

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 787**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009** **E 09749511 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2282728**

54 Título: **Modulación de los receptores con dominio Vps10p**

30 Prioridad:

22.05.2008 DK 200800711
22.05.2008 US 55385 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.04.2015

73 Titular/es:

H. LUNDBECK A/S (100.0%)
Ottiliavej 9
2500 Valby, DK

72 Inventor/es:

NYKJÆR, ANDERS y
FUGLSANG KJØLBY, MADS

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 533 787 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

Modulación de los receptores con dominio Vps10p

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la identificación de ligandos capaces de actuar como antagonistas/inhibidores de los receptores con dominio Vps10p.

Antecedentes de la invención

10 La concentración plasmática de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que transportan el colesterol en la circulación humana, es uno de los factores de riesgo más importantes de la morbilidad y mortalidad cardiovascular (1). Las cantidades excesivas de colesterol en la circulación son depositadas en las paredes de los vasos coronarios produciendo el cierre del lumen del vaso y la obstrucción del flujo sanguíneo al corazón (y otros órganos.) Este proceso patológico se conoce como aterosclerosis. Como consecuencia de sucesos ateroscleróticos, se produce la arteriopatía coronaria y el infarto de miocardio. Dada la importancia de la gestión de los niveles de LDL en pacientes, el colesterol LDL sigue siendo hoy el objetivo principal de la terapia cardiovascular (2, 3).

15 El riesgo de desarrollar enfermedades y afecciones como la aterosclerosis, arteriopatía coronaria y cardiopatía coronaria se ha demostrado que está fuertemente correlacionado con los niveles altos de LDL-colesterol y triglicéridos. Los niveles elevados de lipoproteína de baja densidad-colesterol (LDL-colesterol) es un contribuyente asociado a lípidos significativo, por ejemplo, para la cardiopatía coronaria.

20 La aterosclerosis y la arteriopatía coronaria asociada es la causa principal de la mortalidad en el mundo industrializado. A pesar de los intentos de modificar los factores de riesgo secundarios (fumar, obesidad, falta de ejercicio) y el tratamiento de la dislipidemia con la modificación de la dieta y la terapia con fármacos, la cardiopatía coronaria sigue siendo la causa más común de muerte en EE.UU., donde la enfermedad cardiovascular da cuenta de 44% de todas las muertes, con 53% de estas asociadas con cardiopatía coronaria aterosclerótica.

25 Se conoce una serie de rutas bioquímicas que afectan a los niveles plasmáticos de colesterol y se han considerado objetivos en la intervención terapéutica. Estas etapas incluyen la velocidad con la que es producido el colesterol en el organismo y es introducido en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), la extensión de la conversión de VLDL en LDL, así como la eficacia de la eliminación de las LDL en los tejidos hepáticos. Además, la conversión del colesterol en ácidos biliares que son secretados en el intestino afecta a los niveles de lípidos en la circulación.

La familia de receptores con dominio Vps10p

30 Los autores de la presente invención han estudiado el efecto de la modulación de la actividad de los receptores con dominio Vps10p en los niveles plasmáticos de LDL-colesterol y triglicéridos. Los miembros de esta familia de receptores son Sortilina, SorLA, SorCS1, SorCS2 y SorCS3.

Sortilina

35 La sortilina, el miembro arquetípico de la familia de receptores con dominio Vps10p se denomina en ocasiones el receptor de neurotensina 3 (NTR3), Glicoproteína 95 (Gp95) o receptor NT 100 kDa. La sortilina humana tiene número de acceso en Swiss Prot ID No. Q99523.

La sortilina, (SEQ ID NO. 1) es un receptor de membrana de tipo I expresado en una serie de tejidos, incluyendo el cerebro, médula espinal, testículos, hígado y músculo esquelético (6-7). La sortilina pertenece a una familia de receptores que comprende Sortilina, SorLA (8), SorCS1, SorCS2 y SorCS3.

40 Todos los receptores de esta familia comparten la característica estructural de un dominio N-terminal de aproximadamente 600 aminoácido con un gran parecido con cada uno de los dos dominios que constituyen la parte luminal del receptor de clasificación de levaduras Vps10p (9). El dominio Vps10p (Vps10p-D) que entre otros ligandos une factores neurotróficos y neuropéptidos (10-14), constituye la parte luminal entera de la sortilina (sSortilina) y es activado por la unión de ligando por escisión enzimática propeptídica (10, 11). La sortilina es un receptor multifuncional de tipo 1 capaz de endocitosis así como de clasificación intracelular (9-11), y como se ha
45 mostrado recientemente, también está implicada en la señalización produciendo la inducción por proneurotrofina de la apoptosis neuronal mediada por p75^{NTR} (12, 13, 18, 19). La sortilina es sintetizada como una proproteína, que se convierte en la sortilina madura por escisión enzimática y eliminación de un propéptido N-terminal corto. Solo el receptor maduro se une a ligandos y lo que es interesante es que todos sus ligandos conocidos, por ejemplo, neurotensina (NT), lipoproteína lipasa, las proformas del factor de crecimiento nervioso β (proNGF) y factor
50 neurotrófico derivado del cerebro (proBDNF), proteína asociada al receptor (RAP), y su propio péptido, compiten por la unión (11-13, 16) indicando que los diversos ligandos se dirigen a un sitio de unión compartido o parcialmente compartido. El NT es un tridecapéptido, que se une a sortilina, SortLA y los dos receptores acoplados a proteína G NTR1 y NTR2 (10, 20-22). La función fisiológica de la NT en relación con la sortilina no se ha elucidado completamente (23), aunque la NT es una herramienta importante, puesto que inhibe la unión de todos los demás

ligandos al Vps10p-D de la sortilina.

SorLA

El receptor relacionado con la proteína de clasificación, abreviada SorLA (nº de ID en Swiss Prot Q92673), también conocida como LR11, es una proteína de membrana de tipo 1, de 250 kDa y el segundo miembro identificado en la familia de receptores con dominio Vps10p de SorLa, como la sortilina, cuyo dominio luminal consiste en un dominio Vps10p solo, se sintetiza como un pro-receptor que es escindido por furina en los compartimentos tardíos de Golgi. Se ha demostrado que el truncado acondiciona el dominio Vps10p para la unión inhibitoria al propéptido de neuropéptidos y la proteína asociada al receptor. Se ha demostrado (21) que se produce la unión ávida de la proteína asociada al receptor, apolipoproteína E, y la lipoproteína lipasa no inhibida por propéptido en sitios localizados en otros dominios lumenales. En células transfectadas, aproximadamente 10% de SorLa de longitud completa es expresada en la superficie celular capaz de mediar la endocitosis. El principal grupo de receptores se encuentra en los compartimentos tardíos de Golgi, y se ha sugerido la interacción con ligandos recién sintetizados.

SorCS1-3

SorCS1 (nº de ID en Swiss Prot Q8WY21), SorCS2 (nº de ID en Swiss Prot Q96PQ0) y SorCS3 (nº de ID en Swiss Prot Q9UPU3) constituyen un subgrupo de proteínas muy similares mutuamente que contienen tanto un Vps10p-D como un dominio rico en leucina limitando el dominio transmembrana (14, 26). SorCS1 puede tener una función importante fuera del sistema nervioso, ya que su región en el gen se ha identificado como un locus de característica cuantitativa de la diabetes de tipo 2 en ratones (27), y las variaciones en el gen de SorCS1 humano se asocian con características relacionadas con la diabetes (28). Se presentan indicaciones adicionales en esta dirección en otro estudio (29) en donde la SorCS1 se asocia con la región Niddm1i 16-Mb controladora de glucosa principal, en la rata GK diabética, una región que produce secreción defectuosa de insulina y que también corresponde a los locus en seres humanos y ratones asociados con la diabetes de tipo 2.

Estado de la técnica

El estado actual de la técnica para la terapia de LDL plasmático alto es la aplicación de estatinas, inhibidores que interfieren con la producción de colesterol endógeno y por lo tanto, reducen la producción de partículas LDL ricas en colesterol. Sin embargo, el uso de estatinas está asociado con un riesgo sustancial de efectos secundarios tales como efectos adversos en las funciones muscular y hepática, así como en las capacidades cognitivas (4,5). Por lo tanto, los amplios esfuerzos de investigación se dirigen a la identificación de nuevos factores que contribuyen a la regulación del metabolismo del colesterol plasmático. Estos factores pueden representar alternativas más seguras a la intervención terapéutica con altos niveles de LDL plasmático.

Recientemente, una serie de grupos ha usado estudios de asociación del genoma completo para identificar regiones cromosómicas en el genoma humano que se puedan asociar con el control de los valores de lípidos plasmáticos. En particular, estos estudios sugieren simplemente determinadas regiones en cromosomas particulares que pueden tener algún valor predictivo de las concentraciones de lípidos y riesgo cardiovascular. Ninguno de estos estudios proporciona pruebas experimentales que confirmen una función causal de los genes candidatos en dicha región cromosómica en el control de la homeostasia de lípidos.

Por ejemplo, Wilier et al. (6) así como Kathiresan et al. (7) han cartografiado ambos un locus cromosómico asociado con el LDL-colesterol en 1p13. Este locus contiene varios genes candidatos entre los cuales están CELSR2, PSRC1 y SORT1. No está claro si cualquiera de los tres genes u otros en esta región pueden ser relevantes para la determinación del LDL-colesterol, como establecen Kathiresan et al. en la página 191: "No está claro todavía qué variantes causales o incluso los genes causales en el nuevo locus"

Incluso es más confuso el que Kathiresan et al. identificaran un aumento de los niveles de ARNm para SORT1 con el alelo C que predispone a su portador a LDL plasmático bajo. Los autores concluyen, "... estas observaciones sugieren un mecanismo por el cual la expresión de la sortilina aumentada vista con el alelo C (en SNP rs646776) podría llevar a menores concentraciones de LDL-colesterol en la circulación". En la argumentación de los autores, la sortilina actúa como un factor protector reductor de los niveles de LDL en la circulación. Cuanto mayores son los niveles de ARNm para la sortilina (SORT1), menor es la concentración plasmática de LDL.

Sin embargo, esta suposición es incorrecta como demuestran los autores de la presente invención mediante estudios funcionales usando modelos de ratón deficientes en sortilina en donde, de hecho, la pérdida de expresión de la sortilina está asociada con el LDL plasmático bajo. Por lo tanto, la actividad normal de la sortilina aumenta en lugar de disminuir las concentraciones de LDL. El aumento visto en el alelo C en el estudio de Kathiresan et al., es probable que refleje una regulación por aumento compensatoria de un alelo de sortilina difuncional.

La solicitud de patente WO 2004/056385 describe un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de dolor inflamatorio, enfermedades o trastornos del páncreas, trastornos renales, trastornos pulmonares, trastornos cardiovasculares, diferentes tipos de tumores, trastornos psiquiátricos o trastornos neuronales, mediante el uso de agentes capaces de inhibir receptores con dominio Vps10p, en particular la sortilina. Sin embargo, el documento WO 2004/056385 no describe que la sortilina esté implicada en la regulación de los

niveles plasmáticos de lípidos.

Otras solicitudes de patente tales como WO 2006/138343 y WO 2007/035716 describen composiciones que comprenden proteínas/receptores que contienen CR que se unen a la proteína asociada al receptor (RAP) para tratar un gran número de enfermedades incluyendo enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la cita en este documento de la sortilina como una proteína que comprende repeticiones CR es incorrecta como lo es la referencia al número de acceso en SwissProt Q92673 junto con la sortilina. Q92673 es el número de acceso en SwissProt para el receptor con dominio Vps10p SorLa que comprende realmente repeticiones CR a las que se puede unir la RAP.

Una solicitud de patente adicional WO 2007/141346 describe genes que regulan el tráfico de colesterol intracelular como dianas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colesterol.

- 10 Una solicitud de patente adicional WO2008/074329 describe agentes para inhibir la unión de una pro-neurotrofina a un receptor con dominio Vps10p, en particular la unión de un pro-NGF o un pro-BDNF a un receptor sortilina. La invención proporciona por lo tanto agentes para tratar y/o prevenir enfermedades, trastornos y degeneraciones neurológicas, neuropsiquiátricas y oculares, así como la obesidad, diabetes, dolor y/o nocicepción en un individuo.

Resumen de la invención

- 15 La presente invención en su sentido más amplio se define por las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para el cribado de un antagonista capaz de unirse a un receptor sortilina, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un receptor sortilina, y
- b) proporcionar ApoB como agonista,
- 20 c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
- d) proporcionar un ensayo para medir la unión de dicho agonista a dicho receptor, y
- e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar al ensayo, y
- f) determinar la cantidad de agonista unido a dicho receptor, y
- 25 g) comparar la cantidad determinada en f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,
- h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista que altera la unión de dicho agonista a dicho receptor.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en donde dicho receptor sortilina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60% con la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar un cultivo celular que expresa dicho receptor sortilina, y
- b) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y
- c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
- 35 d) proporcionar un ensayo para determinar la unión a, internalización de y señalización a través de, dicho receptor sortilina, comprendiendo dicho ensayo,
- e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar c) al cultivo celular a), en presencia de dicho agonista b), y
- f) determinar
- 40 i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
- ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o
- iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y
- g) comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,
- 45 h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista

- i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o
- ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o
- iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de dicho receptor sortilina.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de expresión de dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor sortilina, y
- b) proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor sortilina, y
- c) opcionalmente proporcionar un cultivo celular que expresa en exceso un receptor sortilina

10 d) proporcionar ApoB como agonista del receptor sortilina, y

e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y

f) proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un tercer ensayo que comprende c), y

g) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar a los tres ensayos, y

15 h) determinar

- i) la cantidad de antagonista unido al receptor sortilina, y/o
- ii) la cantidad de antagonista internalizado por el receptor sortilina, y/o
- iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, y

20 i) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),

j) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista

- i) capaz de unirse a un receptor sortilina, y/o
- ii) capaz de inhibir la señalización a través de un receptor sortilina, y/o
- iii) capaz de inhibir la internalización de ApoB como agonista de dicho receptor sortilina.

25 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) administrar dicho antagonista a un mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural,

b) determinar

- 30 i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
- ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o
- iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y

c) comparar la medición de la etapa b) con una medición obtenida en ausencia del compuesto que se va a ensayar,

35 d) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica el efecto de dicho antagonista en dicho mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor con un segundo mamífero no humano que carece de expresión de dicho receptor y un tercer mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 40 a) proporcionar un mamífero no humano que expresa dicho receptor sortilina, y
- b) proporcionar un mamífero no humano que no expresa dicho receptor sortilina, y

- c) proporcionar un mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor sortilina, y
- d) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y
- e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
- f) administrar dicha biblioteca de antagonistas a dicho mamífero no humano de a), b) y c) respectivamente, y
- 5 g) determinar
 - i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
 - ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o
 - iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, en cada uno de los mamíferos no humanos en a), b) y c), y
- 10 h) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),
- i) en donde la diferencia en las cantidades identifica un antagonista
 - i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o
 - ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o
 - 15 iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de ApoB de dicho receptor sortilina.

Resumen de los dibujos

- Figura 1: Resumen del receptor
- Figura 2a: Metabolismo de colesterol y triglicéridos
- Figura 2b: Metabolismo del colesterol y triglicéridos
- 20 Figura 3: Diagrama del colesterol en el plasma
- Figura 4: Diagrama de triglicéridos en el plasma
- Figura 5a: Perfil de lipoproteínas - colesterol y triglicéridos
- Figura 5b: Análisis por resonancia de plasmón de superficie de la unión de ApoB a la sortilina.
- Figura 6: Transcurso del tiempo para el aumento de los niveles de colesterol y perfil de FPLC en ratones que expresan en exceso la sortilina.
- 25 Figura 7: Transferencia Western del plasma de ratones que expresan en exceso la sortilina
- Figura 8: Colesterol y triglicéridos
- Figura 9: Perfil de apoproteínas y lípidos
- Figura 10: Unión competitiva a la sortilina inmovilizada usando péptidos

30 Descripción detallada de la invención

Definiciones

Concentraciones plasmáticas de lípidos anómalas: La expresión concentraciones plasmáticas de lípidos anómalas como se usa en la presente memoria, se refiere al nivel de uno o más de los siguientes niveles plasmáticos de lípidos: colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos.

- 35 Dichos niveles anómalos son niveles (es decir, concentraciones) que están fuera de uno o más de los siguientes intervalos de la tabla 1:

Tabla 1: Niveles plasmáticos normales de lípidos

A: Colesterol total	
Grupo de pacientes	Concentración
Hombres y mujeres de 19-29 años de edad	3,5 -6,2 mM
Hombres y mujeres de 30-59 años de edad	4,4-7,8 mM
Mujeres de más de 59 años de edad	4,8-8,0 mM
Hombres de más de 59 años de edad	4,3 -7,3 mM
Niños menores de 1 año de edad	1,5-4,5 mM
Niños de 1-18 años de edad	2,7-6,0 mM
Límite recomendado para el tratamiento en pacientes que padecen trastornos cardiovasculares, cuando el colesterol total es mayor que:	5 mM
Límite recomendado para el tratamiento en pacientes que padecen diabetes, cuando el colesterol total es mayor que:	4,5 mM
B: LDL-colesterol	
Mujeres de 20-29 años de edad	1,5-4,3 mM
Mujeres de 30-45 años de edad	1,9-4,5 mM
Mujeres de más de 45 años de edad	2,4-5,5 mM
Hombres de 20-29 años de edad	1,7-4,3 mM
Hombres de 30-45 años de edad	2,1-5,0 mM
Hombres de 46-69 años de edad	2,3-5,3 mM
Hombres de más de 69 años de edad	2,3-4,8 mM
Niños de 10-19 años de edad	1,8-3,5 mM
Adultos con mayor riesgo de trastorno cardiovascular cuando el LDL-colesterol es mayor que:	3 mM
C: HDL-colesterol	
Mujeres 20-40 años de edad	1,0-2,0 mM
Mujeres de más de 40 años de edad	1,0-2,3
Hombres de 20-60 años de edad	0,7-1,7 mM
Hombres de más de 60 años de edad	0,8-1,9 mM
Adultos con mayor riesgo de trastorno cardiovascular cuando el HDL-colesterol es mayor que:	1 mM
D: Triglicéridos	
Hombres y mujeres de 20-40 años de edad	0,4-1,6 mM
Hombres y mujeres de más de 40 años de edad	0,5-2,5 mM
Niños de 0-9 años	0,3-1,2 mM
Adultos con mayor riesgo de trastorno cardiovascular cuando el nivel de triglicéridos es mayor que:	2 mM

Fuentes de la tabla 1:

"Dansk Laboratorie medicin, En Håndbog" Jørgen Lyngbye, 2001

Konsensus, www.cardio.dk el 18 de mayo de 2009 (Dansk Kardiologisk Selskab).

Adyuvante: Cualquier sustancia cuya mezcla con un determinante inmunógeno/antígeno administrado aumenta o modifica de otra forma la respuesta inmunitaria a dicho determinante.

- 5 Afinidad: La interacción de la mayoría de los ligandos con sus sitios de unión se puede caracterizar en términos de afinidad de unión. En general, la unión del ligando de alta afinidad resulta de la mayor fuerza intermolecular entre el ligando y su receptor, mientras que la unión del ligando de baja afinidad implica menos fuerza intermolecular entre el ligando y su receptor. En general, la unión de alta afinidad implica un tiempo de permanencia más largo para el ligando en su sitio de unión al receptor que en el caso de la unión de baja afinidad. La unión de alta afinidad de ligandos a receptores a menudo es fisiológicamente importante cuando parte de la energía de la unión se puede usar para producir un cambio conformacional en el receptor, produciendo el comportamiento alterado de un canal de iones asociado o enzima.

Un ligando que se une a un receptor, altera la función del receptor y produce una respuesta fisiológica, se llama un agonista para ese receptor. La unión del agonista a un receptor se puede caracterizar tanto en términos de cuánto se puede producir la respuesta fisiológica y la concentración del agonista que se necesita para producir la respuesta fisiológica. La unión del ligando de alta afinidad implica que una concentración relativamente baja de un ligando es adecuada para ocupar de forma máxima un sitio de unión del ligando y producir una respuesta fisiológica. La unión del ligando se caracteriza a menudo en términos de la concentración de ligando a la que la mitad de los sitios de unión al receptor están ocupados, conocido como la constante de disociación (K_d). Por consiguiente, un antagonista que es capaz de unirse a un receptor de la familia con dominio Vps10p, inhibiendo de esta forma la actividad de dicho receptor con dominio Vps10p puede ser un antagonista que tiene mayor afinidad por el sitio de unión de un agonista del dominio Vps10p que el propio agonista.

Alcohol: Una clase de compuestos orgánicos que contienen un o más grupos hidroxilo (OH). En este contexto un grupo hidrocarbonado saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, colocado como sustituyente en una molécula mayor.

Grupo alicíclico: la expresión "grupo alicíclico" significa un grupo hidrocarbonado cíclico que tiene propiedades parecidas a las de los grupos alifáticos.

Grupo alifático: en el contexto de la presente invención, la expresión "grupo alifático" significa un grupo hidrocarbonado saturado o insaturado, lineal o ramificado. Esta expresión se usa para abarcar grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, por ejemplo.

Grupo alquilo: la expresión "grupo alquilo" significa un grupo hidrocarbonado saturado, lineal o ramificado, por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, t-butilo, heptilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo y similares.

Grupo alquenilo: la expresión "grupo alquenilo" significa un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado con uno o más dobles enlaces carbono-carbono, tal como un grupo vinilo.

35 Grupo alquinilo: la expresión "grupo alquinilo" significa un grupo hidrocarbonado insaturado, lineal o ramificado con uno o más triples enlaces carbono-carbono.

Anfifílico: sustancia que contiene grupos tanto polares, solubles en agua, como no polares insolubles en agua.

Agonista: Un agonista es un compuesto capaz de aumentar o afectar a la actividad de un receptor. Específicamente, un agonista del receptor con dominio Vps10p es un compuesto capaz de unirse a uno o más sitios de unión de un receptor con dominio Vps10p, induciendo de esta forma la misma respuesta fisiológica que un compuesto ligando agonista endógeno dado.

45 Antagonista: Un antagonista en este caso es sinónimo de un inhibidor. Un antagonista es un compuesto capaz de disminuir la actividad de un efector tal como un receptor. Específicamente, un antagonista de receptor con dominio Vps10p es un compuesto capaz de unirse a uno o más sitios de unión del receptor con dominio Vps10p, inhibiendo de esta forma la unión de otro ligando, inhibiendo así una respuesta fisiológica.

ARN de sentido contrario: una molécula de ARN capaz de producir el silenciamiento de un gen mediante la unión específica a una molécula de ARNm de interés.

ADN de sentido contrario: una molécula de ADN capaz de producir el silenciamiento de un gen mediante la unión específica a una molécula de ARNm de interés.

50 Apoptosis: La apoptosis es un proceso de suicidio por una célula en un organismo multicelular. Es una de los tipos principales de muerte celular programada (PCD), e implica una serie orquestada de sucesos bioquímicos que conducen a una morfología celular característica y muerte.

Inhibidor de apoptosis: Cualquier compuesto capaz de disminuir el proceso de apoptosis.

Grupo aromático: la expresión “grupo aromático” o “grupo arilo” significa un grupo hidrocarbonado aromático mono o policíclico.

5 Unión: El término “unión” o “asociado con” se refiere a un estado de proximidad entre entidades químicas o compuestos, o partes de los mismos. La asociación puede ser no covalente, en donde la yuxtaposición es favorecida energéticamente por enlaces de hidrógeno o interacciones de van der Waals o electrostáticas, o puede ser covalente.

10 Sitio de unión: La expresión “sitio de unión” o “bolsillo de unión”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una región de una molécula o complejo molecular que, como resultado de su forma, se asocia favorablemente con otra molécula, complejo molecular, entidad química o compuesto. Como se usa en la presente memoria, el bolsillo comprende al menos una cavidad profunda y opcionalmente una cavidad poco profunda.

15 Sitio de unión 1 de la sortilina: Un sitio de unión de alta afinidad de la neurotensina o, de forma sinónima, el sitio de unión 1 es un sitio de unión de la sortilina (SEQ ID NO: 1) que tiene alta afinidad por la neurotensina o un fragmento o variante de neurotensina, y que tiene afinidad por el propéptido de sortilina o un fragmento del mismo (restos de aminoácidos 34-37 de la SEQ ID NO. 1) dicho sitio de unión comprende los restos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de la SEQ ID NO. 1. Más preferiblemente, el sitio de unión 1 comprende los aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de la SEQ ID NO. 1. Lo más preferiblemente, el sitio de unión 1 de la sortilina comprende los aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314 y F350 a M363 de la SEQ ID NO. 1.

20 El sitio de unión 1 es un sitio de unión promiscuo.

25 Sitio de unión 2 de la sortilina: Un sitio de unión de la sortilina que tiene baja afinidad por la neurotensina o un fragmento o variante de neurotensina, comprendiendo dicho sitio de unión los restos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y S584 a F588 de la SEQ ID NO. 1. Más preferiblemente, el sitio de unión de la sortilina de baja afinidad de la neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de la SEQ ID NO. 1. Lo más preferiblemente, el sitio de unión de la sortilina de baja afinidad de la neurotensina comprende los aminoácidos L572, L114 y V112. El sitio de unión 2 es promiscuo y se puede unir al propéptido de sortilina (restos de aminoácidos 34-77 de la SEQ ID NO. 1).

30 Sitio de unión 3 de la sortilina: Un sitio de unión promiscuo de la sortilina que comprende los restos de aminoácidos D403, S420, D422, N423, S424, I425, Q426, E444, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de la SEQ ID NO. 1, más preferiblemente que comprende los restos de aminoácidos D403, N423, S424, I425, T451, Y466, I498 y V500 de la SEQ ID NO. 1, lo más preferiblemente que comprende los restos de aminoácidos T451, Y466, I498 y V500 de la SEQ ID NO. 1.

35 Agente biorreactivo: La expresión “agente biorreactivo” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que se puede usar en relación con una aplicación que es terapéutica o de diagnóstico, tal como, por ejemplo, en métodos para el diagnóstico de la presencia o ausencia de una enfermedad en un paciente, y/o métodos para el tratamiento de una enfermedad en un paciente. El “agente biorreactivo” se refiere a sustancias que son capaces de ejercer un efecto biológico in vitro y/o in vivo. Los agentes bioactivos pueden ser neutros, con carga positiva o negativa. Los agentes bioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, profármacos, agentes de diagnóstico, agentes terapéuticos, agentes farmacéuticos, fármacos, agentes de suministro de oxígeno, sustitutos de sangre, moléculas orgánicas sintéticas, polipéptidos, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides y determinantes genéticos, incluyendo nucleósidos, nucleótidos y polinucleótidos.

45 Isquemia cerebral: La isquemia cerebral global es una afección isquémica donde el cerebro no recibe suficiente flujo sanguíneo para mantener la función neurológica normal.

Coma: Un periodo prolongado de inconciencia después de lesión cerebral o trastornos metabólicos. La persona en coma puede tener un reflejo simple en respuesta al tacto o dolor, pero esencialmente no hay respuesta significativa a estímulos externos.

50 Grupo catiónico: Un grupo químico capaz de funcionar como un donador de protones cuando un compuesto que comprende el grupo químico se disuelve en un disolvente, preferiblemente cuando se disuelve en agua.

Complejo: Como se usa en la presente memoria, el término “complejo” se refiere a la combinación de una molécula o una proteína, análogos conservativos o truncados de la misma, asociada con una entidad química.

55 Coordenadas: El término “coordenadas” como se usa en la presente memoria, se refiere a la información de la organización tridimensional de los átomos que contribuyen a una estructura de proteína. El mapa final que contiene las coordenadas atómicas de los constituyentes del cristal se puede almacenar en un soporte informático;

típicamente, los datos se almacenan en un formato de PDB o en un formato de mmCIF, los cuales son ambos conocidos para el experto en la técnica. Sin embargo, las coordenadas cristalinas también se pueden almacenar en tablas simples o formato de texto. El formato de PDB se organiza de acuerdo con las instrucciones y directrices dadas por el Research Collaboratory for Structural Biology.

- 5 Grupo cíclico: la expresión “grupo cíclico” significa un grupo hidrocarbonado de anillo cerrado que se clasifica como un grupo alicíclico, grupo aromático o grupo heterocíclico.

10 Cicloalqueno: significa un radical carbocíclico insaturado que consiste en 1, 2 o 3 anillos de 3 a 8 carbonos por anillo, que puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alqueno inferior, alcoxi inferior, halogenoalcoxi inferior, alquenoilitio, halógeno, halogenoalqueno, hidroxialqueno, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquenoilamino, alquenoilsulfonilo, arilsulfonilo, alquenoilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquenoilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquenoilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

15 Cicloalquilo: significa un radical carbocíclico saturado monovalente que consiste en 1, 2 o 3 anillos, de 3 a 8 carbonos por anillo, que puede estar opcionalmente sustituido con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, halogenoalcoxi inferior, alquilitio, halógeno, halogenoalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

20 Interacción dipolo-dipolo: La expresión “interacción dipolo-dipolo” como se usa en la presente memoria se refiere a la atracción que puede ocurrir entre dos o más moléculas polares. Por lo tanto, la “interacción dipolo-dipolo” se refiere a la atracción de un extremo positivo parcial, no cargado, de una primera molécula polar, con el extremo negativo parcial, no cargado, de una segunda molécula polar. La “interacción dipolo-dipolo” también se refiere al enlace de hidrógeno intermolecular.

