

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 222**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/10** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010** **E 10784029 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 2440568**

54 Título: **Entrecruzamiento de monómeros de superóxido dismutasa**

30 Prioridad:

**02.06.2009 US 183286 P**

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

**07.05.2015**

73 Titular/es:

**BRANDEIS UNIVERSITY (100.0%)**  
**415 South Street**  
**Waltham, MA 02453-2728, US**

72 Inventor/es:

**AGAR, JEFFREY, N.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 535 222 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

Entrecruzamiento de monómeros de superóxido dismutasa

5 **Antecedentes de la invención**

Se necesitan enfoques innovadores para combatir las enfermedades neurodegenerativas, entre las más serias de las cuales está la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), un trastorno caracterizado por la muerte de las neuronas motoras tanto superiores como inferiores y por una supervivencia mediana de 3-5 años tras el diagnóstico. El único fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de ELA, riluzol, tiene en el mejor de los casos, un efecto moderado sobre la supervivencia y calidad de vida de los pacientes (1-3). De los más de cincuenta ensayos clínicos para ELA que implican todo desde compuestos antiinflamatorios a metales a antioxidantes, no se han identificado ningún fármaco eficaz. Notablemente, a pesar de la evidencia creciente de que la agregación y pérdida de la estabilidad proteica son parte de la etiología de ELAf, no se ha llevado ningún inhibidor o chaperona farmacológica a ensayos clínicos. El único ensayo que conocemos que se dirige específicamente a SOD1 es un ensayo clínico de fase I en marcha, pequeño que implica oligonucleótidos antisentido. De forma interesante, los ensayos clínicos de ELA han implicado en general las mismas estrategias y muchos de los mismos compuestos usados en ensayos de Parkinson, aunque probablemente no compartan rutas de enfermedad comunes.

Mientras que las causas de las enfermedades neurodegenerativas esporádicas permanecen un misterio, las mutaciones que causan las formas familiares de muchas de estas enfermedades (por ejemplo, Alzheimer, Parkinson y ELA) se conocen. Por ejemplo, las mutaciones en el gen que codifica la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1) son responsables de ~20% de los casos de ELA familiar (ELAf) y el 2% de toda la ELA. Dos de tales mutaciones son G93A, que mantiene actividad enzimática similar al tipo salvaje, y G85R deficiente en metal, que es esencialmente inactiva. Se han invocado las modificaciones postraduccionales de proteínas implicadas en enfermedades familiares en la etiología de las correspondientes enfermedades esporádicas, por ejemplo, modificación de alfa-sinucleína y parkina en Parkinson, una modificación de beta y tau en Alzheimer, y modificación de TDP43 y SOD1 en ELA. Sin embargo, la esperanza es que estrategias para tratar las enfermedades familiares se puedan traducir a al menos un subconjunto de enfermedades esporádicas.

Tanto la herencia dominante de SOD1 mutante como la falta de síntomas en ratones deficientes sugieren una "función de ganancia tóxica" como opuesto a una pérdida de función. La propensión a la agregación y la pérdida de de estabilidad de SOD1 son factores de riesgo sinérgicos para la gravedad de la enfermedad en pacientes de ELAf, y se ha sugerido que una propiedad común de las variantes de ELAf in vitro e in vivo es su propensión a agregar. Una hipótesis predominante para el mecanismo de la toxicidad de variantes de ELAf-SOD1 implica la desestabilización y disociación de dímeros a monómeros, que después nuclean la formación de agregados de orden superior. En efecto, las proteínas variantes tal como la SOD1 G85R usada en este estudio, se encuentran como monómeros in vivo. Un número de modificaciones, incluyendo pérdida de Cu o Zn, corte del disulfuro intramolecular nativo, oxidación y mutación asociada a ELAf, predisponen SOD1 a la disociación de dímeros. Las estructuras cristalinas de rayos X de tanto A4V, como a un nivel menor I113T; el análisis del doble híbrido en levaduras de H46R, A4V y H48Q; la disociación de G85R, G93R, E100G e I113T por caotropos; y las simulaciones de dinámica molecular son todas consistentes con esta hipótesis. Además de la hipótesis que la desestabilización de dímeros produce agregación, otra hipótesis para la agregación es que SOD1 ELAf recién traducida produce variantes que no dimerizan nunca debido a la falta de la formación de disulfuro intrasubunidad, deficiencia en metal, etc., que produce monómeros inestables. Consistente con esto, la estabilización de la interfase del dímero de SOD1 por subunidades de anclaje, o a través del uso de moléculas pequeñas, puede prevenir la agregación de proteínas.

El documento EP1803808 A1 proporciona una composición de superóxido dismutasa lecitinizada (PC-SOD) divulgada como útil como un material fármaco y un proceso para su producción.

El documento US4818698 (correspondiente a DE3628508 A1) tiene como su objeto la provisión de polipéptidos análogos de SOD-h (SOD de origen humano) novedosos que sean útiles como medicamentos.

El intercambio tiol-disulfuro se puede explorar como un enfoque representativo para anclar un dímero de SOD1 estable. El intercambio tiol-disulfuro es adecuado para la investigación como una estrategia terapéutica y de hecho se sabe que se produce in vivo en Cys111 de SOD1, lo que produce la unión de SOD1 al tripeptido glutatión (GSH). Esto sugiere que los residuos de Cys111 en la interfase del dímero de SOD1 son una potencia diana para agentes terapéuticos. Además, Cys111 de SOD1 humana es uno de al menos dos residuos (el otro es W32 de SOD1) que modulan la toxicidad de las mutaciones de ELAf. Por ejemplo, el mutante C111S aumenta la estabilidad de SOD1 y revierte la citotoxicidad y agregación de las mutaciones de SOD1 de ELAf C6F, C146R, G93A, A4V, y H46R. La modificación química de Cys111 por alquilación también aumenta la estabilidad de SOD1.

**Compendio de la invención**

Un aspecto de la invención es un análogo de superóxido dismutasa estabilizado, en donde dicho análogo tiene una estructura terciaria y comprende un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1, y un

entrecruzador; dicho entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud desde 3 Å hasta 15 Å; en donde dicho primer monómero de SOD1 comprende una primera cisteína en una primera posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje, y dicho segundo monómero comprende una segunda cisteína en una segunda posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje; y la primera cisteína está covalentemente unida a la segunda cisteína por el entrecruzador. Otro aspecto de la invención es un método de producir un análogo de superóxido dismutasa (SOD1) estabilizado, que comprende el paso de hacer reaccionar un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1, y un entrecruzador, formando de esta manera dicho análogo. Un sitio representativo eficaz para este entrecruzamiento es la posición 111 de cada monómero. La invención también incluye un método de producir el análogo de SOD1, en donde una primera cisteína de un primer monómero de SOD1 y una segunda cisteína de un segundo monómero de SOD1 y una segunda cisteína de un segundo monómero de SOD1 se unen por un entrecruzador. Otro aspecto de la invención es un análogo de SOD1 estabilizado de la invención para su uso en el tratamiento o profilaxis para una enfermedad neurodegenerativa. Una enfermedad neurobiológica representativa para la que esta invención puede tener una eficacia significativa es esclerosis lateral amiotrófica. También se divulga una composición farmacéutica, que comprende un análogo de SOD1, y un soporte farmacéuticamente aceptable.

### Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra el sitio del entrecruzamiento entre subunidades en cisteína 111 en SOD1. Los residuos de cisteína 111 en monómeros de SOD1 enfrentados se muestran en cada extremo.

La **figura 2** muestra un diagrama de bloques que resume ciertos métodos usados en experimentos de entrecruzamiento.

La **figura 3** muestra los resultados de análisis de inmunotransferencia de ciertos experimentos de entrecruzamiento de SOD1. (A) Entrecruzamiento con diferentes entrecruzadores de maleimida y vinilsulfona. SOD1 se entrecruzó con una concentración 1:1 o 1:3 de entrecruzador respecto a proteína. Cada uno de los entrecruzadores de maleimida entrecruzó SOD1 produciendo la formación de dímeros. TMEA, un entrecruzador trifuncional, parece ser el entrecruzador más eficaz. HBVS, una vinilsulfona, no parece entrecruzar SOD1. (B) Entrecruzamiento con DTME de SOD1. SOD1 se entrecruzó con DTME, que contiene un enlace disulfuro en su región enlazadora, y se corrió en un SDS PAGE en presencia o ausencia de agente reductor. El agente reductor redujo el entrecruzador devolviendo el dímero a su forma monomérica.

La **figura 4** muestra los resultados del análisis de MALDI-TOF MS de SOD1 entrecruzada. (A) Entrecruzamiento de SOD1 de tipo salvaje. (B) entrecruzamiento de G93A. Tanto SOD1 WT como G93A se entrecruzan usando entrecruzadores de maleimida como se ve por el aumento en dímero observado en el análisis de MALDI-TOF MS de SOD1 entrecruzada.

La **figura 5** muestra el análisis por LC-FTMS de SOD1 entrecruzada. Espectros de SOD1 G93A entrecruzada. (A) El cromatograma iónico total (TIC) para la carrera de cromatografía líquida; el dímero eluye a aproximadamente 30 minutos. (B) El espectro sin procesar de G93A dimérica referido a 32,1 minutos en el TIC. (C) El dímero de G93A a 1455,4 modificado por un entrecruzador. (D) Disociación en separador en embudo del dímero entrecruzado de G93A. La m/z de 1442,4 corresponde al monómero de G93A, m/z de 1456,8 corresponde al monómero de G93A modificado por el entrecruzador cortado, m/z de 1471,0 corresponde al monómero de G93A modificado por un entrecruzador, y m/z de 1499,7 corresponde a G93A modificado por dos entrecruzadores.

La **figura 6** representa los productos de reacción del entrecruzamiento de dímeros de SOD1 usando DTME como un entrecruzador homobifuncional y heterobifuncional. Productos de reacción del entrecruzamiento de dímeros de SOD1 usando DTME como entrecruzador homobifuncional (arriba) y heterobifuncional (abajo). La estructura superior usa dos reacciones iniciadas por maleimida, mientras que la estructura inferior usa maleimida e intercambio de disulfuro.

La **figura 7** muestra un modelo de cisteína 111 de SOD1 con 1/2 DTME en la interfase del dímero. El azufre de la cisteína 111 se indica por bolas amarillas y 1/2 DMTE se muestra en cian. Se pudieron entrecruzar monómeros de SOD1 eficazmente usando intercambio tiol-disulfuro produciendo que se una 1/2 DMTE, que es potencialmente susceptible para estrategias terapéuticas basadas en péptidos (figura 13). El sitio del entrecruzamiento confirmado a través de análisis de LC-FTMS (figura 14).

La **figura 8** muestra el entrecruzamiento de SOD1 que produce un dímero entrecruzado con un entrecruzador por dímero. (A) cromatograma iónico extraído para el estado de carga 15 H<sup>+</sup> del monómero de SOD1 (línea con pico > 3,0 a t ~ 36 minutos) y (B) estado de carga 23 H<sup>+</sup> del dímero entrecruzado con DTME (línea con pico > 6,0 a t ~ 30 minutos). (C) Espectro de masas de SOD1 G93A no entrecruzado y (D) SOD1 G93A entrecruzado con DTME.

En la figura 8A, la curva con pico > 3,0 a t = 37 minutos es intensidad de 1058,271 m/z (monómero+ 15 H<sup>+</sup>). En la figura 8B, la curva con pico > 6,0 a t = 30 minutos es intensidad de 1392,085 m/z (dímero + DTME + 23 H<sup>+</sup>)

Además de entrecruzar SOD1 WT, se entrecruzó G93A usando DTME y BMOE a una concentración molar de 1:1. Los espectros observados son consistentes con el peso molecular de G93A más un entrecruzador, BMOE o DTME. (E) Entrecruzamiento químico de SOD1 WT con una molécula reductivamente lábil. Uno de los entrecruzadores de maleimida probados, DTME, tiene un enlace disulfuro en su brazo espaciador que se puede cortar por agentes reductores tal como DTT. SOD1 WT se entrecruzó con una proporción molar de 1:1 de DTME y se analizó por gel de SDS PAGE tanto en presencia como en ausencia de agente reductor, DTT. El dímero entrecruzado de SOD1 se convirtió en monómero en presencia del agente reductor (figura 8B, carril 2) lo que sugiere que el dímero formado es específico a los entrecruzadores usados, y no era el resultado de formación de dímero catalizado por el entrecruzador.

La **figura 9** representa la estabilización de variantes de SOD1 asociadas a ELAf por entrecruzamiento químico. Véase también la figura 15 (estabilidad de SOD1 mutante medida por ensayo de termofluorescencia). Se incubaron SOD1 G93A (A) y G85R (C) con concentraciones de BMOE que variaban de 2,5-20  $\mu\text{M}$ . Se incubaron SOD1 G93A (B) y G85R (D) con 10  $\mu\text{M}$  con cobre/zinc 20  $\mu\text{M}$  y concentraciones de BMOE que variaban desde 2,5-20  $\mu\text{M}$ . Los entrecruzadores usados aquí se resuspendieron en DMSO, por tanto se usaron controles de SOD1 en DMSO al 4%. También se investigó SOD1 wt, sin embargo, debido a su temperatura de fusión cerca del punto de ebullición el ensayo usado aquí no es capaz de detectar si se produjo estabilización o no (datos no mostrados).

G85R y G93A se estabilizaron de una manera dependiente de la concentración de entrecruzador en aproximadamente 40°C y 20°C, respectivamente. La adición de cobre y zinc tuvo poco efecto sobre el tipo salvaje como el mutante G93A, sin embargo, la adición de cobre y zinc a G85R, un mutante deficiente en metal, junto con entrecruzadores estabiliza la proteína a casi niveles de tipo salvaje. La figura 10 ilustra que esta forma muy estable de G58R ha reganado actividad superóxido dismutasa de tipo salvaje. Los gráficos anteriores representan la media de tres replicados de cada concentración respectiva; repetido en triplicado.

