

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 224**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09732855 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2262526**

54 Título: **Monómeros y oligómeros de beta amiloide estables**

30 Prioridad:

14.04.2008 SE 0800842

20.11.2008 SE 0802433

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

03.03.2016

73 Titular/es:

**ALZINOVA AB (100.0%)
Erik Dahlbergsgatan 11 A
411 26 Göteborg, SE**

72 Inventor/es:

**HÄRD, TORLEIF y
SANDBERG, ANDERS**

ES 2 562 224 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

Monómeros y oligómeros de beta amiloide estables

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a péptidos beta amiloide monoméricos y oligoméricos que son resistentes a la fibrillogénesis para su uso como antígenos o reactivos de selección para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y otros estados relacionados con el plegamiento erróneo de proteínas.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad caracterizada por la acumulación de depósitos de amiloide insolubles de la proteína amiloide- β ($A\beta$) generados por la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP) (Blennow, K., *et al.*, Lancet 368: 387-403 (2006)). La EA es una de varias enfermedades provocadas por el plegamiento erróneo de proteínas, que incluye más de 22 de otras dolencias conocidas tales como enfermedad de Parkinson y diabetes tipo II (Dobson, C. M., Protein Pept. Lett. 13: 219-227 (2006)). En la actualidad no hay ningún tratamiento eficaz contra EA y la mayoría de las demás enfermedades por plegamiento erróneo de proteínas, debido parcialmente al hecho de que no está claro todavía si estos depósitos son tóxicos y en qué medida. De hecho, recientemente la atención ha dejado de centrarse en los depósitos de amiloide insolubles, que anteriormente se creía que eran la causa de EA, para centrarse en las especies oligoméricas de $A\beta$ solubles como el agente tóxico (Haass, C. y Selkoe D. J., Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 8: 101-112 (2007)). Además, se ha mostrado que anticuerpos dependientes de la conformación generados contra oligómeros de $A\beta$ (por ejemplo el anticuerpo policlonal A11) son reactivos frente a otras especies oligoméricas además de $A\beta$, sugiriendo por tanto que estas estructuras tóxicas son genéricas en las enfermedades por plegamiento erróneo de proteínas aunque estén implicadas diferentes proteínas (Glabbe, C. G., Trends Biochem. Sci. 29: 542-547 (2004)). Por tanto, gran parte del esfuerzo está centrándose actualmente en todo el mundo en el aislamiento y la caracterización de tales oligómeros solubles para fines inmunogénicos y de selección de fármacos. Sin embargo, las proteínas $A\beta$ tanto monoméricas como oligoméricas tienen una alta tendencia a agregarse adicionalmente para dar fibrillas. Esta fibrilación es una reacción de polimerización dependiente de nucleación espontánea para la que la velocidad es sensible a la concentración de péptido (Lomakin, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1125-1129 (1996)). En consecuencia, la fibrillogénesis limita gravemente la longevidad de las preparaciones oligoméricas, y también las concentraciones a las que pueden mantenerse.

La proteína $A\beta$ de tipo natural implicada en EA es un péptido muy propenso a la fibrilación a concentraciones $>100 \mu\text{M}$. A menores concentraciones (de $>20 \mu\text{M}$ a $<100 \mu\text{M}$) dicha proteína tiene una tendencia a oligomerizarse lentamente (los oligómeros son estructuras solubles que contienen una pluralidad de monómeros) antes de avanzar al estado fibrilar inerte. Este estado oligomérico se ha implicado recientemente como agente neurotóxico y, por tanto, como especie tóxica implicada en EA (Haass, C. y Selkoe, D. J., Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 8: 101-112 (2007)). El método prevalente para producir estas estructura tóxicas en condiciones fisiológicas implican incubar disoluciones de péptido a $20\text{-}100 \mu\text{M}$ y 4°C en medio de cultivo celular (F-12) o en disoluciones salinas tamponadas durante varios días (Lambert, M. P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 6448-6453 (1998); Stine, W. B., *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 11612-11622 (2003)). Debido a que las velocidades de nucleación y elongación dependen fuertemente de la concentración de péptido (Lomakin, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1125-1129 (1996)), cualquier aumento en la concentración de péptido por encima de $100 \mu\text{M}$ será perjudicial para la estabilidad de la preparación de oligómero. En la visión clásica del ensamblaje de fibrillas de amiloide, se cree incluso que los núcleos que desencadenan la polimerización y las estructuras oligoméricas son la misma especie. Por tanto, las preparaciones de oligómero tienen una duración de vida muy limitada e impredecible (la nucleación por agregación es un acontecimiento espontáneo) una vez formadas. En disoluciones diluidas (de $20 \mu\text{M}$ a $25 \mu\text{M}$) a 4°C , las preparaciones de oligómero de $A\beta(42)$ son estables normalmente sólo durante 24 h, y las de $A\beta(40)$ durante quizá una semana. En disoluciones menos diluidas, $>100 \mu\text{M}$, la insolubilidad de la proteína $A\beta$ disminuye drásticamente. Por tanto, el proceso de fibrilación es un inconveniente grave cuando, como en ensayos de selección para medicamentos, se requieren proteínas estables a una concentración relativamente alta.

