

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 141**

21 Número de solicitud: 201331274

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

26.08.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.02.2015

71 Solicitantes:

**GALLAR RUIZ, Juan Carlos (100.0%)
C/ ACTRIZ MARGARITA LOZANO Nº 6 BAJO B
30100 MURCIA ES**

72 Inventor/es:

RODRIGUEZ MANOTAS, Miguel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Péptido útil como diana farmacológica para el cribado de moléculas para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer, anticuerpo frente al mismo y uso del anticuerpo para el tratamiento y/o prevención de dicha enfermedad.**

57 Resumen:

Péptido útil como diana farmacológica para el cribado de moléculas para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de alzheimer, anticuerpo frente al mismo y uso del anticuerpo para el tratamiento y/o prevención de dicha enfermedad.

La presente invención se refiere a un péptido aislado de ocho aminoácidos localizado en el bucle luminal 1 de la primera región luminal de la presenilina, el cual es útil como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para mejorar el rendimiento cognitivo y/o promover el desarrollo cognitivo, preferiblemente para tratar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer (EA). Asimismo, la invención se refiere a un anticuerpo específico frente a dicho péptido, el cual es útil para el tratamiento y/o prevención de la EA, y a composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo.

ES 2 530 141 A2

**PÉPTIDO ÚTIL COMO DIANA FARMACOLÓGICA PARA EL CRIBADO DE
MOLÉCULAS PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER, ANTICUERPO FRENTE AL MISMO Y USO DEL
ANTICUERPO PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE DICHA
ENFERMEDAD**

5

DESCRIPCIÓN

10 La presente invención se encuadra en el campo de la neurología y la medicina, específicamente dentro de los métodos de cribado de moléculas útiles para mejorar el rendimiento cognitivo y promover el desarrollo cognitivo, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades o síndromes que producen deterioro cognitivo, como la enfermedad de Alzheimer.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

20 Los genes que codifican para las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2, respectivamente) y la proteína precursora de amiloide (A β PP) son las únicas moléculas conocidas hasta el momento implicadas en la enfermedad de Alzheimer (EA) de causa monogénica (Albert Lleò *et al.*, 2002, *Archives of Neurology*; 59:1759–1763). La relación entre estas proteínas y la enfermedad se puede entender como una asociación entre enzima/sustrato en la que la enzima es la presenilina y A β PP es el sustrato.

25 La presenilina se encuentra formando parte de un gran complejo enzimático llamado γ -secretasa, del cual es el núcleo catalítico (Bart De Strooper *et al.*, 2003, *Neuron*; 38:9–12). En los vertebrados existen dos genes de presenilina: PSEN1, que contiene la información genética para la presenilina 1 (PS1) y PSEN2, que contiene la información genética para la presenilina 2 (PS2). Ambos genes se encuentran
30 altamente conservados entre las distintas especies de vertebrados. En la especie humana los genes codificantes para estas dos proteínas presentan una alta homología entre sí (80%). El complejo γ -secretasa se compone en total de cuatro proteínas que están presentes en igual estequiometría: presenilina, nicastrin, gen asociado al defecto en nasofaringe anterior de drosophila (APH1) y potenciador de
35 presenilina 2 (PEN2).

En primer lugar, en el procesamiento proteolítico secuencial de la proteína A β PP, tiene lugar una escisión por la α - o β -secretasa. La secretasa α conduce al fragmento C83 (α CTF). La escisión por β -secretasa (BACE1) resulta en dos fragmentos potenciales: C99 y C89 (β CTFs). Todos estos fragmentos pueden sufrir, posteriormente, una primera escisión proteolítica (escisión ϵ) por parte del complejo γ -secretasa. Este proceso libera el dominio intracelular del amiloide (AICD o γ CTF) hacia el citoplasma (principalmente dos: AICD51 y AICD50); mientras que en el lado opuesto (el extremo N-terminal) deja un remanente peptídico en la zona transmembrana (péptidos amiloides: A β 48 y A β 49 respectivamente), unido al complejo γ -secretasa:

1. α - ó β CTF \rightarrow A β 48 + AICD51
2. α - ó β CTF \rightarrow A β 49 + AICD50

Posteriormente, los remanentes transmembrana A β 48 y A β 49 pueden sufrir una escisión secuencial progresiva por el complejo γ -secretasa en el dominio transmembrana (escisión γ), liberando tres o cuatro residuos en cada paso de la secuencia de escisión, resultando en dos secuencias escisorias distintas en función del péptido de partida:

1. A β 48 \rightarrow A β 45 \rightarrow A β 42 \rightarrow A β 38.
2. A β 49 \rightarrow A β 46 \rightarrow A β 43 \rightarrow A β 40 \rightarrow A β 37.

La secuencia de escisión (escisión representada por la flecha) se podría interrumpir en cualquier paso del proceso proteolítico, liberando finalmente el sustrato que no se ha escindido. Para la secuencia que comienza en A β 49 el producto final más probable sería A β 40 y para la que comienza en A β 48 el péptido A β 42.

Una droga funcional debería tratar la enfermedad y detener o retrasar el daño celular que conduce al empeoramiento de los síntomas. En este sentido, los esfuerzos de los investigadores se han centrado en buscar nuevas formas de tratamiento de la EA, ya que los medicamentos actuales únicamente ayudan a enmascarar los síntomas de la enfermedad sin llegar a tratarla.

Desde el punto de vista de su actuación, se estudian tres tipos de fármacos en la EA: los que actúan sobre la posible causa de la enfermedad, modulando la producción del péptido A β , los que tratan de prevenir las consecuencias de la enfermedad o fármacos neuroprotectores y los que tratan de paliar las consecuencias de la enfermedad actuando sobre los síntomas (Hugo Geerts *et al.*, 2013, *Frontiers of Pharmacology*; 4:47).

La tendencia actual hacia el desarrollo de terapias frente a la EA, que tienen como objetivo reducir los niveles de A β en el cerebro, viene respaldada por la evidencia que sustenta la hipótesis de la cascada amiloidea (1. la deposición del péptido A β en el parénquima cerebral en forma de placas; 2. el hecho de que los tres genes causales de EA monogénica, A β PP como sustrato y PSEN1-2 como enzimas, intervengan en la formación de péptido A β) y apunta al papel crucial del péptido A β en la enfermedad. De acuerdo con esta hipótesis, la deposición de A β constituye el desencadenante patológico inicial de la enfermedad. Por ello, los fármacos diseñados en base a esta hipótesis tratan de modificar los niveles de A β desde varios frentes (Martin Citron, 2010, *Nature Reviews. Drug Discovery*; 9(5):387-398):

- i. Actuando sobre la producción del péptido A β . Son los compuestos llamados "A β lowering compounds": inhibidores y moduladores de γ -secretasa (GSI, GSM) e inhibidores de β -secretasa (inhibidores de BACE1).
- ii. Aumentando el aclaramiento del péptido A β . Se realiza principalmente mediante anticuerpos.
- iii. Disminuyendo la agregación del péptido A β .

Al margen de los discretos resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados con los fármacos desarrollados a partir de la hipótesis amiloidea, existen dos grandes paradojas respecto a los objetivos que persiguen y el comportamiento de las mutaciones asociadas a la EA de causa monogénica, a saber, a) la mayoría de las mutaciones reducen la cantidad global del péptido A β producido y b) todas las mutaciones conllevan un aumento del cociente entre las dos principales formas de péptido A β : A β 42/A β 40 (Eric Karran, *et al.*, 2011, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 698-712). A pesar de que los GSM consiguen invertir este cociente, lo

hacen a expensas de un cambio en la producción de A β 42 por A β 38 (en la misma línea escisoria), lo que se traduce en un aumento de la toxicidad *in vivo* (Lucia Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2012, *EMBO Journal*; 31(10):2261-74). Por ello, aunque el mecanismo exacto por el que se produce la EA permanece sin esclarecer, el objetivo de cualquier fármaco diseñado para combatir esta enfermedad debería ser el de disminuir el cociente A β 42/A β 40 sin disminuir los niveles del péptido A β producido, atacando selectivamente la escisión ϵ , lo que condicionaría los productos de la secuencia escisoria posterior (escisión γ).