La **figura 10** representa el rescate de la actividad de SOD1 G85R variante de ELAf por entrecruzamiento químico. La actividad de SOD wt parece no cambiada por la adición de cobre, zinc, y/o BMOE. G93A, un mutante de tipo wt, tampoco parece afectada por la adición de cobre, zinc, y/o BMOE, sin embargo, parece tener una actividad reducida comparada con el tipo salvaje. G85R es un mutante deficiente en metal que es inactivo. En presencia de exceso de cobre, zinc o BMOE la actividad de G85R aumenta. Lo más notable, G85R en presencia de cobre, zinc y DTME tiene un aumento incluso mayor en actividad. Por tanto, el aumento en estabilidad de G85R también corresponde a un aumento en actividad (figura 16).

La **figura 11** representa la presencia de formación de dímeros en SOD1 WT y SOD1 G93A entrecruzadas. (A) Espectro de wtSOD1 nativa (no entrecruzada). (B) Espectro de wtSOD1 entrecruzada con DTME. La mayoría de la especie observada es wtSOD1 dimérica. (C) Espectro de G93A nativa. (D) Espectro de G93A entrecruzada con DTME. Además de entrecruzar SOD1 WT, G93A se entrecruzó usando DTME y BMOE a una concentración molar de 1:1. El segundo pico de menor peso molecular podría corresponder bien a SOD1 monomérica o el dímero  $[M+2H]^{2+}$ .

La **figura 12** muestra mediante análisis de inmunotransferencia cómo el entrecruzamiento de cisteína produce la formación de dímeros de SOD1. Basado en las distancias cristalográficas entre los rotómeros de los dos residuos de cisteína, se usaron entrecruzadores de maleimida con espaciadores que variaban desde 8,0 a 14,7 Å y un entrecruzador de vinilsulfona con un espaciador de 14,7 Å. Antes del entrecruzamiento SOD1 se trató con DTT para eliminar el azufre de sulfano adventicio (de Beus, 2004 #1268). La reducción de DTT se extinguió por cromatografía inversa de C18, elución de SOD1 en H<sub>2</sub>O/ACN 50/50, ácido fórmico al 0,1%, e intercambio de tampón de este eluyente en PBS, pH 7,4 usando un concentrador Amicon YM10. El entrecruzamiento se realizó a una proporción molar de 1:1 o 1:3 de SOD1 respecto al entrecruzador durante 1 hora a temperatura ambiente y se analizó por inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal para SOD1 (SOD100, Stressgen), (A) entrecruzamiento químico 1:1 y 1:3 de SOD WT con varias maleimidadas y una vinilsulfona.

La **figura 13** muestra fragmentación que sugiere intercambio tiol-disulfuro de DTME. (A) El dímero de G93A (ion precursor) a 1455,4 modificado por un entrecruzador. (B) Disociación de separador en embudo del dímero entrecruzado de G93A (iones fragmentados). La m/z de 1442,4 corresponde al monómero de G93A, m/z de 1456,8 corresponde al monómero de G93A modificado por el entrecruzador cortado, m/z de 1471,0 corresponde al monómero de G93A modificado por entrecruzador y m/z de 1499,7 corresponde al monómero de G93A modificado por dos entrecruzadores.

La **figura 14** muestra que Cys111 es un sitio representativo de entrecruzamiento químico. Para identificar el sitio representativo de entrecruzamiento, G85R se entrecruzó con BMOE y se digirió con Glu-C. Los péptidos se analizaron después usando espectrometría de masa de transformada de Fourier (LC-FTMS). Los datos de péptidos generados de las carreras de LC-FTMS se sometieron a búsqueda MASCOT y los resultados para las muestras no entrecruzadas y entrecruzadas se compararon. Dos  $M_r$  que estaban en la muestra entrecruzada pero no en la nativa eran 5232,674 (m/z 873,120) y 5347,700 (m/z 892,291). Se crearon cromatogramas iónicos extraídos (EIC) para cada una de las anteriores m/z usando una tolerancia de error de 0,01 Da: línea con pico > 1,5 a t ~ 22,5 minutos (entrecruzada) y línea con pico > 1,5 a t ~ 23 minutos (no entrecruzada). La m/z 487,790 ( $M_r$  973,563; residuos 1-9,

extremo N acetilado) se observa en ambas muestras y se presenta como control positivo. Después de la comparación de los EIC, 5232,674, 5347,740, y otros candidatos peptídicos para estar entrecruzados se introdujeron en el sitio web MS-Bridge, que compara las  $M_r$  con una lista de todas las  $M_r$  de péptidos entrecruzados posibles más el peso molecular del entrecruzador (BMOE 220,05 Da). MS-Bridge identificó tanto 5232,674 como 5347,740, como que estaban implicadas en un entrecruzamiento (residuos 103-125 respecto a residuos 103-126) y (residuos 103-126 respecto a residuos 103-126) respectivamente. El entrecruzamiento predicho para 5232,674 tenía una precisión de 6,19 ppm mientras que 5347,740 tenía una precisión de 5,88 ppm. Por tanto, puesto que solo una cisteína está en estos entrecruzamientos predichos, los datos de LC-FTMS/MS revelaron el sitio de entrecruzamiento como Cys111. Notablemente, debido a la complejidad del entrecruzamiento no se obtuvieron datos de MS/MS para los péptidos entrecruzados predichos.

La **figura 15** muestra la estabilización de variantes de SOD1 asociados con ELAf por entrecruzamiento químico. (A) G93A 10  $\mu$ M incubada con DTME 2,5-20  $\mu$ M. (B) G85R 10  $\mu$ M incubada con DTME 0-20  $\mu$ M. Se observaron resultados similares a BMOE (figura 9) para DTME.

La **figura 16** muestra el rescate de la actividad de SOD1 G85R variante de ELAf por entrecruzamiento químico. La actividad SOD1 se siguió usando un ensayo basado en gel de poliacrilamida al 12,5% de nitroazul de tetrazolio (NBT) (69-72). Se incubaron SOD1 WT o variantes asociadas a ELAf en presencia o ausencia de lo siguiente: 2 veces exceso de cobre y zinc; DTME equimolar; y TCEP, que corta cualquier entrecruzamiento mediado por DTME. G85R es un mutante deficiente en metal que es esencialmente inactivo, mientras SOD1 wt y SOD1 G93A son completamente activas. En presencia de exceso de cobre, zinc o DTME, sin embargo, la actividad de G85R aumenta. Notablemente, G85R en presencia de cobre, zinc y DTME tenía el mayor aumento en actividad, y el corte del entrecruzamiento mediado por DTME por TCEP produjo una pérdida de actividad. Se obtuvieron resultados similares para BMOE.

La **figura 17** muestra el contenido de metal por monómero para SOD1 de tipo salvaje y mutantes seleccionados.

Las **figuras 18A-G** muestran varios tipos de entrecruzadores útiles en la invención.

### Descripción detallada de la invención

Desarrollamos estrategias para aumentar la termoestabilidad de variantes de SOD1 asociadas a ELAf que se aprovechan de la nucleofilicidad única de los residuos de cisteína en general, y la proximidad de la Cys111 de monómeros de SOD1 adyacentes en particular. Presentamos estabilización de SOD1 tanto por maleimida como mediada por intercambio tiol-disulfuro usando dos cisteínas adyacentes (Cys111) en cada monómero de SOD1 respectivo. Los datos de espectrometría de masas son consistentes con que un equivalente de entrecruzador produce un equivalente de dímero, y un entrecruzador reductivamente lábil (DTME), descartó la aparición de reacciones catalizadas por el entrecruzador. La reducción de DTME mediante TCEP también descartó efectos mediados por Cys111 que no implican disulfuros entre subunidades (figura 16).

El entrecruzamiento químico estabilizó G93A a  $\sim 20^\circ\text{C}$  y el exceso de cobre, zinc y entrecruzador químico estabilizaron G85R a  $\sim 45^\circ\text{C}$ , que es la mayor alcanzada nunca para SOD1, y según se sabe para cualquier proteína asociada a enfermedad. G85R está entre las variantes de ELAf que se encuentran como monómeros in vivo, lo que sugiere que nuestro enfoque puede ser eficaz para variantes similares. Además de estabilizar G85R, el exceso de cobre, zinc, y entrecruzamiento químico aumentó su actividad enzimática. Se espera que alguna si no todas de las variantes de SOD1 prevalentes, incluyendo las variantes de SOD1 de ELAf más prevalentes (D90A, A4V, E100G, H46R, e I113T) también puedan mostrar estabilización y actividad enzimática aumentadas.

Notablemente, la actividad aumentada alcanzada aquí dirigiéndose a residuos distales respecto al sitio activo está en contraste con la estrategia más popular para diseñar chaperones farmacéuticos, que implica la unión de inhibidores reversibles al sitio activo. Para tales inhibidores del sitio activo una fuente primaria de toxicidad, o falta de eficacia contra algunos mutantes, es la inhibición enzimática que es fundamental para el enfoque, y que produce comprometerse en una dosis que puede ser subóptima para la estabilización. En contraste, nuestro enfoque, interaccionar en la interfase del dímero, tanto estabiliza SOD1 como aumenta la actividad de SOD1 para al menos algunos mutantes inactivos. El uso de ciertos agentes de entrecruzamiento representativos descritos aquí también es adecuado para uso como andamiajes para el diseño de compuestos de alta afinidad y/o especificidad que pueden servir como agentes terapéuticos potenciales que se pueden validar en cultivo celular de ELA y modelos de ratones.

Para estabilizar el dímero de SOD1 humana al tiempo que se minimiza el potencial para toxicidad (de la diana uniéndose a otras proteínas), aprovechamos la presencia de dos residuos de Cys111 simétricamente dispuestos en lados opuestos de la interfase del dímero que están separados por  $\sim 9$  o 13 angstroms, dependiendo del rotómero de Cys (figura 7); la alta nucleofilicidad (reactividad única) de los residuos de cisteína en general; y los beneficios entrópicos del entrecruzamiento. La fuerza de unión del compuesto aumentó mediante el uso de enlaces covalentes, de modo que la unión es esencialmente irreversible *in vitro*.

Otras clases de compuestos dirigidos a cisteína incluyen reactivos mercuriales, péptidos, reactivos que forman disulfuro no peptídicos, bismaleimidas y agentes alquilantes (por ejemplo, yodoacetamida). Para comparar estas clases diferentes de entrecruzadores, se consideró la solubilidad general (el log del coeficiente de reparto octanol-agua), expresada como logP y la toxicidad, expresada como  $Cl_{50}$  o  $DL_{50}$ , la dosis letal para el 50% de las células o animales expuestos, respectivamente. Las reglas de Lipinski mostraron que los compuestos con valores de logP de no más de 5 (idealmente entre 1-3) se consideran “de tipo fármaco”, y los compuestos con logP menor de 1 se pueden disolver suficientemente en soluciones acuosas. Se puede buscar un número representativo de compuestos (de 3-350 dependiendo de la disponibilidad) en cada una de las clases en la bibliografía mediante PubChem. Las clases se ordenan en el siguiente orden de solubilidad en agua, *desde la mayor a la menor*: péptidos (muy variable y dependiente de la secuencia, con intervalos de logP de -3 a 12 para 350 péptidos) > bismaleimidas ( $XlogP \sim 1$ ) > agentes alquilantes ( $XlogP \sim 2,5$ ) > reactivos que forman disulfuro no peptídicos ( $XlogP \sim 4$ ), mercurial (no buscado debido a la alta toxicidad, véase posteriormente). El orden para la toxicidad *desde la menor a la mayor* es como sigue: péptidos (variable pero con frecuencia tolerados a concentraciones biológicas de >10 mM), bismaleimidas (nota: la maleimida más comúnmente estudiada, N-etilmaleimida es hepatotóxica a  $0,075 \text{ mg kg}^{-1}$  en ratas, y una segunda maleimida tenía  $Cl_{50} 2 \mu\text{m}$  en cultivo celular y  $<40 \text{ mg kg}^{-1}$  en ratones) < agentes alquilantes [ $1,3$ -dibromoacetona ( $3 \text{ g kg}^{-1}$  en ratones), bis-epóxidos (intervalo de  $4-20 \text{ g kg}^{-1}$ ), y algunas vinilsulfonas ( $1 \text{ g kg}^{-1}$ )] mientras que otros agentes alquilantes [fenilhidracina ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y N,N'-etilenbis-(yodoacetamida) ( $9 \text{ mg kg}^{-1}$ )] no están recomendadas debido a sus valores de  $DL_{50}$  en seres humanos) < derivados mercuriales (variable, pero algunos compuestos están en el intervalo de  $10-40 \text{ mg/kg}$  para seres humanos). De estos compuestos, ciertos agentes alquilantes se podrían tolerar a dosis muy altas.

#### Formas de realización proféticas

*Determinar si la estabilización mediada por Cys11-entrecruzador es aplicable a las variantes de SOD1 en ELAf más prevalentes y a SOD1 WT oxidada*

En resultados preliminares se usaron entrecruzadores de maleimida, específicos para Cys111, homobifuncionales para anclar los monómeros de SOD1 individuales de las variantes de SOD1 G93A y G85R. Alcanzamos lo que es para nuestro conocimiento un nivel sin precedentes de estabilización mediada por molécula pequeña para cualquier proteína aumentando el punto de fusión de SOD1 G85R en  $\sim 45^\circ\text{C}$ , mientras que también se restablecía la actividad casi total a la variante G85R de otra manera inactiva. Para determinar este potencial terapéutico más amplio, las cinco variantes de SOD1 de ELAf más prevalentes (D90A, A4V, E100G, H46R, e I113T), C6G y SOD1 WT oxidada se analizarán de la siguiente manera:

- A. Expresar y purificar las variantes prevalentes de SOD1 D90A, A4V, E100G, H46R, I113T, y C6G.
- B. Determinar si las maleimidas homobifuncionales Cys111: 1) anclan los dímeros de estas variantes en Cys11 usando espectrometría de masas; 2) estabilizan las variantes de SOD1 de ELAf usando un ensayo de estabilidad de “termofluorescencia”; y 3) mejoran la actividad enzimática. Determinar los sitios de unión del compuesto usando espectrometría de masas, y usar el compuesto unido a Cys6 de SOD1 como un intermedio para reacción secundaria con otras cisteínas libres.
- C. Determinar si las maleimidas homobifuncionales ralentizan la velocidad de oxidación y monomerización causada por el producto de la reacción enzimática de SOD1, peróxido, y también determinar si las maleimidas homobifuncionales estabilizan SOD1 WT que se ha oxidado previamente.