El objetivo de la presente invención es superar estos problemas proporcionando péptidos $A\beta$ modificados por ingeniería genética que forman oligómeros estables.

No hay ningún informe previo de estructuras en horquilla de $A\beta$ estabilizadas y ningún informe de péptidos $A\beta$ que contengan sólo el disulfuro A21C/A30C sin cisteínas complicadas adicionales. El documento US 2006/0018918 da a conocer isómeros de $A\beta$ basados en la consideración de la estructura primaria de $A\beta$ sola con sustitución por múltiples cisteínas de todas las Ser y Ala en general, con la intención de estabilizar conformaciones no nativas de $A\beta$ que van a usarse como vacunas. Las mutaciones A21C y A30C se obtienen junto con tres o cuatro mutantes de cisteína adicionales en las posiciones Ala2, Ser8, Ser26 y Ala42. La oxidación de estos isómeros de $A\beta$ produce una mezcla de 15 posibles isoformas con diferentes enlaces disulfuro intramoleculares en donde sólo tres de las 15 posibles isoformas contendrán un enlace disulfuro A21C/A30C, pero siempre en combinación con enlaces disulfuro

adicionales.

5 Mutantes de disulfuro de péptido A β previos notificados en la bibliografía son L17C/L34C, L17C/M35C y L17C/V36C (Shivaprasad, S. y Wetzel, R., *Biochemistry* 43: 153-15317 (2004)). Estas mutaciones son todas sustituciones no conservativas. Además, estos mutantes se prepararon específicamente para investigar la proximidad de Leu17 a Leu34, Met35 y Val36 en la estructura fibrilar. Shivaprasad y Wetzel presentan datos que demuestran que estos tres mutantes experimentan fibrillogénesis con tiempos de demora que son casi idénticos para los mutantes reducidos (con los residuos mutados como cisteínas) y oxidados (con los residuos mutados como cistinas). Los mismos autores han publicado otros mutantes de disulfuro, que también son sustituciones no conservativas, concretamente V18C/L34C, F19C/A30C, F19C/I32C y F19C/L34C (Wetzel, R., *et al.*, *Biochemistry* 46: 1-10 (2007)). Se encontró que estos mutantes se comportaban de manera similar a los mutantes L17C/L34C, L17C/M35C y L17C/V36C. Por tanto, todos los mutantes de disulfuro de la proteína A β publicados previamente han demostrado que se agregan fácilmente para dar fibrillas de una estabilidad al menos similar a la de las fibrillas obtenidas a partir de péptido de tipo natural. Estos derivados oxidados de los mutantes L17C/L34C, L17C/M35C, L17C/V36C, V18C/L34C, F19C/A30C, F19C/I32C y F19C/L34C experimentan todos fibrilación debido a que son incompatibles con la estructura en horquilla presentada en Hoyer *et al.* (Hoyer, W. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 5099-5104 (2008)) mientras que son compatibles con los modelos actuales de estructuras fibrilares de péptido A β en las que dos hebras β se empaquetan una contra la otra (véase por ejemplo Petkova, A. T., *et al.*, *Biochemistry* 45: 498-512).

20 Se describen preparaciones de oligómero de A β en los documentos WO 2007/005358, WO 2007/005359, WO 2007/142320 y WO 2004/067561. Estas preparaciones de oligómero descritas se han obtenido usando agentes de reticulación intermoleculares (documento WO 2007/005358), pH no fisiológico (pH 9 en el documento WO 2007/005359) y/o aditivos (se reivindicó que TFE o glicerol al 40% estabilizaban los oligómeros a 37°C en el documento WO 2007/005359; gangliósido GM1 en el documento WO 2007/142320; y SDS en el documento WO 25 2004/067561).