Por ello, existe la necesidad de desarrollar nuevos abordajes, tales como la creación de modelos de comportamiento cinético del complejo enzimático γ -secretasa para los diferentes productos de escisión del péptido A β PP. La correlación entre estos modelos cinéticos y los modelos estructurales tridimensionales establecidos ayudaría a entender la dinámica molecular del procesamiento proteolítico del péptido A β PP para generar los péptidos A β 42 y A β 40 y permitiría la identificación de dianas moleculares, dentro del complejo enzimático γ -secretasa, cuya inhibición pueda ser interesante desde el punto de vista clínico para el tratamiento y/o prevención de la EA.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona dianas moleculares dentro del complejo enzimático γ -secretasa, concretamente localizadas en la molécula de presenilina que constituye la subunidad catalítica de dicho complejo, las cuales permiten identificar y/o diseñar moléculas, preferiblemente anticuerpos, cuya unión bloquee selectivamente la entrada del sustrato A β PP a uno de los dos canales que conducen al sitio activo de la enzima responsable de la producción del péptido A β 42. Dicho canal se encontraría delimitado por un agujero que comunica el espacio extracelular con el citoplasma (Fig. 1). De este modo, la unión de dichas moléculas a las dianas moleculares aquí descritas conduce a la interrupción de la línea de producción del producto peptídico A β 42 frente a la línea de producción del producto peptídico A β 40, provocando así una reducción en el cociente A β 42/A β 40, lo cual es deseable desde el punto de vista del tratamiento y/o prevención de la EA.

El inventor de la presente invención ha desarrollado un modelo de comportamiento cinético para el complejo enzimático γ -secretasa que incluye a la presenilina como subunidad catalítica, proponiendo la existencia de dos posibles canales o vías de entrada (Fig. 1), que conducirían hasta el sitio catalítico en la presenilina, para un mismo sustrato amiloideo ($A\beta$ PP), el cual es el sustrato más abundante y relevante del complejo en enfermedades que afectan al rendimiento y deterioro cognitivo, como la EA. En el modelo propuesto, dichos canales, denominados canal γ 40 y canal γ 42, deberían divergir físicamente hacia el espacio luminal (por condicionamientos estéricos), pero confluirían en el centro activo en sentido hacia el citoplasma, y cada uno de ellos estaría asociado a las respectivas líneas escisorias dado que el sustrato presentaría diferentes condicionamientos estéricos respecto a la escisión ϵ en función del canal de entrada (el canal γ 40 y el γ 42 darían lugar a distintas escisiones ϵ , las que producen $A\beta$ 49 y $A\beta$ 48 respectivamente). De modo que el canal γ 40 daría lugar al péptido $A\beta$ 40 y el canal γ 42 al péptido $A\beta$ 42. En resumen, a través de dos vías de acceso o canales de entrada a la presenilina, dentro del complejo enzimático, el modelo permite explicar el mecanismo cinético que da lugar a la formación de estos dos péptidos ($A\beta$ 42 y $A\beta$ 40) y su distribución cuantitativa.

Por ello, la presente invención propone el bloqueo luminal del canal de entrada al complejo enzimático γ -secretasa atribuido a la formación del péptido $A\beta$ 42, el cual se localiza en la estructura de la presenilina y que en esta invención se ha denominado "canal γ 42 de la presenilina", mediante moléculas que presentan especificidad frente a determinantes antigénicos que bordean la zona de entrada a dicho canal desde el espacio extracelular. De esta forma la subunidad enzimática presenilina, que forma el núcleo catalítico del complejo enzimático γ -secretasa, resulta parcialmente inaccesible para el sustrato que va a ser escindido, $A\beta$ PP, mientras la molécula permanezca unida al canal γ 42 ejerciendo un impedimento estérico sobre el mismo. Esto provoca un bloqueo selectivo del canal γ 42 y consecuentemente, como se muestra en los ejemplos de la presente invención, una reducción del cociente $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40, lo cual es deseable desde el punto de vista del tratamiento y/o prevención de patologías asociadas al procesamiento proteolítico del sustrato $A\beta$ PP. Por tanto, la presente invención se basa en la utilidad del canal γ 42 de la presenilina como diana molecular y en la funcionalidad terapéutica de cualquier molécula identificada o diseñada a partir de dicha diana que sea capaz de bloquear la zona de

entrada al canal γ 42 desde el espacio extracelular impidiendo, parcial o totalmente, la entrada del sustrato a la enzima.

El canal γ 42 de la presenilina se ha asociado hasta el momento con la entrada de agua e iones, por lo que hasta ahora no se había propuesto como un posible canal de entrada del sustrato amiloideo que posteriormente será escindido para producir el péptido A β 42. Estructuralmente, el canal γ 42 se encuentra flanqueado por los dominios transmembrana 2, 3, 5 y 7. Los dominios transmembrana, como su nombre indica, atraviesan la membrana celular y contactan, por un lado, con el lumen y, por el lado opuesto, con el citoplasma, concretamente algunos de los aminoácidos que constituyen estos dominios transmembrana estarán en contacto con el lumen o espacio extracelular (a esta región se llamará en la presente invención “extremo luminal del dominio transmembrana”). Entre dos dominios transmembrana cualesquiera se encuentra un bucle que conecta dos dominios entre sí y que se proyecta hacia el lumen o hacia el citoplasma. La conjunción de la parte luminal de los dominios transmembrana 2, 3, 5 y 7 con los bucles luminales con los que conectan (LL1, LL2, LL3 y LL4 respectivamente; TM-II con LL1, TM-III con LL2, TM-V con LL3 y TM-VII con LL4) configuran el acceso de las moléculas amiloideas al interior del canal γ 42 de la presenilina 1 (Fig. 2a). Más adelante se hará referencia a estas combinaciones estructurales transmembrana-bucle como “regiones luminales, RL,” de acceso al canal γ 42. Este patrón estructural es extrapolable a la presenilina 2 (Fig. 2b).

Por ello, un primer aspecto de la invención se refiere al uso del canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA.

El “complejo enzimático γ -secretasa” es el complejo compuesto por cuatro proteínas: presenilina, nicastrina, gen asociado al defecto en nasofaringe anterior de drosophila (APH1) y potenciador de presenilina 2 (PEN2). El complejo lleva a cabo el procesamiento proteolítico del sustrato A β PP dentro de la membrana plasmática para dar lugar a los dos péptidos A β 40 y A β 42. La subunidad catalítica del complejo enzimático γ -secretasa es la presenilina, pudiendo estar presente en el complejo la presenilina 1 o la presenilina 2. Estas presenilinas son proteínas transmembrana

cuyos genes, en humano, presentan una elevada homología entre ellos (80% de identidad a nivel de nucleótidos). En la presente invención se entiende, por tanto, por “presenilina” la presenilina 1 o la presenilina 2. En una realización preferida, la presenilina 1 es la proteína de humano de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 21.

5 En otra realización preferida, la presenilina 2 es la proteína de humano de secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 22. Las secuencias aminoacídicas de las presenilinas pueden contener mutaciones, tales como inserciones, sustituciones, adiciones o deleciones de uno o más residuos aminoacídicos. Por ello, dentro del alcance de la presente invención se incluyen las presenilinas 1 y 2 cuya secuencia de aminoácidos

10 sea idéntica u homologa a las secuencias descritas en SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, respectivamente.

El término “diana farmacológica”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, preferiblemente a cualquiera de las regiones luminales que delimitan

15 dicho canal descritas posteriormente en la presente invención, las cuales son de utilidad para el estudio del efecto bioquímico de moléculas capaces de unirse a ellas. Las moléculas de interés son aquellas que ejerzan un impedimento estérico que impida la entrada del sustrato amiloideo al complejo enzimático a través de este

20 canal. Estas moléculas, pueden ser sin limitarnos, anticuerpos, aptámeros, RNAs de interferencia o agentes químicos, que se seleccionan mediante un cribado en el cual se analiza la presencia de dicho impedimento estérico y/o la reducción del cociente $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40.

25 El término “enfermedad de Alzheimer” o “EA”, tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a una enfermedad neurodegenerativa que presenta deterioro cognitivo y/o trastornos conductuales. Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas degeneran y/o mueren y diferentes zonas del cerebro se

30 atrofian.