*Desarrollar entrecruzamiento de Cys111 basado en péptidos y moléculas que estabilizan SOD1*

Usando tanto restricciones predefinidas, racionales como restricciones determinadas experimentalmente, repetitivas, se puede analizar una biblioteca combinatoria de  $\sim 2000$  péptidos que son sensibles a estabilización de dímeros de SOD1 mediada por intercambio tiol-disulfuro de los >20 millones posibles de di-, tri-, tetra- y péptidos cíclicos y usar. Estos péptidos se pueden sintetizar en una instalación de servicio de alto rendimiento; ensayos de espectrometría de masas multiplexada determinar la velocidad de entrada de compuestos y su velocidad de salida en presencia del agente reductor fisiológico, glutatión; se realizan ensayos de estabilidad multiplexados, y se determina la actividad dismutasa para los 200 mejores compuestos.

Para probar diferentes longitudes del brazo espaciador y diferente espacio químico, se crearán entrecruzadores R-Cys-Cys-R, R-Cys-X-Cys-R<sub>1</sub> y R-Cys-X-X-Cys-R, en donde R es un grupo variable unido por un enlace disulfuro a un azufre cisteínico de un péptido, y X es una aminoácido variable que puede estar compuesto de los 20 aminoácidos naturales y 8 aminoácidos no naturales. Se probará la capacidad de estos compuestos para estabilizar SOD1 usando espectrometría de masa, termofluorescencia y actividad.

Se crearán péptidos cíclicos acoplando los péptidos más activos de los fines 2A-C a través de sus enlaces disulfuro Cys-Cys. El ensayo de estos compuestos será como anteriormente.

Se generarán modelos de relación de estructura y actividad cuantitativos usando los resultados experimentales y se usarán estos para crear 200 péptidos optimizados adicionales, que se probarán como anteriormente y se espera que tengan rendimiento mejorado.

Se espera desarrollar y caracterizar la primera generación de entrecruzadores de Cys11 de SOD1 basados en péptidos. El coste relativamente bajo de la síntesis de péptidos permite un aumento concomitante en la escala de las relaciones estructura actividad in vitro. Un fin es que las relaciones estructura-actividad surjan y alienten a grupos cualificados, colaboradores o empresas a emprender el diseño de peptidomiméticos. Las relaciones estructura-actividad son un prerequisite para crear peptidomiméticos, que implica el "analogamiento" adicional de residuos críticos. Otro fin es posibilitar nuestros propios ensayos de toxicología y bioactividad basados en cultivo celular, que proporcionen información estructura-actividad adicional y crítica. En otros estudios, inmunopurificamos rutinariamente SOD1 de cultivo celular y animales, y el mismo protocolo se podría usar en futuros estudios en cultivo celular o animales como un bioensayo para SOD1 entrecruzada.

Proponemos primero descubrir péptidos que se puedan unir a SOD1 y después crear análogos cíclicos de estos péptidos uniéndolos a través de sus residuos de cisteína N- y C-terminales a otros péptidos activos. Usando péptidos podremos explorar una gran cantidad de espacio químico al tiempo que subcontratamos la síntesis, y nos concentramos en el cribado relativamente de alto rendimiento. Los péptidos representan una forma relativamente económica de explorar el espacio químico, y la potencial debilidad de tener malas propiedades farmacológicas que probablemente solo se pueden superar con experiencia en peptidomiméticos. En otras palabras, se pueden usar péptidos para informar la síntesis de moléculas pequeñas no peptídicas. Los fármacos peptídicos tienen un bajo coste, síntesis robusta, especificidad aumentada en localizar aminoácidos de interés inherentemente baja toxicidad, y en los tamaños de péptidos usados aquí, virtualmente no inmunogenicidad. Una diferencia principal, y potencial diferencia de nuestro enfoque es que nominalmente solo dos aminoácidos, Cys-Cys, se requieren para entrecruzar SOD1, lo que hace nuestro péptido potencialmente mucho más pequeño que otros péptidos bioactivos. Esto ciertamente ayudará a cruzar la barrera hematoencefálica y probablemente disminuirá la digestión por peptidasas.

Un potencial enfoque basado en péptidos representativos para la estabilización de SOD1 es la creación de péptidos cíclicos. El enfoque general de ciclar los residuos activos de un péptido usando cisteína-disulfuro tuvo éxito en el caso de análogos de  $\alpha$ -MSH, que flanquean el núcleo activo esencial His-Phe-Arg-Trp de  $\alpha$ -MSH con residuos de cisteína, y después ciclar usando las mismas cisteínas. Los péptidos cíclicos se han usado durante casi treinta años para aumentar la bioactividad y propiedades farmacológicas de péptidos lineales. Otro testimonio a su eficacia es que numerosos antibióticos derivados de productos naturales, incluyendo antibióticos bien conocidos como bacitracina, ciclosporina y nisina (un conservante alimentario común), son péptidos cíclicos. El péptido cíclico puede ser extraordinariamente estable, incluso hasta el nivel de que sobreviven en el aparato digestivo humano. El péptido cíclico resultante tenía 60 veces la actividad biológica. Esta semivida biológica del péptido se mejoró hasta incluso más acortando la secuencia a solo siete aminoácidos e incorporando aminoácidos no naturales. Hay numerosas ventajas de los péptidos cíclicos sobre sus análogos lineales, incluyendo farmacocinética superior tanto de metabolismo como de secreción y más resistencia a la degradación proteolítica. Los péptidos cíclicos están más constreñidos y pueblan una estructura molecular más definida, lo que a su vez permite mejor estimación del farmacóforo apropiado cuando se construyen peptidomiméticos. Realizamos simulaciones dinámicas moleculares basadas en MM2 de 20 picosegundos cualitativas y la diferencia entre la movilidad del azufre de cisteinilo en péptidos lineales, que podría ser mayor de 8 Å, y péptidos cíclicos, que estaba en el orden de 2 Å, fue notable.

#### Análogos representativos de la invención

Un aspecto de la invención es un análogo de superóxido dismutasa estabilizado, en donde dicho análogo tiene una estructura terciaria y comprende un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1, y un entrecruzador; dicho entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud desde 3 Å hasta 15 Å; en donde dicho primer monómero de SOD1 comprende un primer residuo de cisteína en una primera posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje, y dicho segundo monómero de SOD1 comprende un segundo residuo de cisteína en una segunda posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje; y la primera cisteína se une covalentemente a la segunda cisteína por el entrecruzador.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la estructura terciaria es sustancialmente la misma que la enzima superóxido dismutasa de tipo salvaje.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la primera cisteína y la segunda cisteína ocupan la misma posición numerada.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la primera cisteína y la segunda cisteína ocupan diferentes posiciones numeradas.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la primera cisteína está en la posición 111.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la segunda cisteína está en la posición 111.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la identidad de secuencia de dicho primer monómero de SOD1 y dicho segundo monómero de SOD1 es mayor que o igual a aproximadamente el 85%.

5 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde dicho primer monómero de SOD1 y dicho segundo monómero de SOD1 tienen la misma secuencia de aminoácidos.

10 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la longitud de la conexión es desde aproximadamente 5 angstroms hasta aproximadamente 15 angstroms.

15 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la longitud de la conexión es desde aproximadamente 8 angstroms hasta aproximadamente 14 angstroms.

20 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la longitud de la conexión es desde aproximadamente 9 angstroms hasta aproximadamente 11 angstroms.

25 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la longitud de la conexión es desde aproximadamente 9 angstroms hasta aproximadamente 13 angstroms.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el primer monómero de SOD1 de dicho análogo es la secuencia de tipo salvaje o comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en G93A, G85R, D90A, A4V, E100G, C6G, e I113T.

30 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el segundo monómero de SOD1 de dicho análogo es la secuencia de tipo salvaje o comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en G93A, G85R, D90A, A4V, E100G, C6G, e I113T.

35 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde dicho análogo retiene al menos el 90% de actividad de la enzima superóxido dismutasa de tipo salvaje hasta una temperatura de 75 grados C.

40 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 10 grados C a 60 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

45 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 20 grados C a 40 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 15 grados C a 25 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

50 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 30 grados C a 50 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

55 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta en 20 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

60 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta en 40 grados C comparada con su dímero sin entrecruzar.

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el entrecruzador se selecciona del grupo que consiste en tris[2-meleimidoetil]amina (TMEA), ditio-bismaleimidoetano (DTME), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB), (1,8-bis-maleimido-dietilenglicol (BM(PEG)2), 1,4-bis(maleimido)butano (BMB) y bis(maleimido)etano (BMOE).

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el entrecruzador se selecciona del grupo que consiste en organomercuriales, maleimidas, vinilsulfonas, y agentes alquilantes.

5 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud desde aproximadamente 7 angstroms hasta aproximadamente 11 angstroms.

10 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los análogos mencionados anteriormente, en donde el entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud de aproximadamente 9 angstroms.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacológica, que comprende un análogo de SOD1 estabilizado; y un soporte farmacéuticamente aceptable.

#### 15 Métodos representativos de la invención

Un aspecto de la invención es un método de producir un análogo de superóxido dismutasa (SOD1) estabilizado, que comprende el paso de hacer reaccionar un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1 y un entrecruzador, formando de esta manera dicho análogo.

Un aspecto de la invención es un método de producir un análogo de superóxido dismutasa (SOD1) estabilizado, que comprende el paso de unir una primera cisteína de un primer monómero de SOD1 con una segunda cisteína de un segundo monómero de SOD1.

25 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además el paso de sustituir un aminoácido natural del primer monómero de SOD1 con la primera cisteína.

30 En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, que comprende además el paso de sustituir un aminoácido natural del segundo monómero de SOD1 con la segunda cisteína.

Otro aspecto de la invención es un análogo de SOD1 estabilizado de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o en la profilaxis para una enfermedad neurodegenerativa, en donde la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica.

#### Definiciones

40 El término "análogo" se refiere a una molécula sustancialmente similar en función a la proteína SOD1 o un fragmento de la misma.

Los términos "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" o "porcentaje de homología de secuencia de aminoácidos" o "porcentaje (%) idéntico" como se usan en el presente documento con respecto a un polipéptido de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia polipeptídica candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin considerar sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede lograr por varios métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo sobre la secuencia completa de la secuencia peptídica que se usa en la comparación. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, se dice que un análogo de SOD1 comparte "homología sustancial" con SOD1 si la secuencia de aminoácidos de dicho análogo es al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 99% idéntica al tipo salvaje.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea para referirse a esos ligandos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, en el ámbito del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales, sustancialmente no pirógenos, sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, equivalente a una proporción riesgo/beneficio razonable.

La frase "soporte farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como un relleno, diluyente, excipiente, solvente o material encapsulante líquido o sólido, implicado en llevar o transportar el sujeto químico de un órgano o parte del cuerpo a otro órgano o parte del cuerpo. Cada soporte debe ser "aceptable" en el sentido de que es compatible con los otros

ingredientes de la formulación, no lesivo para el paciente, y sustancialmente no pirógeno. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tal como lactosa, glucosa, y sacarosa; (2) almidones tal como almidón de maíz y fécula de patata; (3) celulosa y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) 5 gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tal como manteca de cacao y ceras de supositorios; (9) aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja; (10) glicoles, tal como propilenglicol; (11) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua sin pirógeno; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas con fosfato; y (21) otras 10 sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son no pirógenas, es decir, no inducen elevaciones de temperatura significativas cuando se administran a un paciente.

El término “prevenir” está reconocido en la técnica, y cuando se usa en relación a una afección, tal como una recaída local (por ejemplo, dolor), una enfermedad tal como cáncer, un síndrome complejo tal como insuficiencia cardiaca o cualquier otra afección médica, se entiende bien en la técnica, e incluye la administración de una composición que reduce la frecuencia de, o retrasa el inicio de, síntomas de una afección médica en un sujeto relativo a un sujeto que no recibe la composición. Por tanto, la prevención del cáncer incluye, por ejemplo, reducir el 20 número de crecimientos cancerosos detectables en una población de pacientes que reciben un tratamiento profiláctico relativo a una población control sin tratar, y/o retrasar la aparición de crecimientos cancerosos detectables en una población tratada frente a una población control sin tratar, por ejemplo, en una cantidad estadística y/o clínicamente significativa. La prevención de una infección incluye, por ejemplo, reducir el número de diagnósticos de la infección en una población tratada frente a una población control sin tratar, y/o retrasar el inicio de los síntomas de la infección en una población tratada frente a una población control sin tratar. La prevención del 25 dolor incluye, por ejemplo, reducir la magnitud de, o alternativamente retrasar, las sensaciones de dolor experimentadas por sujetos en una población tratada frente a una población control sin tratar.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto, por ejemplo, tal como un polipéptido o análogo de péptido de la presente invención, con respecto al uso en el tratamiento, se refiere a una cantidad del polipéptido o péptido en una preparación que, cuando se administra como parte de una pauta de dosis deseada (a un mamífero, preferiblemente un ser humano) alivia un síntoma, mejora una afección, o ralentiza el inicio de afecciones de enfermedad según estándares clínicamente aceptables para el trastorno o afección que se va a tratar o el fin cosmético, por ejemplo, en una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. 30

Los términos tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” son reconocidos en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica de una afección indeseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado indeseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico (es decir, protege al huésped contra el desarrollo de la afección indeseada), mientras que si se 40 administra después de la manifestación de la afección indeseada, el tratamiento es terapéutico (es decir, se pretende para disminuir, mejorar o estabilizar la afección indeseada existente o los efectos secundarios de la misma).

### Ejemplificación

La invención que se describe ahora en general, se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos que se incluyen meramente para fines de ilustración de ciertos aspectos y formas de realización de la presente invención, y no se pretenden para limitar la invención.

