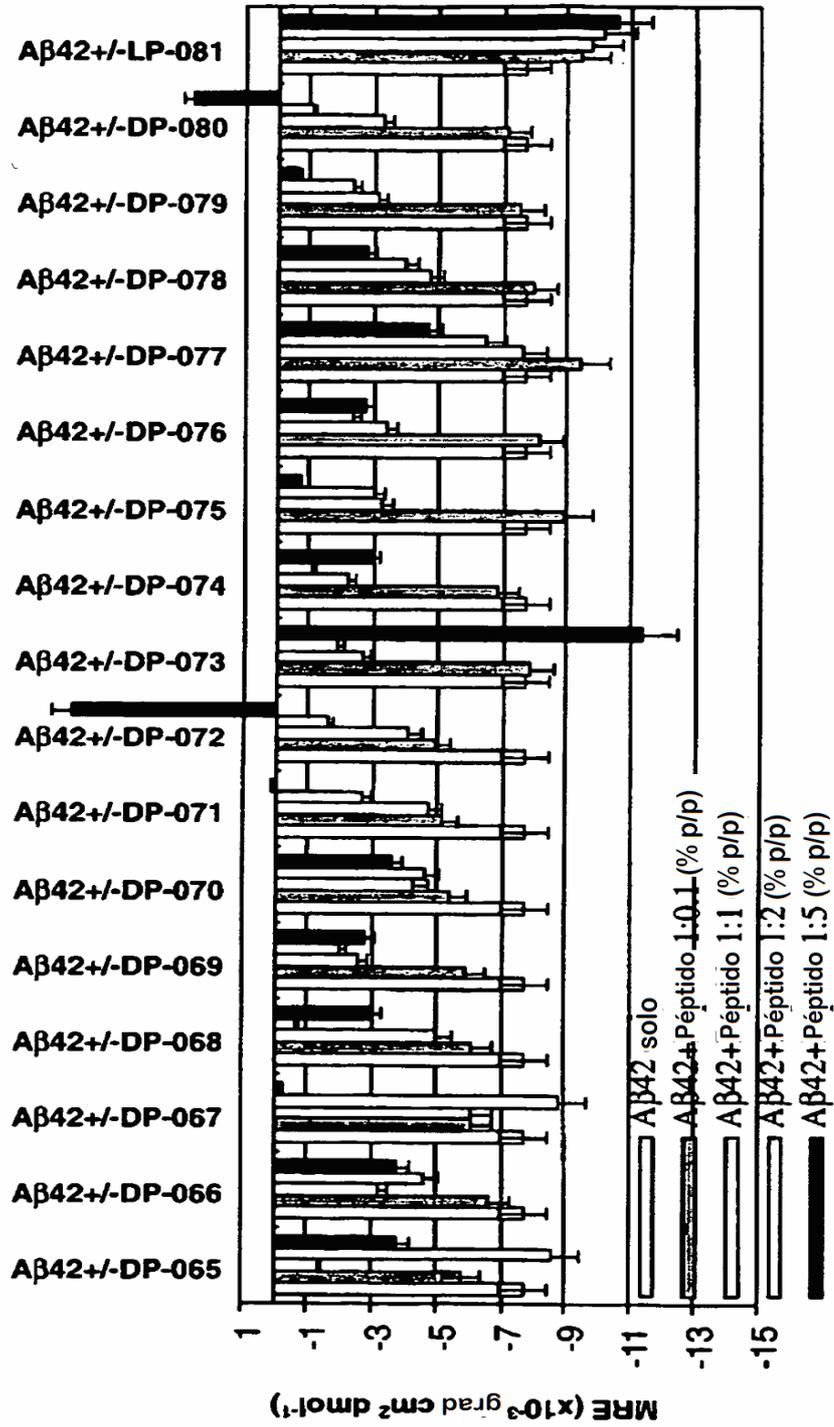


Figura 10

Rotura de Ab42 fibrilar (0,1 mg/ml) por diversos péptidos 6-9meros valorada por pérdida de elipticidad CD a 218 nm