El término “canal γ 42” tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al canal mostrado en la Fig. 1, el cual permite la entrada del sustrato amiloideo necesaria para su posterior procesamiento proteolítico para generar el péptido $A\beta$ 42,

35 o cualquiera de los péptidos de su misma línea escisoria, tales como $A\beta$ 45 ó $A\beta$ 38. El

acceso luminal a dicho canal estará delimitado, preferiblemente, por las regiones luminales (RL) como se indica posteriormente y que se encuentran representadas en la Fig. 2.

5 En otra realización preferida, dicho canal γ 42 está delimitado por:

a) una primera región luminal (RL1) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina y el bucle luminal 1 (LL1) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio TM-II,

10

b) una segunda región luminal (RL2) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina y el bucle luminal 2 (LL2) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio TM-III,

15

c) una tercera región luminal (RL3) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina y el bucle luminal 3 (LL3) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio TM-V, y

20

d) una cuarta región luminal (RL4) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina y el bucle luminal 4 (LL4) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio TM-VII.

El término “región luminal” (RL), tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una región dispuesta hacia el exterior luminal del canal γ 42 de las presenilinas 1 y 2 (Fig. 2) y compuesta por los elementos definidos anteriormente en los puntos a), b), c) ó d), donde los dominios TM-II, TM-III, TM-V y TM-VII son dominios transmembrana de la presenilina; y LL1, LL2, LL3 y LL4 son bucles luminales de la presenilina. Las regiones luminales a) a d) descritas anteriormente se encuentran dispuestas de manera que conforman el acceso luminal al canal γ 42 de la presenilina, que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa.

Se entiende por “extremo luminal del dominio transmembrana” la región aminoacídica de cualquiera de los dominios transmembrana 2, 3, 5 ó 7 (TM-II, TM-III, TM-V y TM-VII) de las presenilinas 1 ó 2 dispuesta hacia el extremo luminal del canal γ 42 (Fig. 2), dentro del complejo enzimático γ -secretasa, los cuales, como se ha

35

indicado anteriormente, forman parte del canal γ 42 de la presenilina. Estas regiones aminoacídicas consisten en los últimos 3 a 4 aminoácidos del extremo C- ó N-terminal de cada dominio transmembrana (Fig. 2).

5 En una realización más preferida, el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, el extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica
10 SEQ ID NO: 3 y el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica LVG.

Se entiende por “bucle luminal” (“*luminal loop*”, LL) aquella región aminoacídica de las presenilinas 1 ó 2 (Fig. 2) dispuesta enteramente hacia el lumen y que presenta
15 estructura de bucle o “*loop*” debido a que conecta dos dominios transmembrana, contiguos en la secuencia primaria, entre sí.

En una realización más preferida, el bucle luminal 1 (LL1) de la primera región luminal (RL1) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO:
20 6, el bucle luminal 2 (LL2) de la segunda región luminal (RL2) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7, el bucle luminal 3 (LL3) de la tercera región luminal (RL3) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8 y el bucle luminal 4 (LL4) de la cuarta región luminal (RL4) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9.

25

En una realización aun más preferida, la primera región luminal (RL1) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 13, la segunda región luminal (RL2) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 14, la tercera región luminal (RL3) de la presenilina 1 consiste en la
30 secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15 y la cuarta región luminal (RL4) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 16.

En otra realización preferida, el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, el
35 extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina 2 consiste en

la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5, el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 y el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica LVG.

5

En una realización más preferida, el bucle luminal 1 (LL1) de la primera región luminal (RL1) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 10, el bucle luminal 2 (LL2) de la segunda región luminal (RL2) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 11, el bucle luminal 3 (LL3) de la
10 tercera región luminal (RL3) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8 y el bucle luminal 4 (LL4) de la cuarta región luminal (RL4) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 12.

En una realización aun más preferida, la primera región luminal (RL1) de la
15 presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 17, la segunda región luminal (RL2) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 18, la tercera región luminal (RL3) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15 y la cuarta región luminal (RL4) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 19.

20

Las regiones lumbales definidas en la presente invención pueden ser utilizadas en su forma aislada como dianas farmacológicas para el cribado de moléculas capaces de ejercer un impedimento estérico sobre el canal γ 42 de la presenilina que impida la entrada del sustrato a dicho canal. Por ello, en un segundo aspecto, la presente
25 invención se refiere a una región luminal aislada del canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, de ahora en adelante "región luminal de la invención", seleccionada de la lista que consiste en:

a) región luminal 1 (RL1) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina y el bucle luminal 1 (LL1) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II),
30

b) región luminal 2 (RL2) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina y el bucle luminal 2 (LL2) de la
35

presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III),

5 c) región luminal 3 (RL3) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina y el bucle luminal 3 (LL3) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V), y

10 d) región luminal 4 (RL4) que comprende el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina y el bucle luminal 4 (LL4) de la presenilina que enlaza con dicho extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII).

La utilidad de estas dianas moleculares se basa en su situación estratégica dentro
15 del área que delimita el canal γ 42 de la presenilina, por lo que su inhibición o bloqueo conduce a un impedimento estérico del canal γ 42 para la entrada del sustrato A β PP, lo que finalmente se traduce en una reducción del cociente A β 42/A β 40.

La región luminal de la presente invención puede ser sintetizada, por ejemplo,
20 aunque sin limitarnos, *in vitro*. Por ejemplo, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. La región luminal de la invención puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un
25 sitio de corte por una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido. La producción recombinante de la región luminal de la invención comprende la amplificación de un polinucleótido que codifica para dicha región, la clonación del polinucleótido amplificado en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicho
30 vector, el cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión de la región luminal de la invención y el aislamiento y purificación de la región luminal de la invención producida por la célula.

La región luminal de la invención puede presentar variantes. Estas variantes se
35 refieren a variaciones limitadas en la secuencia aminoacídica, que permiten el

mantenimiento de la funcionalidad del péptido. Esto quiere decir que la secuencia de referencia y la secuencia de la variante son similares en conjunto, e idénticas en muchas regiones. Estas variaciones se generan por sustituciones, deleciones o adiciones. Dichas sustituciones son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, por aminoácidos conservados. Los aminoácidos conservados son aminoácidos que tienen cadenas laterales y propiedades similares en cuanto a, por ejemplo, hidrofobicidad o aromaticidad. Estas sustituciones incluyen, aunque sin limitarse, sustituciones entre ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp), entre lisina (Lys) y arginina (Arg), entre asparagina (Asn) y glutamina (Gln), entre serina (Ser) y treonina (Thr), y/o entre los aminoácidos que componen el grupo alanina (Ala), leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile). Las variaciones pueden ser variaciones generadas artificialmente como, por ejemplo, mediante mutagénesis o síntesis directa. Por ello, dentro del alcance de la presente invención también se incluyen los péptidos o polipéptidos cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica u homologa a las secuencias descritas en la presente invención.

En una realización preferida de la región luminal de la invención, el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, el extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 2, el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 y el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica LVG.

25

En una realización más preferida, el bucle luminal 1 (LL1) de la región luminal 1 (RL1) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6, el bucle luminal 2 (LL2) de la región luminal 2 (RL2) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 7, el bucle luminal 3 (LL3) de la región luminal 3 (RL3) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8 y el bucle luminal 4 (LL4) de la región luminal 4 (RL4) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9.

En una realización aun más preferida, la región luminal 1 (RL1) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 13, la región luminal 2 (RL2) de

35

la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 14, la región luminal 3 (RL3) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15 y la región luminal 4 (RL4) de la presenilina 1 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 16.

5

En otra realización preferida de la región luminal de la invención, el extremo luminal del dominio transmembrana 2 (TM-II) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, el extremo luminal del dominio transmembrana 3 (TM-III) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 5, el extremo luminal del dominio transmembrana 5 (TM-V) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 y el extremo luminal del dominio transmembrana 7 (TM-VII) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica LVG.

15 En una realización más preferida, el bucle luminal 1 (LL1) de la región luminal 1 (RL1) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 10, el bucle luminal 2 (LL2) de la región luminal 2 (RL2) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 11, el bucle luminal 3 (LL3) de la región luminal 3 (RL3) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 8 y el bucle luminal 4 (LL4) de la región luminal 4 (RL4) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 12.