25 Interacción electrostática: La expresión “interacción electrostática” como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier interacción que se produce entre componentes cargados, moléculas o iones, debido a fuerzas de atracción cuando componentes de carga eléctrica opuesta son atraídos entre sí. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: interacciones iónicas, interacciones covalentes, interacciones entre un ion y un dipolo (ion y molécula polar), interacciones entre dos dipolos (cargas parciales de moléculas polares), enlaces de hidrógeno y enlaces de dispersión de London (dipolos inducidos de moléculas polarizables). Así, por ejemplo, la “interacción iónica” o
30 “interacción electrostática se refiere a la atracción entre una primera molécula positivamente cargada y una segunda molécula negativamente cargada. Las interacciones iónicas o electrostáticas incluyen, por ejemplo, la atracción entre un agente bioactivo negativamente cargado.

35 Hipercolesterolemia familiar: La hipercolesterolemia familiar (abreviada HF) es un trastorno genético caracterizado por niveles altos de colesterol, específicamente niveles muy altos de lipoproteína de baja densidad (LDL, “colesterol malo”), en la sangre y enfermedades cardiovasculares tempranas. Muchos pacientes tienen mutaciones en el gen de LDLR que codifica la proteína receptora de LDL (véase la figura 3) que elimina el LDL de la circulación, o apolipoproteína B (ApoB), que es parte del LDL que se une al receptor de LDL. Las mutaciones en otros genes son raras. Los pacientes que tienen una copia anómala (son heterocigotos) del gen de LDLR pueden tener enfermedad cardiovascular prematura a la edad de 30 a 40 años. Tener dos copias anómalas (ser homocigoto) puede producir
40 enfermedad cardiovascular grave en la infancia. La HF heterocigota es un trastorno genético común, que aparece en 1:500 personas en la mayoría de los países; la HF homocigota es mucho más rara, apareciendo en 1 en un millón de nacimientos. El tratamiento de la HF heterocigota normalmente es con estatinas, secuestradores de ácidos biliares u otros fármacos que disminuyen los niveles de colesterol (agentes hipolipidémicos). A los nuevos casos se les ofrece normalmente asesoramiento genético. La HF homocigota a menudo no responde a la terapia médica y
45 puede requerir otros tratamientos, incluyendo la aféresis de LDL (eliminación del LDL en un método similar a la diálisis) y ocasionalmente el trasplante de hígado. La presente invención proporciona nuevos medios para preparar un medicamento para el tratamiento de la HF y proporciona un método de tratamiento de la HF. La invención proporciona antagonistas de receptores con dominio Vps10p, en particular antagonistas que se unen específicamente a sitios de unión de la sortilina y/o SorLA.

50 Forman un anillo: significa que los átomos mencionados se conectan mediante un enlace cuando se forma la estructura de anillo.

Fragmentos: Los fragmentos de polipéptidos según la presente invención, incluyendo cualesquiera equivalentes funcionales de los mismos, en una realización pueden comprender menos de 500 restos de aminoácidos, tal como menos de 450 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 400 restos de aminoácidos, tal como menos de 350
55 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 300 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 250 restos de aminoácidos, tal como menos de 240 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 225 restos de aminoácidos, tal como menos de 200 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 180 restos de aminoácidos, tal como menos de 160 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 150 restos de aminoácidos, tal como menos de 140 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 130 restos de aminoácidos, tal como menos de 120 restos de aminoácidos, por

- ejemplo menos de 110 restos de aminoácidos, tal como menos de 100 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 90 restos de aminoácidos, tal como menos de 85 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 80 restos de aminoácidos, tal como menos de 75 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 70 restos de aminoácidos, tal como menos de 65 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 60 restos de aminoácidos, tal como menos de 55
- 5 restos de aminoácidos, por ejemplo menos de 50 restos de aminoácidos. Los fragmentos de neurotensina incluyen, pero no se limitan a los aminoácidos C-terminales de la neurotensina PYIL e YIL. En un aspecto, el fragmento se selecciona del grupo que consiste en LYENKPRRPYIL, YENKPRRPYIL, ENKPRRPYIL, NKPRRPYIL, KPRRPYIL, PRRPYIL, RRPYIL, RPYIL, PYIL, YIL e IL, y variantes naturales o artificiales de los mismos. En una realización de la presente invención, el antagonista no es neurotensina o un fragmento de la misma.
- 10 Equivalencia funcional: "Equivalencia funcional" como se usa en la presente memoria, según una realización preferida, se establece por referencia con la correspondiente funcionalidad de un fragmento predeterminado de la secuencia.
- Los equivalentes funcionales o variantes de un antagonista del receptor con dominio Vps10p, se entiende que presentan secuencias de aminoácidos que difieren gradualmente del péptido o polipéptido predeterminado preferido,
- 15 basado en la secuencia del antagonista del dominio Vps10p, al aumentar el número y alcance de inserciones, eliminaciones y sustituciones incluyendo sustituciones conservativas. Esta diferencia se mide como una reducción en la homología entre la secuencia predeterminada preferida y el fragmento o equivalente funcional.
- Una variante funcional obtenida por sustitución puede presentar alguna forma o grado de actividad de antagonista del dominio Vps10p natural, y todavía ser menos homólogo, si se sustituyen los restos que contienen cadenas
- 20 laterales de aminoácidos funcionalmente similares. En este aspecto, funcionalmente similares se refiere a características dominantes de las cadenas laterales tales como hidrófobo, básico, neutro o ácido, o la presencia o ausencia de impedimento estérico. Por consiguiente, en una realización de la invención, el grado de identidad no es una medida principal de un fragmento que es una variante o equivalente funcional de un fragmento preferido predeterminado, según la invención.
- 25 "Silenciamiento" de genes: un procedimiento que conduce a la expresión reducida de genes endógenos. El silenciamiento de genes preferiblemente es el resultado de la reducción postranscripcional de la expresión de genes.
- Isquemia global: anoxia resultante de la detención del suministro de sangre a todo el cuerpo dando como resultado el daño tisular por una variedad de mecanismos incluyendo la apoptosis.
- Grupo: (resto/sustitución) como se entiende en este campo técnico, un grado alto de sustitución no solo es tolerado, sino que a menudo es aconsejable. En los materiales de la presente invención, está prevista la sustitución. Como
- 30 medio para simplificar la descripción y cita de determinada terminología usada a lo largo de esta solicitud, los términos "grupo" y "resto" se usan para diferenciar entre especies químicas que permiten la sustitución o que pueden estar sustituidas, y aquellas que no permiten o no pueden estar sustituidas. Por lo tanto, el término "grupo" se usa para describir un sustituyente químico, el material químico descrito incluye el grupo no sustituido y ese grupo con
- 35 átomos de O, N y S, por ejemplo, en la cadena así como grupos carbonilo, u otra sustitución convencional. Cuando se usa el término "resto" para describir un compuesto químico o sustituyentes, se pretende que esté incluido solo un material químico no sustituido. Por ejemplo, la frase "grupo alquilo" se pretende que incluya no solo sustituyentes alquilo hidrocarbonado saturado de cadena abierta puro, tales como metilo, etilo, propilo, t-butilo, y similares, sino también sustituyentes alquilo que llevan otros sustituyentes conocidos en la técnica, tales como hidroxilo, alcoxi,
- 40 alquilsulfonilo, átomos de halógeno, ciano, nitro, amino, carboxilo, etc. Por lo tanto, "grupo alquilo" incluyen grupos éter, halogenoalquilos, nitroalquilos, carboxialquilos, hidroxialquilos, sulfoalquilos, etc. Por otra parte, la frase "resto alquilo" está limitada a la inclusión de solo sustituyentes alquilo hidrocarbonado saturado de cadena abierta, puros, tales como metilo, etilo, propilo, t-butilo, y similares. La misma definición se aplica a "grupo alquenilo" y "resto alquenilo", a "grupo alquinilo" y "resto alquinilo", a "grupo cíclico" y "resto cíclico", a "grupo alicíclico" y "resto alicíclico", a "grupo aromático" o a "grupo arilo" y "resto aromático" o "resto arilo", así como a "grupo heterocíclico" y "resto heterocíclico".
- 45 Grupo heterocíclico: la expresión "grupo heterocíclico" significa un hidrocarburo de anillo cerrado, en el que uno o más átomos en el anillo son un elemento distinto de carbono (p. ej., nitrógeno, oxígeno, azufre, etc.).
- Heterociclilo significa un radical cíclico saturado monovalente, que consiste en uno a dos anillos, de 3 a 8 átomos por anillo, que incorpora 1 o 2 heteroátomos en el anillo (seleccionados de N, O o S(O)₀₋₂), y que puede estar
- 50 opcionalmente sustituido con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, oxo, ciano, alquilo inferior, alcoxi inferior, halogenoalcoxi inferior, alquiltio, halógeno, halogenoalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxycarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminofarbenilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino, o arilcarbonilamino.
- 55 Heteroarilo significa un radical cíclico aromático monovalente que tiene de 1 a 3 anillos, de 4 a 8 átomos por anillo, que incorpora 1 o 2 heteroátomos en el anillo (seleccionados de N, O o azufre) dentro del anillo que puede estar opcionalmente sustituido con 1 o 2 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, ciano, alquilo

inferior, alcoxi inferior, halogenoalcoxi inferior, alquiltio, halo, halogenoalquilo, hidroxialquilo, nitro, alcoxicarbonilo, amino, alquilamino, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, alquilaminosulfonilo, arilaminosulfonilo, alquilsulfonilamino, arilsulfonilamino, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alquilcarbonilamino y arilcarbonilamino.

5 Homología: como se usa en la presente memoria debe entenderse como sinónimo de la expresión identidad de secuencia. Por lo tanto, "homólogo con" es sinónimo de "idéntico a". La homología entre secuencias de aminoácidos se puede calcular usando matrices de puntuación bien conocidas, tales como una cualquiera de BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, y BLOSUM 90.

10 Se describen en la presente invención fragmentos que comparten homología con fragmentos de las SEQ ID NO: 1 a 13, respectivamente. Tienen una homología de al menos aproximadamente 60 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 65 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 70 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 75 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 80 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 85 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 90 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 92
15 por ciento, tal como homología de al menos aproximadamente 94 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 95 por ciento, tal como homología de al menos aproximadamente 96 por ciento, tal como homología de al menos aproximadamente 97 por ciento, tal como homología de al menos aproximadamente 98 por ciento, por ejemplo homología de al menos aproximadamente 99 por ciento, con dichas secuencias de fragmentos predeterminadas, respectivamente. Los porcentajes de homología se refieren a porcentajes de identidad.

20 Otro método que se puede adaptar de forma adecuada para determinar las relaciones de estructura y función de fragmentos de péptidos se describe en el documento US 6.013.478. Los expertos en la técnica también conocen método de ensayo de la unión de una secuencia de aminoácidos a un resto de receptor.

Además de sustituciones conservativas introducidas en cualquier posición de un péptido o polipéptido predeterminado preferido basado en antagonista del dominio Vps10p, o un fragmento del mismo, también puede ser
25 deseable introducir sustituciones no conservativas en una cualquiera o más posiciones de dicho antagonista.

Una sustitución no conservativa que conduce a la formación de un fragmento funcionalmente equivalente de un péptido o polipéptido basado en el antagonista del dominio Vps10p, por ejemplo, i) diferiría sustancialmente en polaridad, por ejemplo un resto con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn o Gln, o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg o Lys, sustituido por un resto con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met), o se sustituye un resto no polar por uno cargado o polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en su efecto en la orientación de la cadena principal del polipéptido, tal como la sustitución de o por Pro o Gly por otro resto; y/o iii) diferiría sustancialmente en la carga eléctrica, por ejemplo la sustitución de un resto positivamente cargado tal como Lys, His o Arg por un resto negativamente cargado tal como Glu o Asp (y viceversa);
30 y/o iv) diferiría sustancialmente en el impedimento estérico, por ejemplo la sustitución por un resto voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr, de uno que tiene una cadena lateral menor, p. ej. Ala, Gly o Ser (y viceversa).

Las variantes obtenidas por sustitución de aminoácidos, en una realización preferida, se pueden hacer basándose en los valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de aminoácidos, incluyendo carga, tamaño y similares. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo que tienen en cuenta varias de las características anteriores son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen: arginina
40 y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

Además de las variantes descritas en la presente memoria, se pueden formular variantes estéricamente similares para imitar partes clave de la estructura variante, y dichos compuestos también se pueden usar de la misma forma que las variantes de la invención. Esto se puede lograr por técnicas de modelado y diseño químico conocidas por los expertos en la técnica.

45 En una realización adicional de la presente invención, se refiere a variantes funcionales que comprenden aminoácidos sustituidos que tienen valores hidrófilos o índices hidropáticos que están dentro de $\pm 4,9$, por ejemplo dentro de $\pm 4,7$, tal como dentro de $\pm 4,5$, por ejemplo dentro de $\pm 4,3$, tal como dentro de $\pm 4,1$, por ejemplo dentro de $\pm 3,9$, tal como dentro de $\pm 3,7$, por ejemplo dentro de $\pm 3,5$, tal como dentro de $\pm 3,3$, por ejemplo dentro de $\pm 3,1$, tal como dentro de $\pm 2,9$, por ejemplo dentro de $\pm 2,7$, tal como dentro de $\pm 2,5$, por ejemplo dentro de $\pm 2,3$, tal como dentro de $\pm 2,1$, por ejemplo dentro de $\pm 2,0$, tal como dentro de $\pm 1,8$, por ejemplo
50 with-in $\pm 1,6$, tal como dentro de $\pm 1,5$, por ejemplo dentro de $\pm 1,4$, tal como dentro de $\pm 1,3$ por ejemplo dentro de $\pm 1,2$, tal como dentro de $\pm 1,1$, por ejemplo dentro de $\pm 1,0$, tal como dentro de $\pm 0,9$, por ejemplo dentro de $\pm 0,8$, tal como dentro de $\pm 0,7$, por ejemplo dentro de $\pm 0,6$, tal como dentro de $\pm 0,5$, por ejemplo dentro de $\pm 0,4$, tal como dentro de $\pm 0,3$, por ejemplo dentro de $\pm 0,25$, tal como dentro de $\pm 0,2$ el valor del aminoácido que se ha sustituido.
55

La importancia de los índices hidrófilo e hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína, se entiende bien en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982 y Hopp, patente de EE.UU. nº 4.554.101).

Los valores del índice hidropático de aminoácidos como se usan en la presente memoria son: isoleucina (+4,5);

valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5) (Kyte y Doolittle, 1982).

- 5 Los valores de hidrofiliidad de aminoácidos son: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0.+0,1); glutamato (+3,0.+0,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5.+0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4) (documento U.S. 4.554.101).

- 10 Además de los compuestos de peptidilo descritos en la presente memoria, se pueden formular compuestos estéricamente similares para imitar partes clave de la estructura peptídica y dichos compuestos también se pueden usar de la misma forma que los péptidos descritos en la invención. Esto se puede lograr mediante técnicas de modelado y diseño químico conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar la esterificación y otras alquilaciones para modificar los extremos amino, por ejemplo, de una cadena principal de péptido diarginina, para imitar una estructura de tetrapéptido.

- 15 También se describen en la presente invención péptidos con alquilaciones N-terminales y esterificaciones C-terminales. Los equivalentes funcionales también comprenden glicosilados y conjugados covalentes o agregativos formados con el mismo u otros antagonistas del dominio Vps10p, incluyendo dímeros o restos químicos no relacionados. Dichos equivalentes funcionales se preparan por unión de grupos funcionales a grupos que se encuentran en el fragmento, incluyendo en cualquiera o ambos de los extremos N y C, por medios conocidos en la técnica.

- 20 Por lo tanto, los equivalentes funcionales pueden comprender fragmentos conjugados a ésteres alifáticos o de acilo o amidas del extremo carboxilo, alquilaminas o restos que contienen cadenas laterales carboxilo, p. ej., conjugados con alquilaminas en los restos de ácido aspártico; derivados de O-acilo de restos que contienen grupo hidroxilo y derivados de N-acilo del amino del aminoácido terminal o de restos que contienen grupo amino, p. ej., conjugados con fMet-Leu-Phe o proteínas inmunógenas. Los derivados de los grupos acilo se seleccionan del grupo de restos alquilo (incluyendo alquilo normal de C3 a C10), formando así especies de alcanilo, y compuestos carbocíclicos o heterocíclicos, formando así especies aroilo. Los grupos reactivos preferiblemente son compuestos difuncionales conocidos para usar en el entrecruzamiento de proteínas en matrices insolubles por los grupos laterales reactivos.

- 25 Los equivalentes funcionales covalentes o agregativos y derivados de los mismos, son útiles como reactivos en inmunoensayos o para procedimientos de purificación por afinidad. Por ejemplo, un fragmento de un péptido antagonista del dominio Vps10p encontrado por la presente invención, se puede insolubilizar por unión covalente a Sepharose activada con bromuro de cianógeno, por métodos conocidos, o se puede adsorber a superficies poliolefinicas, con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído, para usar en un ensayo o purificación de anticuerpos anti-dominio Vps10p o receptores de superficie celular. También se pueden marcar fragmentos con un grupo detectable, p. ej., radioyodado por el procedimiento de cloramina T, unido covalentemente a quelatos de tierras raras, o conjugado con otro resto fluorescente para usar, p. ej., en ensayos de diagnóstico.

- 30 La mutagénesis de un fragmento predeterminado preferido de un péptido basado en antagonista del dominio Vps10p se puede llevar a cabo haciendo inserciones de aminoácidos, normalmente del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 1 a 5 restos de aminoácidos, o eliminaciones de aproximadamente 1 a 10 restos, tal como de aproximadamente 2 a 5 restos.

- 40 En una realización, el ligando del sitio de unión 1, 2 o 3, es un oligopéptido sintetizado por síntesis automática. Se puede usar cualquiera de las técnicas en fase sólida disponibles en el comercio, tal como el método de síntesis en fase sólida de Merrifield, en el que se añaden secuencialmente restos de aminoácidos a una cadena de aminoácidos en crecimiento (véase, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2146, 1963).

- 45 El equipo para la síntesis automática de polipéptidos está disponible en el comercio de proveedores tales como Applied Biosystems, Inc. de Foster City, Calif., y en general se pueden manejar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis en fase sólida permitirá la incorporación de sustituciones de aminoácidos deseables en cualquier fragmento de un péptido basado en antagonista del dominio Vps10p encontrado por la presente invención. Se entenderá que las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier subcombinación de los mismos, se pueden combinar para llegar a una secuencia final de un equivalente funcional. Debe entenderse que las inserciones incluyen fusiones de amino-terminales y/o carboxilo-terminales, p. ej., con una proteína hidrófoba o inmunógena, o un vehículo tal como cualquier polipéptido o estructura de armazón capaz de servir como un vehículo.

- 50 Se describen oligómeros incluyendo dímeros, que incluyen homodímeros y heterodímeros, de fragmentos de inhibidores de sortilina encontrados por la invención. Los equivalentes funcionales y variantes del péptido o polipéptido antagonista del dominio Vps10p se pueden producir como homodímeros o heterodímeros con otras secuencias de aminoácidos, o con secuencias de inhibidor de sortilina naturales. Los heterodímeros incluyen dímeros que contienen fragmentos de inhibición de sortilina inmunorreactivos, así como fragmentos de inhibición de sortilina que no es necesario que tengan o ejerzan ninguna actividad biológica.

Los antagonistas del receptor con dominio Vps10p que incluyen fragmentos de péptido inhibidor de sortilina se

pueden sintetizar tanto in vitro como in vivo. Los métodos para la síntesis in vitro son bien conocidos, y también se describen en la técnica anterior métodos que son adecuados o que se pueden adaptar de forma adecuada a la síntesis in vivo de inhibidores de sortilina. Cuando se sintetizan in vivo, una célula hospedante se transforma con vectores que contienen ADN que codifica un péptido inhibidor de sortilina o un fragmento del mismo. Un vector se define como una construcción de ácido nucleico que se puede replicar. Los vectores se usan para mediar la expresión de un péptido basado en antagonista del dominio Vps10p. Un vector de expresión es una construcción de ADN que se puede replicar, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica el fragmento inhibidor de sortilina predeterminado, o cualquier equivalente funcional del mismo que se pueda expresar in vivo, está operativamente unida a secuencias de control adecuadas capaces de llevar a cabo la expresión del fragmento o equivalente en un hospedante adecuado. Dichas secuencias de control son bien conocidas en la técnica. Se pueden usar tanto células procariontes como eucariotas para la síntesis de ligandos. Sin embargo, los cultivos de células derivadas de organismos multicelulares representan células hospedantes preferidas. En principio, se puede trabajar con cualquier cultivo de células eucariotas superiores, sea de un cultivo de vertebrado o invertebrado. Los ejemplos de líneas celulares de hospedante útiles son células VERO y HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y líneas celulares WI38, BHK, COS-7, 293 y MDCK. Las células hospedantes preferidas son células eucariotas que se sabe que sintetizan inhibidores de sortilina endógenos. Los cultivos de dichas células hospedantes se pueden aislar y usar como una fuente del fragmento, o usar en métodos de tratamiento terapéuticos, incluyendo métodos terapéuticos dirigidos a promover o inhibir un estado de crecimiento, o métodos de diagnóstico llevados a cabo en el cuerpo humano o animal.

Enlace hidrófobo: La expresión "enlace hidrófobo" como se usa en la presente memoria se refiere a una fuerza de atracción, o puente, que puede haber entre un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un átomo electronegativo, por ejemplo, oxígeno, azufre o nitrógeno, y otro átomo electronegativo. El enlace de hidrógeno puede ser entre un átomo de hidrógeno en una primera molécula y un átomo electronegativo en una segunda molécula (enlace de hidrógeno intermolecular). El enlace de hidrógeno también puede estar entre un átomo de hidrógeno y un átomo electronegativo que están ambos contenidos en una sola molécula (enlace de hidrógeno intramolecular).

Interacción hidrófoba: La expresión "interacción hidrófoba" como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier interacción que ocurre entre componentes esencialmente no polares (hidrófobos) dentro de un intervalo de atracción de una con otra en un entorno polar (p. ej., agua). Como se usa en la presente memoria, el intervalo de atracción es en la escala desde 0,1 hasta 2 nm. Un tipo particular de interacción hidrófoba es la ejercida por las "fuerzas de Van der Waals", es decir, las fuerzas atractivas entre moléculas no polares explicadas por mecánica cuántica. Las fuerzas de Van der Waals en general están asociadas con momentos dipolares momentáneos que son inducidos por moléculas vecinas y que implican cambios en la distribución de electrones.

Hiperlipidemia: que también se conoce como hiperlipoproteínemia o dislipidemia, es la presencia de niveles elevados o anómalos de lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. Los lípidos (moléculas grasas) son transportados en una cápsula de proteína, y la densidad de los lípidos y el tipo de proteína, determinan el destino de la partícula y su influencia en el metabolismo. Las anomalías en lípidos y lipoproteínas son extremadamente comunes en la población general, y se consideran como un factor de riesgo altamente modificable para la enfermedad cardiovascular, debido a la influencia del colesterol, una de las sustancias lipídicas clínicamente más relevantes, en la aterosclerosis. Además, algunas formas pueden predisponer a la pancreatitis aguda. La hiperlipoproteínemia se puede clasificar en los siguientes subtipos:

Hiperlipidemia como se usa en la presente memoria, debe entenderse como una afección caracterizada por concentraciones en el plasma sanguíneo de HDL-colesterol y/o LDL-colesterol y/o triglicéridos mayores que los valores recomendados citados en la tabla 1 en la presente memoria.

Hiperlipoproteínemia de tipo I

Esta forma muy rara (conocida también como síndrome de Buerger-Gruetz, hiperlipoproteínemia primaria, o hiperquilomicronemia familiar) se debe a una deficiencia de la lipoproteína lipasa (LPL) o apolipoproteína C2 alterada, produciendo quilomicrones elevados, las partículas que transfieren los ácidos grasos del tracto digestivo al hígado. La lipoproteína lipasa también es responsable de la rotura inicial de los triacilglicéridos hechos de forma endógena en la forma de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL). Como tal, se esperaría que un defecto en la LPL diera como resultado también VLDL elevada. Su prevalencia es de 0,1% de la población.

Hiperlipoproteínemia de tipo II

La hiperlipoproteínemia de tipo II, es con mucho la más común, se clasifica además en tipo IIa y tipo IIb, dependiendo principalmente en si hay elevación en el nivel de triglicéridos además del LDL-colesterol.

Hiperlipoproteínemia de tipo IIa

Hipercolesterolemia familiar - Esta puede ser esporádica (debido a factores de la dieta), poligénica, o realmente familiar como resultado de una mutación en el gen del receptor de LDL en el cromosoma 19 (0,2% de la población) o el gen de la ApoB (0,2%). La forma familiar se caracteriza por xantoma tendinoso, xantelasma y enfermedad

cardiovascular prematura.

Hiperlipoproteinemia de tipo IIb

5 Los niveles altos de VLDL se deben al exceso de producción de sustratos, incluyendo triglicéridos, acetil CoA, y un aumento de la síntesis de B-100. También puede estar causada por la disminución de la eliminación de la LDL. La prevalencia en la población es 10%.

Hiperlipoproteinemia familiar combinada (HFC)

10 Hiperlipoproteinemia combinada secundaria (normalmente en el contexto de síndrome metabólico, para el que hay un criterio de diagnóstico). Aunque la modificación de la dieta es el procedimiento inicial para el tratamiento de los tipos de hiperlipoproteinemia mencionados, muchos pacientes requieren el tratamiento con estatinas (inhibidores de la HMG-CoA reductasa) para reducir el riesgo cardiovascular. Si el nivel de triglicéridos es notablemente elevado, pueden ser preferibles los fibratos debidos a sus efectos beneficiosos. El tratamiento de combinación de estatinas con fibratos, aunque es muy eficaz, produce un riesgo notablemente mayor de miopatía y rhabdomiolisis, y por lo tanto solo se hace bajo una estrecha supervisión. Otros agentes añadidos normalmente a las estatinas son ezetimiba, niacina y secuestrantes de ácidos biliares. Hay algunas pruebas del beneficio de los productos que
15 contienen esteroides vegetales y ácidos grasos ω 3. La presente invención proporciona una nueva estrategia para controlar los niveles de lípidos de los pacientes que lo necesiten.

Hiperlipoproteinemia de tipo III

20 Esta forma se debe a quilomicrones e IDL (lipoproteína de densidad intermedia) elevados. También conocida como enfermedad de la beta ancha o disbetalipoproteinemia, la causa más común de esta forma es la presencia del genotipo ApoE E2/E2. Se debe a las VLDL ricas en colesterol (β -VLDL). La prevalencia es 0,02% de la población.

Hiperlipoproteinemia de tipo IV

Esta forma se debe a triglicéridos elevados. Se conoce como hipertrigliceridemia (o hipertrigliceridemia pura). De acuerdo con la definición de NCEP-ATPIII de triglicéridos elevados (>200 mg/dl), la prevalencia es aproximadamente 16% de la población adulta.

25 Hiperlipoproteinemia de tipo V

Este tipo es muy similar a la hiperlipoproteinemia de tipo I, pero con VLDL elevada además de quilomicrones. También está asociada con intolerancia a la glucosa e hiperuricemia. Además, las formas no clasificadas y raras incluyen lipoproteinemia hipo-alfa.

30 Los antagonistas encontrados por la presente invención se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hiperlipoproteinemia I, IIa, IIb, III, IV y V.

Inhibición: El término inhibición como se usa en la presente memoria, se refiere a la prevención de la unión entre dos o más componentes. Los ligandos identificados por la presente invención son capaces de inhibir la unión entre un receptor con dominio Vps10p y una proneutrotrófina.

35 Unión inhibidora: La expresión unión inhibidora entre p. ej., una proneutrotrófina y una sortilina, como se usa en la presente memoria se refiere a un método para proporcionar un ligando identificado por la presente invención, siendo dicho ligando capaz de prevenir la unión de una proneutrotrófina al sitio de unión 3 de la sortilina, previniendo así la formación de un complejo ternario entre sortilina, proNGF y p75^{NTR} o cualquier fragmento o variante del mismo. La expresión unión inhibidora puede referirse también a la unión inhibidora de la neurotensina y/o péptido de sortilina al sitio de unión 1 o 2 del receptor con dominio Vps10p sortilina.

40 In vitro/in vivo: los términos se usan con su significado normal.

In silico: un método de llevar a cabo una operación in vitro o in vivo por simulación con ordenador.

Isquemia: Restricción del suministro de sangre con disfunción o daño tisular resultante.

Daño tisular isquémico: Daño tisular debido a isquemia.

45 Ligando: una sustancia o compuesto que es capaz de unirse y formar un complejo con una biomolécula para servir para un fin biológico. En un sentido más estrecho, es una molécula que produce una señal al unirse a un sitio en una proteína diana, por fuerzas intermoleculares tales como enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. El acoplamiento (asociación) normalmente es reversible (disociación). La unión covalente irreversible real entre un ligando y su molécula diana es rara en los sistemas biológicos. A diferencia del significado en química metalorgánica e inorgánica, es irrelevante si el ligando se une realmente o no a un sitio de metal, como es el caso en
50 la hemoglobina. La unión de ligando a receptores puede alterar la conformación química, es decir, la forma tridimensional de la proteína receptora. El estado conformacional de una proteína receptora determina el estado

funcional de un receptor. La tendencia o fuerza de la unión se llama afinidad. Los ligandos incluyen sustratos, inhibidores, activadores y neurotransmisores. Los radioligandos son compuestos marcados con radioisótopos y se usan in vivo como trazadores en estudios de PET y en estudios de unión in vitro.