#### *Expresión y purificación de proteínas*

WtSOD1 se compró de Sigma-Aldrich (Sr. Louis, Missouri). Las construcciones para la expresión de G93A y G85R en *S. cerevisiae* se han obtenido a través del generoso regalo del Dr. P. John Hart, PhD (Health Science Center de la Universidad de Texas, San Antonio). La expresión y purificación de G93A y G85R se llevó a cabo como se ha 55 publicado previamente (26, 27). Brevemente, cada construcción en el vector de expresión de levaduras YEp-351 se transformó en levaduras EGY118ΔSOD1 y se hicieron crecer a 30°C durante 36-48 horas. Los cultivos se precipitaron, se lisaron usando bolas de vidrio de 0,5 mm y un mezclador, y se sometieron a corte con sulfato de amonio al 60%. Después de la precipitación con sulfato de amonio, la muestra se precipitó y el sobrenadante se diluyó con 0,19 volúmenes hasta una concentración final de sulfato de amonio 2,0 M. Esta muestra se purificó después usando una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica de fenil-sepharosa 6 de flujo rápido (alto sub) (GE Life Sciences) usando un gradiente de sal que disminuye linealmente de 300 ml desde un tampón con alta sal (sulfato de amonio 2,0 M, fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 0,1 M, DTT 0,25 mM, pH 7,0) a un tampón de baja sal (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 0,1 M, DTT 0,25 mM, pH 7,0). Las 60 muestras que contenían SOD1 eluyeron en sulfato de amonio entre 1,6-1,1 M y se identificaron usando análisis por SDS PAGE, se juntaron e intercambiaron a un tampón Tris 10 mM, pH 8,0. La proteína se cargó después en una columna de cromatografía de intercambio aniónico Mono Q 10/100 (GE Life Sciences) y se eluyó usando un

gradiente de sal linealmente creciente de 200 ml de un tampón con baja sal (Tris 10 mM, pH 8,0) a un tampón con alta sal (Tris 10 mM, pH 8,0, cloruro de sodio 1 M). El gradiente se corrió desde el 0-30% de Tris 10 mM, pH 8,0, cloruro de sodio 1 M y SOD1 eluyó entre el 5-12% de Tris 10 mM, pH 8,0, cloruro de sodio 1 M. La proteína SOD1 se confirmó a través de SDS PAGE, inmunotransferencia, MALDI-TOF y FTMS.

#### *Entrecruzamiento e inmunotransferencias*

Se incubaron SOD1 wt, G93A o G85R con DTT 5-25 mM durante aproximadamente 20 minutos y o bien el tampón se intercambió usando concentradores de centrifugación Amicon Ultra-4 (MWCo 10K) o usando cromatografía de fase inversa (ZIPTIP, Millipore, Inc.). Las muestras limpiadas por ZIPTIP también se sometieron a incubación con EDTA 5 mM. Las muestras de SOD1 en las que se intercambió el tampón usando concentradores Amicon se intercambiaron en agua de HPLC, mientras que las muestras de ZIPTIP se intercambiaron además después de ZIPTIP en PBS, pH 7,4 o agua de HPLC. Se incubó SOD1 reducida con DTT a una proporción de 1:1 (20 µM:20 µM o 10 µM:10 µM) o 1:3 (20 µM:60 µM o 10 µM:30 µM) de proteína respecto a entrecruzador.

Se usaron una variedad de entrecruzadores (Thermo-Fisher Scientific): ditio-bismaleimidoetano (DTME, brazo espaciador 13,3 Å), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB, brazo espaciador 10,2 Å), 1,8-bis-maleimido-dietilenglicol (BM(PEG)<sub>2</sub>, brazo espaciador 14,7 Å), 1,4-bismaleimidobutano (BMB, brazo espaciador 10,9 Å), tris[2-meileimidoetil]amina (TMEA, 10,3 Å), y 1,6-hexanol-bis-vinilsulfona (HBVS, brazo espaciador, 14,7 Å). El entrecruzamiento se logró incubando la reacción en PBS pH 7,4 o agua a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de una hora las reacciones se analizaron en un gel de SDS PAGE al 15% con un control no entrecruzado, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron usando un anticuerpo policlonal para SOD1. Repetido en triplicado.

Además, DTME es un agente de entrecruzamiento sulfhidrido-sulfhidrido cortable. Por tanto, se realizó una reacción de entrecruzamiento que contiene una proporción molar 1:1 de wtSOD1 respecto de DTME a temperatura ambiente durante una hora. Después del entrecruzamiento, la reacción se dividió por la mitad y la mitad de la muestra se corrió en un tampón de muestra que contenía DTT (reductor) y la otra mitad en uno que no contenía DTT (no reductor). Estas muestras junto con controles no entrecruzados se analizaron en gel de SDS PAGE al 15% y se inmunotransfirieron como anteriormente.

#### *Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI)-tiempo de vuelo (TOF)*

WtSOD1 y SOD1 G93A se trataron con DTT y entrecruzaron a una proporción molar 1:1 como se ha descrito anteriormente. WtSOD1 se entrecruzó con todos los entrecruzadores mencionados previamente, mientras que G93A se entrecruzó con DTME y bis(maleimido)etano (BMOE, brazo espaciados 8,0 Å). Se usó BMOE debido a la longitud más corta de su brazo espaciador. Después del entrecruzamiento, se dispensó 1 µl de la muestra en una diana MALDI que contenía 1 µl de matriz, ácido sinápico 20 mg/ml, y se analizó en un Bruker Daltonics Microflex. El MALDI se calibró cada vez usando un estándar de calibración de proteína de alto peso molecular, Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics). El MALDI-TOF se operó en modo lineal usando una potencia de laser entre el 72-90%. Los espectros de MALDI-TOF eran de muestras entrecruzadas y no entrecruzadas se analizaron usando software FlexAnalysis (Bruker Daltonics). Repetido en triplicado.

#### *Cromatografía líquida (LC)-Espectrometría de masa por transformada de Fourier (FTMS) y Disociación por separador en embudo (FSD)*

G93A se entrecruzó usando DTME o BMOE como se ha descrito previamente a una proporción molar de 1:1 (5 µM:5 µM). Después de una hora, se añadió acetonitrilo al 3% y ácido fórmico al 1% a la muestra y se centrifugó a 14.000 RPM durante 10 minutos para precipitar cualquier proteína precipitada. La muestra entrecruzada se colocó en un cargador automático de muestras y 1 µl de la muestra entrecruzada se aspiró en un Proxeon 1D HPLC o Eksigent 2D UPLC con el siguiente gradiente: 3-50% de B durante 30 minutos, 50-95% de B durante 7 minutos, 95% de B durante 5 minutos, 95-3% de B durante 1 minuto, y 3% de B durante 5 minutos. El tampón A es agua de HPLC con ácido fórmico al 0,1% y el tampón B es acetonitrilo al 100%, ácido fórmico al 0,1%. Después de la cromatografía líquida, la muestra se ionizó usando ionización de nanoespray y se analizó usando un 94 Tesla Bruker Daltonics FTMS. El FTMS se controló usando software de control Apex y los parámetros fuente se controlaron usando el software Apollo II. Los espectros (G93A monomérica y dimérica) se recogieron usando un separador 1 diferencia de potencial 35-40 V mientras que la disociación por separador en embudo se usó para fragmentar G93A entrecruzada aumentando el separador uno a una diferencia de potencial de 140 voltios. Los datos de LC-FTMS de G93A entrecruzada y no entrecruzada se analizaron usando el software Data Analysis (Bruker Daltonics). Estos experimentos se repitieron en triplicado.

#### *Secuenciación de péptidos usando LC-FTMS (análisis de abajo-arriba)*

G85R se entrecruzó usando BMOE como se ha descrito previamente a una proporción molar de 1:1 (5 µM:5 µM). Después de una hora, la proteína entrecruzada se calentó a 99°C durante 30 minutos y después se incubó con TCEP 10 mM durante 10 minutos. La G85R entrecruzada calentada y reducida se incubó después con 1,5 µl de Glu-

C 0,5 mg/ml a 30°C durante la noche. La muestra digerida se centrifugó a 14.000 RPM durante 10 minutos y después se inyectó en el Eksigent UPLC usando el gradiente anterior. Después de la cromatografía líquida, las muestras se introdujeron usando ionización de nanoespray y los datos de MS/MS se recogieron usando CID. Los compuestos se identificaron usando el software Bruker Daltonics Data Analysis, se deconvolucionaron, y se exportaron a un fichero mascot genérico. Se realizó el análisis entrecruzado y no entrecruzado cargando los ficheros mascot genéricos en la máquina de búsqueda MASCOT seleccionando ninguna como la enzima, usando la base de datos NCBIR, con 1,2 Da (tolerancia de error de MS) y 0,6 Da (error de tolerancia MS/MS). Las búsquedas MASCOT para las muestras entrecruzadas y no entrecruzadas se compararon y las m/z identificadas en la muestra entrecruzada y la muestra no entrecruzada se sometieron a una búsqueda MS Bridge (protein prospector, UCSF) usando BMOE como el entrecruzador (220,05 Da). MS Bridge busca todos los pesos moleculares potenciales de péptidos entrecruzados más el peso molecular del entrecruzador. Los péptidos identificados de la búsqueda MS Bridge como que están implicados en entrecruzamiento se caracterizaron adicionalmente por cromatogramas iónicos extraídos en el software Data Analysis.

#### *Análisis de metal*

El análisis de metal se realizó usando espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS) en el Laboratorio de Análisis Químico de la Universidad de Georgia (Athens, GA). Brevemente, se envió tampón solo para análisis como un blanco junto con 1 µM de cada variante; el análisis se repitió en triplicado. Además, 5 µM de cada variante se analizó usando el FTMS en modo ESI usando el método de infusión directa.

#### *Ensayo de estabilidad de termofluorescencia*

Las curvas de fusión de SOD1 G93A y G85R se siguieron en presencia o ausencia de DTME o BMOE y un exceso tanto de cobre como zinc donde un aumento en la temperatura de fusión sugiere unión y un aumento en la estabilidad de la proteína. Por tanto, se analizaron muestras de proteína en ausencia de entrecruzador (que se resuspenden en DMSO) o cobre y zinc en presencia de DMSO al 2-4% para determinar los efectos de DMSO sobre la estabilidad de la proteína. En la primera secuencia de reacciones, se incubó 10 µM de SOD1 mutante con concentraciones crecientes de DTME o BMOE 0-20 µM, incubada con SYPRO™ naranja 20X y añadida a una placa de 96 pocillos. Alternativamente, en la segunda secuencia de reacciones, se incubaron 10 µM de SOD1 mutante con cobre 20 µM, zinc 20 µM y BMOE o DTME 0-20 µM. La temperatura de fusión de la proteína se siguió usando una máquina de RT-PCR (Applied Biosystems) con un aumento de 0,3°C en temperatura cada minuto de 25-100°C. Los datos se analizaron restando un blanco de colorante solo de cada pocillo respectivo, normalizado a 1, y se representó temperatura frente a fracción de proteína desnaturalizada. Restar un blanco de DTME o BMOE, cobre, zinc, colorante dio resultados similares que restar un blanco de colorante solo. Repetido en triplicado.

#### *Ensayo de actividad SOD1*

La actividad SOD1 se siguió usando un ensayo basado en gel de nitroazul de tetrazolio (NBT) (69-72). Se incubaron 10 µg (~42 µM) de SOD1 wt o mutante en presencia o ausencia de cobre y zinc 80 µM y/o BMOE 42 µM, después se analizó en un gel de poliacrilamida al 12,5%. Alternativamente, se incubaron 10 µg (~42 µM) de SOD1 wt o mutante en presencia o ausencia de cobre y zinc 80 µM y/o DTME 42 µM. Las muestras entrecruzadas con DTME se dividieron por la mitad, donde una mitad se incubó con TCEP 10 mM y la otra no, después se analizaron en un gel de poliacrilamida al 12,5%. El gel se tiñó usando una solución que contenía fosfato de potasio 50 mM, pH 7,8, 1 comprimido de NBT (10 mg/comprimido) y riboflavina 0,1 mg/ml durante 45 minutos en la oscuridad. Después de 45 minutos de incubación se añadió 1 µl/ml de TEMED y el gel se expuso a la luz durante 2 minutos. Los radicales superóxido crean formazán azul insoluble a partir de NBT. La actividad SOD1 se ve como una banda incolora ya que SOD1 capta el superóxido, inhibiendo de esta manera la formación de color azul. Repetido en triplicado.

## **Resultados**

#### *Entrecruzamiento usando entrecruzador de grupo funcional maleimida extrínseco para estabilizar SOD1 dimérica*

Todos los entrecruzadores de maleimida probados que tenían longitudes de cadena en el intervalo de 8-14 Å produjeron la estabilización del dímero de SOD1, incluyendo ditio-bismaleimidoetano (DTME, brazo espaciador 13,3 Å), 1,4-bismaleimidil-2,3-dihidroxibutano (BMDB, brazo espaciador 10,2 Å), 1,8-bis-maleimido-dietilenglicol (BM(PEG)<sub>2</sub>, brazo espaciador 14,7 Å), 1,4-bismaleimidobutano (BMB, brazo espaciador 10,9 Å), y tris[2-maleimidoetil]amina (TMEA, 10,3 Å) (figura 12). Alternativamente, la única vinilsufona probada, 1,6-hexanol-bis-vinilsulfona (HBVS, brazo espaciador, 14,7 Å), no produjo la formación de SOD1 dimérica (figura 12).

Para investigar la estequiometría de la unión del entrecruzador, se compararon los pesos moleculares de variantes G93A entrecruzadas (DTME o BMOE) frente a no entrecruzadas usando cromatografía líquida (LC)-espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS). Se determinó que el peso molecular experimental para la especie monomérica no entrecruzada era 15851,055 Da (teórico 15850,889 Da), y se determinó que el peso molecular experimental para la especie entrecruzada con DTME dimérica era 32013,904 Da (0,244 Da de diferencia del valor teórico del peso molecular de dos monómeros de G93A más un DTME (312,037 Da)). El peso molecular

experimental de G93A entrecruzada con DTME dimérica, 32013,904 Da, sugiere que un equivalente de entrecruzador produjo un equivalente de dímero (figura 8), consistente con la unión de un único entrecruzador a dos monómeros. Se obtuvieron resultados similares para el entrecruzamiento de G93A y BMOE (datos no mostrados).

- 5 Para descartar la aparición de reacciones catalizadas por el entrecruzador, se usó un entrecruzador reductivamente lábil, DTME, y el entrecruzamiento se siguió usando inmunotransferencia. El entrecruzamiento usando DTME produjo SOD1 dimérica, sin embargo en presencia de agente reductor solo se observó monómero (figura 8E), lo que sugiere que la creación del dímero de SOD1 se debía específicamente a entrecruzadores químicos unidos.