En una realización aun más preferida, la región luminal 1 (RL1) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 17, la región luminal 2 (RL2) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 18, la región luminal 3 (RL3) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 15 y la región luminal 4 (RL4) de la presenilina 2 consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 19.

30 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de la región luminal de la invención como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA, de ahora en adelante

35

“método de la invención”, que comprende:

- a. Poner en contacto una molécula a estudiar con el canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, *ex vivo*, o con la región luminal de la invención aislada,
- b. Analizar la interacción entre la molécula a estudiar y las regiones luminales de la invención, y
- c. Seleccionar la molécula del paso (a) para el tratamiento y/o prevención de la EA cuando ésta se ha unido a al menos una de las regiones luminales de la invención.

Se entiende por “poner en contacto una molécula a estudiar con el canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, o con la región luminal de la invención aislada”, la incubación de la molécula a estudiar con la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, o con la región luminal de la invención aislada, bajo condiciones que permiten la unión molécula-diana farmacológica, siendo la diana el canal γ 42 o la región luminal de la invención aislada. Si la molécula a estudiar es un anticuerpo, la incubación se realiza bajo condiciones que permitan la formación de complejos antígeno-anticuerpo y se mantiene durante un periodo de tiempo adecuado para que tenga lugar una respuesta inmune.

El término “analizar la interacción”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere preferiblemente al estudio del cambio operado o respuesta tras la incubación de la molécula a estudiar, objeto del cribado en el paso (a), en la concentración de los sustratos/productos relacionados con la “escisión γ ” realizada por la presenilina, perteneciente al complejo enzimático γ -secretasa. Una realización más preferida sería cuando el sustrato/producto se refiera a un sustrato/producto amiloideo o un derivado/análogo de éste.

Si la molécula a estudiar es un anticuerpo, la presencia de una respuesta inmunológica puede determinarse, en una realización preferente, haciendo un seguimiento mediante FRET (“Fluorescent Resonance Energy Transfer”) de la unión del sustrato (previamente marcado con un donador de fluorescencia) a la enzima presenilina, que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa, cuando la enzima

está unida al anticuerpo a estudiar (previamente marcado con un aceptor de fluorescencia).

La presencia de una respuesta también puede determinarse, en otra realización preferente, estudiando los productos (derivados de la “escisión γ ” realizada por la presenilina, perteneciente al complejo enzimático γ -secretasa) por métodos convencionales conocidos en el estado de la técnica. Por ello, en una realización preferida, la presencia de respuesta se determina mediante ensayos como *Western blot*, geles de electroforesis, inmunoprecipitación, *arrays* de proteína, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante la incubación con un ligando específico; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen; o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

Los “productos/sustratos relacionados con la “escisión γ ” realizada por la presenilina” se refieren, preferiblemente, a un sustrato/producto amiloideo o un derivado/análogo de éste, más preferiblemente a los péptidos A β 48 y A β 49, como sustratos, y a los péptidos A β 45, A β 42, A β 38, A β 46, A β 43, A β 40 y A β 37, como productos de la escisión γ . En una realización aun más preferida, el sustrato es A β 48 y los productos son A β 45, A β 42 y/o A β 38.

El criterio de selección de moléculas en el paso (c) ha de ser el siguiente: una vez que la molécula se ha unido al canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa (preferiblemente a una o varias de las regiones luminales de la invención), ésta debe ser capaz de disminuir el cociente entre los productos amiloideos A β 42 y A β 40 (A β 42/A β 40). La medida de este cociente puede realizarse *in vitro* mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante la incubación con un anticuerpo específico para A β 42 y otro para A β 40, en ensayos como *Western blot*, geles de electroforesis, inmunoprecipitación, *arrays* de proteína, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante la incubación con un ligando específico; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen; o, por ejemplo, mediante técnicas cromatográficas combinadas con espectrometría de masas.

35

La región luminal de la invención presenta capacidad antigénica, por lo que puede ser empleada para la inmunización de un individuo, preferiblemente mamífero. Una vez producida la inmunización, se extrae el suero del animal inmunizado. La extracción del suero se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo aunque sin limitarnos, extracción sanguínea, posterior coagulación de ésta, eliminación del coágulo de fibrina y otros componentes y aislamiento del suero. Para obtener el suero, a la sangre no se aplica anticoagulante, sino que se deja que coagule y se centrifuga. Se entiende por “suero”, “suero sanguíneo” o “suero hemático” el componente de la sangre resultante tras permitir la coagulación de ésta y eliminar el coágulo de fibrina y otros componentes, que contiene numerosos efectores biológicos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, segregados por los elementos formes al suceder dicha coagulación. Es de un color amarillo, un poco más intenso que el plasma. Posteriormente, se purifican los anticuerpos específicos frente a la región luminal de la invención empleada en la inmunización presentes en el suero obtenido. Son conocidos en el estado de la técnica diversos métodos de purificación de anticuerpos que podrían llevarse a cabo para tal fin, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, métodos electroforéticos o cromatográficos.

La región luminal también puede ser empleada para la inmunización de un ave. Preferiblemente, una vez producida la inmunización se recogen los huevos del animal inmunizado, se separan las yemas, eliminan los lípidos y precipitan/purifican los anticuerpos mediante diversos métodos conocidos en el estado de la técnica.

La “electroforesis” es una técnica analítica de separación basada en el movimiento o la migración de macro-moléculas disueltas en un medio (*buffer* de electroforesis), mediante una matriz o un apoyo sólido como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula depende de su movilidad electroforética y esta movilidad depende de la carga, tamaño y forma. Existen numerosas variaciones de esta técnica basadas en el equipamiento usado, soportes y condiciones para llevar a cabo la separación de las moléculas. La electroforesis se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional.

Los “métodos cromatográficos” permiten la separación de las moléculas por, aunque sin limitarse, su carga, tamaño, masa molecular, mediante su polaridad o mediante su potencial redox. La técnica de cromatografía se selecciona de entre, pero sin limitarse, cromatografía de partición, filtración, cromatografía de adsorción, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica o cromatografía de afinidad, y pueden realizarse tanto en columna, como en papel o en placa.

El péptido de secuencia SEQ ID NO: 20 es un péptido de 8 aminoácidos que corresponde a los residuos 14 a 21 de la secuencia aminoacídica del bucle luminal 1 (LL1) de la primera región luminal (RL1) de la presenilina 1 (SEQ ID NO: 6) ó 2 (SEQ ID NO: 10). Como se muestra en los ejemplos de la presente invención, este péptido de SEQ ID NO: 20 presenta capacidad antigénica y, por tanto, puede emplearse como se ha explicado anteriormente para la inmunización de un animal y la consiguiente obtención de anticuerpos. Como muestran los ejemplos, cuando al menos un anticuerpo específico frente a dicho péptido se encuentra unido al mismo en el complejo enzimático γ -secretasa, dicha interacción ejerce un impedimento estérico que impide la entrada del sustrato A β PP al canal γ 42 de la presenilina, provocando así una reducción en el cociente A β 42/A β 40.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 20, de ahora en adelante “péptido de la invención”. Dicho péptido puede ser sintetizado, por ejemplo, aunque sin limitarnos, *in vitro*. Por ejemplo, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida o mediante aproximaciones de ADN recombinante. El péptido de la invención puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino como un polipéptido de fusión junto con un polipéptido heterólogo, el cual puede contener, por ejemplo aunque sin limitarnos, una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de corte por una proteasa, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido. La producción recombinante del péptido de la invención comprende la amplificación de un polinucleótido que codifica para dicho péptido, la clonación del polinucleótido amplificado en un vector de expresión, la transformación o transfección de una célula competente con dicho vector, el cultivo de dicha célula en condiciones que promuevan la expresión del péptido de la invención y el aislamiento y purificación del péptido producido por la célula.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica para el péptido de la invención, de ahora en adelante “polinucleótido de la invención”. Otro aspecto de la invención se refiere a una construcción génica, preferiblemente un vector de expresión, que comprende dicho polinucleótido. Otro aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el polinucleótido de la invención o la construcción génica de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de SEQ ID NO: 20 como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo específico frente a la región luminal de la invención, de ahora en adelante “anticuerpo de la invención”. En una realización preferida, este anticuerpo de la invención es específico frente al péptido que consiste en la SEQ ID NO: 20.