Restos de un compuesto particular cubre grupo(s) o parte(s) de dicho compuesto particular.

- 5 Agente farmacéutico: Las expresiones “agente farmacéutico” o “fármaco” o “medicamento”, se refieren a cualquier agente terapéutico o profiláctico que se puede usar en el tratamiento (incluyendo prevención, diagnóstico, alivio o cura) de una dolencia, indisposición, afección, enfermedad o lesión en un paciente. Se pueden incluir determinantes genéticos, péptidos, polipéptidos y polinucleótidos terapéuticamente útiles, en el significado de la expresión agente farmacéutico o fármaco. Como se define en la presente memoria, un “agente terapéutico”, “agente farmacéutico” o “fármaco” o “medicamento” es un tipo de agente bioactivo.

- 10 Composición farmacéutica: o fármaco, medicamento o agente, se refieren a cualquier material, compuesto o composición químicos o biológicos capaces de inducir un agente terapéutico deseado cuando se administran de forma adecuada a un paciente. Algunos de los fármacos se venden en forma inactiva que se convierte in vivo en un metabolito con actividad farmacéutica. Para los propósitos de la presente invención, las expresiones “composición farmacéutica” y “medicamento” abarcan tanto el fármaco inactivo como el metabolito activo.

- 15 Polipéptido: El término “polipéptido” como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende al menos dos aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. Los “oligopéptidos” se definen en la presente memoria como polipéptidos de longitud no mayor de 100 aminoácidos. El término “polipéptido” se pretende que incluya también proteínas, es decir, biomoléculas funcionales que comprenden al menos un polipéptido; cuando comprenden al menos dos polipéptidos, estos pueden formar complejos, estar unidos covalentemente o pueden estar unidos de forma no covalente. Los polipéptidos en una proteína pueden estar glicosilados y/o comprender lípidos y/o comprender grupos prostéticos.

- 20 Polinucleótido: “Polinucleótido” como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende al menos dos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden ser naturales o modificados, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Polinucleótido como se usa en la presente memoria en general se refiere a

- i) un polinucleótido que comprende una secuencia codificante determinada, o
- ii) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos predeterminada, o
- iii) un polinucleótido que codifica un fragmento de un polipéptido codificado por los polinucleótidos (i) o (ii), en donde dicho fragmento tiene al menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y
- 30 iv) un polinucleótido cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en uno cualquiera de (i), (ii) y (iii), y codifica un polipéptido, o un fragmento del mismo, que tiene a menos una actividad predeterminada como se especifica en la presente memoria; y
- v) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es degenerada con respecto a la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos (iii) o (iv);
- 35 o la cadena complementaria de dicho polinucleótido.

- Anticuerpo purificado: La expresión un “anticuerpo purificado” es un anticuerpo 60% al menos del cual carece de polipéptidos y moléculas orgánicas que se encuentran de forma natural, con los que está naturalmente asociado. Preferiblemente, la preparación comprende el anticuerpo en una cantidad de al menos 75 por ciento en peso, más preferiblemente al menos 90% en peso, y lo más preferiblemente al menos 99 por ciento en peso. Preferiblemente el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de conejo anti-sortilina.

- Desviación media cuadrática: La expresión “desviación media cuadrática” (rmsd) se usa como medio de comparación de dos estructuras estrechamente relacionadas, y se refiere a una desviación en la distancia entre átomos relacionados de las dos estructuras después de minimizar estructuralmente esta distancia en un alineamiento. Proteínas relacionadas con estructuras estrechamente relacionadas se caracterizarán por valores de RMSD relativamente bajos, mientras que mayores diferencias darán como resultado un aumento del valor de la RMSD.

- Identidad de secuencia: La identidad de secuencia se determina en una realización usando fragmentos de un péptido o polipéptido basado en antagonista del dominio Vps10p, que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, tal como 85%, por ejemplo 90%, tal como 95%, por ejemplo 99% idéntica con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 respectivamente, en donde el porcentaje de identidad se determina con el algoritmo GAP, BESTFIT, o FASTA en el

Wisconsin Genetics Package Release 7.0, usando los pesos de los huecos por defecto.

Las siguientes expresiones se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

- 5 Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más larga, por ejemplo, como un segmento de un ADN o secuencia de gen de longitud completa dado en una lista de secuencias, tal como una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1, o puede comprender un ADN o secuencia de gen completo. En general, una secuencia predeterminada es de al menos 20 nucleótidos de longitud, con frecuencia al menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud.

- 10 Puesto que dos polinucleótidos puede cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos típicamente se llevan a cabo comparando secuencias de los polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en la presente memoria, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en donde una secuencia de polinucleótido se puede comparar con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos, y en donde la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos comparado con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

- 20 El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443, por la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que produce el mayor porcentaje de homología a lo largo de la ventana de comparación) generado por diferentes métodos.

- 30 La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, basándose en nucleótido a nucleótido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que hay base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para dar para dar el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial" como se usa en la presente memoria, indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos 85 por ciento, preferiblemente identidad de secuencia de al menos 90 a 95 por ciento, más habitualmente identidad de secuencia de al menos 99 por ciento, comparada con una secuencia predeterminada a lo largo de una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótidos, con frecuencia a lo largo de una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en donde el porcentaje de la identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia predeterminada con la secuencia de polinucleótido que puede incluir eliminaciones o adiciones en un total de 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia más larga, por ejemplo, como un segmento de la secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 1 de longitud entera ilustrada en la presente memoria.

- 40 Aplicado a los polipéptidos, un grado de identidad de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos. Un grado de homología o similitud de secuencias de aminoácidos es una función del número de aminoácidos, es decir, estructuralmente relacionados, en posiciones compartidas por las secuencias de aminoácidos.

- 50 Una secuencia "no relacionada" o "no homóloga" comparte una identidad menor de 40%, pero preferiblemente una identidad menor de 25%, con un péptido o polipéptido basado en el antagonista del dominio Vps10p de la presente invención. La expresión "identidad sustancial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas de forma óptima, tal como por los programas GAP o BESTFIT que usan los pesos de huecos por defecto, comparten una identidad de secuencia de al menos 80 por ciento, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90 por ciento, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 95 por ciento o más (p. ej., una identidad de secuencia de 99 por ciento). Preferiblemente, las posiciones de los restos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de restos que tiene en cadenas

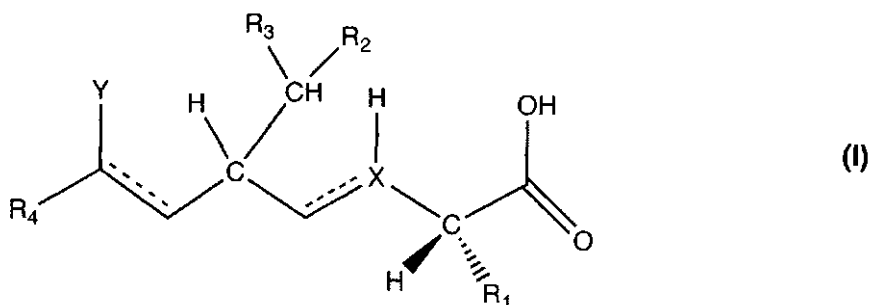
- laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene en cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que tienen hidroxilo alifático es serina y treonina, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.
- Adicionalmente, las variantes también se determinan basándose en un número predeterminado de sustituciones de aminoácidos conservativas como se define en la presente memoria más adelante. La sustitución de aminoácido conservativa como se usa en la presente memoria, se refiere a la sustitución de un aminoácido (dentro de un grupo predeterminado de aminoácidos) por otro aminoácido (dentro del mismo grupo) en donde los aminoácidos presentan características similares o sustancialmente similares.
- Dentro del significado de la expresión “sustitución de aminoácido conservativa” como se aplica en la presente memoria, un aminoácido se puede sustituir por otro dentro de los grupos de aminoácidos indicados en la presente memoria a continuación:
- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys),
 - ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)
 - iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
 - iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
 - v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
 - vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
 - vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
 - viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida (Asn, Gln)
 - ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales con hidroxilo (Ser, Thr)
 - x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),
 - xi) Aminoácidos neutros, débilmente hidrófobos (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
 - xii) Aminoácidos ácidos, hidrófilos (Gln, Asn, Glu, Asp), y
 - xiii) Aminoácidos hidrófobos (Leu, Ile, Val)
- Por consiguiente, una variante o uno de sus fragmentos puede comprender, dentro de la misma variante de la secuencia o sus fragmentos, o entre diferentes variantes de la secuencia o sus fragmentos, al menos una sustitución tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre sí.
- Está claro a partir del esquema anterior, que la misma variante o su fragmento puede comprender más de una sustitución de aminoácido conservativa de más de un grupo de aminoácidos conservativos como se ha definido antes en la presente memoria.
- La adición o eliminación de al menos un aminoácido puede ser una adición o eliminación preferiblemente de 2 a 250 aminoácidos, tal como de 10 a 20 aminoácidos, por ejemplo de 20 a 30 aminoácidos, tal como de 40 a 50 aminoácidos. Sin embargo, adiciones o eliminaciones de más de 50 aminoácidos, tal como adiciones de 50 a 100 aminoácidos, adición de 100 a 150 aminoácidos, adición de 150-250 aminoácidos, también están comprendidas dentro de la presente invención. La eliminación y/o adición puede ser, independientemente entre sí, una eliminación y/o una adición dentro de una secuencia y/o en el extremo de una secuencia.
- ARNip: “ARN interferente pequeño” (ARNip) es una molécula de ARN bicatenaria, corta (a menudo, pero no restringido, de menos de 30 nucleótidos de longitud) capaz de producir el silenciamiento específico de genes en células de mamífero.
- Alquilo inferior sustituido significa un alquilo inferior que tiene de 1 a 3 sustituyentes, seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, alcoxi, amino, amido, carboxilo, acilo, halógeno, ciano, nitro y tiol.
- Tratamiento: El término “tratamiento” como se usa en la presente memoria, se refiere a un método que implica terapia, incluyendo cirugía, de una afección clínica en un individuo, incluyendo un cuerpo humano o animal. La terapia puede ser de mejora, curativa o profiláctica, es decir, que reduce el riesgo de adquirir la enfermedad.

Variantes: El término "variantes" como se usa en la presente memoria, se refiere a variantes de secuencias de aminoácidos, teniendo preferiblemente dichas variantes de secuencias una identidad de al menos 60%, por ejemplo identidad de al menos 63%, tal como identidad de al menos 66%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 70%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 72%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 75%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 80%, tal como identidad de secuencia de al menos 85%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 90%, tal como identidad de secuencia de al menos 91%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 93%, tal como identidad de secuencia de al menos 94%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 95%, tal como identidad de secuencia de al menos 96%, por ejemplo identidad de secuencia de al menos 97%, tal como identidad de secuencia de al menos 98%, por ejemplo identidad de secuencia de 99% con cualquiera de las secuencias predeterminadas. Las variantes de neurotensina incluyen, pero no se limitan a variantes artificiales de la neurotensina tales como NT69L.

Regulación por aumento de la expresión: un proceso que conduce al aumento de expresión de genes, preferiblemente de genes endógenos.

Antagonista/inhibidor del receptor con dominio Vps10p

La presente invención describe además antagonistas que tienen la estructura general de fórmula (I):



en donde X es un átomo que actúa como donador de hidrógeno, seleccionado dicho átomo del grupo que consiste en N, O, S, P y en donde

Y es un átomo electronegativo que actúa como aceptor de enlace de hidrógeno seleccionado del grupo que consiste en O, N, S, F, Cl, Br, I, y en donde

R₁ es alquilo C3-6, ciclilo C4-6, una estructura heterocíclica o heteroaromática que tiene 1 anillo, de 4 a 6 miembros en el anillo en cada uno y de 1 a 3 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende de 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S(O)₀₋₂, y en donde

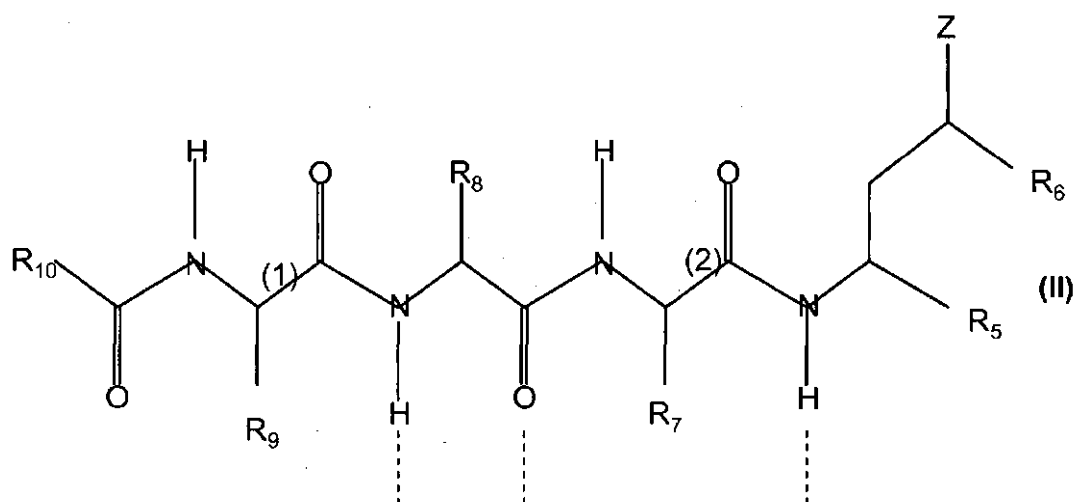
R₂ es hidrógeno, un alquilo C1-12 o una estructura aromática, carbocíclica, heterocíclica o heteroaromática que tiene 1-3 anillos, 3-8 miembros en el anillo en cada uno, y 0-4 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende de 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste N, O, S(O)₀₋₂, y en donde

R₃ es hidrógeno, SH, imidazol, alquilo C1-12 o una estructura aromática, carbocíclica, heterocíclica o heteroaromática que tiene 1-3 anillos, 3-8 miembros en el anillo en cada uno, y 0-4 heteroátomos, o un heteroalquilo que comprende de 1 a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S, y en donde

R₄ se selecciona de los grupos funcionales alquilo lineal o ramificado C1-100, alqueno lineal o ramificado, alquino lineal o ramificado, fenilo, bencilo, halogenoalcano, cloroalcano, bromoalcano, yodoalcano, halogenoformilo, hidroxilo, carbonilo, aldehído, éster de carbonato, carboxilato, carboxilo, éter, éster, hidropoxi, peroxi, carboxamida, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amonio, cetimina primaria, cetimina secundaria, aldimina primaria, aldimina secundaria, imida, azida, azo (diimida), cianato, isocianuro, isotiocianato, nitrato, nitrilo, nitrosooxi, nitro, nitroso, piridilo, fosfino, fosfato, fosfono, sulfonilo, sulfinilo, sulfhidrilo (SH), tiocianato, disulfuro, un conector L2 o L3, y una secuencia de aminoácidos que es al menos 50% idéntica a la SEQ ID NO: 10 o un fragmento de la misma.

El antagonista de fórmula (I) es específico para el sitio de unión 1 (sitio de unión de neurotensina de alta afinidad) de la sortilina.

El antagonista tiene la estructura general de fórmula (II):



en donde Z es un donador o aceptor de enlace de hidrógeno, seleccionado del grupo que consiste en carbonilo, hidroxilo, amino, imino, amida, sulfhidrilo, cloro, fluoro, y en donde

R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, y un conector L2, y en donde

5 R₆ se selecciona del grupo que consiste en H, -CH₃, -CH₂CH₃ y -OCH₃, y en donde

R₇ se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de glutamato, glutamina, lisina, arginina, histidina, tirosina, metionina, cisteína, grupos alifáticos C4-6, y en donde

R₈ se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de tirosina, histidina, serina, treonina, aspartato, asparagina, cisteína, fenilalanina, yodo-tirosina y -CH₂-NH₂, y en donde

10 R₉ se selecciona del grupo que consiste en cadena lateral de lisina, arginina, glutamina, grupos C3-8 alifáticos y heteroalifáticos, grupos carbocíclicos y heterocíclicos que comprenden 5 o 6 miembros en el anillo, y en donde

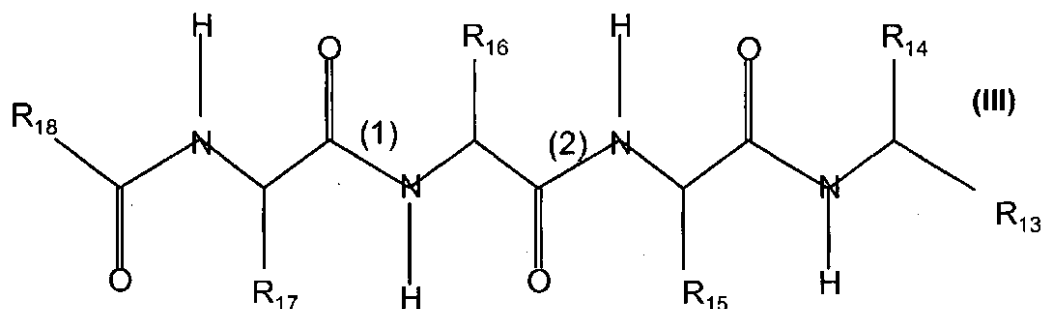
R₁₀ se selecciona del grupo que consiste en un piroglutamato, polícarbohidratos y un polipéptido de longitud mayor o igual que 10, y en donde

15 R₁₁ y R₁₂ individualmente se seleccionan del grupo que consiste en H, alquilo lineal o ramificado C1-12, alqueno lineal o ramificado, alquino lineal o ramificado, fenilo, bencilo, halogenoalcano, cloroalcano, bromoalcano, yodoalcano, halogenoformilo, hidroxilo, carbonilo, aldehído, éster de carbonato, carboxilato, carboxilo, éter, éster, hidroperoxi, peroxi, carboxamida, amina primaria, amina secundaria, amina terciaria, amonio, cetimina primaria, cetimina secundaria, aldimina primaria, aldimina secundaria, imida, azida, azo (diimida), cianato, isocianuro, isotiocianato, nitrato, nitrilo, nitrosooxi, nitro, nitroso, piridilo, fosfino, fosfato, fosfono, sulfonilo, sulfino, sulfhidrilo (SH), y en donde

los enlaces covalentes (1) y (2) se seleccionan individualmente del grupo que consiste en enlaces sencillos y enlaces dobles.

El antagonista de fórmula (II) es específico para el sitio de unión 2 (sitio de unión de neurotensina de baja afinidad) de la sortilina.

25 El antagonista puede tener además la estructura general de fórmula (III):



en donde R₁₃ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C1-12, alqueno, alquino y un conector L3, y en

donde

R₁₄, R₁₅, R₁₇, R₁₉, R₂₀ se seleccionan individualmente del grupo que consiste en H, alquilo C1-12, alqueno y alquino, y en donde

5 R₁₆ se selecciona del grupo que consiste en cadenas laterales de fenilalanina, leucina, isoleucina, valina, metionina, histidina, cisteína, lisina y alifática C3-7, y en donde

R₁₈ se selecciona del grupo que consiste en H, -CH₃ y -CH₂OH, y en donde

los enlaces covalentes (1) y (2) se seleccionan individualmente del grupo que consiste en enlaces sencillos y enlaces dobles.

10 El antagonista de fórmula (I) o (II), en donde el conector L2 se selecciona del grupo que consiste en una cadena principal de péptido de 5 a 6 restos, alquilo C15-20, alqueno C15-20 y alquino C15-20.

El antagonista de fórmula (III) es específico para el sitio de unión 3 (sitio de unión de proneurotrofina) de la sortilina.

En una realización, el antagonista de fórmula (I) está conectado al antagonista de fórmula (II) por un conector L2, formando así la fórmula general (IV):

[Fórmula (I)] - [Conector L2] - [Fórmula (II)] (IV)

15 En una realización, el conector L3 se selecciona del grupo que consiste en una cadena principal de péptido de 12 a 20 restos, alquilo C30-60, alqueno C30-60 y alquino C30-60.

El antagonista de fórmula (I) está conectado al antagonista de fórmula (III) por el conector L3, formando así la fórmula general (V):

[Fórmula (I)] - [Conector L3] - [Fórmula (III)] (V)

20 El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista se selecciona del grupo que consiste en RRPYI(chg), yodoYIL, QIL, YCL, dYIL, YHL, RRPYI(acc), RRPYI(nMe)L, YIL representado en la figura 10.

El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es RRPYI(chg) representado en la figura 10.

25 El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es yodoYIL representado en la figura 10.

El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es QIL representado en la figura 10.

30 El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es YCL representado en la figura 10.

El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es dYIL representado en la figura 10.

El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es YHL representado en la figura 10.

35 El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es RRPYI(acc) representado en la figura 10.

El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es RRPYI(nMe)L representado en la figura 10.

40 El antagonista como se ha definido antes en la presente memoria en donde dicho antagonista es YIL representado en la figura 10.

En una realización de la presente invención, el animal se selecciona del grupo que consiste en ratón, rata, conejo, animal canino y perro.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60% con la SEQ ID NO. 1.

45 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 65% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 70% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 75% con la SEQ ID NO. 1.

- 5 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 85% con la SEQ ID NO. 1.

- 10 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 91% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 92% con la SEQ ID NO. 1.

- 15 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 93% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 94% con la SEQ ID NO. 1.

- 20 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 96% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 97% con la SEQ ID NO. 1.

- 25 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 98% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 99% con la SEQ ID NO. 1.

- 30 En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 99,5% con la SEQ ID NO. 1.

En una realización adicional de la presente invención, el receptor con dominio Vps10p comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 99,9% con la SEQ ID NO. 1.

- 35 En una realización de la presente invención el al menos un antagonista como se define en la presente memoria, es capaz de inhibir la unión de un agonista seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6 (proNGF), SEQ ID NO. 7 (proBDNF), SEQ ID NO. 8 (proNT3), SEQ ID NO. 9 (pro-NT4/5), SEQ ID NO. 14 (ApoE) o SEQ ID NO. 15 (LpL) o un fragmento o variante de los mismos, a dicho receptor con dominio Vps10p.

- 40 En otra realización de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306, T398 a G400, I303-G309, Q349-A356, Y395 y T402 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En otra realización más de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314, F350 a M363, S305, F306 y T398 a G400 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

- 45 En otra realización más de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos R325, S316, Y351, I353, K260, I327, F314 y F350 a M363 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

- 50 En otra realización más de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586, W597, T168-I174, L572, A573 y

S584 a F588 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En otra realización más de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos L572, L114, V112, R109 a S111, S115 a G118, T570, G571, W586 y W597 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En otra realización importante de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos L572, L114 y V112 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En una realización importante de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos D403, S420, D422, N423, S424, I425, Q426, E444, T451, Y466, E470, I498, S499 y V500 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En una realización preferida de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos D403, N423, S424, I425, E444, T451, Y466, I498 y V500 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

En una realización muy preferida de la presente invención, el al menos un antagonista como se ha definido antes en la presente memoria se une a al menos un resto de aminoácido del sitio de unión que comprende los restos de aminoácidos E444, T451, Y466, I498 y V500 de la SEQ ID NO. 1 (sortilina).

El antagonista, que en este sentido es sinónimo de un inhibidor del receptor con dominio Vps10p, se selecciona, pero no está limitado al grupo que comprende proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas y ARNip.

Anticuerpos contra el receptor con dominio Vps10p

Un anticuerpo se une fuertemente a una molécula diana particular, inactivándola así directamente o marcándola para su destrucción. El anticuerpo reconoce su diana (antígeno) con una notable especificidad y fuerza que viene dada por la suma de muchas fuerzas químicas, que incluyen enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y de van der Waals, así como interacciones iónicas. En general, cuanto más compleja químicamente es la diana, más inmunógena será. El determinante antigénico puede abarcar tramos de aminoácidos lineales cortos o un módulo de proteína tridimensional más complicado.

Conceptualmente, los anticuerpos dirigidos contra un receptor diana pueden inhibir la unión del ligando de dos formas: competitiva o alostérica. La inhibición competitiva implica la unión directa del anticuerpo a o cerca del sitio de unión del ligando en el receptor, desplazando de esta forma al ligando de su receptor, o la inhibición estérica del acercamiento del ligando al sitio de unión del ligando. La inhibición alostérica implica la unión del anticuerpo a un sitio en el polipéptido receptor que es distinto del epítipo de unión del ligando. Sin embargo, la unión a este sitio inducirá un cambio conformacional en la estructura general del receptor que hace más difícil o incluso imposible para el ligando unirse a su sitio de reconocimiento cognado.

Los autores de esta solicitud han producido anticuerpos contra varias partes de los receptores con dominio Vps10p. La presente invención describe anticuerpos contra la característica unificadora de esta familia de receptores, las de dominio Vps10p. El alineamiento de secuencias más adelante de dominios Vps10p demuestra la conservación dentro de esta familia de receptores.

Tabla 2: Anticuerpos contra receptores con dominio Vps10p

Receptor	Nombre	Antígeno	Especie	Western	IH/IC	Ref.
SorLA	SORLA cabra	Dominio extracelular	cabra	X	X	Schmidt et. al., <i>J. Biol. Chem.</i> 282:32956-67, 2007
	Hale SORLA	Dominio citoplasmático	conejo	X		
	SORLA LA	Repetición de tipo complemento	conejo	X		
	Sol SORLA	Dominio extracelular	conejo	X	X	Andersen et al., <i>PNAS</i> 103:13461-6, 2005

Receptor	Nombre	Antígeno	Especie	Western	IH/IC	Ref.
	SORLA cola	Dominio citoplasmático	conejo	X		
	SORLA VPS	Dominio Vps10p	conejo	X		
	nº 606870	Sec. de péptido en dominio Vps10p	conejo	X		
	nº 642739	C-terminal	conejo	X		
	nº 643739	Cola citoplasmática	conejo	X		
	20C11	Dominio extracelular	ratón	X	X	
	AG4	Dominio extracelular	ratón	X		
Sortilina	nº 5264	Dominio extracelular	conejo	X	X	Munck Petersen et al., <i>EMBO J.</i> 18 :595-604, 1999
	nº 5448	Dominio citoplasmático	conejo	X	X	Jansen et al., <i>Nature Neurosci.</i> 10 :1449-1457, 2007
	nº 5287	Dominio citoplasmático	conejo	X		
	CP 96 334 SR 96 204	Propéptido	conejo	X		Munck Petersen et al., <i>EMBO J.</i> 18 :595-604, 1999
	nº 5438	Vps10p	conejo	X		
	Sortilina cabra/Laika	Dominio extracelular	cabra	X		
	F9	Dominio extracelular	ratón	X	X	
	F11	Dominio extracelular	ratón	X	X	
	AF2934	Dominio extracelular	cabra	X	X	R&D Systems, Jansen et al., <i>Nature Neurosci.</i> 10:1449-1457, 2007
	AF3154	Dominio extracelular	cabra	X	X	R&D Systems; Jansen et al., <i>Nature Neurosci.</i> 10:1449-1457, 2007
	anti-NTR3	Dominio extracelular	ratón	X	X	BD Transduction Laboratories,
	ANT-009	Dominio extracelular	ratón	X	X	Alomone Labs; Nykjaer et al., <i>Nature</i> 427 :843-848, 2004
SorCS1	AF3457	Dominio extracelular	cabra	X	X	BD Transduction Laboratories
	SorCSI cabra	Dominio extracelular	cabra	X		
	L-SorCS1	Dominio extracelular	conejo	X	X	Hermey et al., <i>J. Biol. Chem.</i> 279:50221- 50229, 2003
	Leu-SorCS1	Dominio rico en leucina	conejo	X	X	Hermey et al., <i>J. Biol. Chem.</i> 279:50221-50229, 2003
	nº 5466	Dominio extracelular	conejo	X	X	
	1D	Dominio extracelular	ratón	X		
	4H	Dominio extracelular	ratón	X		

Receptor	Nombre	Antígeno	Especie	Western	IH/IC	Ref.
	6B	Dominio extracelular	ratón	X		
	4A	Dominio extracelular	ratón	X		
SorCS2	AF4237	Dominio extracelular	oveja	X		BD Transduction Laboratories
	SorCS2 cabra	Dominio extracelular	cabra	X	X	
	nº 5422	Dominio extracelular	conejo	X	X	Hermey et al., <i>Biochem. J.</i> , 395:285-93, 2006
	nº 5431	28 aminoácidos C-terminales	conejo	X	X	
	SorCS2-prp	Propéptido	conejo	X		Schousboe Sjoegaard, Dissertation, Aarhus University, 2005
	M1	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M3	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M4	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M7	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M9	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M10	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M13	Dominio extracelular	ratón	X		Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M15	Dominio extracelular	ratón		X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M18	Dominio extracelular	ratón	X	X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	M19	Dominio extracelular	ratón	X	X	Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	S21	Dominio extracelular	ratón	X		Roland Hoist, Master of Science Thesis, Aarhus University, 2006
	SorCS2-GST-73aa	Dominio extracelular	conejo	X		

Receptor	Nombre	Antígeno	Especie	Western	IH/IC	Ref.
	SorCS2-GST-100aa	Dominio extracelular	conejo	X		
	SorCS2-GST-172aa	Dominio extracelular	conejo	X		
SorCS3	SorCS3-N	Dominio extracelular	conejo	X		
	SorCS3-C	15 aa C-terminales	conejo	X		
	Sort3 N-Term n° 5389	Dominio N-terminal	conejo	X	X	Westergaard et al., <i>FEBS Lett.</i> 579:1172-6, 2005
	n° 5432	Dominio extracelular	conejo	X	X	
	MAB3067	Dominio extracelular	ratón	X		BD Transduction Laboratories
	MAB30671	Dominio extracelular	ratón	X		BD Transduction Laboratories
	AF3326	Dominio extracelular	cabra	X		BD Transduction Laboratories
	SorCS3	Dominio extracelular	cabra	X		

Uso genérico de un anticuerpo para inhibir la unión de un ligando

- 5 Un anticuerpo se une fuertemente a una molécula diana particular, inactivándola así directamente o marcándola para su destrucción. El anticuerpo reconoce su diana (antígeno) con una notable especificidad y fuerza que viene dada por la suma de muchas fuerzas químicas, que incluyen enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrófobas y de van der Waals, así como interacciones iónicas. En general, cuanto más compleja químicamente es la diana, más inmunógena será. El determinante antigénico puede abarcar tramos de aminoácidos lineales cortos o un módulo de proteína tridimensional más complicado.