#### 10 *Estabilización del dímero de SOD1 mediada por intercambio tiol-disulfuro*

La masa de SOD1 intacta y los datos de fragmentación MS/MS usando la disociación con separador en embudo (FSD) de la variante G93A entrecruzada (iones precursores) reveló un mecanismo de reacción único, intercambio tiol-disulfuro, para entrecruzar SOD1 (figura 13). Primero, la SOD1 intacta y la SOD1 con 1/2 de DTME eluyen a diferentes tiempos de retención en la carrera de cromatografía líquida lo que sugiere que son especies únicas descartando por tanto la posibilidad de fragmentación en el disulfuro de DTME. Segundo, la fragmentación se produce preferentemente en el sitio de entrecruzamiento. La especie modificada por medio DTME sugiere que el intercambio se produjo entre el enlace sulfhidrilo-sulfhidrilo en el espaciador de DTME y la fracción tiol de un residuo de cisteína en G93A. Por último, la posibilidad de intercambio tiol-disulfuro se confirmó además modelando la mitad de DTME en la interfase del dímero, específicamente Cys111, de la estructura de SOD1 ((2C9V (Strange, 2006 #95))) (figura 7). Por tanto, se pudo entrecruzar monómeros de SOD1 eficazmente usando numerosas moléculas (figura 12) y dos mecanismos de reacción distintos, es decir maleimida (figura 8, figuras 11 y figura 12) e intercambio tiol-disulfuro (figura 13), siendo el último adecuado para estrategias terapéuticas basadas en péptidos.

#### 25 *Cys111 es el sitio de entrecruzamiento químico*

Para identificar el sitio de entrecruzamiento, se compararon datos de proteólisis y LC-FTMS/MS, que proporcionaron datos de secuencia de péptidos digeridos, para muestras no entrecruzadas y entrecruzadas (figura 14). Debido a la resistencia a proteasas de SOD1 WT y G93A, probablemente conferida a través de la unión a metales y un enlace disulfuro intramolecular, se usó la variante G85R, que es menos resistente a proteasas. Se observó la  $m/z$  487,790 ( $M_r$  973,563; residuos 1-9, extremo N acetilado) en ambas muestras y se presenta como un control positivo, subrayando intensidades similares del péptido en las muestras entrecruzada y no entrecruzada. Se observaron dos  $M_r$  que estaban en la muestra entrecruzada pero no en la nativa: 5232,674 ( $m/z$  873,120) y 5347,700 ( $m/z$  892,291). MS-Bridge identificó tanto 5232,674 como 5347,700 como que estaban implicadas en el entrecruzamiento (residuos 103-125 de un monómero entrecruzado a través de BMOE a los residuos 103-126 de un segundo monómero) y (residuos 103-126 de un monómero entrecruzado a través de BMOE a los residuos 103-126 de un segundo monómero), respectivamente. El entrecruzamiento predicho para 5232,674 tenía una precisión de 6,19 ppm mientras que 5347,700 tenía una precisión de 5,88 ppm. Por tanto, la espectrometría de masa confirmó que el entrecruzamiento era estequiométrico y se producía principalmente a través de Cys111, y que la reactividad cruzada con otros residuos de cisteína de SOD1 Cys6, Cys57 y Cys146 era relativamente baja (figura 14). Notablemente, debido a la complejidad del entrecruzamiento había una falta de fragmentación de iones precursores de los péptidos entrecruzados.

#### 45 *El entrecruzamiento químico estabiliza los dímeros de G93A y G85R*

Sypro naranja se une preferentemente a parches hidrofóbicos que se exponen según se desnaturaliza la proteína. Se usó un ensayo basado en fluorescencia que sigue la unión de Sypro naranja como función de la temperatura para observar tendencias en las temperaturas de desnaturalización tanto de G93A como de G85R. Este ensayo no es reversible, probablemente como resultado de la agregación de SOD1, y mientras que las temperaturas de desnaturalización recuerdan las temperaturas de fusión previamente observadas de SOD1, no son estabilidades termodinámicas apropiadas. SOD WT no se pudo seguir usando este ensayo porque su temperatura de fusión está en el límite de detección (~100°C). Se observaron aumentos no precedentes en la estabilidad de los mutantes analizados (figura 9 y figura 15). SOD1 G93A, por ejemplo, se estabilizó en ~20°C; la incubación con exceso de cobre y zinc no tuvo efecto en la estabilidad de G93A; y las concentraciones menores de entrecruzador tuvieron un mayor efecto en la estabilidad de G93A. SOD1 G85R, por otra parte, se estabilizó ~20°C en presencia de exceso de cobre y zinc; aumentó además ~45°C (de ~40°C a 85°C) en presencia de cobre, zinc, y entrecruzador; y las mayores concentraciones de entrecruzador tuvieron un mayor efecto sobre la estabilidad de G85R. Por tanto, el grado de estabilización alcanzado aquí por lo que son esencialmente chaperones farmacológicos (covalentes) es el mayor nunca alcanzado para SOD1, y por lo que sabemos, para cualquier proteína asociada a enfermedad.

#### 60 *La actividad de SOD1 G85R variante de ELAf se restablece estabilizando el dímero de SOD1*

Además de la estabilidad investigamos el efecto que el entrecruzamiento químico tenía sobre la actividad SOD1 usando un ensayo basado en gel. La actividad de SOD1 WT y G93A no estaba afectada por la adición de cobre, zinc o entrecruzamiento químico. Sin embargo, además de aumentar la termoestabilidad de SOD1 G85R, el entrecruzamiento químico aumentó su afinidad de unión a metal cualitativa, lo que produce la transformación de

- 5 SOD1 G85R de una proteína que es catalíticamente inactiva in vitro e in vivo, a una proteína que es activa in vitro y potencialmente in vivo (figura 10). El aumento en la actividad de G85R observado durante el entrecruzamiento con DTME se invirtió tras el corte del enlace disulfuro interno de DTME usando TCEP (figura 16). Por tanto, además de la mejora en la termoestabilidad de SOD1 G85R, estos compuestos tienen el potencial de aumentar la resistencia del organismo a agresión oxidativa, y nuestro enfoque puede ser considerado para otras enfermedades de pérdida de función.

*El contenido en metal de SOD1 desempeña un papel en la estabilización de SOD1*

- 10 Se determinaron los contenidos en metal de SOD1 WT, G93A y G85R aisladas usando espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), que se enumeran en la tabla suplementaria 1: SOD1 WT aislada contenía aproximadamente dos moléculas de cobre y zinc por monómero, G93A aislada contenía una molécula de cobre y una molécula y media de zinc por monómero, mientras de G85R contenía menos de una de cobre y una y media de zinc por monómero. De estos datos parece que SOD1 WT y G93A estaban repletas de metal, y que
- 15 además se produjo alguna unión de metal adventicia (no en el sitio activo). Por tanto también analizamos el contenido de metal usando FTMS, donde hemos observado que el proceso de desolvatación tiende a eliminar la mayoría de los metales adventicios: SOD1 WT aislada parece estar completamente metalada, SOD1 G93A aislada parece estar ~95% metalada, y SOD1 G85R aislada parece estar parcialmente metalada ~70% metalada con una gran población de bien fracciones sin metalar o individualmente metaladas. Estos pueden explicar el aumento en
- 20 estabilidad observado cuando se añadieron metales exógenos a la muestra G85R frente a la muestra G93A, porque la población de G85R consiste en un mayor porcentaje de formas parcialmente metaladas y no metaladas.

**Equivalentes**

- 25 Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las formas de realización específicas de la invención descritas en el presente documento.

## REIVINDICACIONES

1. Un análogo de superóxido dismutasa estabilizado, en donde dicho análogo tiene una estructura terciaria y comprende un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1, y un entrecruzador; dicho entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud desde 3 Å hasta 15 Å; en donde dicho primer monómero de SOD1 comprende una primera cisteína en una primera posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje, y dicho segundo monómero de SOD1 comprende una segunda cisteína en una segunda posición correspondiente a la posición 111 de SOD1 humana de tipo salvaje; y la primera cisteína está covalentemente unida a la segunda cisteína por el entrecruzador.
2. El análogo de la reivindicación 1, en donde aplica uno cualquiera o más de los siguientes,
  - a) la estructura terciaria es sustancialmente la misma que la enzima superóxido dismutasa humana de tipo salvaje;
  - b) la primer cisteína y la segunda cisteína ocupan la misma posición numerada;
  - c) la primer cisteína y la segunda cisteína ocupan distintas posiciones numeradas;
  - d) la primera cisteína está en la posición 111; y
  - e) la segunda cisteína está en la posición 111.
3. El análogo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la identidad de secuencia de dicho primer monómero de SOD1 y dicho segundo monómero de SOD1 es mayor de o igual al 85%; y/o dicho primer monómero de SOD1 y dicho segundo monómero de SOD1 tienen la misma secuencia de aminoácidos.
4. El análogo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el primer monómero de SOD1 de dicho análogo es la secuencia humana de tipo salvaje o es un monómero de SOD1 humana que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en G93A, G85R, D90A, A4V, E100G, H46R, C6G e I113T; y/o el segundo monómero de SOD1 de dicho análogo es la secuencia humana de tipo salvaje o es un monómero de SOD1 humana que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en G93A, G85R, D90A, A4V, E100G, H46R, C6G e I113T.
5. El análogo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho análogo retiene al menos el 90% de actividad de la enzima superóxido dismutasa humana de tipo salvaje hasta una temperatura de 75 grados C.
6. El análogo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde aplica cualquiera de los siguientes,
  - a) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 10 grados C hasta 60 grados C comparada con su dímero no entrecruzado;
  - b) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 20 grados C hasta 40 grados C comparada con su dímero no entrecruzado;
  - c) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 15 grados C hasta 25 grados C comparada con su dímero no entrecruzado;
  - d) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta de 30 grados C hasta 50 grados C comparada con su dímero no entrecruzado;
  - e) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta en 20 grados C comparada con su dímero no entrecruzado; y
  - f) la temperatura de desnaturalización de dicho análogo aumenta en 40 grados C comparada con su dímero no entrecruzado.
7. El análogo de superóxido dismutasa estabilizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde opcionalmente,
  - a)
    - i) el entrecruzador se selecciona del grupo que consiste en DTME, TMEA, BMDB, BM(PEG)<sub>2</sub>, BMB y BMOE; o
    - ii) el entrecruzador se selecciona del grupo que consiste en organomercuriales, maleimidas, vinilsulfonas y algentes alquilantes; y/o
  - b) aplica cualquiera de los siguientes,
    - a) el entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud desde 7 angstroms hasta 11 angstroms;
    - b) el entrecruzador comprende un brazo espaciador con una longitud de 9 angstroms.

8. Una composición farmacéutica que comprende un análogo de SOD1 estabilizado de la reivindicación 1; y un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 5 9. Un método de producir un análogo de superóxido dismutasa (SOD1) estabilizado según la reivindicación 1 que comprende,
  - a) el paso de hacer reaccionar un primer monómero de SOD1, un segundo monómero de SOD1 y un entrecruzador, formando de esta manera dicho análogo; o
  - 10 b) el paso de unir mediante un entrecruzador una primera cisteína de un primer monómero de SOD1 con una segunda cisteína de un segundo monómero de SOD1.
10. El método de la reivindicación 9, en donde aplica uno cualquiera o más de los siguientes,
  - 15 a) el método comprende además el paso de sustituir un aminoácido natural del primer monómero de SOD1 con la primera cisteína; y
  - b) el método comprende además el paso de sustituir un aminoácido natural del segundo monómero de SOD1 con la segunda cisteína.
- 20 11. Un análogo de SOD1 estabilizado de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o en la profilaxis de una enfermedad neurodegenerativa, en donde opcionalmente,
  - i) la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica; y/o
  - 25 ii) el mamífero es un primate, bovino, ovino, equino, porcino, roedor, felino, o canino; y/o
  - iii) el mamífero es un ser humano.

Figura 1

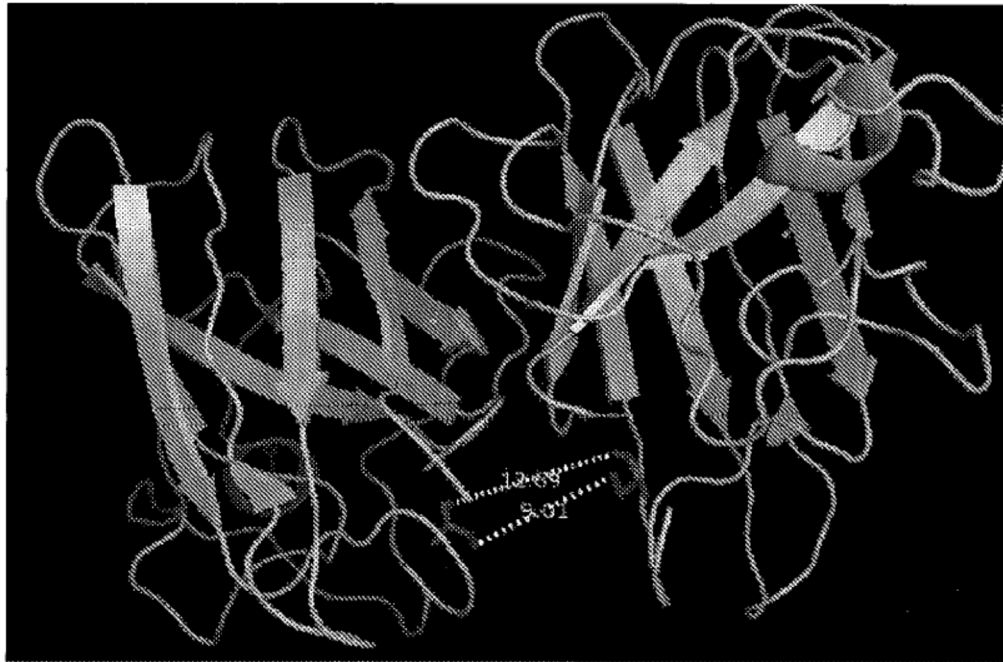
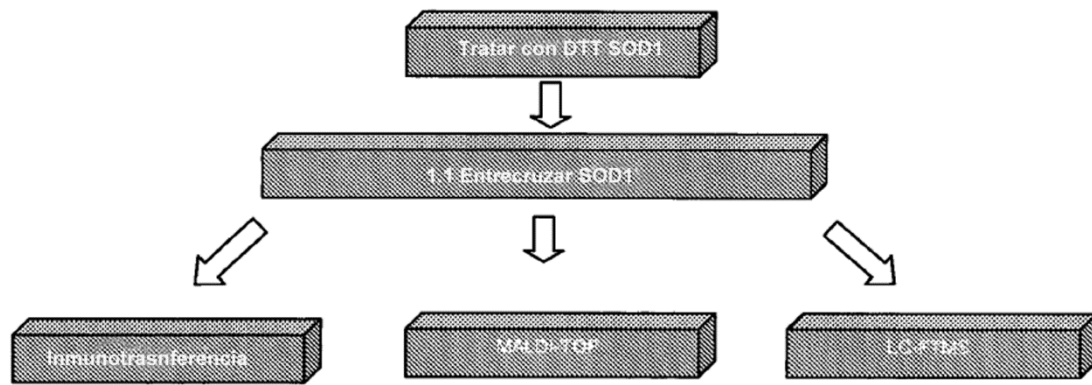