El término “anticuerpo” se refiere a moléculas de inmunoglobulinas o a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la región luminal de la invención, preferiblemente con el péptido de SEQ ID NO: 20. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂, los cuales pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina o recombinantemente.

El anticuerpo de la invención puede ser policlonal (incluye típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonal (dirigido contra un único determinante en el antígeno). La expresión “anticuerpo monoclonal” alude a una población de moléculas de anticuerpos que contienen solamente una especie de un sitio de fijación de antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítomo particular del antígeno. El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, mediante manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la región luminal de la invención, preferiblemente del péptido de SEQ ID NO: 20, y estando sustituidas por otras que

comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. En una realización preferida el anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal.

5 El anticuerpo de la invención también puede ser recombinante, humanizado, quimérico, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora transformada o transfectada con un polinucleótido que codifica para la región luminal de la invención o con el polinucleótido que codifica para el péptido de SEQ ID NO: 20, con un ácido nucleico codificante para el anticuerpo de la
10 invención, o que produce el anticuerpo de la invención o la región luminal de la invención o el péptido de SEQ ID NO: 20 como resultado de la recombinación homóloga. Dicha célula hospedadora incluye una célula en un cultivo celular “in vitro” así como una célula en un animal hospedador.

15 El anticuerpo de la invención también puede ser quimérico. Así, una región de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie determinada o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos determinados, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s), u homóloga(s), a las secuencias correspondientes en
20 anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, de manera que exhiban la actividad biológica deseada.

Como se muestra en los ejemplos más adelante, un anticuerpo generado frente a
25 cualquiera de las regiones lumbales de la invención, preferiblemente frente al péptido de SEQ ID NO: 20, es capaz de bloquear la entrada del sustrato A β PP al canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo γ -secretasa cuando se encuentra unido a su antígeno, lo cual se traduce en una disminución del cociente A β 42/A β 40 y así dicho anticuerpo es de utilidad para el tratamiento de enfermedades
30 o condiciones patológicas en las que el procesamiento proteolítico del sustrato A β PP esté implicado, como por ejemplo, pero sin limitarnos, la EA. Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del anticuerpo de la invención para la elaboración de un medicamento. O alternativamente, al anticuerpo de la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida, el medicamento es
35 para el tratamiento y/o prevención de la EA.

El término “medicamento”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en los organismos, preferiblemente seres humanos, o que pueda usarse o administrarse a los organismos, preferiblemente seres humanos, con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. El medicamento de la invención puede utilizarse tanto solo como en combinación con otros medicamentos o composiciones para mejorar el rendimiento cognitivo y/o promover el desarrollo cognitivo a modo de terapia combinada, pudiendo ser administrados al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”. En una realización preferida la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo.

El “vehículo farmacéuticamente aceptable”, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta

un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o
5 dar consistencia y forma a la composición.

Además, la composición farmacéutica de la invención puede comprender uno o más adyuvantes y/o excipientes. El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención,
10 estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como
15 por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

20 Preferiblemente, la composición de la invención comprende el anticuerpo de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de anticuerpo de la invención que produzca el efecto deseado mejorando el rendimiento cognitivo y/o promoviendo el desarrollo cognitivo, preferiblemente, tratando y/o previniendo la EA,
25 sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición de la invención.

30 La composición de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición de la presente invención
35 también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o

de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

5

Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, y por tanto al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, percutánea, spray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna o bomba de infusión.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación del complejo γ -secretasa desde una perspectiva luminal. Los dos canales alojan sendas estructuras cilíndricas que representan al sustrato amiloideo: la blanca se localiza en el canal γ 42, y la negra en el γ 40.

25

Figura 2. Esquema representativo de las estructuras que configuran el acceso luminal al canal γ 42 de la PS1 (Fig. 2a) y PS2 (Fig. 2b). Las distintas regiones luminales se representan recogidas dentro de los rectángulos (RL1, RL2, RL3 y RL4). Los círculos concatenados representan residuos aminoácidos. Los residuos de los bucles luminales LL1, LL2, LL3 y LL4 se encuentran identificados con la letra del aminoácido correspondiente y sin rellenar. Los residuos de los extremos luminales de los dominios transmembrana TM-II, TM-III, TM-V y TM-VII se encuentran identificados con la letra del aminoácido correspondiente y con relleno.

30

35

Figura 3. Gráfico que representa el porcentaje de amiloide A β 42 y A β 40 y el correspondiente cociente A β 42/A β 40 en el sobrenadante recogido en 24 de un cultivo de células de la línea neuronal SHSY5Y-APP695 cultivado en presencia de los anticuerpos policlonales generados frente al péptido de SEQ ID NO: 20, respecto a un cultivo control paralelo cultivado en ausencia de los anticuerpos.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que demuestran la eficacia del uso del canal γ 42 de la presenilina, y concretamente del péptido de SEQ ID NO: 20, como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la EA. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante muestran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos policlonales frente al péptido de SEQ ID NO: 20.

El péptido antigénico fue sintetizado mediante técnicas de fase sólida y purificado por HPLC (cromatografía líquida de alta presión) alcanzando una pureza del 97,21%. Se modificó la secuencia peptídica original de la SEQ ID NO: 20, añadiendo un residuo de cisteína al extremo N-terminal del péptido. El péptido se unió covalentemente mediante enlaces disulfuro a BC ("Blue Carrier Immunogenic Protein" de Pierce). Se inmunizaron un total de dos gallinas con el complejo BC-péptido y adyuvante de Freund (de Sigma) y se inyectaron refuerzos con intervalos de 14, 28 y 56 días. Se recogieron los huevos de cada gallina entre los días 40 y 71 posteriores al comienzo de la inmunización. Se separaron las yemas, eliminaron los lípidos y precipitaron/purificaron los anticuerpos con el kit de separación de Pierce ("Pierce Chicken IgY Purification Kit" de Thermo Scientific). Se obtuvieron dos lotes de anticuerpo correspondientes a cada uno de los animales inmunizados: Policlonal1 y Policlonal2.

Ejemplo 2. Acción terapéutica asociada al bloqueo del canal γ 42 con los

anticuerpos generados.

La acción terapéutica asociada al bloqueo del canal γ 42 no estuvo asociada con una reducción de los niveles de A β total, toda vez que el aumento en la producción de A β 40, a través del canal que no es objeto del bloqueo (γ 40), iba acompañado del aumento en el fragmento intracelular del A β PP correspondiente (AICD50 ó C50) responsable de un aumento en la expresión del sustrato A β PP en 8.7 veces su valor (Sébastien Hébert *et al.*, 2006, *EMBO Reports*, 7(7), 739-745). El resultado neto fue un *aumento de la cantidad total de A β* , a expensas de un importante aumento en la cantidad de A β 40, y aumento inferior de A β 42 con respecto al incremento de A β 40, lo que llevó a una *disminución del cociente A β 42/A β 40*. Este resultado, lejos de ser un problema por el paradójico aumento de A β 42, corrige las características fenotípicas patológicas que presentan la mayoría de las mutaciones de los pacientes con EA de causa monogénica, descritas en el apartado anterior (Eric Karran, *et al.*, 2011, *Nature Reviews Drug Discovery*, 10, 698-712):

1. Descenso de la cantidad global de amiloide producido, A β total.
2. Aumento del cociente A β 42/A β 40.

En este sentido, existen evidencias de que se produce una regulación positiva del cociente A β 40/ A β 42 (o de otro modo: regulación negativa del cociente A β 42/ A β 40) con aumento de la cantidad total de A β , (aumento en la cantidad de A β 40 y aumento inferior de A β 42 con respecto al incremento de A β 40) en estudios de plasticidad sináptica que permiten ampliar el espectro del tratamiento propuesto a pacientes con EA esporádica (Iftach Dolev *et al.*, 2013, *Nature Neuroscience*, 16(5), 587-595).