Procedimiento para hacer anticuerpos

- 10 Los anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra un antígeno específico, o epítipo de un antígeno, se pueden producir de acuerdo con procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, *Antibodies - A laboratory Manual* de Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory 1998, ISBN 0-87969-314-2). El procedimiento para la posterior generación de anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos también se ha descrito (p. ej., A. M. Scott et al., *Cancer Research* 60:3254-3261, 2000; A. Nissim y Y. Chernajovsky, *Handb. Exp. Pharmacol.* 181:3-18, 2008; A. Mountain y J. R. Adair, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 10:1-142, 1992).

Expectativas generales de éxito en la preparación de anticuerpos

- 20 Se pueden generar anticuerpos contra cualquier motivo de péptido que se elija usando oligopéptidos sintéticos cortos que abarcan el epítipo diana deseado. Por lo tanto, se garantiza que se pueden generar anticuerpos contra sitios de unión del ligando en receptores. El que la especie de anticuerpo individual tenga o no el potencial para inhibir la unión del ligando depende simplemente del hecho de que la afinidad de la inmunoglobulina por el receptor supere la del ligando. Al final es una cuestión de cribar el potencial inhibidor de una serie de anticuerpos individuales para encontrar uno con las propiedades deseadas.

- 25 Los ensayos de cribado para anticuerpos inhibidores son comúnmente conocidos y típicamente implican un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA). En detalle, el receptor recombinante o un fragmento que abarca su motivo de unión de ligando, se inmovilizan en pocillos por duplicado de placas de microvaloración. Posteriormente, los pocillos se incuban con una solución que contiene el ligando. La unión del ligando al receptor inmovilizado se confirma usando un anticuerpo que reconoce el ligando y que está acoplado con una reacción de color con colorante. La unión del ligando al receptor se ensaya en presencia de diferentes anticuerpos para identificar las especies de inmunoglobulina que bloquean la unión del ligando al receptor, y por lo tanto previenen la
- 30 reacción de color en el respectivo pocillo de la placa de microvaloración.

Uso clínico satisfactorio de anticuerpos

Hay una serie de anticuerpos terapéuticos que se usan en clínica. Los ejemplos incluyen Rituxan de Genentech, un anticuerpo dirigido contra el receptor de CD20 (usado en la artritis reumatoide), Remicade de Johnson & Johnson, un anticuerpo dirigido contra el receptor del TNF alfa (en psoriasis), Avastin de Roche, un anticuerpo anti-VEGF

usado para el tratamiento del cáncer colorrectal y pulmonar, así como Herceptin, un anticuerpo contra el receptor HRE2 usando en la terapia del cáncer de mama.

5 La evaluación de la unión a un receptor es un trabajo rutinario para el experto en el campo de la biotecnología. En relación con esto, debe mencionarse que las proneutrofinas, así como la familia de receptores con dominio Vps10p, eran conocidos en la fecha de prioridad de esta invención, y se han mencionado en la técnica anterior ensayos de unión que implican, por ejemplo, proneutrofinas, por ejemplo en el artículo de Lee et al. (2001) *Science* 294:1945-1948.

Por consiguiente, en una realización importante, el agonista usado en la presente invención es un anticuerpo.

En una realización adicional, el anticuerpo se dirige contra una parte extracelular del receptor con dominio Vps10p.

10 En una realización adicional, el anticuerpo se dirige contra una parte intracelular del receptor con dominio Vps10p.

En una realización adicional, el anticuerpo se dirige contra una parte transmembrana del receptor con dominio Vps10p.

15 En una realización de la presente invención, el anticuerpo como se ha definido antes en la presente memoria, se selecciona del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de una cadena, anticuerpos recombinantes.

La presente invención describe además un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo como se ha definido antes en la presente memoria y un conjugado seleccionado del grupo que consiste en: un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, o un isótopo radiactivo; un miembro de un par de unión específico, tal como avidina, o estreptavidina o un antígeno.

20 Métodos para cribar antagonistas/inhibidores de receptores con dominio Vps10p

La presente invención se refiere a métodos in vitro e in vivo para identificar un antagonista de un receptor con dominio Vps10p, siendo capaz dicho antagonista de unirse a dicho receptor con dominio Vps10p y así inhibir la unión de un agonista endógeno a dicho receptor, previniendo/inhibiendo por consiguiente una respuesta fisiológica asociada con la regulación de concentraciones de lípidos en el plasma sanguíneo.

25 Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un método in vitro para cribar un antagonista capaz de unirse a un receptor con dominio Vps10p, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un receptor sortilina, y

b) proporcionar ApoB como agonista,

c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y

30 d) proporcionar un ensayo para medir la unión de dicho agonista a dicho receptor, y

e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar al ensayo, y

f) determinar la cantidad de agonista unido al receptor con dominio Vps10p, y

g) comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,

35 h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista que altera la unión de dicho agonista a dicho receptor.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en donde dicho receptor sortilina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60% con la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método las etapas de:

40

a) proporcionar un cultivo celular que expresa dicho receptor sortilina, y

b) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y

c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y

45 d) proporcionar un ensayo para determinar la unión a, internalización de y señalización a través de, dicho receptor sortilina, comprendiendo dicho ensayo,

e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar c) al cultivo celular a), en presencia de

dicho agonista b), y

f) determinar

i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o

ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o

5 iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y

g) comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,

h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista

i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o

10 ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o

iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de dicho receptor sortilina.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de expresión de dicho receptor, comprendiendo el método las etapas de:

15 a) proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor sortilina, y

b) proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor sortilina, y

c) opcionalmente proporcionar un cultivo celular que expresa en exceso un receptor sortilina

d) proporcionar ApoB como agonista del receptor sortilina, y

e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y

20 f) proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un tercer ensayo que comprende c), y

g) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar a los tres ensayos, y

h) determinar

i) la cantidad de antagonista unido al receptor sortilina, y/o

25 ii) la cantidad de antagonista internalizado por el receptor sortilina, y/o

iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, y

i) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),

j) en donde la diferencia en las cantidades identifica un antagonista

30 i) capaz de unirse a un receptor sortilina, y/o

ii) capaz de inhibir la señalización a través de un receptor sortilina, y/o

iii) capaz de inhibir la internalización de ApoB como agonista de dicho receptor sortilina.

En una realización adicional, el agonista como se ha definido antes en la presente memoria, se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO. 6 (proNGF), SEQ ID NO. 7 (proBDNF), SEQ ID NO. 8 (proNT3), SEQ ID NO. 9 (pro-NT4/5), SEQ ID NO. 14 (ApoE) o SEQ ID NO. 15 (LpL), o un fragmento o variante de los mismos.

35

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) administrar dicho antagonista a un mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural,

40 b) determinar

i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o

ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o

iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y

c) comparar la medición de la etapa b) con una medición obtenida en ausencia del compuesto que se va a ensayar,

d) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica el efecto de dicho antagonista en dicho mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor con un segundo mamífero no humano que carece de expresión de dicho receptor y un tercer mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) proporcionar un mamífero no humano que expresa dicho receptor sortilina, y

b) proporcionar un mamífero no humano que no expresa dicho receptor sortilina, y

c) proporcionar un mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor sortilina, y

d) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y

e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y

f) administrar dicha biblioteca de antagonistas a dicho mamífero no humano de a), b) y c) respectivamente, y

g) determinar

i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o

ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o

iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, en cada uno de los mamíferos no humanos en a), b) y c), y

h) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),

i) en donde la diferencia en las cantidades identifica un antagonista

i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o

ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o

iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de ApoB de dicho receptor sortilina.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1: Familia de receptores con dominio Vps10p. Se indica su organización estructural.

Figura 2a. Metabolismo de colesterol y triglicéridos. Los quilomicrones (CM) transportan los triglicéridos de la dieta a tejidos donde son eliminados por acción de la lipoproteína lipasa (LpL). La apolipoproteína C2 (C2) activa la LpL. Las partículas remanentes resultantes (CMR) son eliminadas por el hígado. Se unen a receptores remanentes que reconocen la apo E (E) y son internalizadas y catabolizadas. Las apolipoproteínas A (A) y B48 (B48) son sintetizadas en células intestinales, mientras que la apoE es adquirida de partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL) junto con el colesterol. Cuando los triglicéridos son retirados de los quilomicrones, la apoA, apo C, colesterol y fosfolípidos son liberados de sus superficies y transferidos a las HDL donde el colesterol es esterificado. El éster de colesterilo es vuelto a transferir a la partícula remanente en un intercambio por triglicéridos por la proteína de transporte de éster de colesterilo.

Figura 2b. Metabolismo de colesterol y triglicéridos. Las partículas de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) son sintetizadas en el hígado y transportan triglicéridos endógenos desde el hígado a otros tejidos donde son eliminados por acción de la lipoproteína lipasa (LpL). Al mismo tiempo, el colesterol, fosfolípidos y apo C (C2) y apo E (E) son liberados y transferidos a partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL). Mediante este proceso las VLDL son convertidas en IDL (no se muestra). Algunas IDL son eliminadas por el hígado, pero la mayoría tienen más eliminación de triglicéridos por la lipasa hepática, y así se convierten en partículas de lipoproteína de baja densidad (LDL) (no se muestra). Por lo tanto, las partículas VLDL ricas en triglicéridos son precursores de las LDL, que comprenden principalmente colesterol (ésteres de colesterilo) y apo B100. Las LDL finalmente son eliminadas de la circulación por receptores de LDL presentes en el hígado y también en tejidos periféricos.

Figura 3: Niveles de colesterol plasmático en ratones con inactivación génica de sortilina. Los niveles de colesterol se midieron en ratones genéticamente intactos (LDLRxSort; +/+,+/+), ratones que carecían de expresión de sortilina (LDLRxSort; +/+, -/-), ratones desprovistos de receptor de lipoproteína de baja densidad LDLR (LDLRxSort; -/-, +/+), y ratones con doble inactivación génica que carecían de expresión de ambos receptores (LDLRxSort; -/-, -/-). Los animales se alimentaron con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante 4-6 semanas, se dejaron en ayunas durante la noche y se analizó el colesterol en las muestras de plasma. Los ratones con inactivación génica de la sortilina presentan una reducción significativa mayor del colesterol plasmático comparado con las crías de la misma camada de control (genéticamente intactos) ($p=0,06$). En los ratones deficientes en el receptor de LDL, un modelo de ratón de hipercolesterolemia familiar, los niveles elevados de colesterol disminuyeron en ausencia de sortilina (LDLRxSort; -/-, -/-) ($p=0,02$).

Figura 4: Niveles plasmáticos de triglicéridos en ratones con inactivación génica de sortilina. Se midieron los triglicéridos en ratones genéticamente intactos (LDLRxSort; +/+,+/+), ratones que carecían de expresión de sortilina (LDLRxSort; +/+, -/-), ratones desprovistos de receptor de lipoproteína de baja densidad LDLR (LDLRxSort; -/-, +/+), y ratones con doble inactivación génica que carecían de expresión de ambos receptores (LDLRxSort; -/-, -/-). Los animales se alimentaron con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante 4-6 semanas, se dejaron en ayunas durante la noche y se analizó el colesterol en las muestras de plasma. Los ratones con inactivación génica de la sortilina presentaban un aumento moderado de los triglicéridos plasmáticos comparado con crías de la misma camada de control (genéticamente intactos). En los ratones con doble inactivación génica de receptor LDL y sortilina (LDLRxSort; -/-, -/-), los niveles de triglicéridos eran considerablemente elevados comparado con los ratones que carecían solo de LDLR.

Figura 5a: Perfil de lipoproteínas - colesterol (izquierda) y triglicéridos (derecha). Perfiles de FPLC de lipoproteínas plasmáticas de ratón, de ratones genéticamente intactos (LDLRxSort; +/+,+/+), ratones que carecían de expresión de sortilina (LDLRxSort; +/+, -/-), ratones desprovistos de receptor de lipoproteína de baja densidad LDLR (LDLRxSort; -/-, +/+), y ratones con doble inactivación génica que carecían de expresión de ambos receptores (LDLRxSort; -/-, -/-). Los ratones con los genotipos indicados, se alimentaron con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante 4-6 semanas, y se recogieron muestras de plasma de cada animal y se sometieron a filtración en gel en FPLC. Posteriormente se midió el contenido de colesterol y triglicéridos en cada fracción. Se indica el tiempo de retención de las diferentes partículas de lipoproteínas.

Figura 5b: Caracterización de la unión de ApoB a sortilina humana recombinante (30). Se inmovilizó sortilina en un Sensor Chip CM5 de BIAcore con una densidad de $0,078 \text{ pmol/mm}^2$. A) Después de calibración del valor inicial en el tampón de desarrollo (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, CaCl_2 1,5 mM, P20 al 0,005%, pH 7,4), se aplicó al chip IgG de conejo anti-sortilina 10 $\mu\text{g/ml}$ (12) o tampón de desarrollo solo. En $t = 700 \text{ s}$, las unidades de respuesta obtenidas en presencia de la IgG anti-sortilina se ajustaron de forma arbitraria a 100 y se aplicó ApoB 50 nM a la celda de flujo preincubada con anticuerpo o solo con tampón. La asociación de la unión de Apo se midió hasta 1200 segundos, después de lo cual el soluto se cambió a tampón para permitir la disociación. B) Datos extraídos del panel A. La unión de la ApoB en $t = 1200$ segundos a la celda de flujo después de preincubación con tampón de desarrollo solo (= máxima unión de ApoB) se ajustó a 100 unidades de respuesta relativas. Cuando se preincubó con el anticuerpo anti-sortilina inhibidor, no se observó unión de ApoB. C) Análisis por resonancia de plasmón de superficie de la unión de ApoB (10, 20, 50 nM) a la sortilina inmovilizada. Se registraron las velocidades de asociación y disociación, y el valor de K_d era 0,4 nM para la unión a la sortilina en el experimento presentado.

Figura 6: Transcurso de tiempo para el aumento de los niveles de colesterol y perfil de FPLC en ratones que expresan en exceso la sortilina. Datos normalizados al 100% el día 0 ($t=0$). Hay un aumento del colesterol plasmático selectivamente en ratones que recibieron adenovirus con sortilina (marcador circular) y no en ratones que recibieron adenovirus con LacZ (marcador cuadrado). A la derecha hay un FPLC del plasma. Los ratones se sometieron a dieta de tipo occidental desde el día -14 al día 14 (28 días).

Figura 7: Transferencia Western de apoproteínas en ratones que expresan la sortilina en exceso. Se tomaron muestras de plasma 14 días después de inyección de adenovirus con sortilina o con LacZ (inyección en la vena de la cola), y posteriormente se llevó a cabo la inmunotransferencia de ApoB y ApoE. Hay una concentración mayor de ApoB100 y, en menor medida, una concentración mayor de ApoE en ratones que recibieron adenovirus con sortilina comparado con el adenovirus con ApoE. Los ratones se sometieron a dieta de tipo occidental desde el día -14 al día 14 (28 días).

Figura 8: Niveles de colesterol y triglicéridos en ratones con doble inactivación génica de SorLA/ApoE. Se midieron los lípidos (colesterol y triglicéridos) en ratones genéticamente intactos (ApoExSorLa; +/+,+/+), ratones que carecían de expresión de SorLA (ApoExSorLa; +/+, -/-), ratones que desprovistos de apolipoproteína E (ApoExSorLa; -/-, +/+), y ratones con doble inactivación génica que carecían de expresión de ambas proteínas (ApoExSorLa; -/-, -/-). Los ratones macho se alimentaron con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante 4-6 semanas, se dejaron en ayunas durante la noche y se analizaron el colesterol y los triglicéridos en las muestras de plasma. Los ratones con inactivación génica de SorLA presentan un aumento significativo del colesterol plasmático comparado con las crías de la misma camada de control (genéticamente intactos) ($p<0,05$). En los ratones deficientes en apoE, los niveles de colesterol y triglicéridos disminuyeron en ausencia de SorLA (ApoExSorLa; -/-, -/-) ($p=0,001$).

Figura 9: Perfiles de apolipoproteína y lipoproteínas en ratones con doble inactivación génica SorLA/ApoE. Panel A) Los sueros de ratones transgénicos con los genotipos indicados, alimentados con una dieta de tipo occidental, se aplicaron a SDS-PAGE reductora seguido de transferencia Western, usando anticuerpos contra ApoA1, ApoB y ApoE. Panel B) Perfiles de lipoproteínas - colesterol. Perfiles de FPLC de lipoproteínas plasmáticas de ratón, de ratones genéticamente intactos (ApoExSorLa; +/+,+/+), ratones que carecían de expresión de SorLA (ApoExSorLa; +/+, -/-), ratones que desprovistos de apolipoproteína E (ApoExSorLa; -/-,+/+), y ratones con doble inactivación génica que carecían de expresión de ambas proteínas (ApoExSorLa; -/-, -/-). Los ratones con los genotipos indicados se alimentaron con una dieta de tipo occidental durante 4-6 semanas, y se recogieron las muestras de plasma de cada animal y se sometieron a filtración en gel en FPLC. Posteriormente se midió el contenido de colesterol en cada fracción. Se indican los tiempos de retención de las diferentes partículas de lipoproteínas.

Figura 10: Competición de péptidos con Tyr-Ile-Leu (YIL) marcado en el extremo C con GST. Se midió la unión a la sSortilina inmovilizada por resonancia de plasmón de superficie. El 100% corresponde a las unidades de respuesta medida obtenidas para GST-YIL 100 nM en ausencia de péptido competidor. Los valores de CE50 son la concentración de péptido a la que la unión de GST-YIL se reduce a 50%. Se dan las secuencias para los péptidos y para los péptidos que contienen aminoácidos no naturales, también se muestra la estructura.

Resumen de las secuencias

SEC ID NO. 1: Sortilina

SEC ID NO. 2: SorLA

SEC ID NO. 3: SorCS1

SEC ID NO. 4: SorCS2

SEC ID NO. 5: SorCS3

SEC ID NO. 6: pre-pro-NGF

SEC ID NO. 7: pre-pro-BDNF

SEC ID NO. 8: Neurotrofina-3

SEC ID NO. 9: Neurotrofina-4/5

SEC ID NO. 10: Neurotensina (1-13)

SEQ ID NO 11: PYIL (extremo C de neurotensina)

SEQ ID NO 12: NT69L

SEQ ID NO 13: Péptido asociado a receptor (RAP)

SEQ ID NO 14: Apolipoproteína E (ApoE)

SEQ ID NO 15: Lipoproteína lipasa (LpL)

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de la concentración plasmática de colesterol y lipoproteínas que contienen colesterol

Ratones de 8-12 semanas de edad se alimentaron durante 4-6 semanas con una dieta de tipo occidental, y después se llevaron a cabo las mediciones y determinación del colesterol y partículas de lipoproteínas. Se usaron las siguientes cepas: ratones genéticamente intactos y ratones que carecían de expresión de sortilina (Jansen et al., *Nat. Neurosci.* (2007) 10:1449-), ratones deficientes en el receptor de LDL (LDLR) (Ishibashi et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92:883-), ratones con inactivación génica de SorLA (Andersen et al., *PNAS* (2005) 102:13461-) y ratones con expresión alterada de la ApoE (Zhang et al., *Science* (1992) 258:468-). Los ratones se entrecruzaron para generar una línea que carecía de expresión de sortilina y LDLR y una línea desprovista tanto de ApoE como de SorLA. Se tomaron muestras de sangre por la mañana después de 12 h de ayuno, por sangrado retroorbital de los animales anestesiados con éter. La sangre se transfirió a tubos recubiertos de heparina sobre hielo. Después de centrifugación a 5400 rpm (3000 g) durante 15 min a 4°C, se determinó el colesterol total usando un kit de "Cholesterol CHOD-PAP" de Roche/Hitachi. Brevemente, el colesterol se midió mezclando las muestras con reactivos CHOD-PAP para el colesterol. Después de incubación, se midió la densidad óptica (D.O.) a 492 nm. Se hizo una curva de calibración de una referencia de colesterol en el mismo experimento. La figura 3 representa niveles menores de colesterol en ratones con inactivación génica de sortilina, comparado con las crías de la misma camada de control. Además, los ratones con doble inactivación génica de sortilina/LDLR están protegidos frente al aumento de los niveles de colesterol observados en los ratones con inactivación génica de LDLR. En cambio, los ratones que carecían de SorLA tienen niveles mayores de colesterol plasmático y la deficiencia tanto de SorLA como

de ApoE produce niveles mayores de colesterol que la deficiencia de solo ApoE (figura 8).

Se llevaron a cabo mediciones de los perfiles de lipoproteínas por análisis de FPLC usando un aparato ÄKTA. Las lipoproteínas se separaron en una columna SuperoseTM 6 PC3.2/30 con un AKTATMpurifier10 usando el método de tiempo-Superose6 en el programa Unicorn 5.11 (GE Healthcare). Brevemente, se diluyó el plasma a <5 mmol/l de colesterol antes de inyección. Se inyectaron 50 µl de la muestra diluida en la columna. El análisis se llevó a cabo en las muestras recién preparadas. Posteriormente se midió el colesterol en las fracciones (véase antes). La figura 5a muestra dicho experimento. Es evidente que los ratones tipo sortilina-/- se caracterizan por niveles reducidos de LDL comparado con los ratones de control. Igualmente los ratones que carecen tanto de sortilina como de LDLR tienen menores concentraciones de LDL comparado con ratones que carecen solo de la expresión de LDLR. Hay que destacar que los ratones con doble inactivación génica de SorLA/ApoE se caracterizan por concentraciones de VLDL notablemente superiores que las observadas para ratones que carecen solo de la expresión de ApoE-/- (fig. 9A y B). Los datos demuestran que la sortilina y SorLA son capaces de modificar los niveles de colesterol y las concentraciones in vivo de LDL (para la sortilina) y de VLDL (para SorLA).

Ejemplo 2: Determinación de la concentración plasmática de triglicéridos y lipoproteínas que contienen triglicéridos

Ratones de 8-12 semanas de edad se alimentaron durante 4-6 semanas con una dieta de tipo occidental, y se usaron las mediciones de colesterol y determinación de partículas de lipoproteínas. Se usaron las siguientes cepas: ratones genéticamente intactos, ratones que carecían de expresión de sortilina (Jansen et al., (2007) *Nat. Neurosci.* 10:1449-), ratones deficientes en el receptor de LDL (LDLR) (Ishibashi et al. (1993) *J. Clin. Invest.* 92 :883-), ratones con inactivación génica de SorLA (Andersen et al., *PNAS* (2005) 102:13461-) y ratones con expresión alterada de la ApoE (Zhang et al., *Science* (1992) 258:468-). Los ratones se entrecruzaron para generar una línea que carecía de expresión de sortilina y LDLR y una línea desprovista tanto de ApoE como de SorLA. Se tomaron muestras de sangre por la mañana después de 12 h de ayuno, por sangrado retroorbital de los animales anestesiados con éter. La sangre se transfirió a tubos recubiertos de heparina sobre hielo. Después de centrifugación a 5400 rpm (3000 g) durante 15 min a 4°C, se determinaron los triglicéridos usando un kit disponible en el comercio "Triglycerides GPO-PAP" (Roche/Hitachi). Los triglicéridos totales se determinaron mezclando las muestras con reactivos GPO-PAP para triglicéridos de Roche/Hitachi. Después de incubación, se midió la D.O. a 492 nm.

Se hizo una curva de calibración de una referencia de glicerol en el mismo experimento. La figura 4 muestra niveles de triglicéridos ligeramente aumentados en ratones LDLR-/- cuando se compararon con las crías de la misma camada de control. Igualmente, los ratones desprovistos tanto de ApoE como de SorLA se caracterizan por niveles mayores de triglicéridos que los animales que carecen solo de ApoE, en cambio los ratones que carecen de SorLA tienen mayores niveles de colesterol plasmático y la deficiencia tanto de SorLA como de ApoE produce mayores niveles de colesterol que la deficiencia de ApoE solo (figura 8). Se llevaron a cabo mediciones de las lipoproteínas con triglicéridos usando FPLC en un aparato ÄKTA. Las lipoproteínas se separaron en una columna SuperoseTM 6 PC3.2/30 con un ÄKTA purifier10 usando el método de tiempo-Superose6 en el programa Unicorn 5.11 (GE Healthcare). Brevemente, se diluyó el plasma a <5 mmol/l de colesterol antes de inyección. Se inyectaron 50 µl de la muestra diluida en la columna. El análisis se llevó a cabo en las muestras recién preparadas. Posteriormente se midieron los triglicéridos en las fracciones (véase antes). La figura 5a muestra dicho experimento.

Ejemplo 3: Evaluación del efecto del exceso de expresión de sortilina usando vectores adenovíricos

Ratones de 8 semanas de edad se alimentaron durante 4 semanas (de día -14 a día 14) con una dieta de tipo occidental, después de los cual se hicieron las mediciones y determinación del colesterol (y triglicéridos y ALAT) y partículas de lipoproteínas (día 0, 7 y 14). Se usaron ratones genéticamente intactos. Se tomaron muestras de sangre por la mañana después de 12 h de ayuno, por sangrado retroorbital de los animales anestesiados con éter. La sangre se transfirió a tubos recubiertos de heparina sobre hielo. Después de centrifugación a 5400 rpm (3000 g) durante 15 min a 4°C, se determinó el colesterol total usando un kit de "Cholesterol CHOD-PAP" de Roche/Hitachi. El día 0, se inyectó a los ratones en la vena de la cola un vector adenovírico con sortilina o LacZ. Las mediciones del colesterol se hicieron el día 7 y 14, para evaluar el efecto de la proteína. En la figura 6 se ilustra el efecto. Los ratones con exceso de expresión de sortilina presentan un aumento notable del colesterol comparado con el día 0. Este aumento no se vio en ratones que recibieron LacZ. Se aplicó la transferencia Western a los hígados para verificar la cantidad aumentada de sortilina, y se llevó a cabo la tinción para LacZ para comprobar los ratones que recibieron el vector vírico con LacZ. Una transferencia Western de las apoproteínas B y E (figura 7) muestra un notable aumento de ApoB100 en ratones que recibieron el adenovirus con sortilina.

Ejemplo 4: Método de cribado in vitro para identificar antagonistas y ligandos del receptor con dominio Vps10p

La determinación de la unión directa del ligando a proteína inmovilizada se puede llevar a cabo por análisis de resonancia de plasmón de superficie (Biacore, Suecia) usando CaHBS como tampón de desarrollo convencional (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, y Tween-20 al 0,005%). Un chip biosensor de Biacore (CMS, nº de cat. BR-1000-14) se activa usando el método de NHS/EDC tal como lo describe el proveedor, seguido de revestimiento con un receptor que pertenece a la familia de receptores con dominio Vps10p. Se pueden aplicar varias metodologías diferentes. Los antagonistas del receptor candidatos se pueden identificar comparando la señal de unión (unidades de respuesta) a un chip inmovilizado con uno de los receptores y comparando esta

señal con una celda de flujo vacía. En otra metodología, la inhibición de un ligando establecido se puede seguir en ausencia o presencia de inhibidores putativos. La diferencia en la señal representa el potencial inhibidor del antagonista. Los datos recogidos se analizaron mediante el ajuste de sensogramas para las estimaciones de afinidad y potencial inhibidor utilizando el programa Biaevaluation versión 3.1.

- 5 Se evaluaron las propiedades de unión de ApoB a la sortilina (figura 5b). A) Después de calibración de los valores iniciales en tampón de desarrollo (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, CaCl_2 1,5 mM, P20 al 0,005%, pH 7,4), se aplicó al chip IgG de conejo anti-sortilina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Nykjaer et al., *Nature* (2004) 427:843-848) o tampón de desarrollo solo. En $t = 700$ s, las unidades de respuesta obtenidas en presencia de la IgG anti-sortilina se ajustaron de forma arbitraria a 100 y se aplicó ApoB 50 nM a la celda de flujo preincubada con anticuerpo o solo con tampón.
- 10 La asociación de la unión de ApoB se midió hasta 1200 segundos, después de lo cual el soluto se cambió a tampón para permitir la disociación. B) Datos extraídos del panel A. La unión de la ApoB en $t = 1200$ segundos a la celda de flujo después de preincubación con tampón de desarrollo solo (= máxima unión de ApoB) se ajustó a 100 unidades de respuesta relativas. Cuando se preincubó con el anticuerpo anti-sortilina inhibidor, no se observó unión de ApoB.
- 15 C) Análisis por resonancia de plasmón de superficie de la unión de ApoB (10, 20, 50 nM) a la sortilina inmovilizada. Se registraron las velocidades de asociación y disociación, y el valor de K_d era 0,4 nM para la unión a la sortilina en el experimento presentado. Por lo tanto, la ApoB se puede unir a la sortilina con alta afinidad, y esta unión se puede inhibir con anticuerpos o neurotensina (NT).