Figura 2



**Figura 3**

**Inmunotransferencias de entrecruzamiento de SOD1**

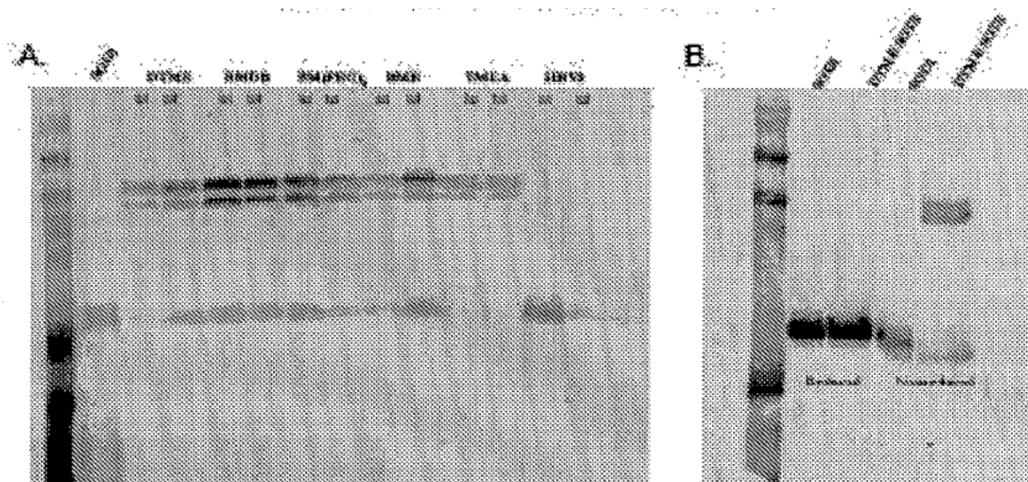


Figura 4

MALDI-TOF MS de SOD1 WT y SOD1 G93A entrecruzadas

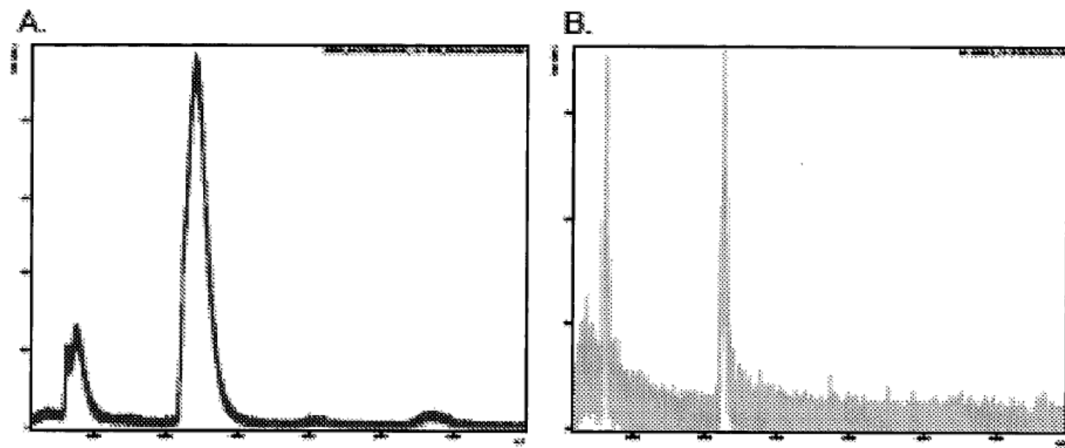


Figura 5

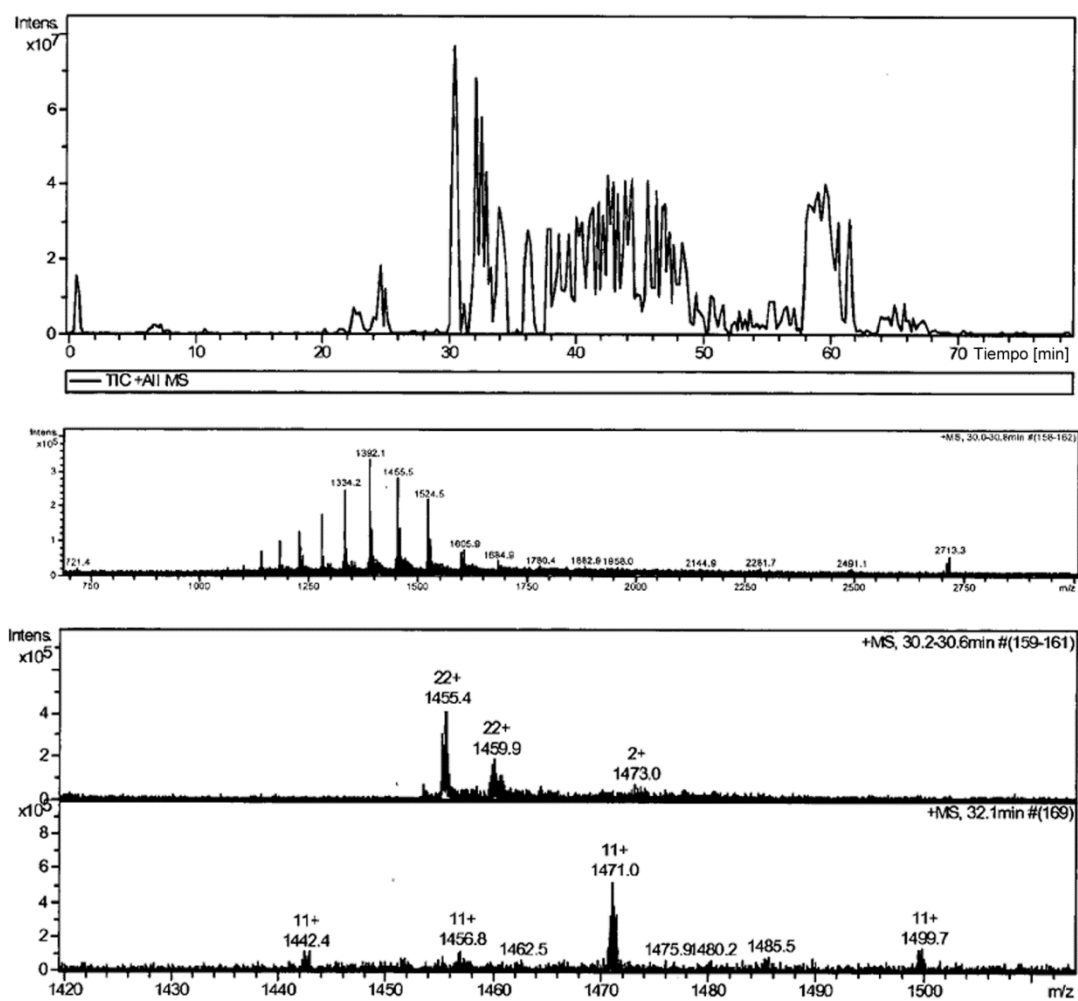


Figura 6

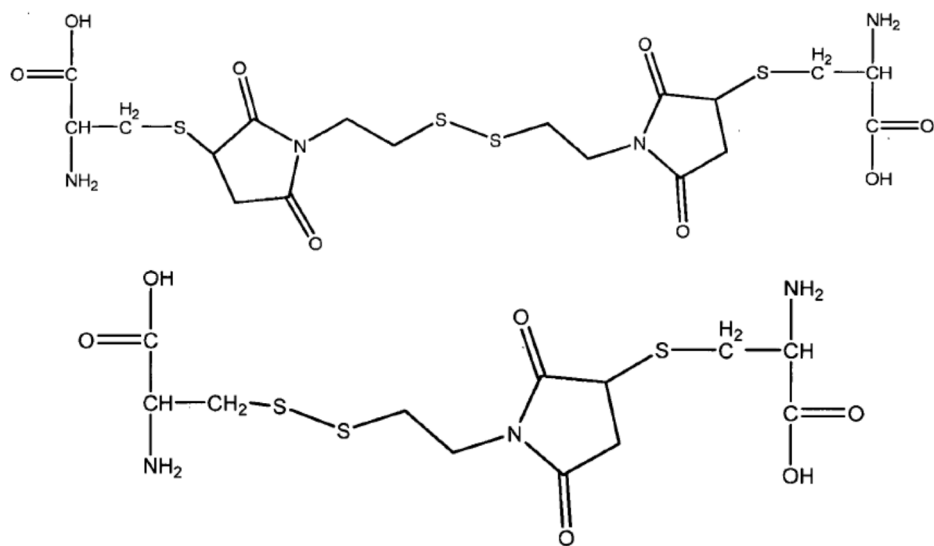


Figura 7

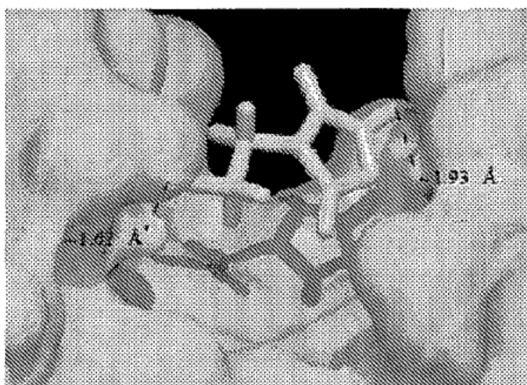
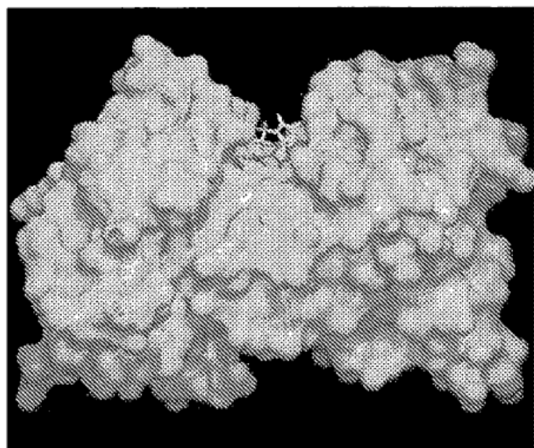