Se evaluó el bloqueo del canal γ 42 de la presenilina que forma parte del complejo enzimático γ -secretasa mediante los anticuerpos policlonales desarrollados contra el péptido SEQ ID NO: 20 descritos en el ejemplo 1. Se expusieron células de la línea neuronal SHSY5Y-APP695 cultivadas hasta una confluencia del 80-90% en medio DMEM (de Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (de Invitrogen-Gibco). Las células fueron desprendidas de la placa utilizando sólo medios mecánicos. A continuación fueron sembradas en medio Opti-MEM (de Invitrogen-Gibco) en una concentración aproximada de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo. Las células

fueron cultivadas durante 24 horas (a 37°C, 5% CO₂) en presencia (concentración final: 6.000 nM) y en ausencia de anticuerpo policlonal (cultivo control). Se midieron los niveles de Aβ40 y Aβ42, tanto de los sobrenadantes a las 24 horas como los del medio de cultivo Opti-MEM (que se consideró como nivel basal, de referencia),
5 utilizando los kits de ELISA “Colorimetric BetaMark™ Beta-Amyloid x-40 ELISA kit” (de Covance) y “Colorimetric BetaMark™ Beta-Amyloid x-42 ELISA kit” (de Covance) respectivamente.

Los resultados se muestran gráficamente en la figura 3. Estos resultados logran
10 invertir las características fenotípicas que presentan la mayoría de las mutaciones de los pacientes con EA de causa monogénica, ya comentadas. De este modo, lo que se observó es:

- 15 1. Aumento de la cantidad global de amiloide producido, Aβ total, respecto al control sin exposición al anticuerpo.
2. Descenso del cociente Aβ42/Aβ40, respecto al control sin exposición al anticuerpo.

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 20.
- 5 2. Polinucleótido aislado que codifica para el péptido según la reivindicación 1.
3. Construcción génica que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2.
- 10 4. Construcción génica según la reivindicación 3 que es un vector de expresión.
5. Célula que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2 o la construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4.
- 15 6. Anticuerpo específico frente al péptido según la reivindicación 1.
7. Anticuerpo según la reivindicación 6, donde el anticuerpo es policlonal.
8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7.
- 20 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo.
- 25 10. Uso del péptido según la reivindicación 1 como diana farmacológica para el cribado de moléculas útiles para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer (EA).
- 30 11. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 para la elaboración de un medicamento.
12. Uso del anticuerpo según la reivindicación 11, donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de la EA.

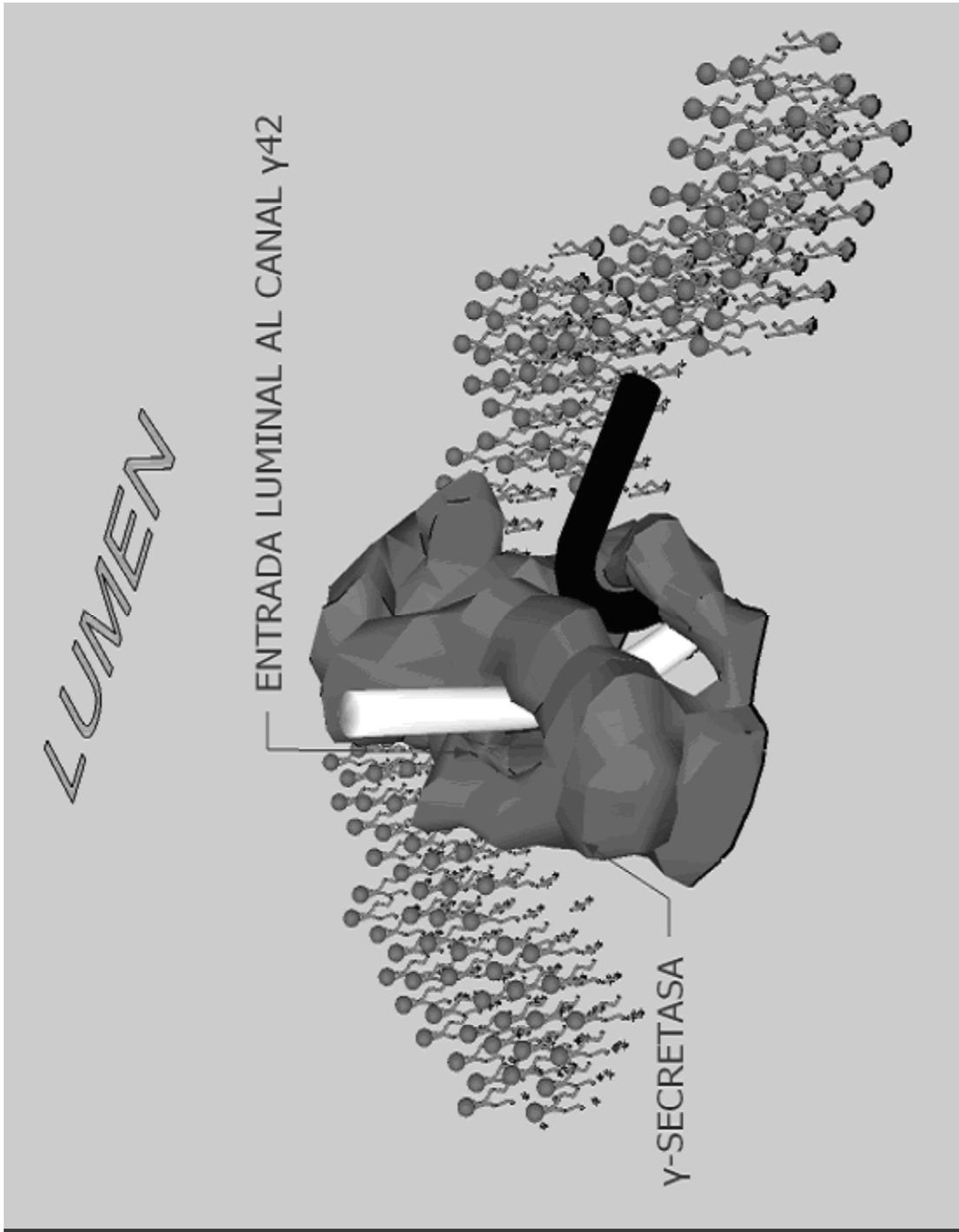
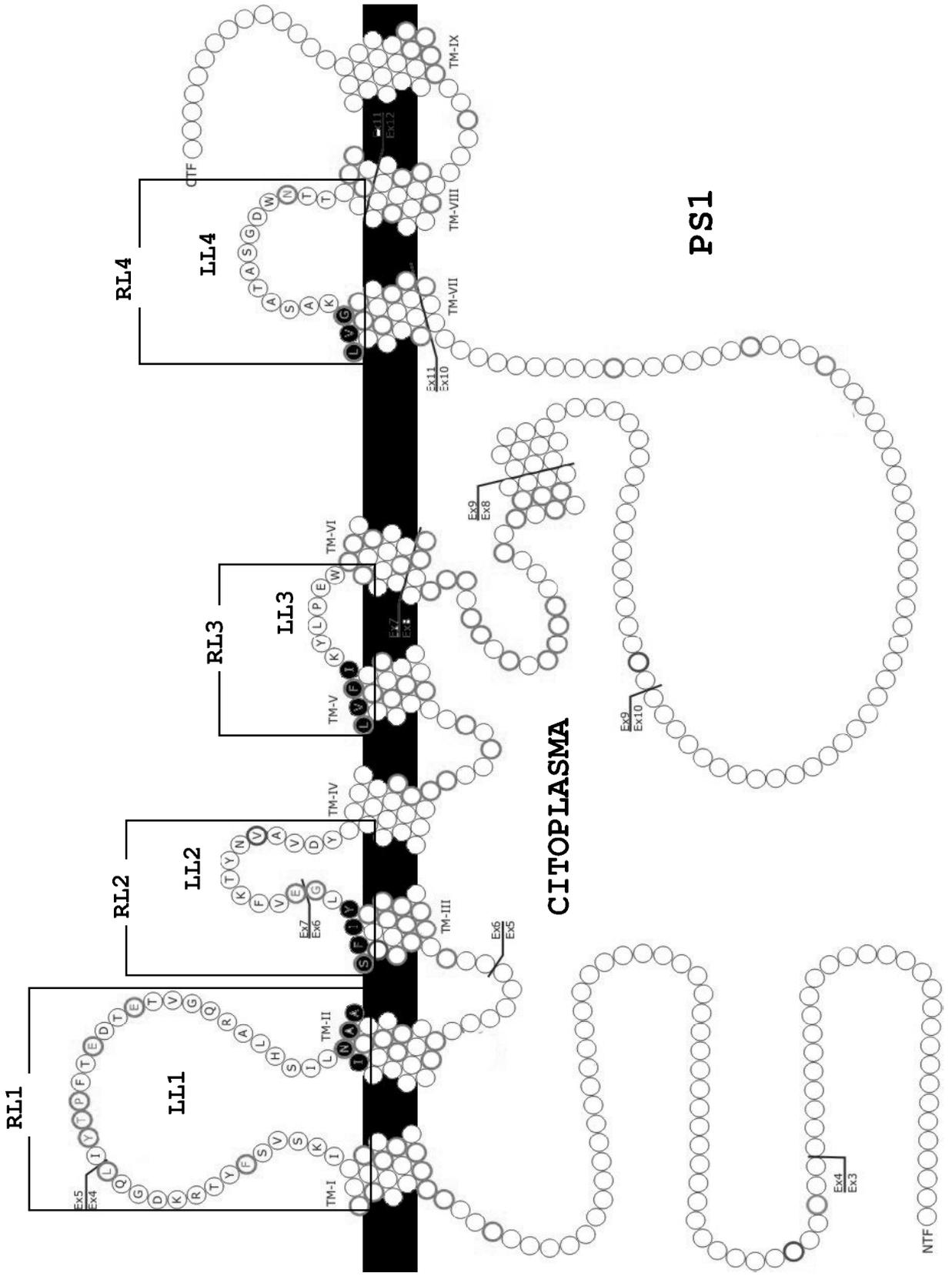