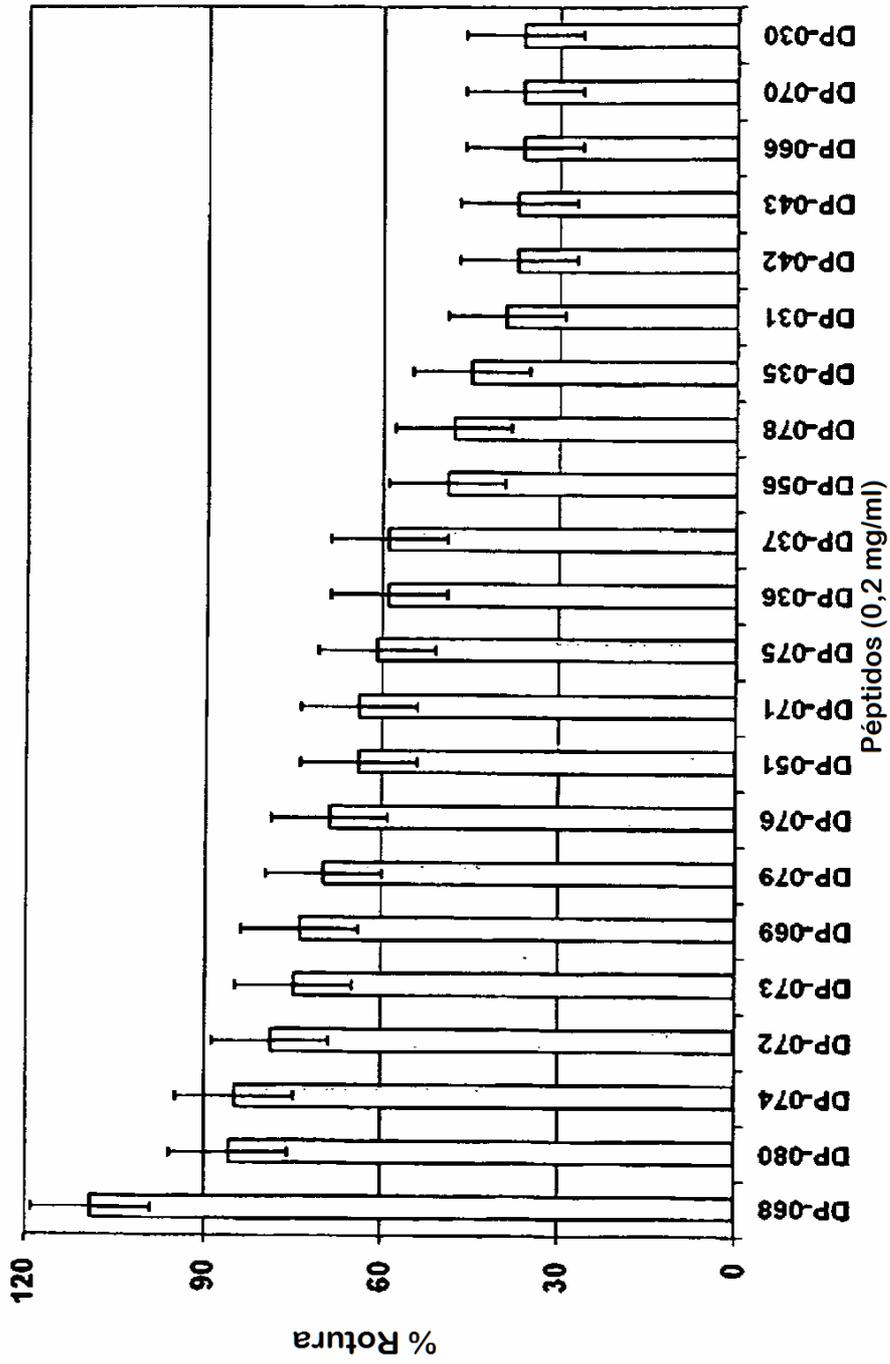


Figura 11

Inhibición de unión de Tioflavina T a 0,1 mg/ml de
fibrilas de Ab42 por 0,2 mg/ml de péptidos 6-9meros