Figura 8

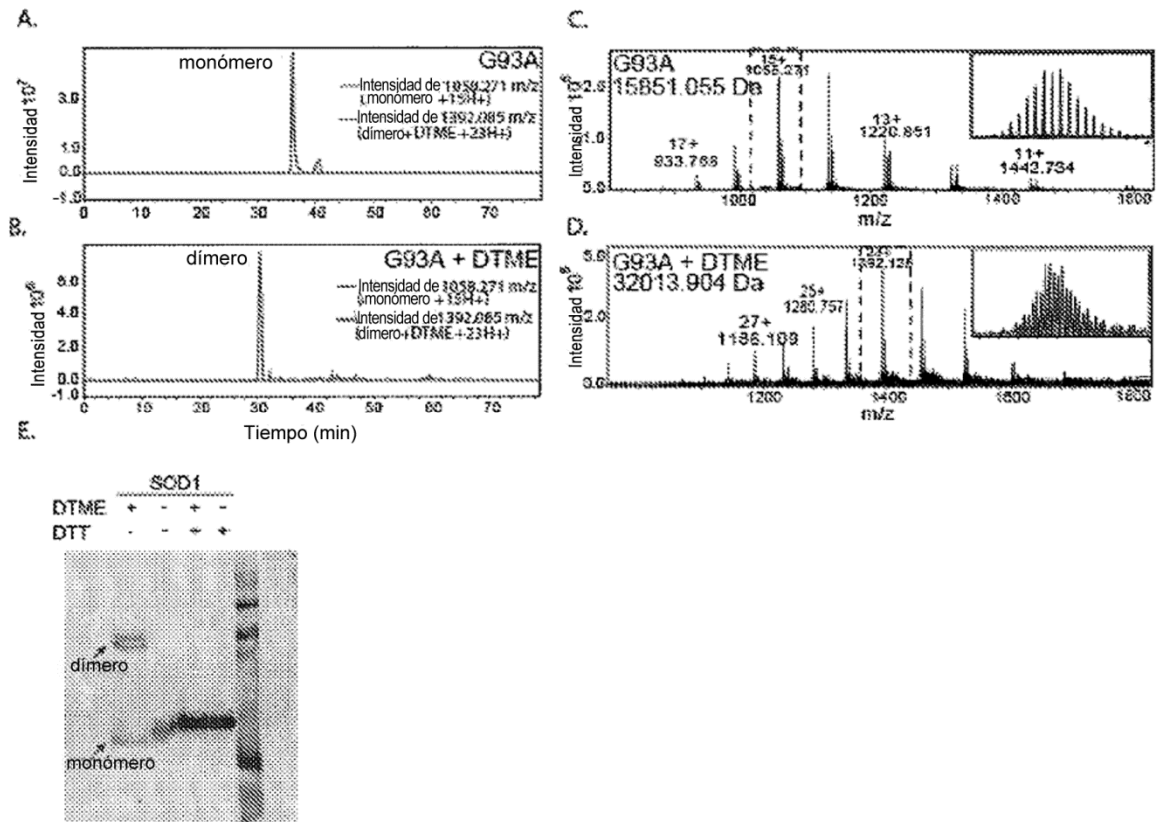
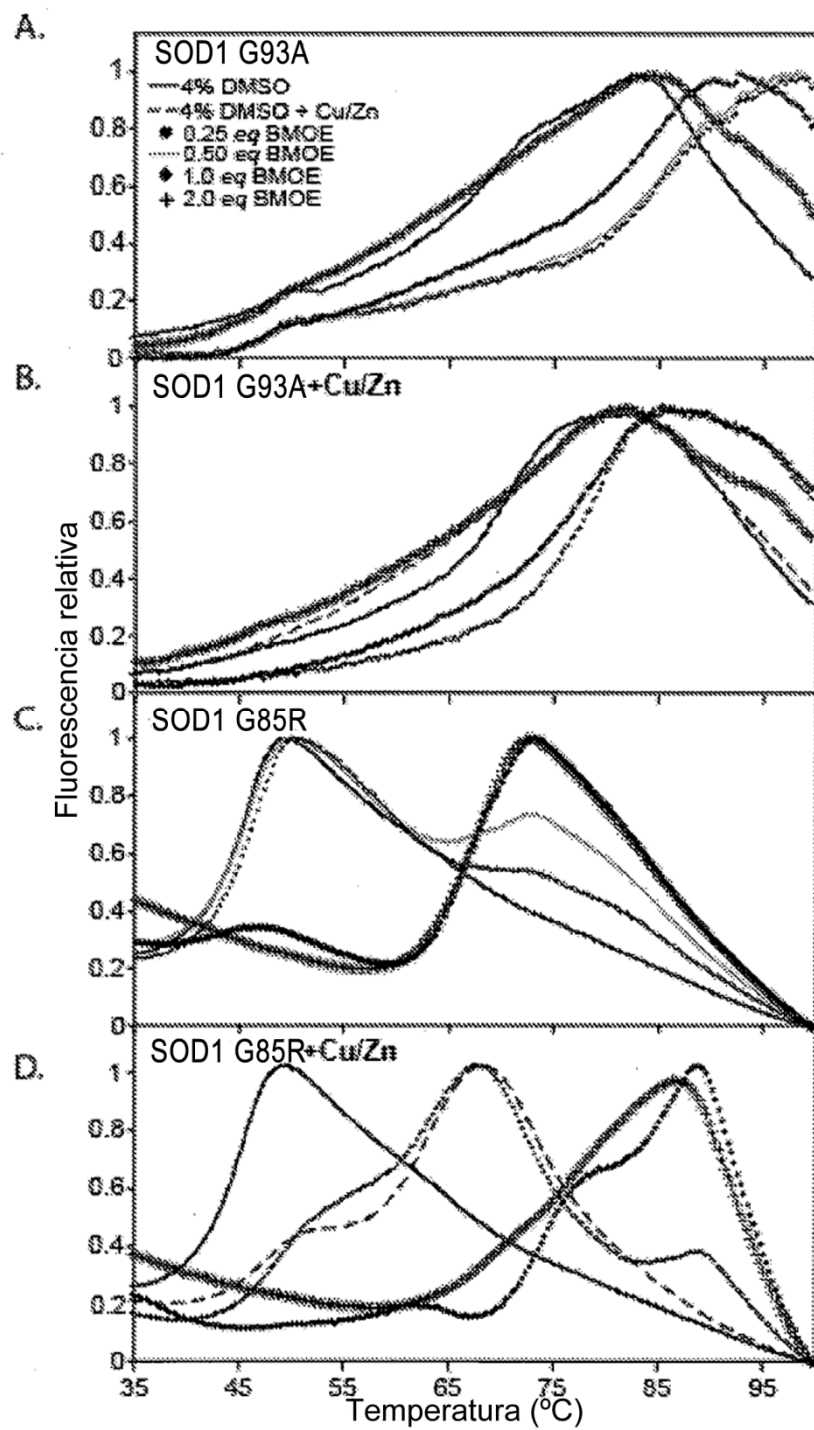


Figura 9



**Figura 10**

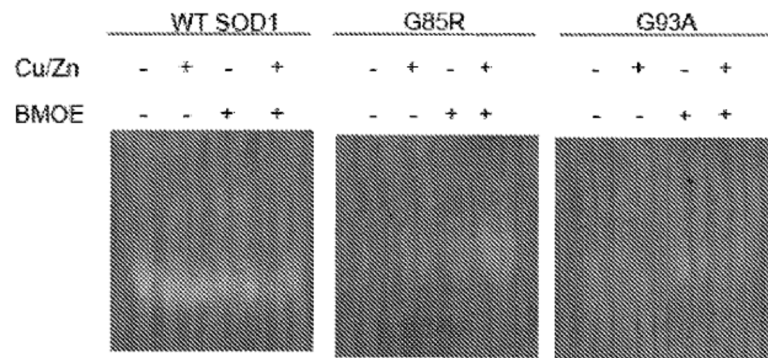


Figura 11

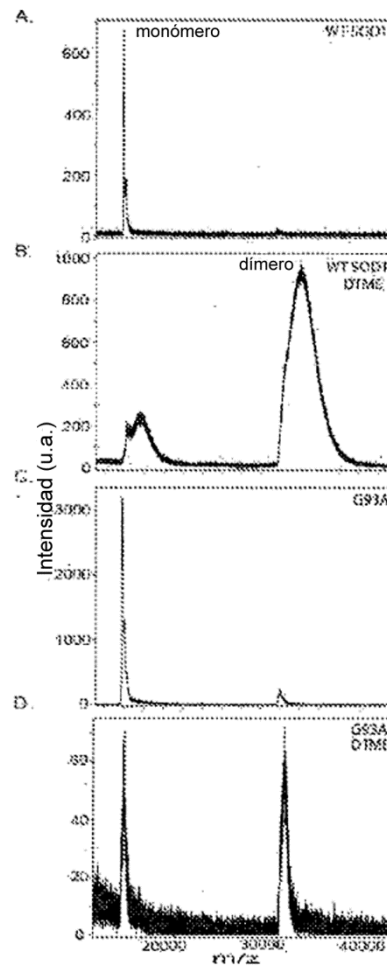


Figura 12

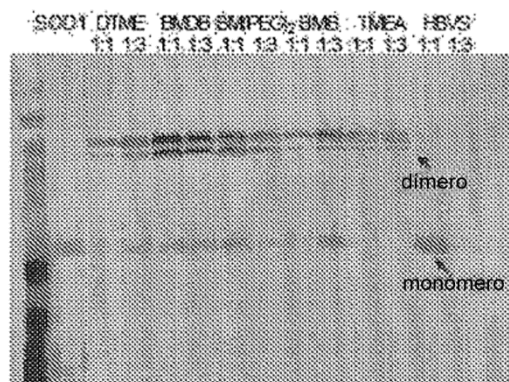


Figura 13

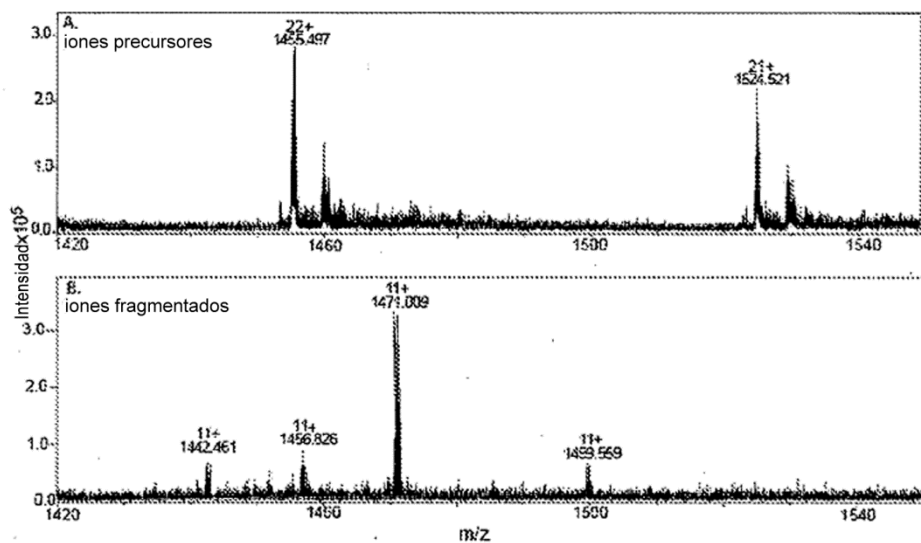


Figura 14

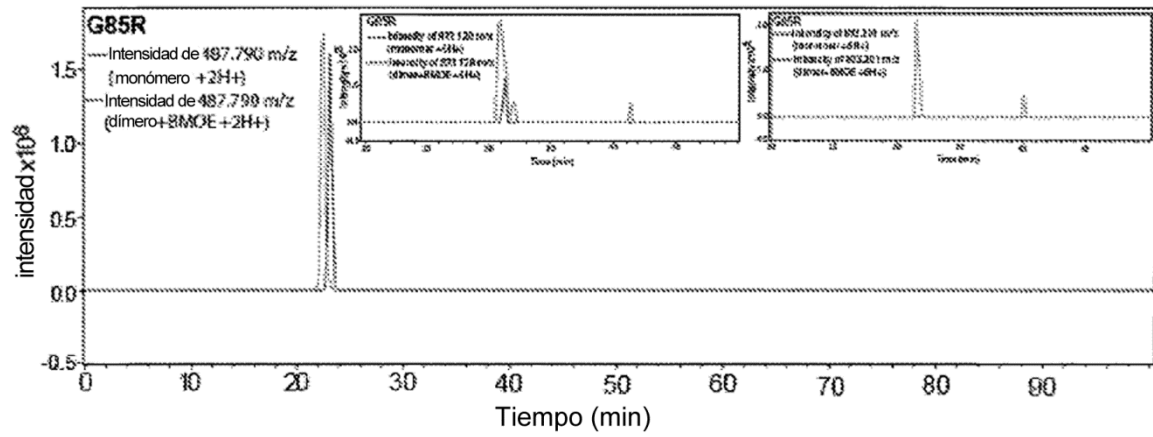


Figura 15

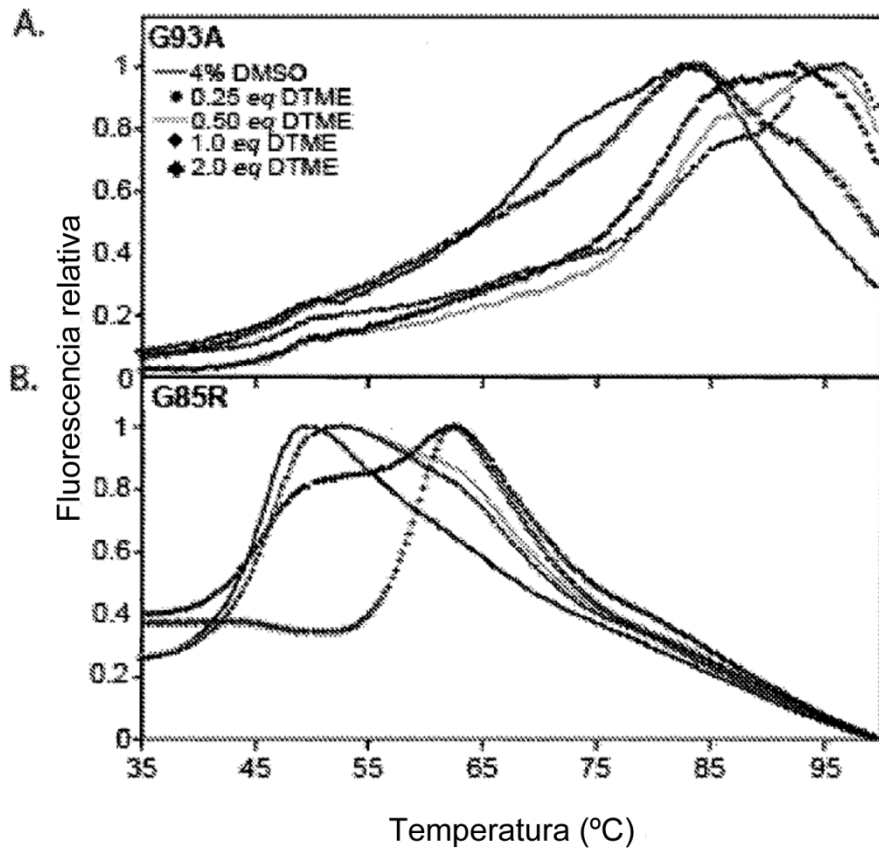


Figura 16

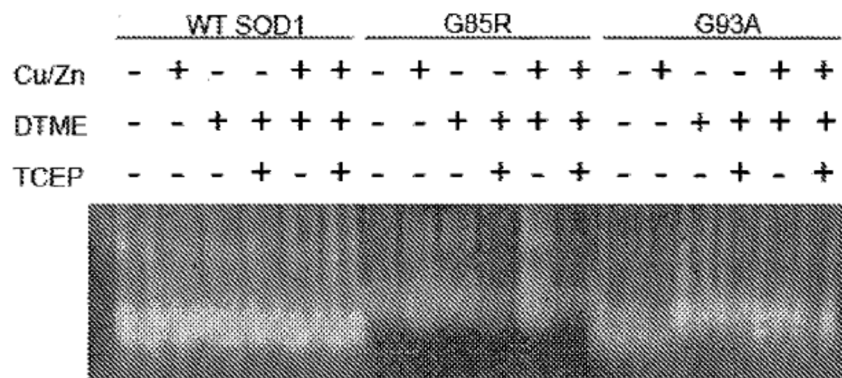


Figura 17

| Nombre         | Cobre           | Zinc          |
|----------------|-----------------|---------------|
| <b>SOD1 WT</b> | 2,26 +/- 0,23   | 2,60 +/- 0,40 |
| <b>G93A</b>    | 0,998 +/- 0,186 | 1,47 +/- 0,09 |
| <b>G85R</b>    | 0,78 +/- 0,074  | 1,60 +/- 0,61 |