- 20 El ensayo de resonancia de plasmón de superficie puede ser fácilmente transformado en otros ensayos en los que el receptor con dominio Vps10p, el ligando o el inhibidor putativo se inmoviliza sobre una fase sólida. Por ejemplo, los receptores se pueden inmovilizar, por ejemplo en pocillos de microvaloración Maxisorp de Nunc (nº de cat. 439454) mediante incubación durante 16 horas a 4°C en NaHCO_3 50 mM, pH 9,6. Después del bloqueo usando albúmina de suero bovino al 5% (Sigma, nº de cat. A9647) durante 2 horas a temperatura ambiente, los pocillos se lavan tres veces con tampón MB (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl_2 2 mM, y MgCl_2 1 mM) antes de la incubación con un ligando marcado (por ejemplo, yodado) en ausencia o presencia de varias concentraciones de un inhibidor candidato.
- 25 Después de la incubación (por ejemplo, durante la noche a 4°C) y lavado con tampón MB, la radiactividad unida es liberada añadiendo SDS al 10%. Se determina la unión no específica de trazador a pocillos recubiertos sólo con albúmina de suero bovino y se resta de los valores determinados en los experimentos de unión. El punto de medición de la unión se puede ajustar a ecuaciones de unión usando el software Prism de GraphPad, versión 4. Del mismo modo, el antagonista se puede marcar y medir directamente la unión al receptor inmovilizado. En otra configuración más, el receptor, ligando o antagonista se pueden inmovilizar sobre perlas de centelleo y medir la unión en un ensayo de centelleo por proximidad en el que la molécula de unión al receptor se ha marcado usando radiactividad.
- 30

Ejemplo 5: Un método de cribado basado en células para identificar antagonistas de receptores con dominio Vps10p

- 35 La determinación de la unión, internalización o señalización por miembros de la familia de receptores con dominio Vps10p, se puede llevar a cabo en sistemas celulares. Células que expresan uno de los receptores, sea de forma endógena o después, p. ej., de transfección con un plásmido que contiene el ADNc del receptor, se incuban con un ligando radiomarcado, en ausencia y presencia respectivamente, de un compuesto inhibidor/antagonista candidato. Después de incubación, las células se lavan para separar la unión no específica y posteriormente se recogen. El grado de unión del inhibidor/antagonista candidato al receptor se determina usando un ensayo de radioligando convencional conocido para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bylund y Toews (1993) *Am. J. Physiol.* 265 (5 Pt1):L421-9 titulado "Radioligand binding methods: practical guide and tips". Igualmente, la endocitosis/internalización se pueden determinar como describen Nykjaer et al. (1992) *FEBS* 300:13- y Nielsen et al. (2001) *EMBO J.*, 20:2180-.
- 40

Ejemplo 6: Un método de cribado in vivo para identificar antagonistas de receptores con dominio Vps10p

- 45 La identificación de antagonistas candidatos capaces de inhibir la unión y/o internalización y/o señalización de un receptor con dominio Vps10p, se lleva a cabo en ratones genéticamente intactos u otros animales adecuados para este fin. Los animales se alimentan con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante un periodo de 4-6 semanas, durante cuyo periodo se administran a dicho animal antagonistas candidatos potencialmente capaces de inhibir la unión a, internalización por, y señalización a través de un receptor con dominio Vps10p (seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO. 1 a 5). Los animales de control se alimentan con una comida normal de una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante un periodo de 4-6 semanas en ausencia de compuestos antagonistas candidatos. Al final del periodo, los animales se dejan en ayunas una noche y se toman muestras de plasma y se analiza el nivel de colesterol en los dos grupos de animales. La diferencia entre el grupo al que se ha administrado el antagonista candidato y el grupo de control indican el grado de inhibición.
- 50

- 55 Ejemplo 7: Un método de cribado in vivo para identificar antagonistas de receptores con dominio Vps10p

La identificación de antagonistas candidatos capaces de inhibir la unión y/o internalización y/o señalización de un receptor con dominio Vps10p, se lleva a cabo en ratones genéticamente intactos u otros animales adecuados para este fin. Los animales se alimentan con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante un periodo de 4-6 semanas, durante cuyo periodo se administran a dicho animal antagonistas candidatos radiomarcados

5 potencialmente capaces de inhibir la unión a, internalización por, y señalización a través de un receptor con dominio Vps10p. Los animales de control se alimentan con una dieta de tipo occidental rica en lípidos durante un periodo de 4-6 semanas en ausencia de dichos compuestos antagonistas candidatos radiomarcados. Al final del periodo, los animales se dejan en ayunas una noche y se sacrifican, después de lo cual se diseccionan tejidos representativos y se determina la cantidad de ligando radiomarcado unido y/o acumulado usando un ensayo de centelleo convencional.

Ejemplo 8: Una evaluación in vivo de la potencia del antagonista del receptor con dominio Vps10p

10 Un paciente hipercolesterolémico se trata con un tratamiento convencional (p. ej., una estatina) o régimen dietético, de modo que se determina el nivel de colesterol en el suero. Posteriormente, el paciente sustituye su tratamiento con estatina durante 1 mes por el antagonista del receptor con dominio Vps10p durante hasta 4-6 semanas con una preparación de acuerdo con la presente invención, de modo que se determina de nuevo el nivel de colesterol y se compara con el nivel obtenido con o sin el tratamiento convencional (p. ej., una estatina) o régimen dietético.

Ejemplo 9: Método de tratamiento

15 Se diagnostica a un hombre de 55 años de edad una hiperlipidemia grave. El médico a cargo decide que el paciente recibirá antagonistas del receptor con dominio Vps10p para reducir los niveles de lípidos plasmáticos anómalos. Se administra una inyección de bolo subcutáneo o intravenosa de un compuesto de esta invención. La dosis está en el intervalo de 0,5 mg/kg a 50 mg/kg. En el hospital se controlan continuamente los niveles plasmáticos de lípidos así como el estado general del paciente, hasta que se obtiene un nivel plasmático de lípidos estable normal. Se prescribe al paciente inyección o un equivalente disponible por vía oral del compuesto de la invención inyectado en el hospital. La dosis oral está en el intervalo de 0,5 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal.

Ejemplo 10: Método de tratamiento

25 Se diagnostica a un hombre de 55 años de edad hipercolesterolemia durante un periodo más largo. La intervención convencional no ha reducido suficientemente el colesterol plasmático. Una medición de la sortilina en el hígado muestra niveles altos. Se decide en el departamento reducir la concentración de sortilina en el hígado usando un ARNip dirigido al hígado. En el hospital, se controlan continuamente los niveles de lípidos plasmáticos así como el estado general del paciente hasta que se obtiene un nivel plasmático de lípidos estable normal. Se prescribe al paciente inyección o un equivalente disponible por vía oral del compuesto de la invención inyectado en el hospital.

Referencias

1. Goldstein, J. L., Hobbs, H. H. y Brown, M. S. (2001). Familial Hypercholesterolemia. In: *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8ª edición, New York: McGraw-Hill, 2863-2913.
2. Tannock LR. Advances in the management of hyperlipidemia-induced atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008 Mar;6(3):369-83.
3. Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol.* 2008 Jan;93(1):27-42..
4. Baker SK, Samjoo IA. A neuromuscular approach to statin-related myotoxicity. *Can J Neurol Sci.* 2008 Mar;35(1):8-21.
5. Radcliffe KA, Campbell WW. Statin myopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2008 Jan;8(1):66-72.
6. Petersen et al., *J. Biol. Chem.*, 272:3599-3605 (1997)
7. Herman-Borgmeyer et al., *Mol. Brain Res.*, 65:216-219 (1999)
8. Jacobsen et al., *J. Biol. Chem.*, 271:31379-31383 (1996)
9. Marcusson, E.G., et al., *Cell*, 77:579-586 (1994)
10. J. Mazella et al., *J Biol Chem* 273, 26273 (1998).
11. C. Munck Petersen et al., *Embo J* 18, 595 (1999).
12. A. Nykjaer et al., *Nature* 427, 843 (2004).
13. H. K. Teng et al., *J Neurosci* 25, 5455 (2005).
14. U. B. Westergaard et al., *J Biol Chem* 279, 50221 (2004).
15. S. Maeda et al., *J Cell Physiol* 193, 73 (2002).
16. M. S. Nielsen, C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, C. M. Petersen, *J Biol Chem* 274, 8832 (1999).
17. M. S. Nielsen et al., *Embo J* 20, 2180 (2001).
18. K. Nakamura, K. Namekata, C. Harada, T. Harada, *Cell Death Differ* 14, 1552 (2007).
19. P. Jansen et al., *Nat Neurosci* 10, 1449 (2007).
20. P. Chalon et al., *FEBS Lett* 386, 91 (1996).
21. L. Jacobsen et al., *J Biol Chem* 276, 22788 (2001).
22. K. Tanaka, M. Masu, S. Nakanishi, *Neuron* 4, 847 (1990).
23. J. P. Vincent, J. Mazella, P. Kitabgi, *Trends Pharmacol Sci* 20, 302 (1999).
24. Willer et al. (2008) *Nature Genetics* 40(2): 161-169
25. Kathiresan et al. (2008) *Nature Genetics* 40(2): 189-97
26. U.B. Westergaard, K. Kirkegaard, E.S. Sørensen, C. Jacobsen, M.S. Nielsen, C.M. Petersen, P. Madsen, (2005) *FEBS Letters* 579:1172–1176

27. Clee SM, Yandell BS, Schueler KM, Rabaglia OC, Richards OC, Raines SM, Kabara EA, Klass DM, Mui ET, Stapleton DS, Gray-Keller MP, Young MB, Stoehr JP, Lan H, Boronenkov I et al. Positional cloning of SorCS1, a type 2 diabetes quantitative trait locus. (2006) *Nature Genetics* 38:688–693
28. Goodarzi MO, Lehman DM, Taylor KD, Guo X, Cui J, Quinones MJ, Clee SM, Blangero J, Hsueh WA, Attie AD, Stern MP, Rotter JI. SorCS1: a novel human type 2 diabetes susceptibility gene suggested by the mouse. (2007) *Diabetes* 56:1922–1929.
29. Granhall, C., Rosengren, A.H., Renström, E., Luthman, H. (2006) *Diabetes* 55: 3494-3500.
30. Quistgaard et al, *Nat. Struc. Mol. Biol.* (2009) 16: 96-98

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NeuronIcon ApS

<120> Modulación de los receptores con dominio Vps10p para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular

5 <130> P1895PC00

<160> 15

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 831

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(33)

20 <223> Péptido señal de sortilina

<220>

<221> PROPEP

<222> (34)..(77)

25 <223> Propéptido de sortilina

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (78)..(755)

30 <223> Parte extracelular de sortilina (ssortilin)

<220>

<221> TRANSMEM

<222> (756)..(778)

35 <223> Parte de la sortilina que atraviesa la membrana

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (779)..(831)

40 <223> Dominio intracelular (citoplasmático) de sortilina

<400> 1

Met Glu Arg Pro Trp Gly Ala Ala Asp Gly Leu Ser Arg Trp Pro His
1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gln Leu Leu Pro Pro Ser Thr Leu
20 25 30

Ser Gln Asp Arg Leu Asp Ala Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Leu Pro
35 40 45

Arg Trp Ser Gly Pro Ile Gly Val Ser Trp Gly Leu Arg Ala Ala Ala
50 55 60

Ala Gly Gly Ala Phe Pro Arg Gly Gly Arg Trp Arg Arg Ser Ala Pro
65 70 75 80

Gly Glu Asp Glu Glu Cys Gly Arg Val Arg Asp Phe Val Ala Lys Leu
85 90 95

Ala Asn Asn Thr His Gln His Val Phe Asp Asp Leu Arg Gly Ser Val
100 105 110

Ser Leu Ser Trp Val Gly Asp Ser Thr Gly Val Ile Leu Val Leu Thr
115 120 125

Thr Phe His Val Pro Leu Val Ile Met Thr Phe Gly Gln Ser Lys Leu
130 135 140

Tyr Arg Ser Glu Asp Tyr Gly Lys Asn Phe Lys Asp Ile Thr Asp Leu
145 150 155 160

Ile Asn Asn Thr Phe Ile Arg Thr Glu Phe Gly Met Ala Ile Gly Pro
165 170 175

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

Arg Gly Gly Arg Ile Phe Arg Ser Ser Asp Phe Ala Lys Asn Phe Val
195 200 205

Gln Thr Asp Leu Pro Phe His Pro Leu Thr Gln Met Met Tyr Ser Pro
210 215 220

Gln Asn Ser Asp Tyr Leu Leu Ala Leu Ser Thr Glu Asn Gly Leu Trp
225 230 235 240

Val Ser Lys Asn Phe Gly Gly Lys Trp Glu Glu Ile His Lys Ala Val
245 250 255

Cys Leu Ala Lys Trp Gly Ser Asp Asn Thr Ile Phe Phe Thr Thr Tyr
260 265 270

Ala Asn Gly Ser Cys Lys Ala Asp Leu Gly Ala Leu Glu Leu Trp Arg
275 280 285

Thr Ser Asp Leu Gly Lys Ser Phe Lys Thr Ile Gly Val Lys Ile Tyr
290 295 300

Ser Phe Gly Leu Gly Gly Arg Phe Leu Phe Ala Ser Val Met Ala Asp
305 310 315 320

Lys Asp Thr Thr Arg Arg Ile His Val Ser Thr Asp Gln Gly Asp Thr
325 330 335

Trp Ser Met Ala Gln Leu Pro Ser Val Gly Gln Glu Gln Phe Tyr Ser
340 345 350

Ile Leu Ala Ala Asn Asp Asp Met Val Phe Met His Val Asp Glu Pro
355 360 365

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

```

        645              650              655
Tyr Val Val Thr Lys Gln Pro Ser Ile Cys Leu Cys Ser Leu Glu Asp
        660              665              670
Phe Leu Cys Asp Phe Gly Tyr Tyr Arg Pro Glu Asn Asp Ser Lys Cys
        675              680              685
Val Glu Gln Pro Glu Leu Lys Gly His Asp Leu Glu Phe Cys Leu Tyr
        690              695              700
Gly Arg Glu Glu His Leu Thr Thr Asn Gly Tyr Arg Lys Ile Pro Gly
        705              710              715              720
Asp Lys Cys Gln Gly Gly Val Asn Pro Val Arg Glu Val Lys Asp Leu
        725              730              735
Lys Lys Lys Cys Thr Ser Asn Phe Leu Ser Pro Glu Lys Gln Asn Ser
        740              745              750
Lys Ser Asn Ser Val Pro Ile Ile Leu Ala Ile Val Gly Leu Met Leu
        755              760              765
Val Thr Val Val Ala Gly Val Leu Ile Val Lys Lys Tyr Val Cys Gly
        770              775              780
Gly Arg Phe Leu Val His Arg Tyr Ser Val Leu Gln Gln His Ala Glu
        785              790              795              800
Ala Asn Gly Val Asp Gly Val Asp Ala Leu Asp Thr Ala Ser His Thr
        805              810              815
Asn Lys Ser Gly Tyr His Asp Asp Ser Asp Glu Asp Leu Leu Glu
        820              825              830

```

<210> 2
 <211> 2214
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(28)
 <223> Péptido señal de SorLA

<220>
 <221> PROPEP
 <222> (29)..(81)
 <223> Propéptido de SorLA

<400> 2
 Met Ala Thr Arg Ser Ser Arg Arg Glu Ser Arg Leu Pro Phe Leu Phe
 1 5 10 15

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

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

Ser Glu Lys Pro Val Phe Val Tyr Gly Leu Leu Thr Glu Pro Gly Glu
580 585 590

Lys Ser Thr Val Phe Thr Ile Phe Gly Ser Asn Lys Glu Asn Val His
595 600 605

Ser Trp Leu Ile Leu Gln Val Asn Ala Thr Asp Ala Leu Gly Val Pro
610 615 620

Cys Thr Glu Asn Asp Tyr Lys Leu Trp Ser Pro Ser Asp Glu Arg Gly
625 630 635 640

Asn Glu Cys Leu Leu Gly His Lys Thr Val Phe Lys Arg Arg Thr Pro
645 650 655

His Ala Thr Cys Phe Asn Gly Glu Asp Phe Asp Arg Pro Val Val Val
660 665 670

Ser Asn Cys Ser Cys Thr Arg Glu Asp Tyr Glu Cys Asp Phe Gly Phe
675 680 685

Lys Met Ser Glu Asp Leu Ser Leu Glu Val Cys Val Pro Asp Pro Glu
690 695 700

Phe Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Pro Pro Val Pro Cys Pro Val Gly Ser
705 710 715 720

Thr Tyr Arg Arg Thr Arg Gly Tyr Arg Lys Ile Ser Gly Asp Thr Cys
725 730 735

Ser Gly Gly Asp Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Glu Leu Val Pro Cys
740 745 750

Pro Leu Ala Glu Glu Asn Glu Phe Ile Leu Tyr Ala Val Arg Lys Ser
755 760 765

Ile Tyr Arg Tyr Asp Leu Ala Ser Gly Ala Thr Glu Gln Leu Pro Leu
770 775 780

Thr Gly Leu Arg Ala Ala Val Ala Leu Asp Phe Asp Tyr Glu His Asn
785 790 795 800

Cys Leu Tyr Trp Ser Asp Leu Ala Leu Asp Val Ile Gln Arg Leu Cys
805 810 815

Leu Asn Gly Ser Thr Gly Gln Glu Val Ile Ile Asn Ser Gly Leu Glu
820 825 830

Thr Val Glu Ala Leu Ala Phe Glu Pro Leu Ser Gln Leu Leu Tyr Trp
835 840 845

Val Asp Ala Gly Phe Lys Lys Ile Glu Val Ala Asn Pro Asp Gly Asp
850 855 860

Phe Arg Leu Thr Ile Val Asn Ser Ser Val Leu Asp Arg Pro Arg Ala
865 870 875 880

Leu Val Leu Val Pro Gln Glu Gly Val Met Phe Trp Thr Asp Trp Gly
885 890 895

Asp Leu Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Ser Asn Met Asp Gly Ser Ala Ala
900 905 910

Tyr His Leu Val Ser Glu Asp Val Lys Trp Pro Asn Gly Ile Ser Val
915 920 925

Asp Asp Gln Trp Ile Tyr Trp Thr Asp Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Glu
930 935 940

Arg Ile Thr Phe Ser Gly Gln Gln Arg Ser Val Ile Leu Asp Asn Leu
945 950 955 960

Pro His Pro Tyr Ala Ile Ala Val Phe Lys Asn Glu Ile Tyr Trp Asp
965 970 975

Asp Trp Ser Gln Leu Ser Ile Phe Arg Ala Ser Lys Tyr Ser Gly Ser
980 985 990

Gln Met Glu Ile Leu Ala Asn Gln Leu Thr Gly Leu Met Asp Met Lys
995 1000 1005

Ile Phe Tyr Lys Gly Lys Asn Thr Gly Ser Asn Ala Cys Val Pro
1010 1015 1020

Arg Pro Cys Ser Leu Leu Cys Leu Pro Lys Ala Asn Asn Ser Arg
1025 1030 1035

Ser Cys Arg Cys Pro Glu Asp Val Ser Ser Ser Val Leu Pro Ser
1040 1045 1050

Gly Asp Leu Met Cys Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Gln Leu Lys Asn
1055 1060 1065

Asn Thr Cys Val Lys Glu Glu Asn Thr Cys Leu Arg Asn Gln Tyr
1070 1075 1080

Arg Cys Ser Asn Gly Asn Cys Ile Asn Ser Ile Trp Trp Cys Asp
1085 1090 1095

Phe Asp Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Arg Asn Cys Pro
1100 1105 1110

Thr Thr Ile Cys Asp Leu Asp Thr Gln Phe Arg Cys Gln Glu Ser
1115 1120 1125

Gly Thr Cys Ile Pro Leu Ser Tyr Lys Cys Asp Leu Glu Asp Asp
1130 1135 1140

Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ser His Cys Glu Met His Gln Cys
1145 1150 1155

Arg Ser Asp Glu Tyr Asn Cys Ser Ser Gly Met Cys Ile Arg Ser
1160 1165 1170

Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp
1175 1180 1185

Glu Ala Asn Cys Thr Ala Ile Tyr His Thr Cys Glu Ala Ser Asn
1190 1195 1200

Phe Gln Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Gln Arg Trp Ala Cys
1205 1210 1215

Asp Gly Asp Thr Asp Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu Asp Pro Val
1220 1225 1230

Asn Cys Glu Lys Lys Cys Asn Gly Phe Arg Cys Pro Asn Gly Thr
1235 1240 1245

Cys Ile Pro Ser Ser Lys His Cys Asp Gly Leu Arg Asp Cys Ser
1250 1255 1260

Asp Gly Ser Asp Glu Gln His Cys Glu Pro Leu Cys Thr His Phe
1265 1270 1275

Met Asp Phe Val Cys Lys Asn Arg Gln Gln Cys Leu Phe His Ser
1280 1285 1290

Met Val Cys Asp Gly Ile Ile Gln Cys Arg Asp Gly Ser Asp Glu
1295 1300 1305

Asp Ala Ala Phe Ala Gly Cys Ser Gln Asp Pro Glu Phe His Lys
1310 1315 1320

Val Cys Asp Glu Phe Gly Phe Gln Cys Gln Asn Gly Val Cys Ile
1325 1330 1335

Ser Leu Ile Trp Lys Cys Asp Gly Met Asp Asp Cys Gly Asp Tyr
1340 1345 1350

Ser Asp Glu Ala Asn Cys Glu Asn Pro Thr Glu Ala Pro Asn Cys
1355 1360 1365

Ser Arg Tyr Phe Gln Phe Arg Cys Glu Asn Gly His Cys Ile Pro

1370	1375	1380
Asn Arg 1385	Trp Lys Cys Asp Arg 1390	Glu Asn Asp Cys Gly 1395
Asp Glu 1400	Lys Asp Cys Gly Asp 1405	Ser His Ile Leu Pro 1410
Pro Gly 1415	Pro Ser Thr Cys Leu 1420	Pro Asn Tyr Tyr Arg 1425
Gly Thr 1430	Cys Val Met Asp Thr 1435	Trp Val Cys Asp Gly 1440
Cys Ala 1445	Asp Gly Ser Asp Glu 1450	Glu Ala Cys Pro Leu 1455
Val Thr 1460	Ala Ala Ser Thr Pro 1465	Thr Gln Leu Gly Arg 1470
Phe Glu 1475	Phe Glu Cys His Gln 1480	Pro Lys Thr Cys Ile 1485
Lys Arg 1490	Cys Asp Gly His Gln 1495	Asp Cys Gln Asp Gly 1500
Ala Asn 1505	Cys Pro Thr His Ser 1510	Thr Leu Thr Cys Met 1515
Phe Gln 1520	Cys Glu Asp Gly Glu 1525	Ala Cys Ile Val Leu 1530
Cys Asp 1535	Gly Phe Leu Asp Cys 1540	Ser Asp Glu Ser Asp 1545
Cys Ser 1550	Asp Glu Leu Thr Val 1555	Tyr Lys Val Gln Asn 1560
Thr Ala 1565	Asp Phe Ser Gly Asp 1570	Val Thr Leu Thr Trp 1575
Lys Lys 1580	Met Pro Ser Ala Ser 1585	Cys Val Tyr Asn Val 1590
Val Val 1595	Gly Glu Ser Ile Trp 1600	Lys Thr Leu Glu Thr 1605
Lys Thr 1610	Asn Thr Val Leu Lys 1615	Val Leu Lys Pro Asp 1620
Gln Val 1625	Lys Val Gln Val Gln 1630	Cys Leu Ser Lys Ala 1635

Asn Asp Phe Val Thr Leu Arg Thr Pro Glu Gly Leu Pro Asp Ala
 1640 1645 1650
 Pro Arg Asn Leu Gln Leu Ser Leu Pro Arg Glu Ala Glu Gly Val
 1655 1660 1665
 Ile Val Gly His Trp Ala Pro Pro Ile His Thr His Gly Leu Ile
 1670 1675 1680
 Arg Glu Tyr Ile Val Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Lys Met Trp
 1685 1690 1695
 Ala Ser Gln Arg Ala Ala Ser Asn Phe Thr Glu Ile Lys Asn Leu
 1700 1705 1710
 Leu Val Asn Thr Leu Tyr Thr Val Arg Val Ala Ala Val Thr Ser
 1715 1720 1725
 Arg Gly Ile Gly Asn Trp Ser Asp Ser Lys Ser Ile Thr Thr Ile
 1730 1735 1740
 Lys Gly Lys Val Ile Pro Pro Pro Asp Ile His Ile Asp Ser Tyr
 1745 1750 1755
 Gly Glu Asn Tyr Leu Ser Phe Thr Leu Thr Met Glu Ser Asp Ile
 1760 1765 1770
 Lys Val Asn Gly Tyr Val Val Asn Leu Phe Trp Ala Phe Asp Thr
 1775 1780 1785
 His Lys Gln Glu Arg Arg Thr Leu Asn Phe Arg Gly Ser Ile Leu
 1790 1795 1800
 Ser His Lys Val Gly Asn Leu Thr Ala His Thr Ser Tyr Glu Ile
 1805 1810 1815
 Ser Ala Trp Ala Lys Thr Asp Leu Gly Asp Ser Pro Leu Ala Phe
 1820 1825 1830
 Glu His Val Met Thr Arg Gly Val Arg Pro Pro Ala Pro Ser Leu
 1835 1840 1845
 Lys Ala Lys Ala Ile Asn Gln Thr Ala Val Glu Cys Thr Trp Thr
 1850 1855 1860
 Gly Pro Arg Asn Val Val Tyr Gly Ile Phe Tyr Ala Thr Ser Phe
 1865 1870 1875
 Leu Asp Leu Tyr Arg Asn Pro Lys Ser Leu Thr Thr Ser Leu His
 1880 1885 1890

Asn Lys Thr Val Ile Val Ser Lys Asp Gly Gln Tyr Leu Phe Leu
 1895 1900 1905
 Val Arg Val Val Val Pro Tyr Gln Gly Pro Ser Ser Asp Tyr Val
 1910 1915 1920
 Val Val Lys Met Ile Pro Asp Ser Arg Leu Pro Pro Arg His Leu
 1925 1930 1935
 His Val Val His Thr Gly Lys Thr Ser Val Val Ile Lys Trp Glu
 1940 1945 1950
 Ser Pro Tyr Asp Ser Pro Asp Gln Asp Leu Leu Tyr Ala Ile Ala
 1955 1960 1965
 Val Lys Asp Leu Ile Arg Lys Thr Asp Arg Ser Tyr Lys Val Lys
 1970 1975 1980
 Ser Arg Asn Ser Thr Val Glu Tyr Thr Leu Asn Lys Leu Glu Pro
 1985 1990 1995
 Gly Gly Lys Tyr His Ile Ile Val Gln Leu Gly Asn Met Ser Lys
 2000 2005 2010
 Asp Ser Ser Ile Lys Ile Thr Thr Val Ser Leu Ser Ala Pro Asp
 2015 2020 2025
 Ala Leu Lys Ile Ile Thr Glu Asn Asp His Val Leu Leu Phe Trp
 2030 2035 2040
 Lys Ser Leu Ala Leu Lys Glu Lys His Phe Asn Glu Ser Arg Gly
 2045 2050 2055
 Tyr Glu Ile His Met Phe Asp Ser Ala Met Asn Ile Thr Ala Tyr
 2060 2065 2070
 Leu Gly Asn Thr Thr Asp Asn Phe Phe Lys Ile Ser Asn Leu Lys
 2075 2080 2085
 Met Gly His Asn Tyr Thr Phe Thr Val Gln Ala Arg Cys Leu Phe
 2090 2095 2100
 Gly Asn Gln Ile Cys Gly Glu Pro Ala Ile Leu Leu Tyr Asp Glu
 2105 2110 2115
 Leu Gly Ser Gly Ala Asp Ala Ser Ala Thr Gln Ala Ala Arg Ser
 2120 2125 2130
 Thr Asp Val Ala Ala Val Val Val Pro Ile Leu Phe Leu Ile Leu
 2135 2140 2145

Leu Ser Leu Gly Val Gly Phe Ala Ile Leu Tyr Thr Lys His Arg
2150 2155 2160

Arg Leu Gln Ser Ser Phe Thr Ala Phe Ala Asn Ser His Tyr Ser
2165 2170 2175

Ser Arg Leu Gly Ser Ala Ile Phe Ser Ser Gly Asp Asp Leu Gly
2180 2185 2190

Glu Asp Asp Glu Asp Ala Pro Met Ile Thr Gly Phe Ser Asp Asp
2195 2200 2205

Val Pro Met Val Ile Ala
2210

<210> 3

<211> 1168

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Met Gly Lys Val Gly Ala Gly Gly Gly Ser Gln Ala Arg Leu Ser Ala
1 5 10 15

Leu Leu Ala Gly Ala Gly Leu Leu Ile Leu Cys Ala Pro Gly Val Cys
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Cys Cys Pro Ser Pro His Pro Ser Ser Ala Pro Arg
35 40 45