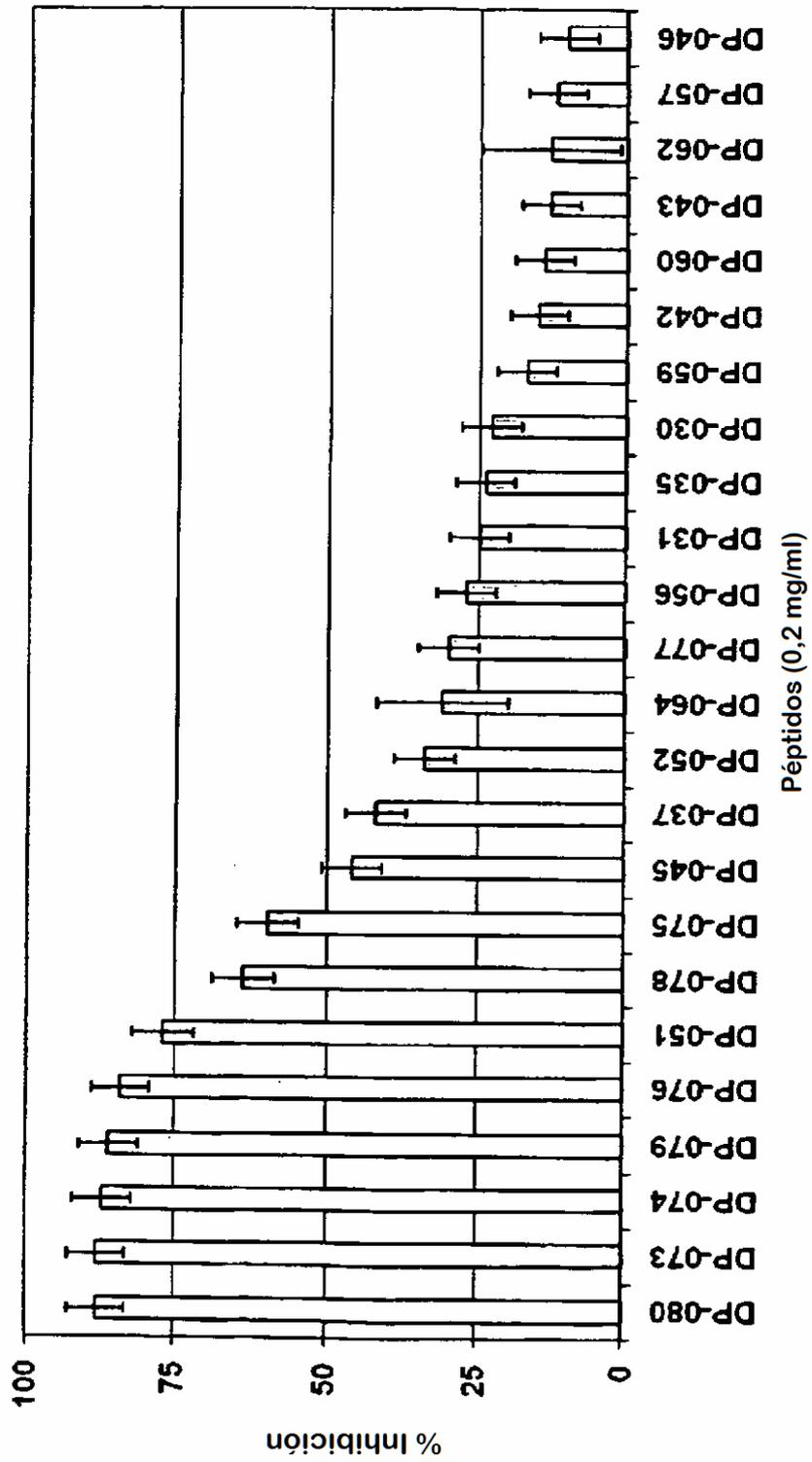


Figura 12

Unión de péptidos 6-9meros a Ab42 