Fig. 1

LUMEN



PS1

CITOPLASMA

Fig. 2a

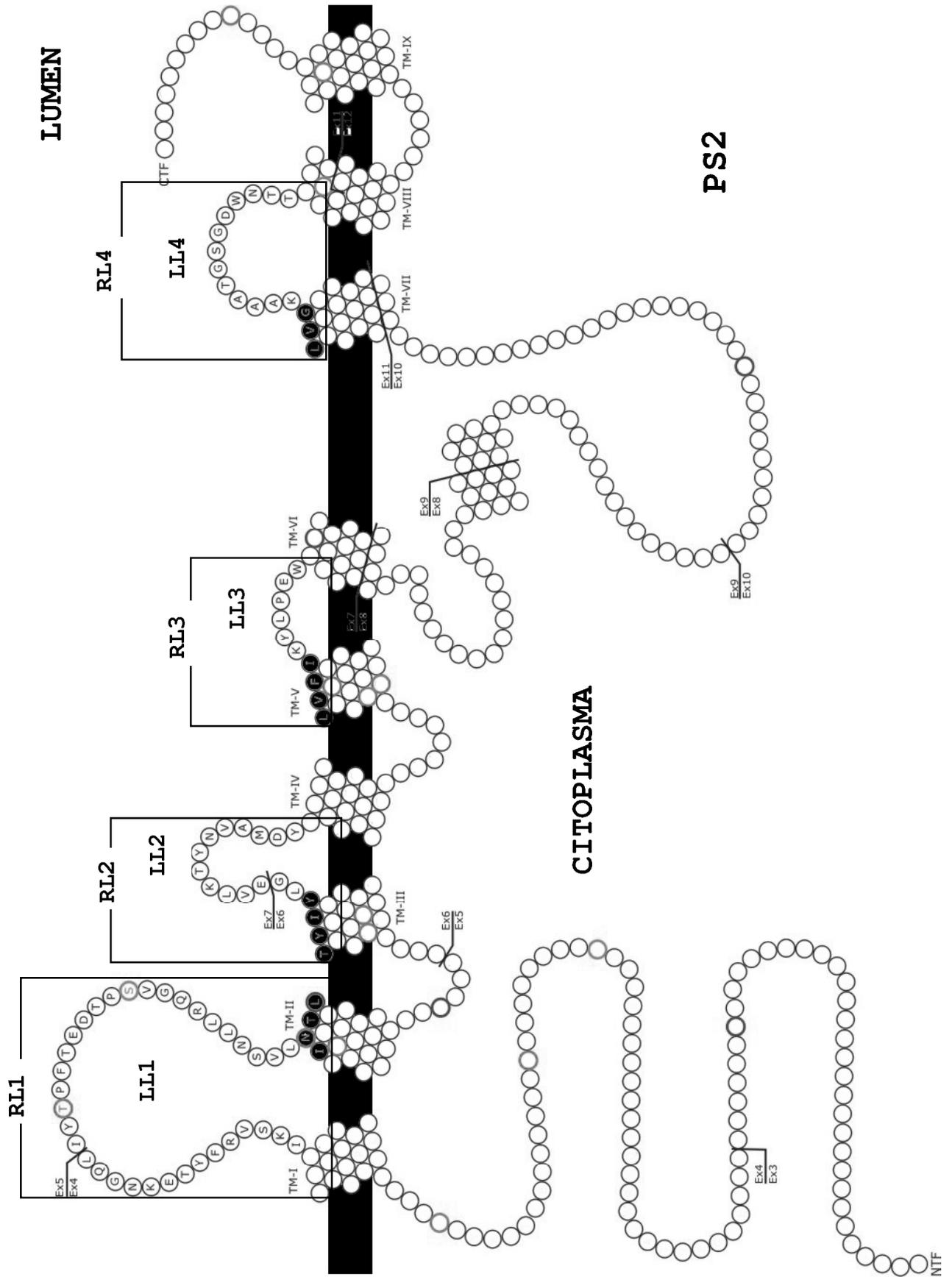


Fig. 2b

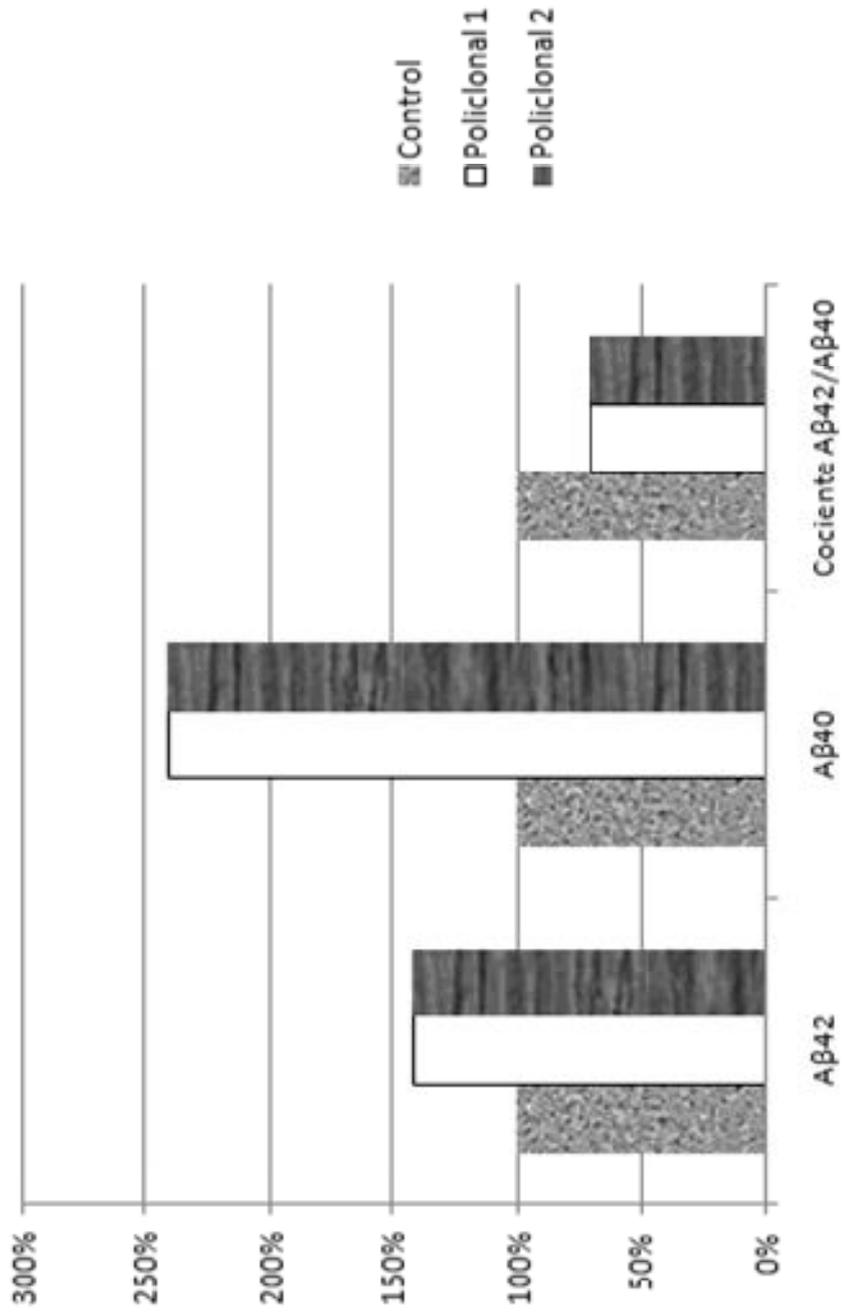


Fig. 3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gallar Ruíz, Juan Carlos