Ser Ala Ser Thr Pro Arg Gly Phe Ser His Gln Gly Arg Pro Gly Arg
50 55 60

Ala Pro Ala Thr Pro Leu Pro Leu Val Val Arg Pro Leu Phe Ser Val
65 70 75 80

Ala Pro Gly Asp Arg Ala Leu Ser Leu Glu Arg Ala Arg Gly Thr Gly
85 90 95

Ala Ser Met Ala Val Ala Ala Arg Ser Gly Arg Arg Arg Arg Ser Gly
100 105 110

Ala Asp Gln Glu Lys Ala Glu Arg Gly Glu Gly Ala Ser Arg Ser Pro
115 120 125

Arg Gly Val Leu Arg Asp Gly Gly Gln Gln Glu Pro Gly Thr Arg Glu
130 135 140

Arg Asp Pro Asp Lys Ala Thr Arg Phe Arg Met Glu Glu Leu Arg Leu
145 150 155 160

Thr Ser Thr Thr Phe Ala Leu Thr Gly Asp Ser Ala His Asn Gln Ala
165 170 175

5

10

Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr
180 185 190

Lys Leu Tyr Asp Tyr Asn Leu Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Leu Trp
195 200 205

Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val
210 215 220

Gly Leu Lys Thr Ile Leu Gly Tyr Leu Tyr Val Cys Pro Thr Asn Lys
225 230 235 240

Arg Lys Ile Met Leu Leu Thr Asp Pro Glu Ile Glu Ser Ser Leu Leu
245 250 255

Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr Gln Lys Tyr Arg Leu Asn Phe
260 265 270

Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro Lys Gln Glu Asp Trp Ile Leu
275 280 285

Ala Tyr Ser Gln Asp Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Ala Glu Phe Gly Arg
290 295 300

Arg Trp Gln Leu Ile Gln Glu Gly Val Val Pro Asn Arg Phe Tyr Trp
305 310 315 320

Ser Val Met Gly Ser Asn Lys Glu Pro Asp Leu Val His Leu Glu Ala
325 330 335

Arg Thr Val Asp Gly His Ser His Tyr Leu Thr Cys Arg Met Gln Asn
340 345 350

Cys Thr Glu Ala Asn Arg Asn Gln Pro Phe Pro Gly Tyr Ile Asp Pro
355 360 365

Asp Ser Leu Ile Val Gln Asp His Tyr Val Phe Val Gln Leu Thr Ser
370 375 380

Gly Gly Arg Pro His Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Ala Phe Ala
385 390 395 400

Gln Met Lys Leu Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Met His Val Ile
405 410 415

Ser Thr Asp Glu Asn Gln Val Phe Ala Ala Val Gln Glu Trp Asn Gln
420 425 430

Asn Asp Thr Tyr Asn Leu Tyr Ile Ser Asp Thr Arg Gly Val Tyr Phe
435 440 445

Thr Leu Ala Leu Glu Asn Val Gln Ser Ser Arg Gly Pro Glu Gly Asn
 450 455 460
 Ile Met Ile Asp Leu Tyr Glu Val Ala Gly Ile Lys Gly Met Phe Leu
 465 470 475 480
 Ala Asn Lys Lys Ile Asp Tyr Gln Val Lys Thr Phe Ile Thr Tyr Asn
 485 490 495
 Lys Gly Arg Asp Trp Arg Leu Leu Gln Ala Pro Asp Thr Asp Leu Arg
 500 505 510
 Gly Asp Pro Val His Cys Leu Leu Pro Tyr Cys Ser Leu His Leu His
 515 520 525
 Leu Lys Val Ser Glu Asn Pro Tyr Thr Ser Gly Ile Ile Ala Ser Lys
 530 535 540
 Asp Thr Ala Pro Ser Ile Ile Val Ala Ser Gly Asn Ile Gly Ser Glu
 545 550 555 560
 Leu Ser Asp Thr Asp Ile Ser Met Phe Val Ser Ser Asp Ala Gly Asn
 565 570 575
 Thr Trp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Glu His Ser Val Leu Tyr Leu Asp
 580 585 590
 Gln Gly Gly Val Leu Val Ala Met Lys His Thr Ser Leu Pro Ile Arg
 595 600 605
 His Leu Trp Leu Ser Phe Asp Glu Gly Arg Ser Trp Ser Lys Tyr Ser
 610 615 620
 Phe Thr Ser Ile Pro Leu Phe Val Asp Gly Val Leu Gly Glu Pro Gly
 625 630 635 640
 Glu Glu Thr Leu Ile Met Thr Val Phe Gly His Phe Ser His Arg Ser
 645 650 655
 Glu Trp Gln Leu Val Lys Val Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Arg Arg
 660 665 670
 Cys Ala Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Trp Gln Leu His Ser Gln Gly Glu
 675 680 685
 Ala Cys Ile Met Gly Ala Lys Arg Ile Tyr Lys Lys Arg Lys Ser Glu
 690 695 700
 Arg Lys Cys Met Gln Gly Lys Tyr Ala Gly Ala Met Glu Ser Glu Pro
 705 710 715 720

Cys Val Cys Thr Glu Ala Asp Phe Asp Cys Asp Tyr Gly Tyr Glu Arg
 725 730 735
 His Ser Asn Gly Gln Cys Leu Pro Ala Phe Trp Phe Asn Pro Ser Ser
 740 745 750
 Leu Ser Lys Asp Cys Ser Leu Gly Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly
 755 760 765
 Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Asn Cys Thr Asp Gly Val Arg Glu Gln
 770 775 780
 Tyr Thr Ala Lys Pro Gln Lys Cys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu
 785 790 795 800
 Arg Ile Val Thr Ala Asp Gly Lys Leu Thr Ala Glu Gln Gly His Asn
 805 810 815
 Val Thr Leu Met Val Gln Leu Glu Gly Asp Val Gln Arg Thr Leu
 820 825 830
 Ile Gln Val Asp Phe Gly Asp Gly Ile Ala Val Ser Tyr Val Asn Leu
 835 840 845
 Ser Ser Met Glu Asp Gly Ile Lys His Val Tyr Gln Asn Val Gly Ile
 850 855 860
 Phe Arg Val Thr Val Gln Val Asp Asn Ser Leu Gly Ser Asp Ser Ala
 865 870 875 880
 Val Leu Tyr Leu His Val Thr Cys Pro Leu Glu His Val His Leu Ser
 885 890 895
 Leu Pro Phe Val Thr Thr Lys Asn Lys Glu Val Asn Ala Thr Ala Val
 900 905 910
 Leu Trp Pro Ser Gln Val Gly Thr Leu Thr Tyr Val Trp Trp Tyr Gly
 915 920 925
 Asn Asn Thr Glu Pro Leu Ile Thr Leu Glu Gly Ser Ile Ser Phe Arg
 930 935 940
 Phe Thr Ser Glu Gly Met Asn Thr Ile Thr Val Gln Val Ser Ala Gly
 945 950 955 960
 Asn Ala Ile Leu Gln Asp Thr Lys Thr Ile Ala Val Tyr Glu Glu Phe
 965 970 975
 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Phe Ser Pro Asn Leu Asp Asp Tyr Asn Pro
 980 985 990
 Asp Ile Pro Glu Trp Arg Arg Asp Ile Gly Arg Val Ile Lys Lys Ser

995	1000	1005
Leu Val 1010	Glu Ala Thr Gly Val 1015	Pro Gly Gln His Ile 1020
Val Leu 1025	Pro Gly Leu Pro Thr 1030	Thr Ala Glu Leu Phe 1035
Tyr Gln 1040	Asp Pro Ala Gly Glu 1045	Asn Lys Arg Ser Thr 1050
Glu Gln 1055	Ile Ser Glu Leu Leu 1060	Ile His Thr Leu Asn 1065
Val His 1070	Phe Glu Leu Lys Pro 1075	Gly Val Arg Val Leu 1080
Ala His 1085	Leu Thr Ala Ala Pro 1090	Leu Val Asp Leu Thr 1095
Ser Gly 1100	Ser Ala Met Leu Met 1105	Leu Leu Ser Val Val 1110
Leu Ala 1115	Val Phe Val Ile Tyr 1120	Lys Phe Lys Arg Arg 1125
Pro Ser 1130	Pro Pro Ser Pro Ser 1135	Thr Gln Pro Gly Asp 1140
Arg Leu 1145	Gln Arg Ala Arg His 1150	Ala Thr Pro Pro Ser 1155
Arg Gly 1160	Ser Ala Gly Ala Gln 1165	Tyr Ala Ile

<210> 4

<211> 907

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Leu Ile Phe His Pro Lys Glu Glu Asp Lys Val Leu Ala Tyr Thr Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Leu Tyr Val Ser Ser Asp Leu Gly Lys Lys Trp Thr Leu
20 25 30

Leu Gln Glu Arg Val Thr Lys Asp His Val Phe Trp Ser Val Ser Gly
35 40 45

Val Asp Ala Asp Pro Asp Leu Val His Val Glu Ala Gln Asp Leu Gly
50 55 60

10

Gly Asp Phe Arg Tyr Val Thr Cys Ala Ile His Asn Cys Ser Glu Lys
65 70 75 80

Met Leu Thr Ala Pro Phe Ala Gly Pro Ile Asp His Gly Ser Leu Thr
85 90 95

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

Lys Tyr Tyr Val Ser Tyr Arg Arg Asn Glu Phe Val Leu Met Lys Leu
115 120 125

Pro Lys Tyr Ala Leu Pro Lys Asp Leu Gln Ile Ile Ser Thr Asp Glu
130 135 140

Ser Gln Val Phe Val Ala Val Gln Glu Trp Tyr Gln Met Asp Thr Tyr
145 150 155 160

Asn Leu Tyr Gln Ser Asp Pro Arg Gly Val Arg Tyr Ala Leu Val Leu
165 170 175

Gln Asp Val Arg Ser Ser Arg Gln Ala Glu Glu Ser Val Leu Ile Asp
180 185 190

Ile Leu Glu Val Arg Gly Val Lys Gly Val Phe Leu Ala Asn Gln Lys
195 200 205

Ile Asp Gly Lys Val Met Thr Leu Ile Thr Tyr Asn Lys Gly Arg Asp
210 215 220

Trp Asp Tyr Leu Arg Pro Pro Ser Met Asp Met Asn Gly Lys Pro Thr
225 230 235 240

Asn Cys Lys Pro Pro Asp Cys His Leu His Leu His Leu Arg Trp Ala
245 250 255

Asp Asn Pro Tyr Val Ser Gly Thr Val His Thr Lys Asp Thr Ala Pro
260 265 270

Gly Leu Ile Met Gly Ala Gly Asn Leu Gly Ser Gln Leu Val Glu Tyr
275 280 285

Lys Glu Glu Met Tyr Ile Thr Ser Asp Cys Gly His Thr Trp Arg Gln
290 295 300

Val Phe Glu Glu Glu His His Ile Leu Tyr Leu Asp His Gly Gly Val
305 310 315 320

Ile Val Ala Ile Lys Asp Thr Ser Ile Pro Leu Lys Ile Leu Lys Phe
325 330 335

Ser Val Asp Glu Gly Leu Thr Trp Ser Thr His Asn Phe Thr Ser Thr
340 345 350

Ser Val Phe Val Asp Gly Leu Leu Ser Glu Pro Gly Asp Glu Thr Leu
355 360 365

Val Met Thr Val Phe Gly His Ile Ser Phe Arg Ser Asp Trp Glu Leu
370 375 380

Val Lys Val Asp Phe Arg Pro Ser Phe Ser Arg Gln Cys Gly Glu Glu
385 390 395 400

Asp Tyr Ser Ser Trp Glu Leu Ser Asn Leu Gln Gly Asp Arg Cys Ile
405 410 415

Met Gly Gln Gln Arg Ser Phe Arg Lys Arg Lys Ser Thr Ser Trp Cys
420 425 430

Ile Lys Gly Arg Ser Phe Thr Ser Ala Leu Thr Ser Arg Val Cys Glu
435 440 445

Cys Arg Asp Ser Asp Phe Leu Cys Asp Tyr Gly Phe Glu Arg Ser Pro
450 455 460

Ser Ser Glu Ser Ser Thr Asn Lys Cys Ser Ala Asn Phe Trp Phe Asn
465 470 475 480

Pro Leu Ser Pro Pro Asp Asp Cys Ala Leu Gly Gln Thr Tyr Thr Ser
485 490 495

Ser Leu Gly Tyr Arg Lys Val Val Ser Asn Val Cys Glu Gly Gly Val
500 505 510

Asp Met Gln Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Cys Pro Leu Thr Pro Pro
515 520 525

Arg Gly Leu Gln Val Ser Ile Gln Gly Glu Ala Val Ala Val Arg Pro
530 535 540

Gly Glu Asp Val Leu Phe Val Val Arg Gln Glu Gln Gly Asp Val Leu
545 550 555 560

Thr Thr Lys Tyr Gln Val Asp Leu Gly Asp Gly Phe Lys Ala Met Tyr
565 570 575

Val Asn Leu Thr Leu Thr Gly Glu Pro Ile Arg His Arg Tyr Glu Ser
580 585 590

Pro Gly Ile Tyr Arg Val Ser Val Arg Ala Glu Asn Thr Ala Gly His
595 600 605

Asp Glu Ala Val Leu Phe Val Gln Val Asn Ser Pro Leu Gln Ala Leu

ES 2 533 787 T3

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

Asn Ser Arg Glu Met His Ser Tyr Leu Val Ser
900 905

<210> 5
<211> 1222
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 5

Met Glu Ala Ala Arg Thr Glu Arg Pro Ala Gly Arg Pro Gly Ala Pro
1 5 10 15

Leu Val Arg Thr Gly Leu Leu Leu Leu Ser Thr Trp Val Leu Ala Gly
20 25 30

Ala Glu Ile Thr Trp Asp Ala Thr Gly Gly Pro Gly Arg Pro Ala Ala
35 40 45

Pro Ala Ser Arg Pro Pro Ala Leu Ser Pro Leu Ser Pro Arg Ala Val
50 55 60

Ala Ser Gln Trp Pro Glu Glu Leu Ala Ser Ala Arg Arg Ala Ala Val
65 70 75 80

Leu Gly Arg Arg Ala Gly Pro Glu Leu Leu Pro Gln Gln Gly Gly Gly
85 90 95

Arg Gly Gly Glu Met Gln Val Glu Ala Gly Gly Thr Ser Pro Ala Gly
100 105 110

Glu Arg Arg Gly Arg Gly Ile Pro Ala Pro Ala Lys Leu Gly Gly Ala
115 120 125

Arg Arg Ser Arg Arg Ala Gln Pro Pro Ile Thr Gln Glu Arg Gly Asp
130 135 140

Ala Trp Ala Thr Ala Pro Ala Asp Gly Ser Arg Gly Ser Arg Pro Leu
145 150 155 160

Ala Lys Gly Ser Arg Glu Glu Val Lys Ala Pro Arg Ala Gly Gly Ser
165 170 175

Ala Ala Glu Asp Leu Arg Leu Pro Ser Thr Ser Phe Ala Leu Thr Gly
180 185 190

Asp Ser Ala His Asn Gln Ala Met Val His Trp Ser Gly His Asn Ser
195 200 205

Ser Val Ile Leu Ile Leu Thr Lys Leu Tyr Asp Phe Asn Leu Gly Ser
210 215 220

Val Thr Glu Ser Ser Leu Trp Arg Ser Thr Asp Tyr Gly Thr Thr Tyr
 225 230 235 240
 Glu Lys Leu Asn Asp Lys Val Gly Leu Lys Thr Val Leu Ser Tyr Leu
 245 250 255
 Tyr Val Asn Pro Thr Asn Lys Arg Lys Ile Met Leu Leu Ser Asp Pro
 260 265 270
 Glu Met Glu Ser Ser Ile Leu Ile Ser Ser Asp Glu Gly Ala Thr Tyr
 275 280 285
 Gln Lys Tyr Arg Leu Thr Phe Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Phe His Pro
 290 295 300
 Lys Gln Glu Asp Trp Val Leu Ala Tyr Ser Leu Asp Gln Lys Leu Tyr
 305 310 315 320
 Ser Ser Met Asp Phe Gly Arg Arg Trp Gln Leu Met His Glu Arg Ile
 325 330 335
 Thr Pro Asn Arg Phe Tyr Trp Ser Val Ala Gly Leu Asp Lys Glu Ala
 340 345 350
 Asp Leu Val His Met Glu Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala His Tyr
 355 360 365
 Leu Thr Cys Arg Ile Gln Glu Cys Ala Glu Thr Thr Arg Ser Gly Pro
 370 375 380
 Phe Ala Arg Ser Ile Asp Ile Ser Ser Leu Val Val Gln Asp Glu Tyr
 385 390 395 400
 Ile Phe Ile Gln Val Thr Thr Ser Gly Arg Ala Ser Tyr Tyr Val Ser
 405 410 415
 Tyr Arg Arg Glu Ala Phe Ala Gln Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
 420 425 430
 Pro Lys Asp Met His Ile Ile Ser Thr Asp Glu Asn Gln Val Phe Ala
 435 440 445
 Ala Val Gln Glu Trp Asn Gln Asn Asp Thr Tyr Asn Leu Tyr Ile Ser
 450 455 460
 Asp Thr Arg Gly Ile Tyr Phe Thr Leu Ala Met Glu Asn Ile Lys Ser
 465 470 475 480
 Ser Arg Gly Leu Met Gly Asn Ile Ile Ile Glu Leu Tyr Glu Val Ala
 485 490 495
 Gly Ile Lys Gly Ile Phe Leu Ala Asn Lys Lys Val Asp Asp Gln Val

ES 2 533 787 T3

500										505										510										
Lys	Thr	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Asn	Lys	Gly	Arg	Asp	Trp	Arg	Leu	Leu	Gln															
		515					520					525																		
Ala	Pro	Asp	Val	Asp	Leu	Arg	Gly	Ser	Pro	Val	His	Cys	Leu	Leu	Pro															
	530					535					540																			
Phe	Cys	Ser	Leu	His	Leu	His	Leu	Gln	Leu	Ser	Glu	Asn	Pro	Tyr	Ser															
545					550					555					560															
Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Ser	Lys	Glu	Thr	Ala	Pro	Gly	Leu	Val	Val	Ala															
				565					570						575															
Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Pro	Glu	Leu	Ser	Tyr	Thr	Asp	Ile	Gly	Val	Phe															
			580					585					590																	
Ile	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Asn	Thr	Trp	Arg	Gln	Ile	Phe	Asp	Glu	Glu															
		595					600					605																		
Tyr	Asn	Val	Trp	Phe	Leu	Asp	Trp	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Ala	Met	Lys															
	610					615					620																			
His	Thr	Pro	Leu	Pro	Val	Arg	His	Leu	Trp	Val	Ser	Phe	Asp	Glu	Gly															
625					630					635					640															
His	Ser	Trp	Asp	Lys	Tyr	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Phe	Val	Asp															
				645					650					655																
Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Gly	Met	Glu	Thr	His	Ile	Met	Thr	Val	Phe															
		660						665					670																	
Gly	His	Phe	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Lys	Val	Asp	Tyr															
		675					680					685																		
Lys	Ser	Ile	Phe	Ser	Arg	His	Cys	Thr	Lys	Glu	Asp	Tyr	Gln	Thr	Trp															
	690					695					700																			
His	Leu	Leu	Asn	Gln	Gly	Glu	Pro	Cys	Val	Met	Gly	Glu	Arg	Lys	Ile															
705					710					715					720															
Phe	Lys	Lys	Arg	Lys	Pro	Gly	Ala	Gln	Cys	Ala	Leu	Gly	Arg	Asp	His															
				725					730					735																
Ser	Gly	Ser	Val	Val	Ser	Glu	Pro	Cys	Val	Cys	Ala	Asn	Trp	Asp	Phe															
			740					745					750																	
Glu	Cys	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Arg	His	Gly	Glu	Ser	Gln	Cys	Val	Pro															
		755					760					765																		
Ala	Phe	Trp	Tyr	Asn	Pro	Ala	Ser	Pro	Ser	Lys	Asp	Cys	Ser	Leu	Gly															
	770					775					780																			

Gln Ser Tyr Leu Asn Ser Thr Gly Tyr Arg Arg Ile Val Ser Asn Asn
785 790 795 800

Cys Thr Asp Gly Leu Arg Glu Lys Tyr Thr Ala Lys Ala Gln Met Cys
805 810 815

Pro Gly Lys Ala Pro Arg Gly Leu His Val Val Thr Thr Asp Gly Arg
820 825 830

Leu Val Ala Glu Gln Gly His Asn Ala Thr Phe Ile Ile Leu Met Glu
835 840 845

Glu Gly Asp Leu Gln Arg Thr Asn Ile Gln Leu Asp Phe Gly Asp Gly
850 855 860

Ile Ala Val Ser Tyr Ala Asn Phe Ser Pro Ile Glu Asp Gly Ile Lys
865 870 875 880

His Val Tyr Lys Ser Ala Gly Ile Phe Gln Val Thr Ala Tyr Ala Glu
885 890 895

Asn Asn Leu Gly Ser Asp Thr Ala Val Leu Phe Leu His Val Val Cys
900 905 910

Pro Val Glu His Val His Leu Arg Val Pro Phe Val Ala Ile Arg Asn
915 920 925

Lys Glu Val Asn Ile Ser Ala Val Val Trp Pro Ser Gln Leu Gly Thr
930 935 940

Leu Thr Tyr Phe Trp Trp Phe Gly Asn Ser Thr Lys Pro Leu Ile Thr
945 950 955 960

Leu Asp Ser Ser Ile Ser Phe Thr Phe Leu Ala Glu Gly Thr Asp Thr
965 970 975

Ile Thr Val Gln Val Ala Ala Gly Asn Ala Leu Ile Gln Asp Thr Lys
980 985 990

Glu Ile Ala Val His Glu Tyr Phe Gln Ser Gln Leu Leu Ser Phe Ser
995 1000 1005

Pro Asn Leu Asp Tyr His Asn Pro Asp Ile Pro Glu Trp Arg Lys
1010 1015 1020

Asp Ile Gly Asn Val Ile Lys Arg Ala Leu Val Lys Val Thr Ser
1025 1030 1035

Val Pro Glu Asp Gln Ile Leu Ile Ala Val Phe Pro Gly Leu Pro
1040 1045 1050

Thr Ser Ala Glu Leu Phe Ile Leu Pro Pro Lys Asn Leu Thr Glu
1055 1060 1065

Arg Arg Lys Gly Asn Glu Gly Asp Leu Glu Gln Ile Val Glu Thr
1070 1075 1080

Leu Phe Asn Ala Leu Asn Gln Asn Leu Val Gln Phe Glu Leu Lys
1085 1090 1095

Pro Gly Val Gln Val Ile Val Tyr Val Thr Gln Leu Thr Leu Ala
1100 1105 1110

Pro Leu Val Asp Ser Ser Ala Gly His Ser Ser Ser Ala Met Leu
1115 1120 1125

Met Leu Leu Ser Val Val Phe Val Gly Leu Ala Val Phe Leu Ile
1130 1135 1140

Tyr Lys Phe Lys Arg Lys Ile Pro Trp Ile Asn Ile Tyr Ala Gln
1145 1150 1155

Val Gln His Asp Lys Glu Gln Glu Met Ile Gly Ser Val Ser Gln
1160 1165 1170

Ser Glu Asn Ala Pro Lys Ile Thr Leu Ser Asp Phe Thr Glu Pro
1175 1180 1185

Glu Glu Leu Leu Asp Lys Glu Leu Asp Thr Arg Val Ile Gly Gly
1190 1195 1200

Ile Ala Thr Ile Ala Asn Ser Glu Ser Thr Lys Glu Ile Pro Asn
1205 1210 1215

Cys Thr Ser Val
1220

<210> 6
<211> 241
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> SEÑAL
10 <222> (1)..(18)
<223> Péptido señal de NGF

<220>
<221> PROPEP
15 <222> (19)..(121)
<223> Propéptido de NGF (NGFpro)

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20 <222> (19)..(241)
<223> proNGF

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
25 <222> (122)..(241)
<223> NGF maduro

<400> 6

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

Ala

<210> 7

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(18)

<223> Péptido señal de BDNF

<220>

<221> PROPEP

15 <222> (19)..(127)

<223> Propéptido de BDNF (BDNFpro)

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (19)..(246)

<223> proBDNF

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (128)..(246)

<223> Péptido maduro de BDNF

<400> 7

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu His
50 55 60

Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp Gln Lys Val Arg Pro Asn Glu
65 70 75 80

Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu Ser
85 90 95

Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu Tyr
100 105 110

Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Arg Val Arg Arg His
115 120 125

Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile Ser
130 135 140

10 Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser Gly
145 150 155 160

Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln Leu
165 170 175

Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr Lys
180 185 190

Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys Arg
195 200 205

Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys Arg
210 215 220

Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr Leu
225 230 235 240

Thr Ile Lys Arg Gly Arg
245

<210> 8

15 <211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> SEÑAL

<222> (1)..(16)
 <223> Péptido señal de NT3

5 <220>
 <221> PROPEP
 <222> (17)..(140)
 <223> Propéptido de NT3 (NT3pro)

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (17)..(257)
 <223> proNT3

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
 <222> (141)..(257)
 <223> Péptido maduro de NT3

<400> 8
 Met Ser Ile Leu Phe Tyr Val Ile Phe Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Ile
 1 5 10 15
 Gln Gly Asn Asn Met Asp Gln Arg Ser Leu Pro Glu Asp Ser Leu Asn
 20 25 30
 Ser Leu Ile Ile Lys Leu Ile Gln Ala Asp Ile Leu Lys Asn Lys Leu
 35 40 45
 Ser Lys Gln Met Val Asp Val Lys Glu Asn Tyr Gln Ser Thr Leu Pro
 50 55 60

20

Lys Ala Glu Ala Pro Arg Glu Pro Glu Arg Gly Gly Pro Ala Lys Ser
65 70 75 80
Ala Phe Gln Pro Val Ile Ala Met Asp Thr Glu Leu Leu Arg Gln Gln
85 90 95
Arg Arg Tyr Asn Ser Pro Arg Val Leu Leu Ser Asp Ser Thr Pro Leu
100 105 110
Glu Pro Pro Pro Leu Tyr Leu Met Glu Asp Tyr Val Gly Ser Pro Val
115 120 125
Val Ala Asn Arg Thr Ser Arg Arg Lys Arg Tyr Ala Glu His Lys Ser
130 135 140
His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr
145 150 155 160
Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly His Gln Val Thr Val Leu
165 170 175
Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu
180 185 190
Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile
195 200 205
Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val
210 215 220
Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile
225 230 235 240
Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg
245 250 255

Thr

<210> 9

<211> 210

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(24)

<223> Péptido señal de NT4/5

<220>

<221> PROPEP

15 <222> (25)..(80)

<223> Propéptido de NT4/5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

20 <222> (25)..(210)

<223> proNT4/5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

25 <222> (81)..(210)

<223> Péptido maduro de NT4/5

<400> 9

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

<210> 10
<211> 13
5 <212> PRT
<213> Homo Sapiens

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(13)
<223> Neurotensina

<400> 10
Gln Leu Tyr Glu Asn Lys Pro Arg Arg Pro Tyr Ile Leu
1 5 10

15 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(4)
<223> Cuatro aminoácidos C-terminales de Neurotensina

	<400> 11
	Pro Tyr Ile Leu
	1
5	<210> 12
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
10	<220>
	<223> Péptido generado sintéticamente
	<220>
	<221> VARIANTE
15	<222> (1)..(1)
	<223> xaa = N-metil-Arg
	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
20	<222> (1)..(6)
	<223> NT69L
	<220>
	<221> VARIANTE
25	<222> (4)..(4)
	<223> Xaa = L-neo-Trp
	<220>
	<221> VARIANTE
30	<222> (5)..(5)
	<223> xaa = tert-Leu
	<400> 12
	Xaa Lys Pro Xaa Xaa Leu
	1 5
35	<210> 13
	<211> 357
	<212> PRT
	<213> Homo Sapiens
40	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
	<222> (1)..(357)
	<223> RAP
45	<400> 13

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

[illegible]

<210> 14
<211> 475
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(475)
<223> LPL

<400> 14
Met Glu Ser Lys Ala Leu Leu Val Leu Thr Leu Ala Val Trp Leu Gln
1 5 10 15
Ser Leu Thr Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Ala Ala Asp Gln Arg Arg
20 25 30
Asp Phe Ile Asp Ile Glu Ser Lys Phe Ala Leu Arg Thr Pro Glu Asp
35 40 45
Thr Ala Glu Asp Thr Cys His Leu Ile Pro Gly Val Ala Glu Ser Val
50 55 60
Ala Thr Cys His Phe Asn His Ser Ser Lys Thr Phe Met Val Ile His
65 70 75 80
Gly Trp Thr Val Thr Gly Met Tyr Glu Ser Trp Val Pro Lys Leu Val

[illegible]

Thr Val Ala Glu Ser Glu Asn Ile Pro Phe Thr Leu Pro Glu Val Ser
370 375 380

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

Glu Leu Leu Met Leu Lys Leu Lys Trp Lys Ser Asp Ser Tyr Phe Ser
405 410 415

Trp Ser Asp Trp Trp Ser Ser Pro Gly Phe Ala Ile Gln Lys Ile Arg
420 425 430

Val Lys Ala Gly Glu Thr Gln Lys Lys Val Ile Phe Cys Ser Arg Glu
435 440 445

Lys Val Ser His Leu Gln Lys Gly Lys Ala Pro Ala Val Phe Val Lys
450 455 460

Cys His Asp Lys Ser Leu Asn Lys Lys Ser Gly
465 470 475

<210> 15
<211> 317
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (1)..(317)
<223> Apo E