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona péptidos A β A21C/A30C monoméricos y oligoméricos restringidos covalentemente que son resistentes frente a la fibrillogénesis. Los péptidos según la invención conservan la mayor parte de sus propiedades similares al tipo natural tal como se investiga mediante cromatografía de exclusión molecular (CEM), DC de UV lejano (indicativo de estructura helicoidal) y RMN (también de tipo helicoidal). Puesto que la etapa de fibrilación se bloquea, los péptidos A β según la invención se pueblan de varios oligómeros de bajo peso molecular con estructura helicoidal (que eluyen de la CEM como proteínas de hasta aproximadamente 42 kDa), así como oligómeros de alto peso molecular con estructura β (que eluyen de la CEM como proteínas de aproximadamente 75-85 kDa y 170 kDa) tras concentración. Además, se obtienen estructuras protofibrilares similares al tipo natural con dimensiones de 6 nm de anchura y normalmente 30 nm de longitud calentando disoluciones de proteína concentradas. Los oligómeros de alto peso molecular con estructura β se reconocen por el anticuerpo policlonal A11.

Breve descripción de la invención

45 La presente invención proporciona péptidos A β monoméricos y oligoméricos con una resistencia frente a la fibrillogénesis sin precedentes.

Con el fin de impedir que la reacción secundaria de agregación reduzca la reserva concentrada de péptido A β monomérico y oligomérico, los presentes inventores han diseñado péptidos A β restringidos covalentemente. Los péptidos A β según la invención comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones 21 y 30 en los péptidos A β (40) (SEQ ID NO: 1) o A β (42) (SEQ ID NO: 2) de tipo natural por cisteínas, dando como resultado péptidos A β (40) A21C/A30C (SEQ ID NO: 3) y A β (42) A21C/A30C (SEQ ID NO: 4) con enlaces disulfuro de manera intramolecular (figura 1A). Estas sustituciones de aminoácidos bloquean eficazmente el cambio conformacional que desencadena la amiloidosis, representándose una hipótesis de este mecanismo esquemáticamente en la figura 1B, y permite la población de varios estados oligoméricos, incluyendo los oligómeros de alto peso molecular con estructura β que se considera que son la especie tóxica. Los péptidos A β según la invención forman estados oligoméricos potencialmente tóxicos que son similares a los obtenidos para el péptido A β de tipo natural, que tiene un espectro de dicroísmo circular (DC) de UV lejano idéntico a los oligómeros de tipo natural, y también se unen al anticuerpo A11, y forman protofibrillas como morfología similar al tipo natural. El estado de tipo helicoidal no oligomérico de los péptidos A β según la invención también siguen siendo similares al tipo natural tal como se investiga mediante CEM de exclusión molecular, espectroscopía de DC de UV lejano y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de coherencia cuántica simple heteronuclear (HSQC) de ¹⁵N.

Debido al enlace disulfuro de restricción presente en los péptidos según la invención, no son necesarios otros métodos para estabilizar oligómeros, incluyendo (i) pH no fisiológico (elevado) para aumentar la repulsión de los péptidos, (ii) el uso de aditivos incluyendo 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), dodecilsulfato de sodio (SDS), glicerol o glicolípidos de membrana celular en forma de gangliósidos GM1, para inducir la estructura oligomérica, (iii) la adición

de aniones para ocultar las cargas aumentando así la solubilidad, y (iv) el uso de un agente de reticulación intermolecular que estabiliza covalentemente los oligómeros una vez preparados mediante una o varias de las alternativas (i)-(iii). Los péptidos Aβ según la invención son de hecho los primeros ejemplos de péptidos Aβ que forman oligómeros estables en condiciones fisiológicas, obteniéndose mediante la detención de la etapa de fibrilación. Además, se evitan tiempos de incubación largos y resultados impredecibles de preparaciones oligoméricas, ya que los péptidos Aβ según la invención pueden purificarse y concentrarse rápidamente en los estados oligoméricos.