unido a sustrato

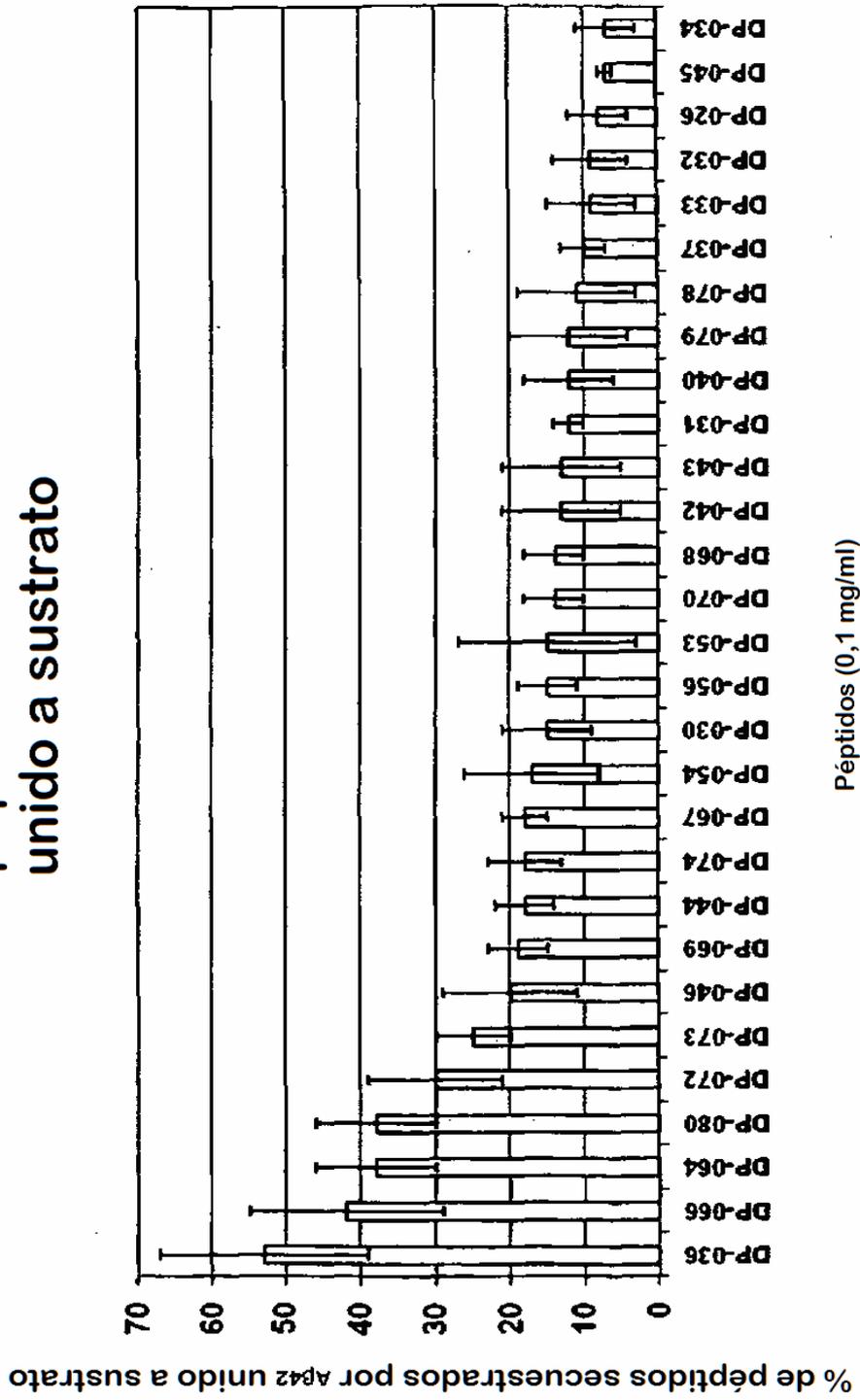


Figura 13