<400> 15
Met Lys Val Leu Trp Ala Ala Leu Leu Val Thr Phe Leu Ala Gly Cys
1 5 10 15

Gln Ala Lys Val Glu Gln Ala Val Glu Thr Glu Pro Glu Pro Glu Leu
20 25 30

Arg Gln Gln Thr Glu Trp Gln Ser Gly Gln Arg Trp Glu Leu Ala Leu
35 40 45

Gly Arg Phe Trp Asp Tyr Leu Arg Trp Val Gln Thr Leu Ser Glu Gln
50 55 60

Val Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Val Thr Gln Glu Leu Arg Ala
65 70 75 80

Leu Met Asp Glu Thr Met Lys Glu Leu Lys Ala Tyr Lys Ser Glu Leu
85 90 95

Glu Glu Gln Leu Thr Pro Val Ala Glu Glu Thr Arg Ala Arg Leu Ser
100 105 110

15

ES 2 533 787 T3

Lys Glu Leu Gln Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ala Asp Met Glu Asp
 115 120 125
 Val Cys Gly Arg Leu Val Gln Tyr Arg Gly Glu Val Gln Ala Met Leu
 130 135 140
 Gly Gln Ser Thr Glu Glu Leu Arg Val Arg Leu Ala Ser His Leu Arg
 145 150 155 160
 Lys Leu Arg Lys Arg Leu Leu Arg Asp Ala Asp Asp Leu Gln Lys Arg
 165 170 175
 Leu Ala Val Tyr Gln Ala Gly Ala Arg Glu Gly Ala Glu Arg Gly Leu
 180 185 190
 Ser Ala Ile Arg Glu Arg Leu Gly Pro Leu Val Glu Gln Gly Arg Val
 195 200 205
 Arg Ala Ala Thr Val Gly Ser Leu Ala Gly Gln Pro Leu Gln Glu Arg
 210 215 220
 Ala Gln Ala Trp Gly Glu Arg Leu Arg Ala Arg Met Glu Glu Met Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Arg Asp Arg Leu Asp Glu Val Lys Glu Gln Val Ala Glu
 245 250 255
 Val Arg Ala Lys Leu Glu Glu Gln Ala Gln Gln Ile Arg Leu Gln Ala
 260 265 270
 Glu Ala Phe Gln Ala Arg Leu Lys Ser Trp Phe Glu Pro Leu Val Glu
 275 280 285
 Asp Met Gln Arg Gln Trp Ala Gly Leu Val Glu Lys Val Gln Ala Ala
 290 295 300
 Val Gly Thr Ser Ala Ala Pro Val Pro Ser Asp Asn His
 305 310 315

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método in vitro para cribar un antagonista seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas o ARNip, capaz de unirse a un receptor sortilina, que comprende las etapas de:
 - 5 a) proporcionar un receptor sortilina, y
 - b) proporcionar ApoB como agonista,
 - c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
 - d) proporcionar un ensayo para medir la unión de dicho agonista a dicho receptor, y
 - e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar al ensayo, y
 - 10 f) determinar la cantidad de agonista unido a dicho receptor, y
 - g) comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,
 - h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista que altera la unión de dicho agonista a dicho receptor.
- 15 2.- Un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista, seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas o ARNip, en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor, en donde dicho receptor sortilina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60% con la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - 20 a) proporcionar un cultivo celular que expresa dicho receptor sortilina, y
 - b) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y
 - c) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
 - d) proporcionar un ensayo para determinar la unión a, internalización de y señalización a través de, dicho receptor sortilina, comprendiendo dicho ensayo,
 - 25 e) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar c) al cultivo celular a), en presencia de dicho agonista b), y
 - f) determinar
 - i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
 - ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o
 - 30 iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y
 - g) comparar la cantidad determinada en la etapa f) con una cantidad medida en ausencia del antagonista que se va a ensayar,
 - h) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica un antagonista
 - i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o
 - 35 ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o
 - iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de dicho receptor sortilina.
- 3.- Un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas o ARNip, en la actividad de un receptor sortilina en un cultivo celular que expresa dicho receptor y con un cultivo celular que carece de expresión de dicho receptor, comprendiendo el método las etapas de:
 - 40 a) proporcionar un cultivo celular que expresa un receptor sortilina, y
 - b) proporcionar un cultivo celular que no expresa un receptor sortilina, y
 - c) opcionalmente proporcionar un cultivo celular que expresa en exceso un receptor sortilina

- d) proporcionar ApoB como agonista del receptor sortilina, y
- e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
- f) proporcionar un primer ensayo que comprende a) y un segundo ensayo que comprende b) y opcionalmente un tercer ensayo que comprende c), y
- 5 g) añadir la biblioteca de potenciales antagonistas que se van a ensayar a los tres ensayos, y
- h) determinar
 - i) la cantidad de antagonista unido al receptor sortilina, y/o
 - ii) la cantidad de antagonista internalizado por el receptor sortilina, y/o
 - iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, y
- 10 i) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),
- j) en donde la diferencia en las cantidades identifica un antagonista
 - i) capaz de unirse a un receptor sortilina, y/o
 - ii) capaz de inhibir la señalización a través de un receptor sortilina, y/o
 - 15 iii) capaz de inhibir la internalización de ApoB como agonista de dicho receptor sortilina.
- 4.- Un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas o ARNip, en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 20 a) administrar dicho antagonista a un mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural,
- b) determinar
 - i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
 - ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o
 - iii) el grado de señalización a través de dicho receptor sortilina, y
- 25 c) comparar la medición de la etapa b) con una medición obtenida en ausencia del compuesto que se va a ensayar,
- d) en donde la diferencia en las dos cantidades identifica el efecto de dicho antagonista en dicho mamífero no humano que expresa el receptor de forma natural.
- 5.- Un método para determinar el grado de inhibición de un antagonista seleccionado de proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, ARN de sentido contrario, ADN de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas o ARNip, en la actividad de un receptor sortilina en un mamífero no humano que expresa dicho receptor con un segundo mamífero no humano que carece de expresión de dicho receptor y un tercer mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 30 a) proporcionar un mamífero no humano que expresa dicho receptor sortilina, y
- b) proporcionar un mamífero no humano que no expresa dicho receptor sortilina, y
- 35 c) proporcionar un mamífero no humano que expresa en exceso dicho receptor sortilina, y
- d) proporcionar ApoB como agonista de dicho receptor sortilina, y
- e) proporcionar una biblioteca de potenciales antagonistas, y
- f) administrar dicha biblioteca de antagonistas a dicho mamífero no humano de a), b) y c) respectivamente, y
- g) determinar
- 40 i) la cantidad de antagonista unido a dicho receptor sortilina, y/o
- ii) la cantidad de antagonista internalizado por dicho receptor sortilina, y/o

- iii) el grado de señalización a través del receptor sortilina, en cada uno de los mamíferos no humanos en a), b) y c), y
- h) comparar la cantidad de antagonista determinada en la etapa g) usando a) con la cantidad determinada en g) usando b) y la cantidad determinada en g) usando c),
- 5 i) en donde la diferencia en las cantidades identifica un antagonista
- i) capaz de unirse a dicho receptor sortilina, y/o
 - ii) capaz de inhibir la señalización a través de dicho receptor sortilina, y/o
 - iii) capaz de inhibir la internalización de dicho agonista de ApoB de dicho receptor sortilina.
- 10 6.- El método según las reivindicaciones 1-5, en donde dicho antagonista es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de una cadena, anticuerpos recombinantes.
- 7.- El método según las reivindicaciones 1-6, en donde dicho antagonista es un anticuerpo dirigido contra la parte extracelular de la sortilina.

Fig. 1

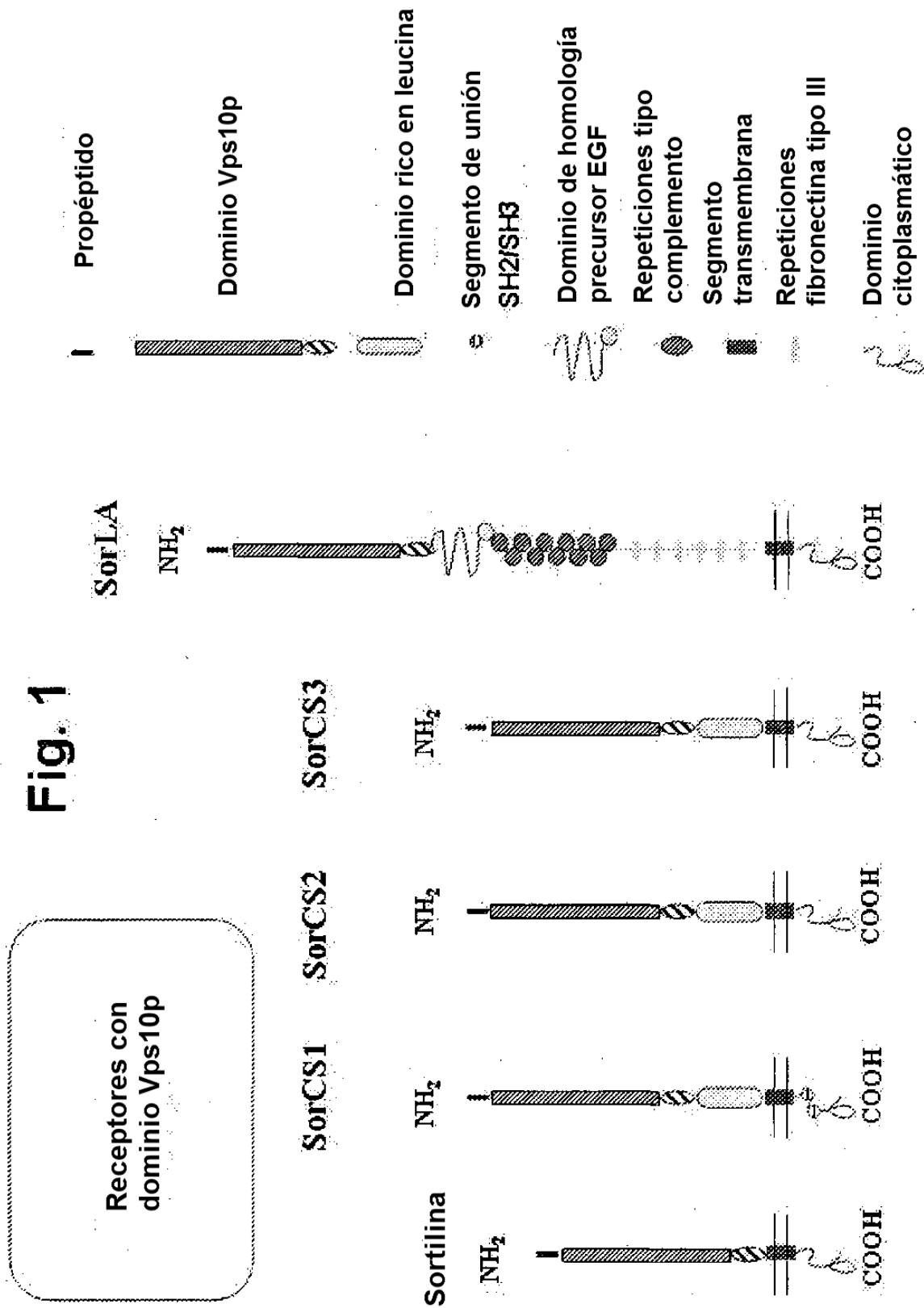


Fig. 2a
Metabolismo de colesterol y triglicéridos

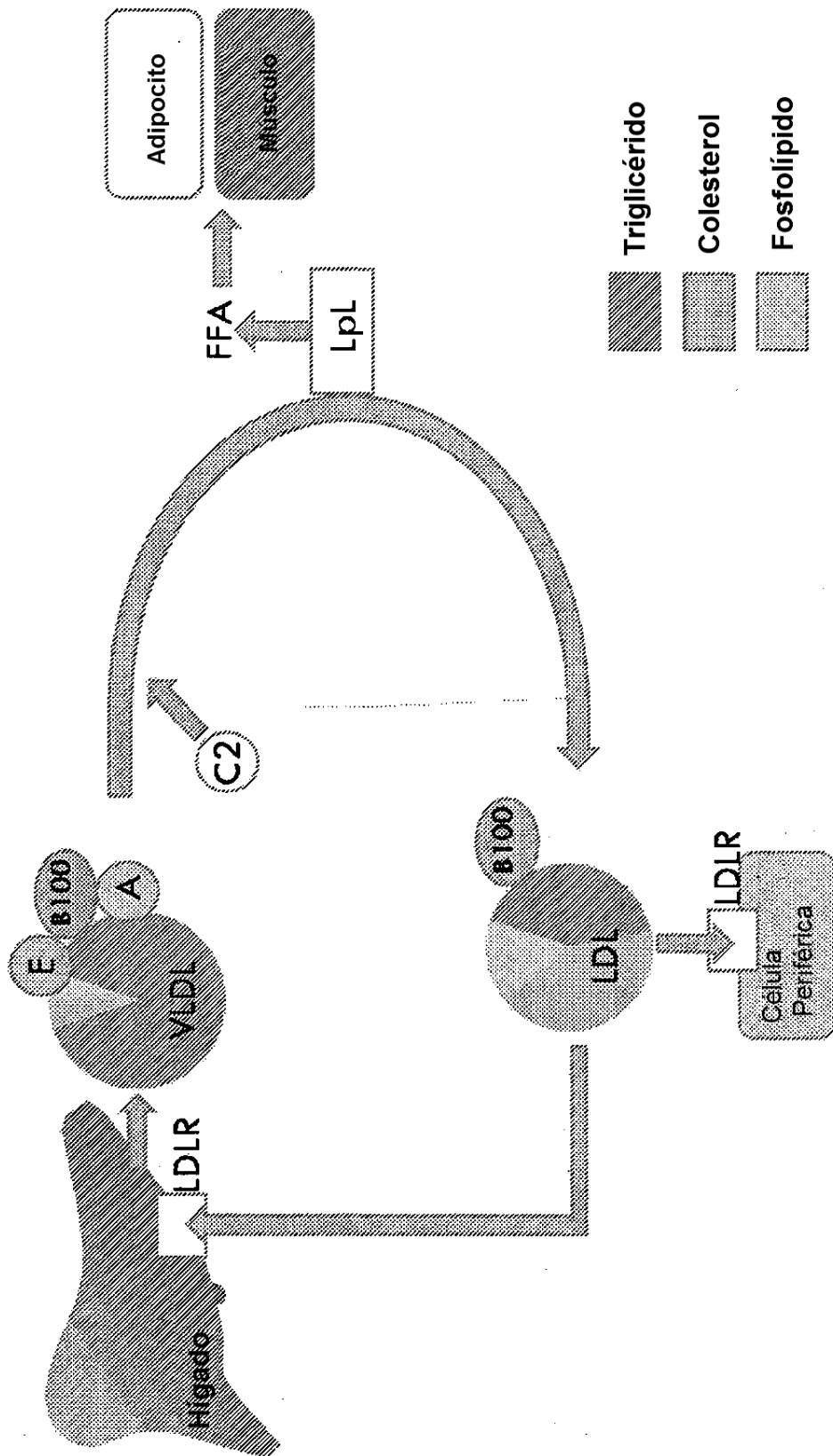
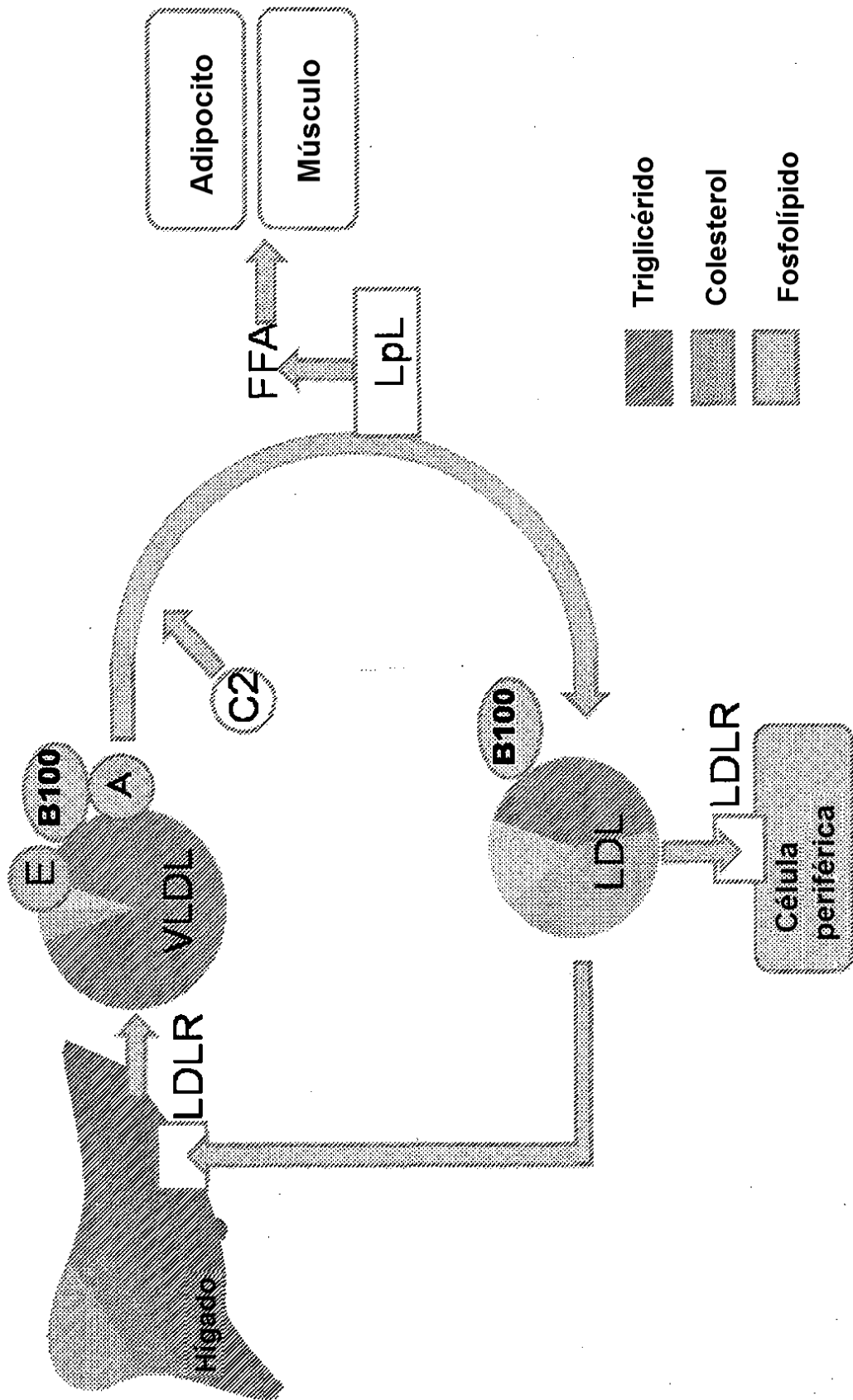