En un aspecto, la presente invención proporciona péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos LVFFC correspondiente a los aminoácidos 17 a 21 de SEQ ID NO: 4, y la secuencia de aminoácidos CIIGLMV correspondiente a los aminoácidos 30 a 36 de SEQ ID NO: 4. El péptido según la invención comprende además un enlace disulfuro entre los aminoácidos correspondientes a Cys21 y Cys30 en SEQ ID NO: 4. En un aspecto preferido de la invención, dicho péptido se obtiene uniendo el péptido que comprende la secuencia de aminoácidos LVFFC al péptido que comprende la secuencia de aminoácidos CIIGLMV mediante un enlace disulfuro intermolecular. En un aspecto más preferido de la invención, dichos dos péptidos son constituyentes de una única cadena peptídica con un enlace disulfuro intramolecular entre Cys21 y Cys30. Además, la secuencia de aminoácidos LVFFC se fusiona con la secuencia de aminoácidos CIIGLMV mediante un péptido que comprende de 4 a 20 aminoácidos, tal como de 6 a 16, preferiblemente de 7 a 12, o incluso más preferiblemente de 8 a 10 aminoácidos, tal como 9 aminoácidos. La presente invención proporciona además variantes de dichos péptidos en las que uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han delecionado, o uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han insertado.

Preferiblemente, el péptido de fusión comprende la secuencia de aminoácidos EDVGSNKG correspondiente a los aminoácidos 22 a 29 de SEQ ID NO: 4. Por consiguiente, los péptidos según la invención comprenden preferiblemente la secuencia de aminoácidos LVFFCEDVGSNKGCIIGLMV correspondiente a los aminoácidos 17 a 36 de SEQ ID NO: 4, y variantes de dichos péptidos en las que uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han delecionado, o uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han insertado.

Incluso más preferiblemente, los péptidos según la invención comprenden la secuencia de aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos completa SEQ ID NO: 4, y variantes de dichos péptidos en las que uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han delecionado, o uno o más, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o preferiblemente uno o dos, aminoácidos se han insertado.

Los péptidos según la invención pueden comprender además una sustitución de glicina en la posición correspondiente al aminoácido 22 (SEQ ID NO: 5), o una sustitución de glutamina en la posición correspondiente al aminoácido 22 (SEQ ID NO: 6), o una sustitución de lisina en la posición correspondiente al aminoácido 22 (SEQ ID NO: 8). Los péptidos según la invención también pueden comprender una sustitución de asparagina en la posición correspondiente al aminoácido 23 (SEQ ID NO: 7). Los péptidos según la invención también pueden comprender un residuo de sulfóxido de metionina en la posición correspondiente al aminoácido 35 en SEQ ID NO: 4.

Además, los péptidos según la invención pueden comprender (a) uno o dos aminoácidos terminales que están maleimidados; (b) uno o dos aminoácidos terminales que están cisteinilados; (c), el extremo carboxilo terminal del péptido se ha amidado, es decir el COOH libre en el extremo carboxilo terminal se ha transformado en CONH₂; y/o el extremo amino terminal del péptido se ha acetilado, es decir el grupo NH₂ libre en el extremo amino terminal se ha transformado en la amida CH₃CONH- (AcNH-). Los péptidos según la invención pueden prepararse mediante síntesis química o prepararse mediante tecnología de ADN recombinante.

Por sustitución conservativa quiere decirse la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que tiene propiedades similares con respecto a la polaridad e hidrofobicidad. En la tabla 1 se proporcionan ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen tales propiedades similares. La sustitución conservativa también puede incluir la sustitución por un aminoácido no convencional. Los aminoácidos no convencionales incluyen, pero no se limitan a, los ejemplos entre paréntesis en la tabla 1, en donde PL es pirrolisina, DA es deshidroalanina, NL es norleucina, SC es selenocisteína, HC es homocisteína, CL es citrulina y OR es ornitina.

Tabla 1

Hidrófobo (apolar)	A V L I P F W M [PL DA NL]
Polar (no cargado)	G S T C Y N Q [SC HC CL]

Polar (cargado)	D E K R H [OR]	Cargado positivamente	H K R [OR]
		Cargado negativamente	E D

Las sustituciones conservativas e inserciones de aminoácidos según la invención no permiten la inserción de cisteínas adicionales además de las cisteínas correspondientes a Cys21 y Cys30 en SEQ ID NO: 4.