Estabilidad de DEP-068 en suero humano

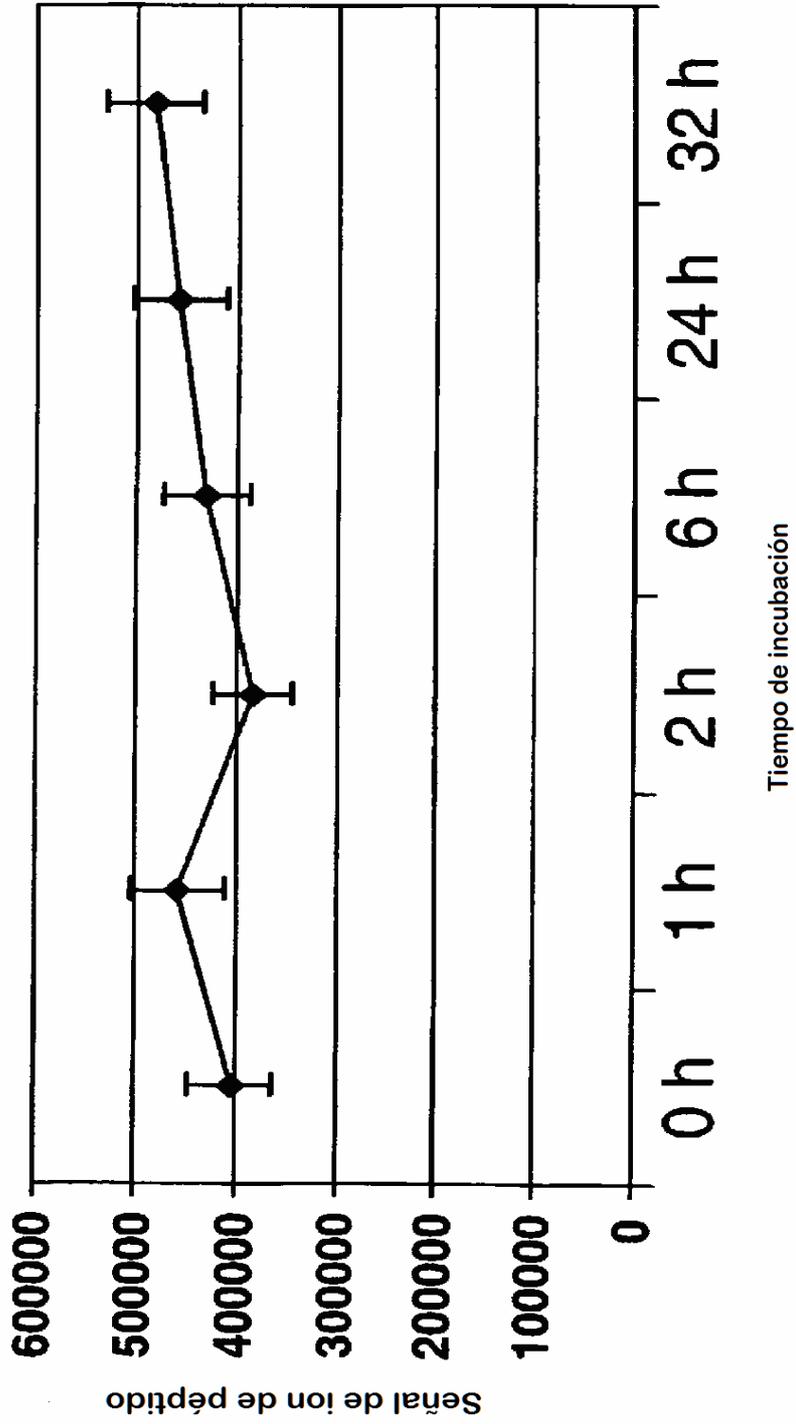


Figura 14