<120> PÉPTIDO ÚTIL COMO DIANA FARMACOLÓGICA PARA EL CRIBADO DE
MOLÉCULAS PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER, ANTICUERPO FRENTE AL MISMO Y USO DEL ANTICUERPO PARA
EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE DICHA ENFERMEDAD

<130> ES2938.1

<140> P201331274

<141> 2013-08-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Ala Ala Ile

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Phe Ile Tyr

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Leu Val Phe Ile

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Thr Leu Ile

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 530 141 A2

Thr Tyr Ile Tyr
1

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr
1 5 10 15

Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His
20 25 30

Ser Ile Leu
35

<210> 7
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Tyr Leu Pro Glu Trp
1 5

<210> 9
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr
1 5 10

<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Ile Lys Ser Val Arg Phe Tyr Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr
1 5 10 15

ES 2 530 141 A2

Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn
20 25 30

Ser Val Leu
35

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11

Leu Gly Glu Val Leu Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr
1 5 10

<210> 13
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 13

Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln Leu Ile Tyr
1 5 10 15

Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg Ala Leu His
20 25 30

Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile
35

<210> 14
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 14

Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala Val
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 530 141 A2

<400> 15

Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp
1 5 10

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 39

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Lys Ser Val Arg Phe Tyr Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr
1 5 10 15

Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn
20 25 30

Ser Val Leu Asn Thr Leu Ile
35

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Tyr Ile Tyr Leu Gly Glu Val Leu Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met
1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr
1 5 10 15

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 530 141 A2

<400> 20

Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu
1 5

<210> 21

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met
1 5 10 15

Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn
20 25 30

Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu
35 40 45

Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu
50 55 60

Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys
65 70 75 80

His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr Leu Cys Met Val Val Val
85 90 95

Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Ser Phe Tyr Thr Arg Lys Asp Gly Gln
100 105 110

Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr Glu Thr Val Gly Gln Arg
115 120 125

Ala Leu His Ser Ile Leu Asn Ala Ala Ile Met Ile Ser Val Ile Val
130 135 140

Val Met Thr Ile Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys
145 150 155 160

Val Ile His Ala Trp Leu Ile Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Phe Phe
165 170 175

Phe Ser Phe Ile Tyr Leu Gly Glu Val Phe Lys Thr Tyr Asn Val Ala
180 185 190

Val Asp Tyr Ile Thr Val Ala Leu Leu Ile Trp Asn Phe Gly Val Val
195 200 205

Gly Met Ile Ser Ile His Trp Lys Gly Pro Leu Arg Leu Gln Gln Ala
210 215 220

ES 2 530 141 A2

Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala Leu Val Phe Ile Lys Tyr
 225 230 235 240

Leu Pro Glu Trp Thr Ala Trp Leu Ile Leu Ala Val Ile Ser Val Tyr
 245 250 255

Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly Pro Leu Arg Met Leu Val
 260 265 270

Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Thr Leu Phe Pro Ala Leu Ile Tyr
 275 280 285

Ser Ser Thr Met Val Trp Leu Val Asn Met Ala Glu Gly Asp Pro Glu
 290 295 300

Ala Gln Arg Arg Val Ser Lys Asn Ser Lys Tyr Asn Ala Glu Ser Thr
 305 310 315 320

Glu Arg Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala Glu Asn Asp Asp Gly Gly Phe
 325 330 335

Ser Glu Glu Trp Glu Ala Gln Arg Asp Ser His Leu Gly Pro His Arg
 340 345 350

Ser Thr Pro Glu Ser Arg Ala Ala Val Gln Glu Leu Ser Ser Ser Ile
 355 360 365

Leu Ala Gly Glu Asp Pro Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly
 370 375 380

Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ser Ala Thr Ala
 385 390 395 400

Ser Gly Asp Trp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile
 405 410 415

Gly Leu Cys Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Phe Lys Lys Ala Leu
 420 425 430

Pro Ala Leu Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Val Phe Tyr Phe Ala
 435 440 445

Thr Asp Tyr Leu Val Gln Pro Phe Met Asp Gln Leu Ala Phe His Gln
 450 455 460

Phe Tyr Ile
 465

<210> 22
 <211> 448
 <212> PRT

ES 2 530 141 A2

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Glu Val Cys Asp Glu
1 5 10 15

Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser Cys Gln
20 25 30

Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln Trp Arg
35 40 45

Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Val
50 55 60

Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Leu Thr
65 70 75 80

Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His Val Ile Met Leu Phe Val Pro Val Thr
85 90 95

Leu Cys Met Ile Val Val Val Ala Thr Ile Lys Ser Val Arg Phe Tyr
100 105 110

Thr Glu Lys Asn Gly Gln Leu Ile Tyr Thr Pro Phe Thr Glu Asp Thr
115 120 125

Pro Ser Val Gly Gln Arg Leu Leu Asn Ser Val Leu Asn Thr Leu Ile
130 135 140

Met Ile Ser Val Ile Val Val Met Thr Ile Phe Leu Val Val Leu Tyr
145 150 155 160

Lys Tyr Arg Cys Tyr Lys Phe Ile His Gly Trp Leu Ile Met Ser Ser
165 170 175

Leu Met Leu Leu Phe Leu Phe Thr Tyr Ile Tyr Leu Gly Glu Val Leu
180 185 190

Lys Thr Tyr Asn Val Ala Met Asp Tyr Pro Thr Leu Leu Leu Thr Val
195 200 205

Trp Asn Phe Gly Ala Val Gly Met Val Cys Ile His Trp Lys Gly Pro
210 215 220

Leu Val Leu Gln Gln Ala Tyr Leu Ile Met Ile Ser Ala Leu Met Ala
225 230 235 240

Leu Val Phe Ile Lys Tyr Leu Pro Glu Trp Ser Ala Trp Val Ile Leu
245 250 255

ES 2 530 141 A2

Gly Ala Ile Ser Val Tyr Asp Leu Val Ala Val Leu Cys Pro Lys Gly
 260 265 270

Pro Leu Arg Met Leu Val Glu Thr Ala Gln Glu Arg Asn Glu Pro Ile
 275 280 285

Phe Pro Ala Leu Ile Tyr Ser Ser Ala Met Val Trp Thr Val Gly Met
 290 295 300

Ala Lys Leu Asp Pro Ser Ser Gln Gly Ala Leu Gln Leu Pro Tyr Asp
 305 310 315 320

Pro Glu Met Glu Glu Asp Ser Tyr Asp Ser Phe Gly Glu Pro Ser Tyr
 325 330 335

Pro Glu Val Phe Glu Pro Pro Leu Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Glu Leu
 340 345 350

Glu Glu Glu Glu Glu Arg Gly Val Lys Leu Gly Leu Gly Asp Phe Ile
 355 360 365

Phe Tyr Ser Val Leu Val Gly Lys Ala Ala Ala Thr Gly Ser Gly Asp
 370 375 380

Trp Asn Thr Thr Leu Ala Cys Phe Val Ala Ile Leu Ile Gly Leu Cys
 385 390 395 400

Leu Thr Leu Leu Leu Leu Ala Val Phe Lys Lys Ala Leu Pro Ala Leu
 405 410 415

Pro Ile Ser Ile Thr Phe Gly Leu Ile Phe Tyr Phe Ser Thr Asp Asn
 420 425 430

Leu Val Arg Pro Phe Met Asp Thr Leu Ala Ser His Gln Leu Tyr Ile
 435 440 445