| (Abreviatura)                                                                                        | Estructura                                                                                                     | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| <b>I. REACTIVO RICAL</b>                                                                             |                                                                                                                |                              |            |
| Ion cúrico                                                                                           | <i>FIG 18A</i><br>$\text{Hg}^{++}$                                                                             | +/tiol                       | 189-192    |
| Bis(mercurimetil) dioxano<br>derivados                                                               | $\text{X}^+ \text{Hg}-\text{CH}_2-\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2-\text{CH}_2-\text{Hg}^+ \text{X}^-$           | +/tiol                       | 193-197    |
| $\text{X}=\text{CH}_3-\text{COO}^-$ : 3,6-Bis(acetoximercurimetil)dioxano                            |                                                                                                                |                              |            |
| $\text{X}=\text{Cl}^-$ : 3,6-Bis(cloromercurimetil)dioxano                                           |                                                                                                                |                              |            |
| $\text{X}=\text{NO}_2^-$ : 3,6-Bis(nitromercurimetil)dioxano                                         |                                                                                                                |                              |            |
| 4-Bis(bromomercuri)butano                                                                            | $\text{Br}^- \text{Hg}^+-(\text{CH}_2)_4-\text{Hg}^+ \text{Br}^-$                                              | +/tiol                       | 193-197    |
| <b>REACTIVOS FORMADORES DE IDA</b>                                                                   |                                                                                                                |                              |            |
| Oxi-(2,2-bis[[(2-((3-carboxi-4-nitrofenil)ditio)etil)-amino]carbonil]hexanil]-4,4-dimetiloxazolidina |                                                                                                                | +/tiol                       | 61, 62     |
| metilenbis(metanotiosulfonato)                                                                       | $\text{H}_3\text{C}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_3$ | +/tiol                       | 200        |
| $n=5$ : 5,5'-Pentametenbis(metanotiosulfonato)                                                       |                                                                                                                | +/tiol                       | 200        |
| $n=6$ : 6,6'-Hexametenbis(metanotiosulfonato)                                                        |                                                                                                                | +/tiol                       | 200        |
| $n=8$ : 8,8'-Octametenbis(metanotiosulfonato)                                                        |                                                                                                                | +/tiol                       | 200, 201   |
| $n=10$ : 10,10'-Decametenbis(metanotiosulfonato)                                                     |                                                                                                                | +/tiol                       | 200        |
| $n=12$ : 12,12'-Dodecametenbis(metanotiosulfonato)                                                   |                                                                                                                | +/tiol                       | 200        |
| Crabescéina                                                                                          |                                                                                                                | +/tiol                       | 252        |
| <b>EIMIDAS</b>                                                                                       |                                                                                                                |                              |            |
| N,N'-Metilenbismaleimida                                                                             |                                                                                                                | -                            | 203        |

**FIG 18B**

| Abreviatura)                                                            | Esctructura | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia      |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------------|-----------------|
| IMIDAS                                                                  |             |                              |                 |
| N,N'-Trimetilenbismaleimida                                             |             | -                            | 204-206         |
| N,N'-Hexametilenbismaleimida:<br>Bis(N-maleimido)-1,6-hexano (BMH)      |             | -                            | 206, 207        |
| N'-Octametilenbismaleimida:<br>Bis(N-maleimido)-1,8-octano (BMO)        |             | -                            | 208             |
| N,N'-Dodecametilenbismaleimida:<br>Bis(N-maleimido)-1,12-dodecano (BMD) |             | -                            | 208             |
| Bis(N-maleimidometil)éter                                               |             | -                            | 203, 209<br>210 |

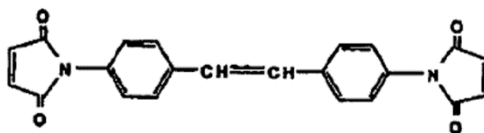
|                                           |  |            |          |
|-------------------------------------------|--|------------|----------|
| N,N'-(1,3-Fenilen)bismaleimida            |  | -          | 204      |
| N,N'-(1,2-Fenilen)-<br>bismaleimida       |  | -          | 204, 211 |
| N'-(1,4-Fenilen)-<br>bismaleimida         |  | -          | 204, 206 |
| Bis(N-maleimido)-4,4'-<br>bibencilo (BMB) |  | -          | 208      |
| Naftalen-1,5-<br>dimaleimida (NDM)        |  | -          | 212, 213 |
| N,N'-Bis(maleimidometil)éter              |  | +ditionito | 205      |

| Abreviatura) | Estructura | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia |
|--------------|------------|------------------------------|------------|
|--------------|------------|------------------------------|------------|

EIMIDAS

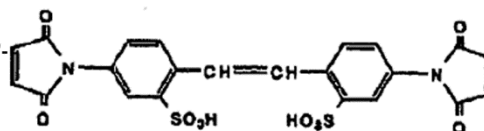
FIG. 18C

,4'-Dimaleimidoestilbeno



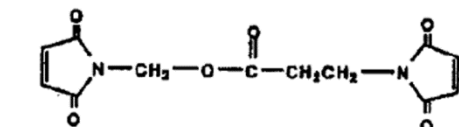
-

214

Ácido Dimaleimidilestilben-2,2'-  
fónico (DMSDS)

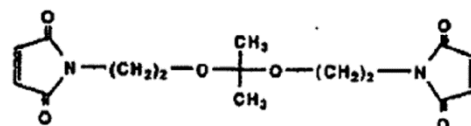
-

214

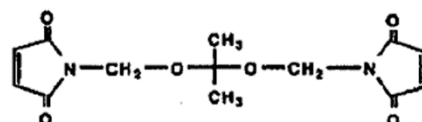
eimidometil-3-maleimido-  
pionato (MMP)

+/base

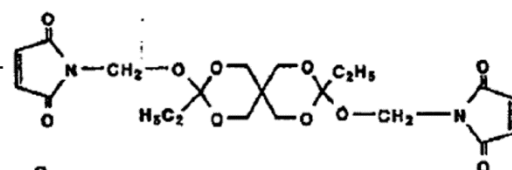
215

-Bis(maleimidoetoxi)-  
pano+/H<sup>+</sup>

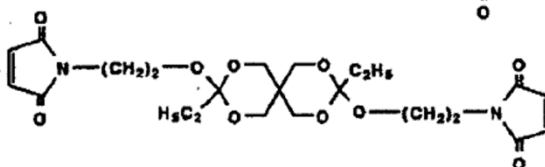
216

is(maleimidometoxi)-  
no+/H<sup>+</sup>

216

[3,9-Dietil-2,4,8,10-  
oxaespíro[5,5]undecano-  
il]bis(oximetilen)]-  
H-pirrol-2,5-diona+/H<sup>+</sup>

216

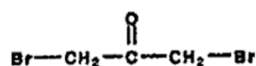
3,9-Dietil-2,4,8,10-  
xaespiro[5.5]-undecano-  
il]bis(oxi-2,1-etano-  
bis-1H-pirrol-2,5-diona+/H<sup>+</sup>

216

## TING AGENTES

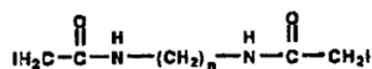
## Derivados acetilo

,3-Dibromoacetona



-

225

Bis(yodoacetyl)poli-  
lendiamina

-

226

n=2 : N,N'-Bis(yodoacetyl)etilendiamina; N,N'-etilen-bis(yodoacetamida)

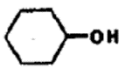
Tabla 2 (continuación)

## ENTRECRUZADORES HOMOBIFUNCIONALES DIRIGIDOS AL GRUPO SULFIDRILO

| Nombre (Abreviatura)                                                                              | Estructura | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------------|------------|
| AGENTES ALQUILANTES                                                                               | FIG. 180   |                              |            |
| CL. N,N'-Di(bromoacetil)fenil-hidracina                                                           |            | -                            | 227        |
| CLI. 1,2-Di(bromoacetil)amino-3-fenilhidracina                                                    |            | -                            | 227        |
| CLII. Bromoacetilhidracina del ácido γ-(2,4-dinitrofenil)-α-bromoacetil-L-diaminobutírico (DIBAB) |            | -                            | 228        |
| CLIII. Bis-[α-bromoacetil-γ-(2,4-dinitrofenil)lisilpropil]-etilendiamina                          |            | -                            | 229        |
| CLIV. 2,2'-Dicarboxi-4,4'-diyodoacetamidoazobenceno                                               |            | +ditionito                   | 232        |
| CLV. 2,2'-Dicarboxi-4,4'-dibromoacetamidoazobenceno                                               |            | +ditionito                   | 232        |
| CLVI. N,N'-Bis(α-yodoacetil)-2,2'-ditiobisetilamina (DIDDBE)                                      |            | +tiol                        | 230        |
| CLVII. 4,5'-Di[[(yodoacetil)amino)-metilpiperazina]                                               |            | -                            | 231        |

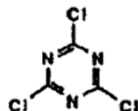
TABLE 4 (continued)

## ENTRECruzADORES HOMOBIFUNCIONALES DIRIGIDOS A GRUPO SULFIDRILLO

| Nombre (Abreviatura)                                                                                                                                  | FIG. 18E | Estructura                                                                                | Procesibilidad/<br>Condición | Referencia |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|
| <b>D. AGENTES ALQUILANTES</b>                                                                                                                         |          |                                                                                           |                              |            |
| <b>CLVIII.</b> p-Bis(ureido)-(1-yodoacetamido-2-etilamino)ligo-prolilazobenceno                                                                       |          |                                                                                           | +/ditionato                  | 28, 143    |
| <b>2. Haluros de di-alkilo</b>                                                                                                                        |          |                                                                                           |                              |            |
| <b>CLIX.</b> Ácido $\alpha,\alpha'$ -dibromo-p-xileno sulfónico                                                                                       |          |                                                                                           | -                            | 233        |
| <b>CLX.</b> Ácido $\alpha,\alpha'$ -diyodo-p-xileno sulfónico                                                                                         |          |                                                                                           | -                            | 233        |
| <b>CLXI.</b> Di(2-cloroetil)sulfuro                                                                                                                   |          | $\text{Cl}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$              | -                            | 235, 238   |
| <b>CLXII.</b> Di(2-cloroetil)sulfona                                                                                                                  |          | $\text{Cl}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$ | +/ditionato                  | 241        |
| <b>CLXIII.</b> Di(2-cloroetil)metilamina                                                                                                              |          | $\text{Cl}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{Cl}$ | -                            | 236        |
| <b>CLXIV.</b> Tri(2-cloroetil)amina (TCEA)                                                                                                            |          | $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_3$                                             | -                            | 242        |
| <b>CLXV.</b> N,N-Bis(beta-bromoetil)bencilamina                                                                                                       |          |                                                                                           | -                            | 227        |
| <b>CLXVI.</b> Di(2-cloroetil)-p-metoxifenilamina                                                                                                      |          |                                                                                           | -                            | 72         |
| <b>Nitrosoureas</b>                                                                                                                                   |          | $\text{R}-\text{N}(\text{NO})-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{R}$                     |                              |            |
| <b>CLXVII.</b> R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ : 1,3-Bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea                                                             |          |                                                                                           | -                            | 243        |
| <b>CLXVIII.</b> R =  : 1,3-Bis(trans-4-hidroxi-etil)-1-nitrosourea |          |                                                                                           | -                            | 246        |
| <b>3. s-Triacinas</b>                                                                                                                                 |          |        |                              |            |

| Abreviatura) | Estructura | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia |
|--------------|------------|------------------------------|------------|
| TING AGENTES | FIG. 18 F  |                              |            |

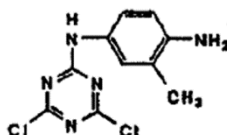
4,6-Tricloro-s-triacina;  
cloruro ianúrico



-

250

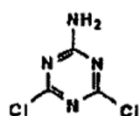
,4-Dicloro-6-(3'-metil-4-  
minoanilino)s-triacina



-

133, 249

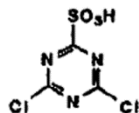
,4-Dicloro-6-amino-s-triacina



-

133, 249

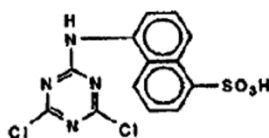
2,4-Dicloro-6-(ácido  
sulfónico)-s-triacina; ácido 2,4-  
dicloro-s-triacin-2-il-6-sulfónico



-

133, 249

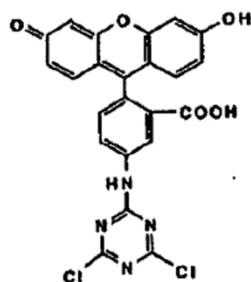
,4-Dicloro-6-(5'-ácido-  
sulfónico-naftalenamino)-s-  
triacina; ácido 5-[(4,6,dicloro-  
s-triacin-2-il)amino]naftaleno-  
1-sulfónico



-

123, 249

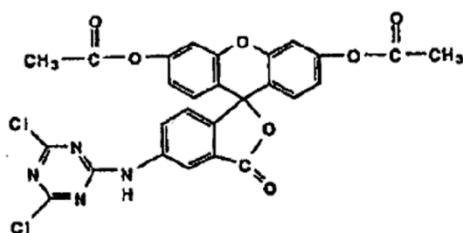
[(4,6-Dicloro-s-triacin-2-  
il)amino]fluoresceína (5-DTAF)



-

251-253

Diacetato de 5-(4,6-dicloro-s-  
triacin-2-il)-aminofluoresceína



-

254

## ENTRECruzADORES HOMOBIFUNCIONALES DIRIGIDOS A GRUPOS SULFIDRILLO

| Abreviatura                                    | Estructura | Procesabilidad/<br>Condición | Referencia           |
|------------------------------------------------|------------|------------------------------|----------------------|
| ATING AGENTES                                  | FIG. 18G   |                              |                      |
| ácridinas                                      |            |                              |                      |
| 2,4,6-Tri(etilenimino)s-triacina               |            | -                            | 234, 235             |
| N,N'-Etileniminoil-1,6,diaminohexano           |            | -                            | 234, 235             |
| Óxido de Tri[1-(2-metilaciridenil)]-fosfina    |            | -                            | 234, 235<br>255, 256 |
| epóxidos                                       |            |                              |                      |
| 2,3,4-Diepoxibutano                            |            | +/ $\text{IO}_4^-$           | 257, 258             |
| 1,2:5,6-Diepoxihexano                          |            | -                            | 259                  |
| Bis(2,3-epoxipropil)éter                       |            | -                            | 258                  |
| 1,4-Butadioldiglicidoxi-éter                   |            | -                            | 260                  |
| 3,4-Isopropiliden-1,2:5,6-dianhidromanitol     |            | -                            | 254                  |
| entrecruzadores que reaccionan con sulfhidrilo |            |                              |                      |
| Divinilsulfona                                 |            | +/ditionato                  | 261, 262             |