Estabilidad de DP-074 en suero humano

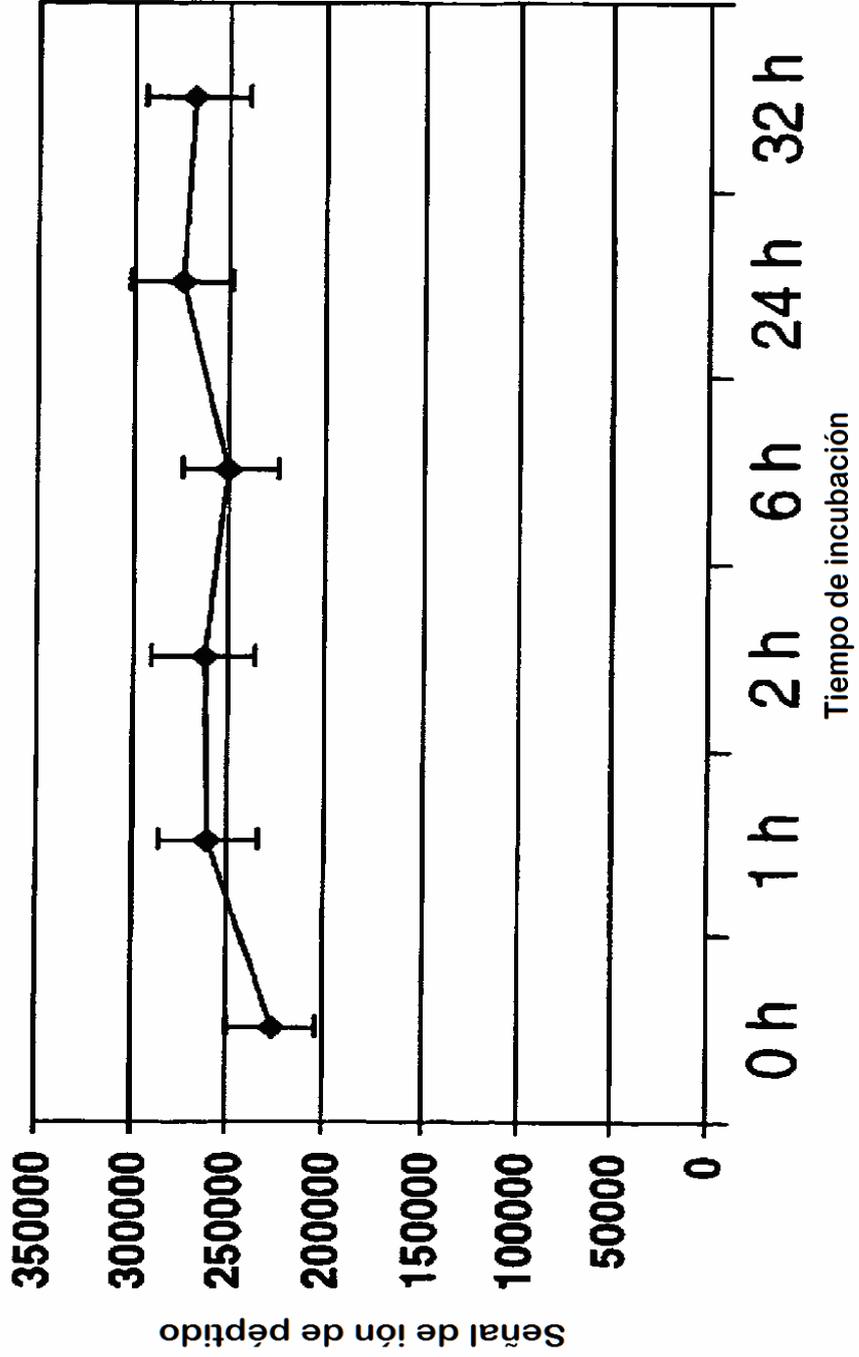


Figura 15