Fig. 2b
Metabolismo de colesterol y triglicéridos



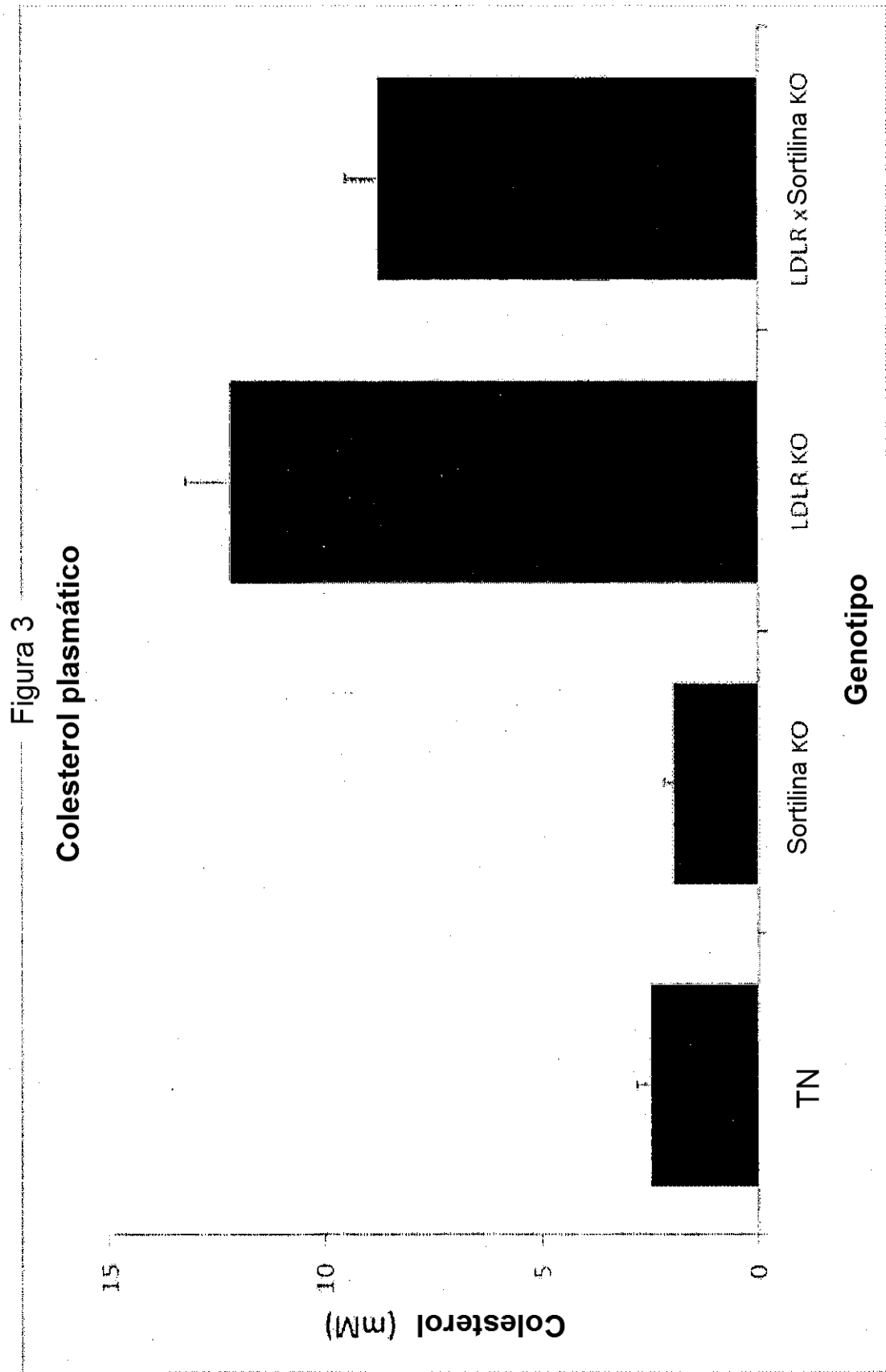


Figura 4

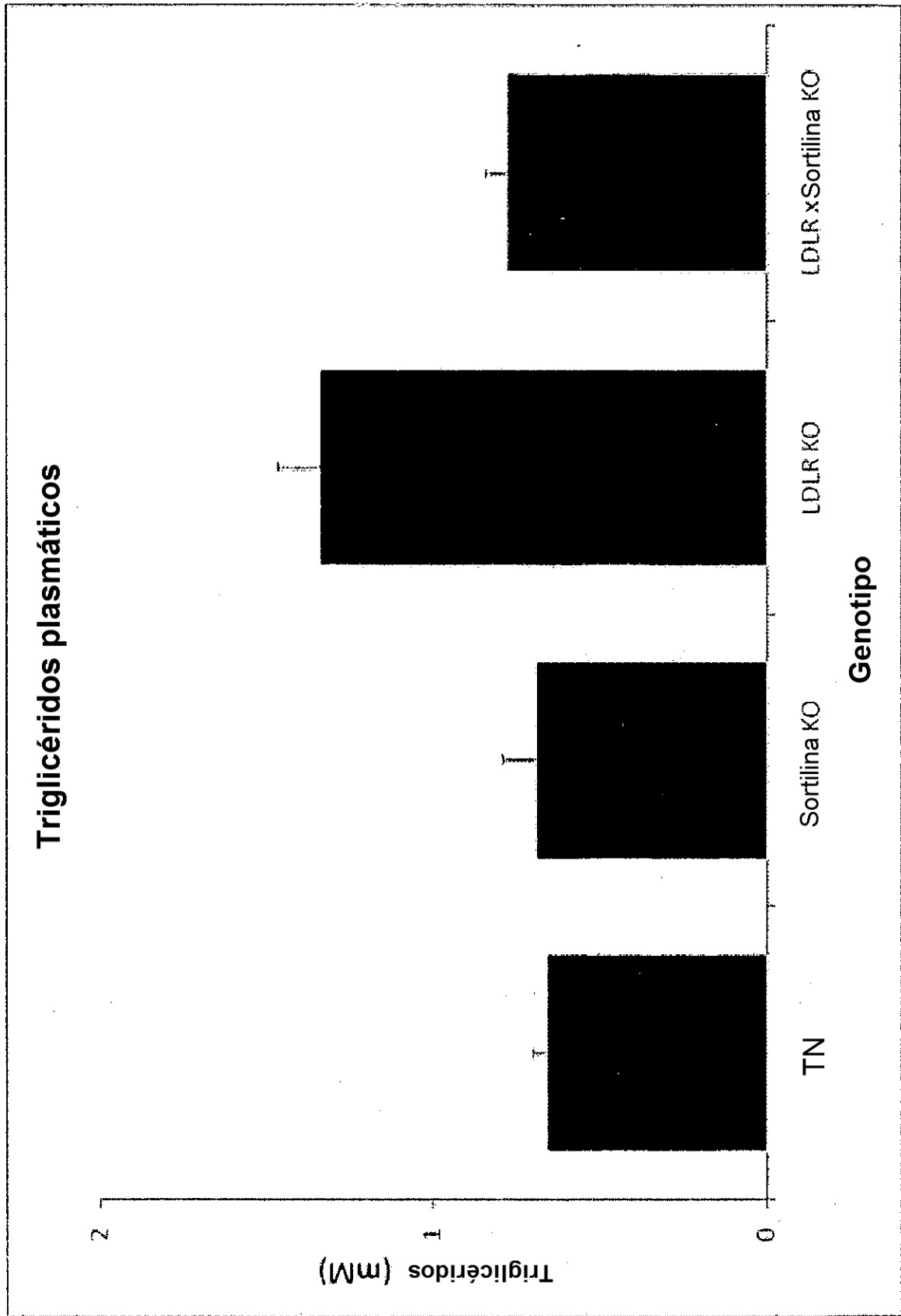


Fig. 5a
Perfil de lipoproteínas - colesterol

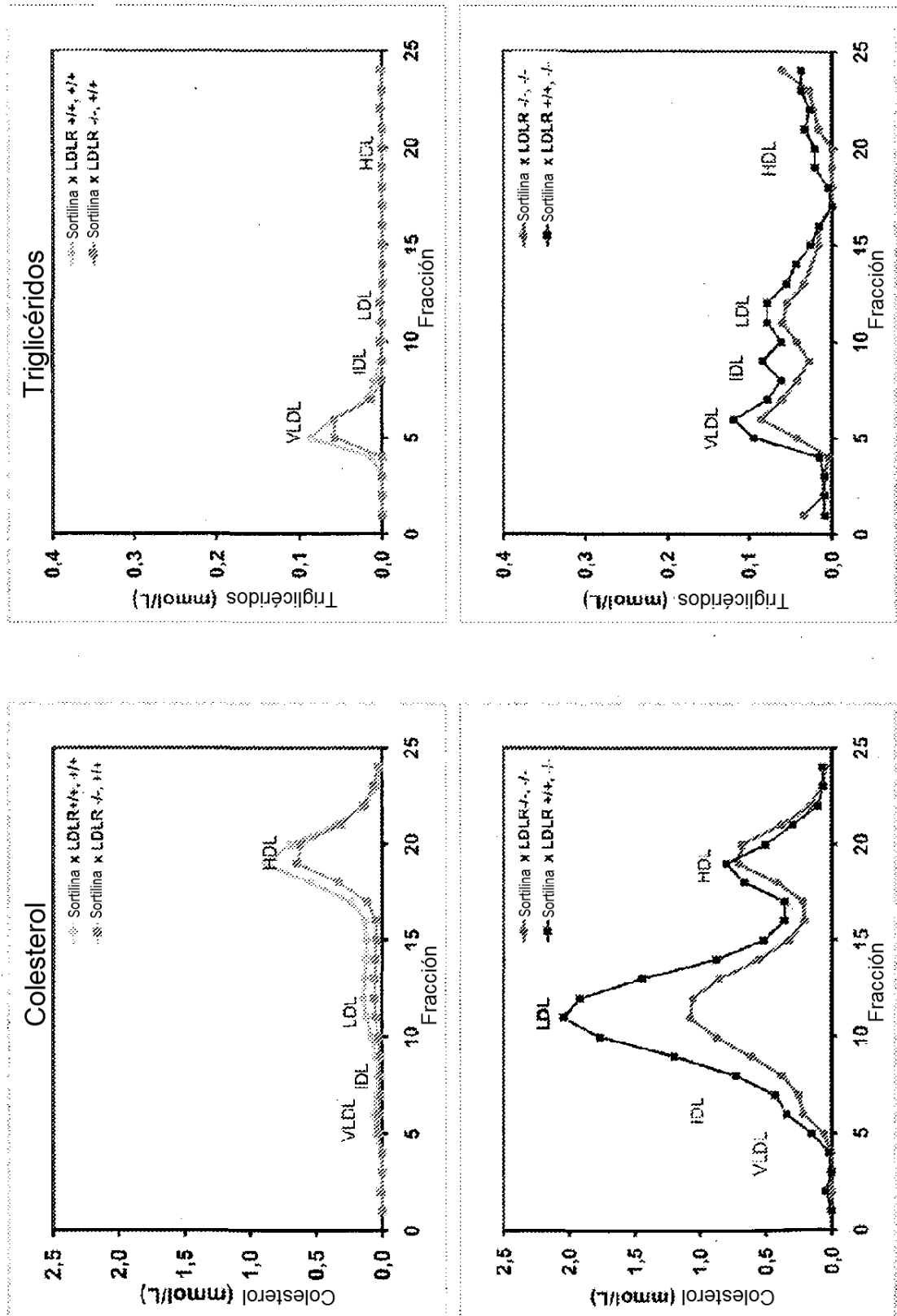


Fig. 5b
Perfil de lipoproteínas - triglicéridos

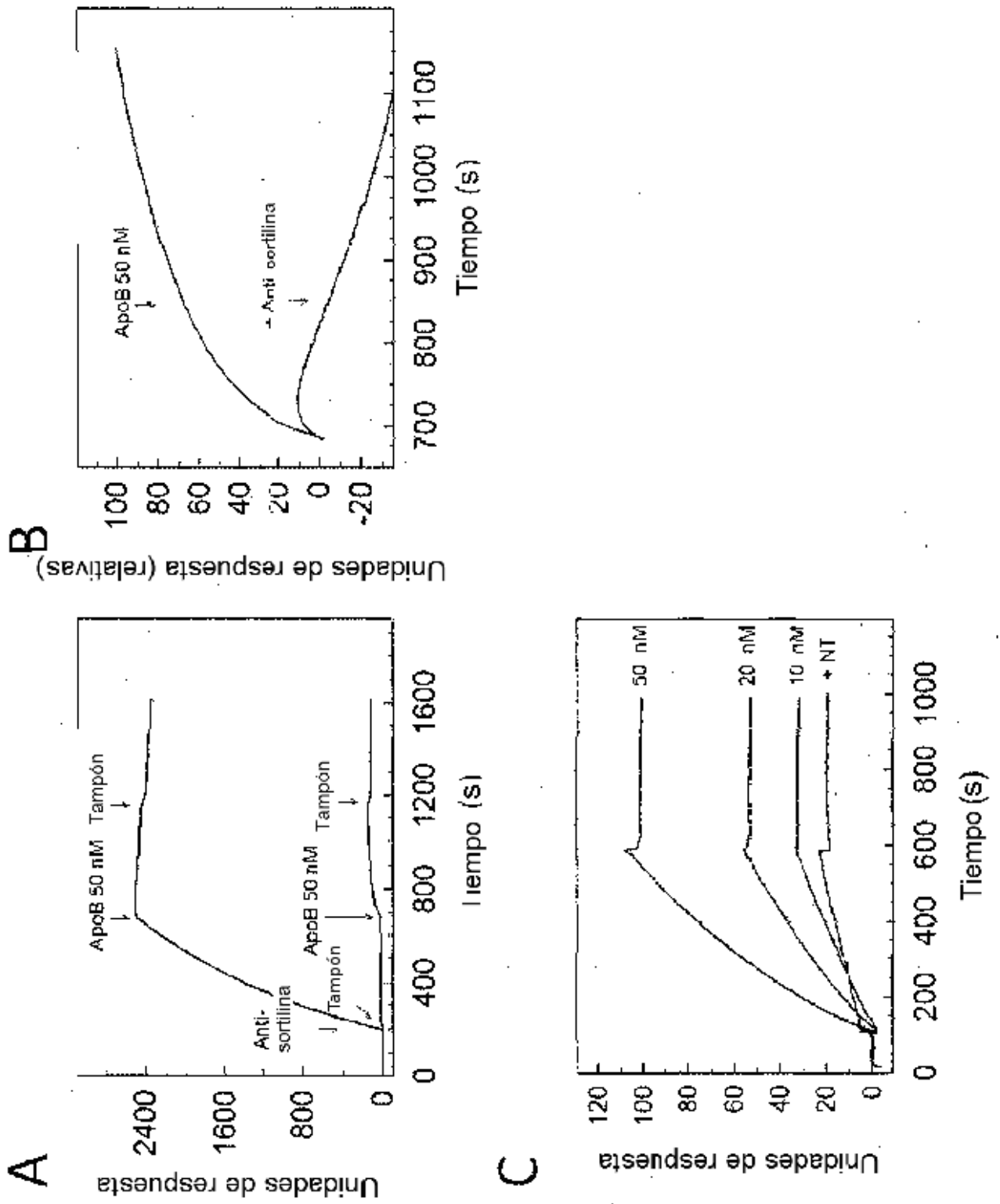


Fig. 6

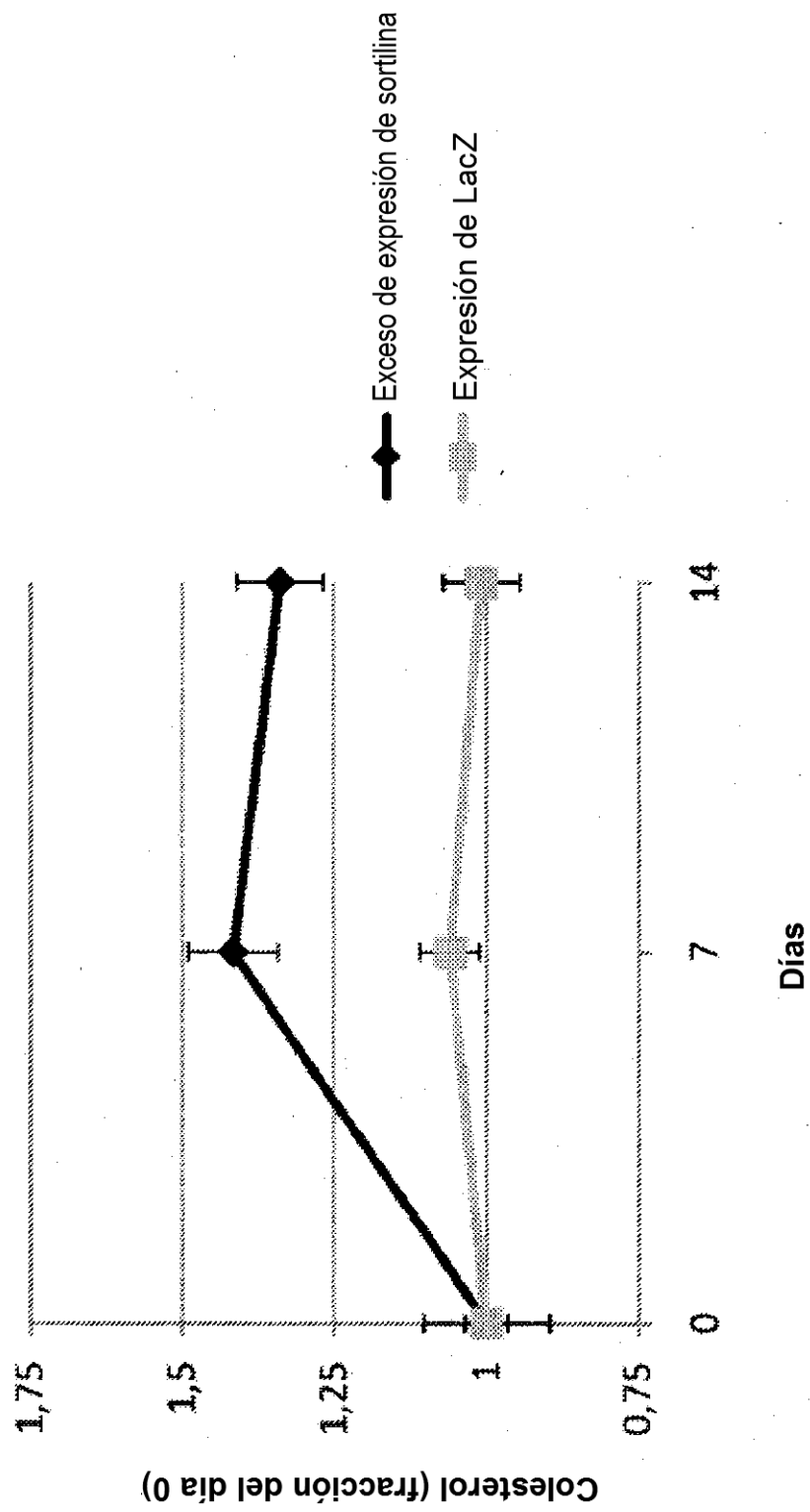


Fig. 6, continuación

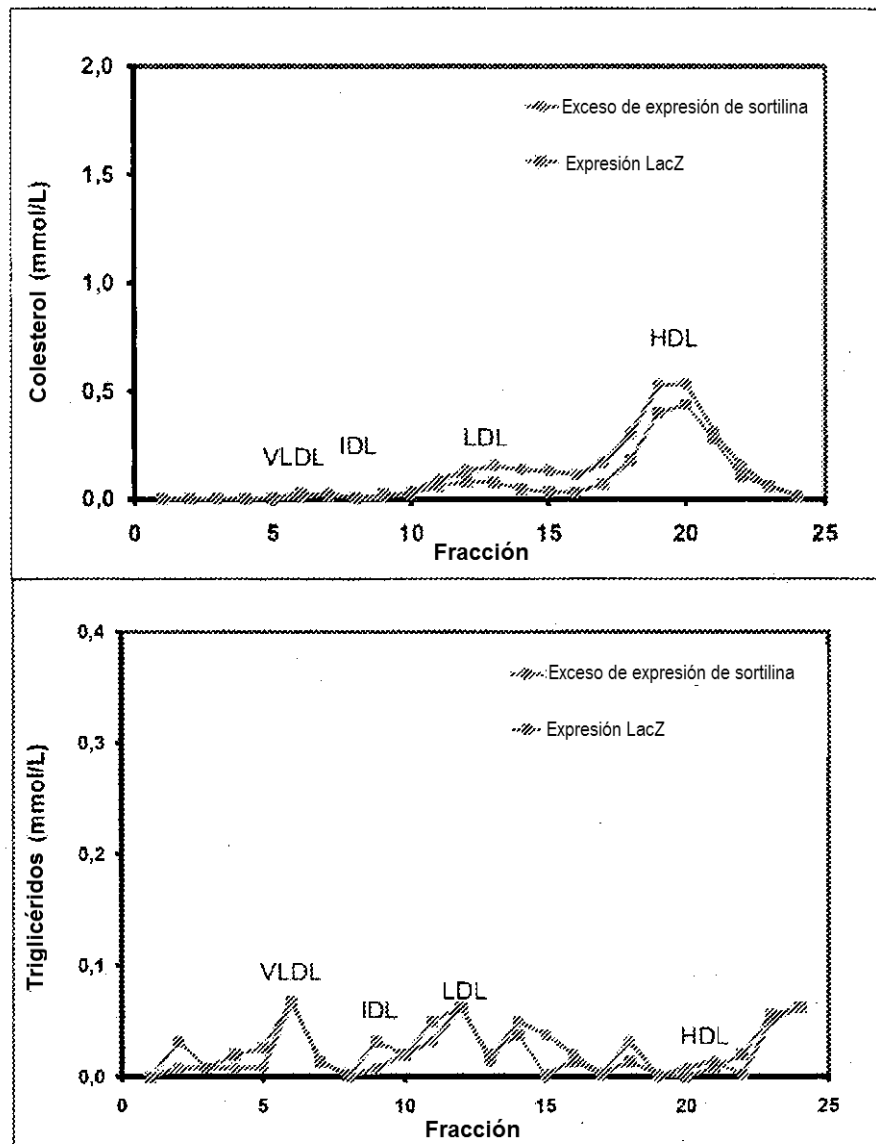


Fig. 7

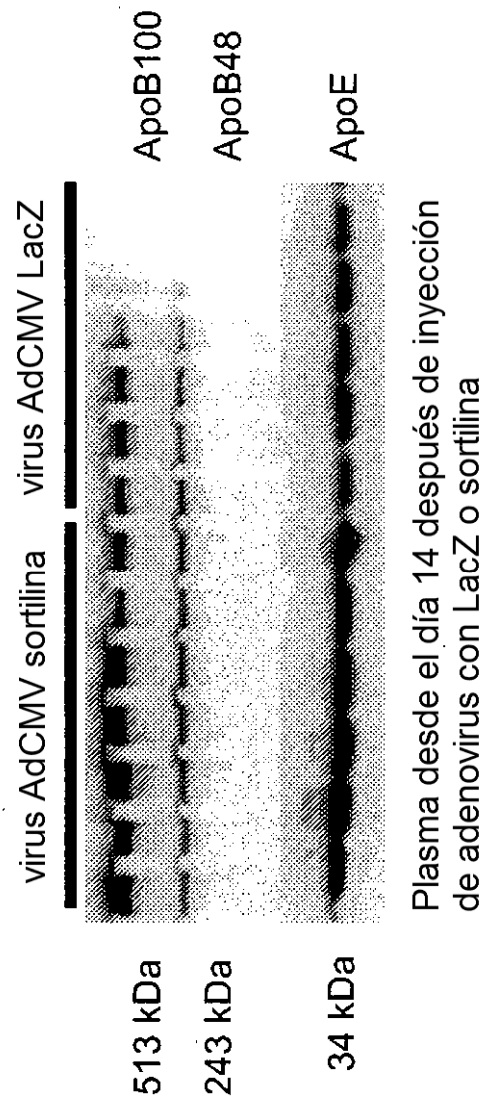


Fig. 8
Colesterol y triglicéridos de SorLA/ApoE KO

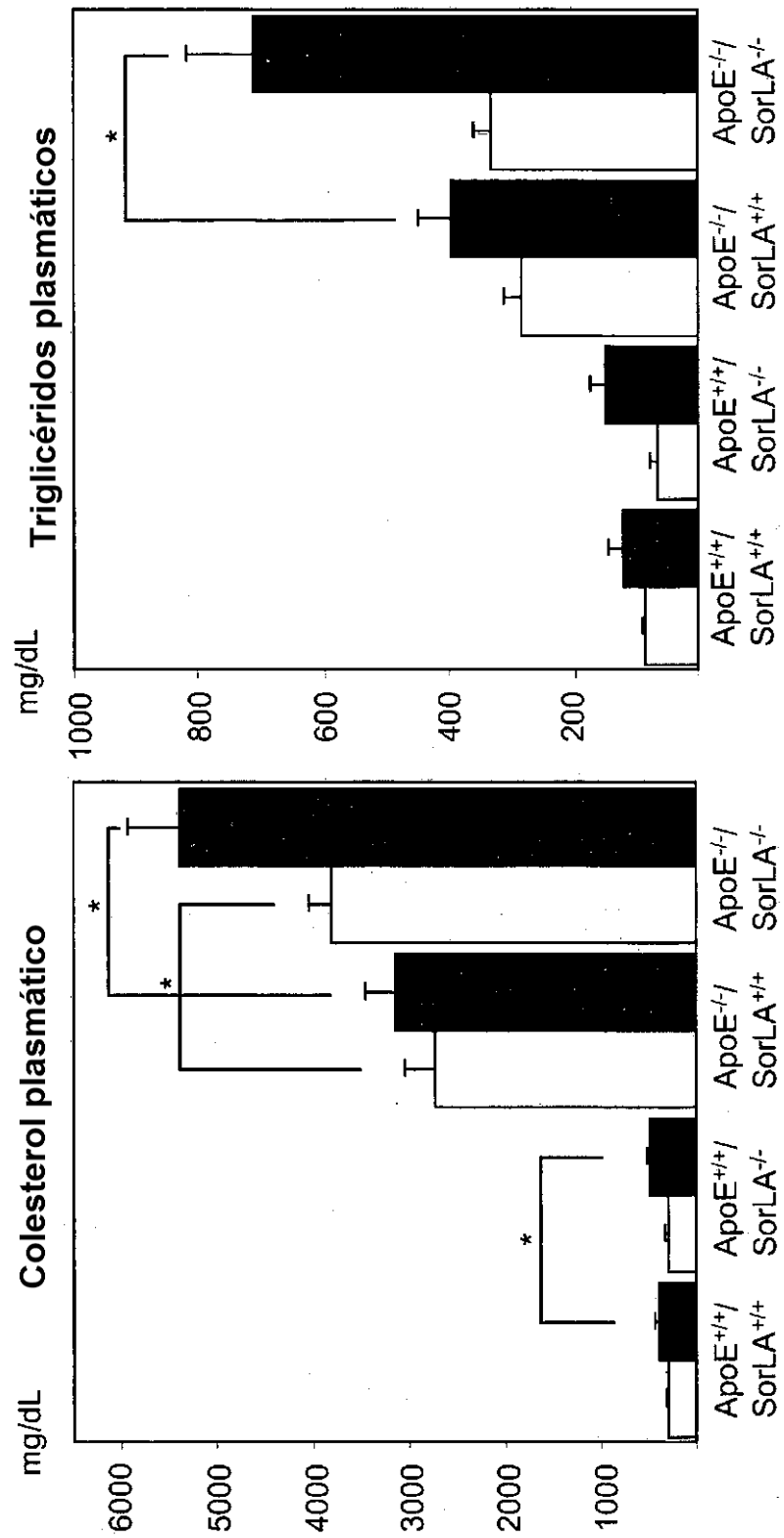
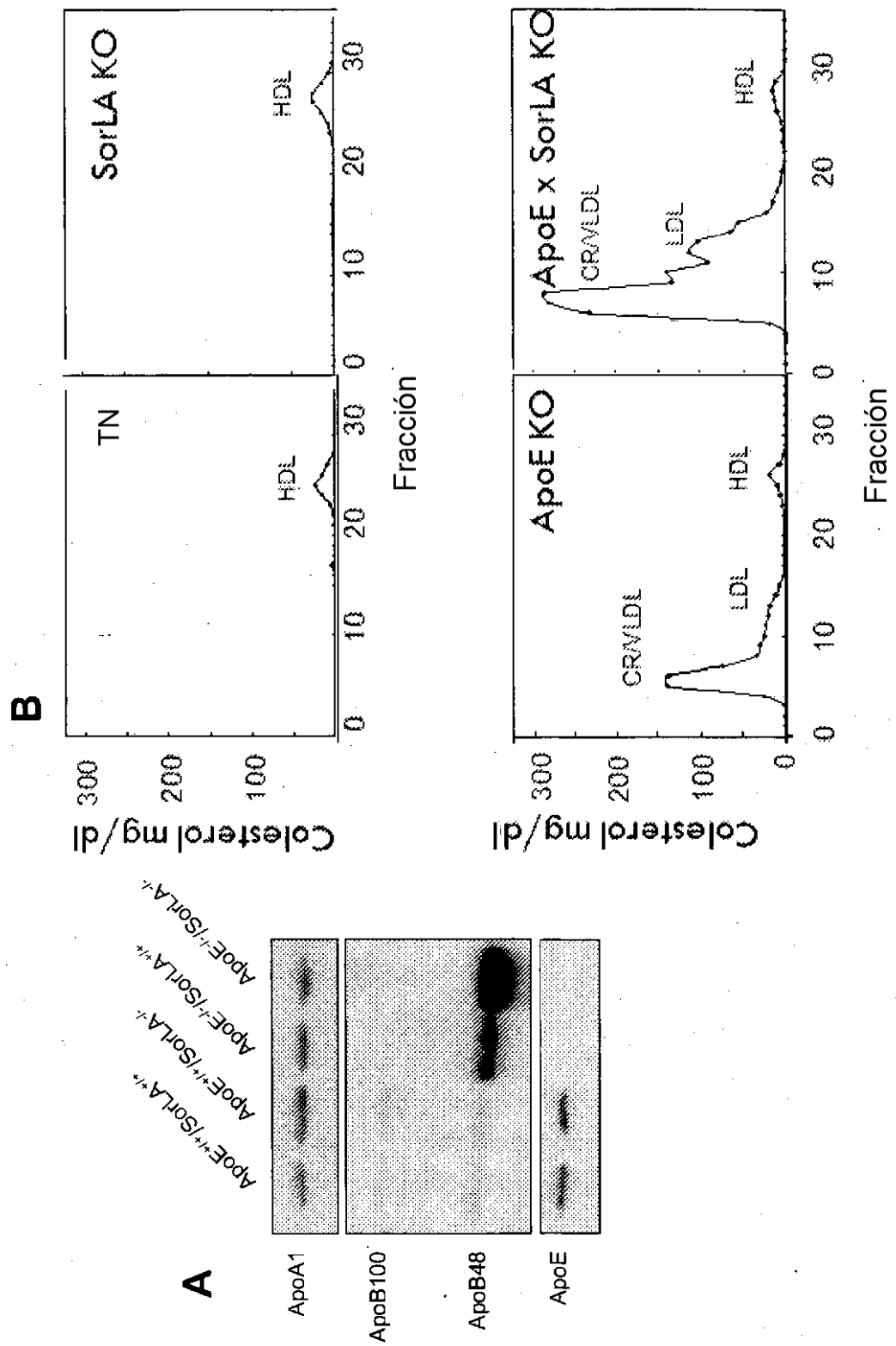
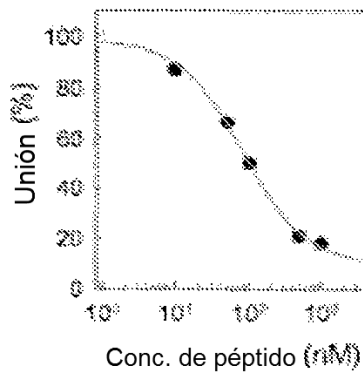


Fig. 9
Perfil de apoproteínas y lípidos



Competición por la unión a sSortilina inmovilizada entre YIL marcado con GST (GST-YIL) 100 nM y los péptidos especificados

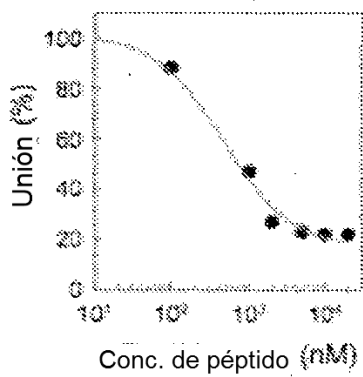
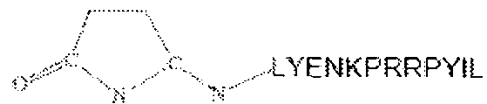


Péptido: NT

CE50: 81nM

Secuencia: pELYENKPRRPYIL

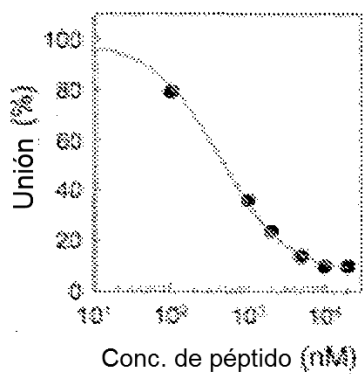
Estructura:



Péptido: NT8-13

CE50: 460nM

Secuencia: RRPYIL



Péptido: RRPYI(chg)

CE50: 420nM

Secuencia: RRPYI-ciclohexil-glicina

Estructura:

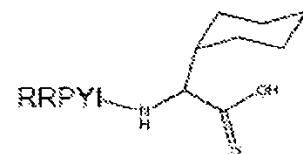
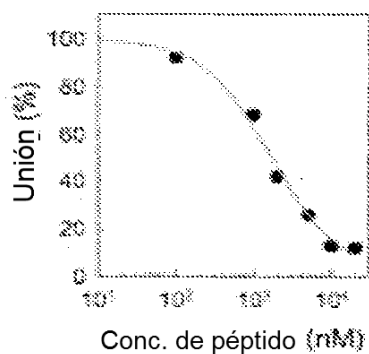


Fig. 10

Competición por la unión a sSortilina inmovilizada entre YIL marcado con GST (GST-YIL) 100 nM y los péptidos especificados

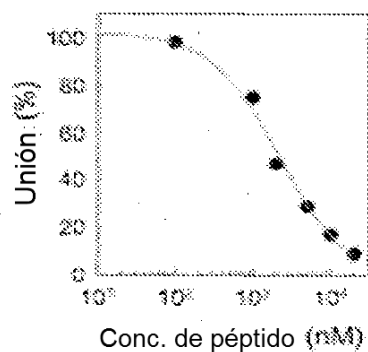
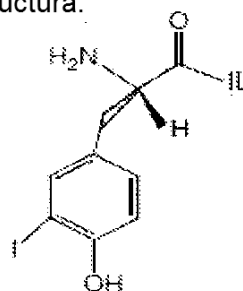


Péptido: yodoYIL

CE50: 1675 nM

Secuencia: yodoYIL

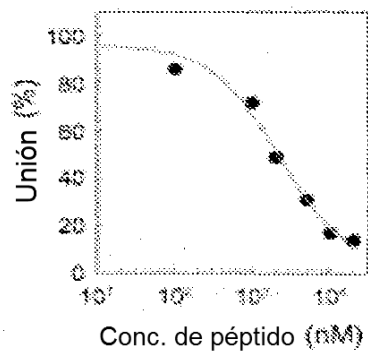
Estructura:



Péptido: QIL

CE50: 1700 nM

Secuencia: QIL



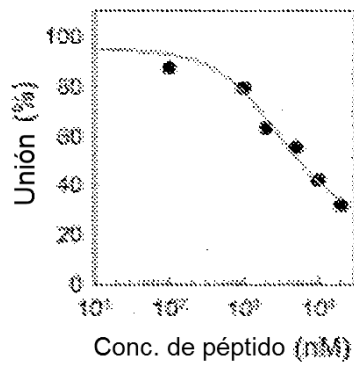
Péptido: YCL

CE50: 2230 nM

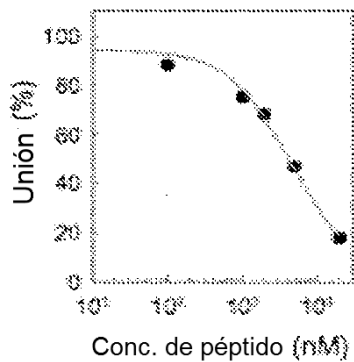
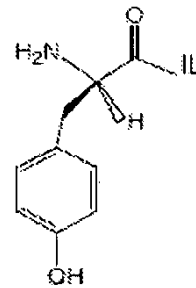
Secuencia: YCL

Fig. 10, continuación

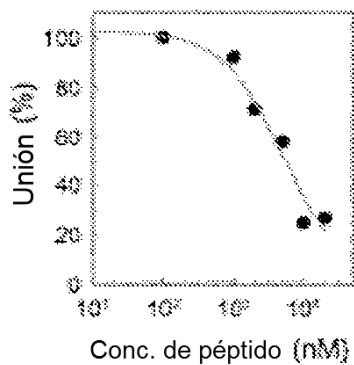
Competición por la unión a sSortilina inmovilizada entre YIL marcado con GST (GST-YIL) 100 nM y los péptidos especificados



Péptido: dYIL
CE50: 3000 nM
Secuencia: dYIL
Estructura:



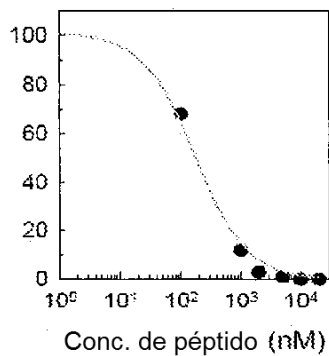
Péptido: YHL
CE50: 4580 nM
Secuencia: YHL



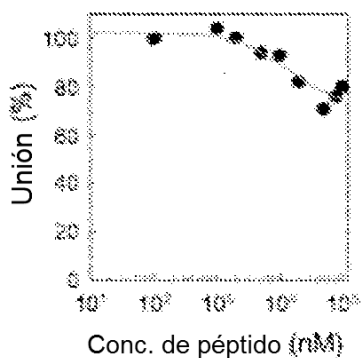
Péptido: NT69L
CE50: 5100 nM
Secuencia:
Estructura:

Fig. 10, continuación

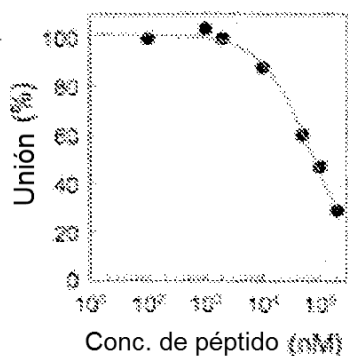
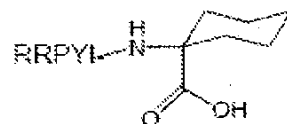
Competición por la unión a sSortilina inmovilizada entre YIL marcado con GST (GST-YIL) 100 nM y los péptidos especificados



Péptido: GST-YIL (100nM)
CE50: 200nM
Secuencia: YIL
Estructura:



Péptido: RRPYI(acc)
CE50: 14000 nM
Secuencia: RRPYI-1-amino-1-carboxi-ciclohexilo
Estructura:



Péptido: RRPYI(nMe)L
CE50: 68000 nM
Secuencia: RRPYI-N-metil-Leucina
Estructura:

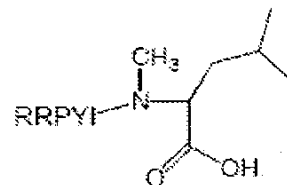


Fig. 10, continuación