5 Las sustituciones conservativas y deleciones de aminoácidos según la invención no permiten la sustitución o la deleción de las cisteínas correspondientes a Cys21 y Cys30 en SEQ ID NO: 4.

Los péptidos A β según la invención comprenden siempre exactamente dos cisteínas, es decir las cisteínas correspondientes a Cys21 y Cys30 en SEQ ID NO: 4.

10 Los péptidos según la invención son sustancialmente resistentes frente a la fibrillogénesis. Por ser resistentes a la fibrillogénesis quiere decirse que dichos péptidos no forman fibrillas en condiciones cercanas a las fisiológicas en las que los péptidos A β de tipo natural experimentan fibrilación, tal como se demuestra mediante varios de los ejemplos presentados en el presente documento. En un aspecto, la presente invención proporciona oligómeros solubles que consisten en péptidos según la invención.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que reacciona específicamente con un péptido según la invención. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otro aspecto, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo que reacciona específicamente con un péptido según la invención. El fragmento de anticuerpo puede ser un fragmento Fab, un fragmento (Fab)₂, un fragmento Fab de cadena sencilla, un fragmento Fv de cadena sencilla o un dímero de Fv de cadena sencilla. En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un agente de unión de proteína que reacciona específicamente con un péptido según la invención. Dichos agentes de unión de proteína incluyen, pero no se limitan a, derivados de la anticalina, Affibody, FNfn10, neocarzinostatina, proteína con repeticiones de anquirina, dedo de PDH, proteína fluorescente verde con injerto de CDR3 y armazones de proteína de unión periplásmica de *E. coli*.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para la identificación de un compuesto adecuado para el tratamiento de una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, comprendiendo dicho método el uso de un péptido según la invención. La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer. El método para la identificación de un compuesto adecuado para el tratamiento de una enfermedad provocada o relacionada con la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, puede comprender:

35 a) proporcionar un compuesto de prueba,
b) poner dicho compuesto de prueba en contacto con un péptido según la invención,
40 c) determinar si el compuesto de prueba se une al péptido y/o inhibe la formación de oligómeros del péptido,
d) identificar dicho compuesto como adecuado para el tratamiento de una enfermedad provocada o relacionada con deposición de amiloides o fibrillas de proteína.

45 La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para identificar y/o seleccionar proteínas de unión, comprendiendo dicho método el uso de un péptido según la invención.

La molécula de unión puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab, un fragmento (Fab)₂, un fragmento Fab de cadena sencilla, un fragmento Fv de cadena sencilla o un dímero de Fv de cadena sencilla. La molécula de unión también pueden ser derivados de receptores no naturales modificados por ingeniería genética, tales como derivados de la anticalina, Affibody, FNfn10, neocarzinostatina, proteína con repeticiones de anquirina, dedo de PDH, proteína fluorescente verde con injerto de CDR3 y armazones de proteína de unión periplásmica de *E. coli*.

60 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido según la invención en la preparación de composiciones farmacéuticas destinadas a la inmunización para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, opcionalmente en combinación con un adyuvante. La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía

espongiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según la invención, opcionalmente en combinación con un adyuvante. En aún otro aspecto, la presente invención proporciona vacunas para la inmunización de mamíferos, incluyendo seres humanos, frente a una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, que comprenden un péptido según la invención, opcionalmente en combinación con un adyuvante. La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona vacunas para la inmunización de mamíferos, incluyendo seres humanos, frente a una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención. La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

Se proporcionan métodos para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína o que se enfrenta al riesgo de desarrollar una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, mediante los cuales se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según la invención a dicho mamífero. La enfermedad puede ser una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral, una enfermedad priónica tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, encefalopatía espongiforme bovina o tembladera de las ovejas, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. Preferiblemente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

Se proporcionan métodos para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un mamífero, incluyendo un ser humano, que padece una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína o que se enfrenta al riesgo de desarrollar una enfermedad provocada por, o relacionada con, la deposición de amiloides o fibrillas de proteína, mediante los cuales se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención a dicho mamífero.

Descripción de las figuras:

La figura 1A representa un dibujo de la estructura en horquilla del péptido A β (n.º de registro de Protein Data Bank 2OTK) con las cisteínas introducidas en las posiciones 21 y 30 y uniendo el enlace disulfuro estas dos posiciones (SEQ ID NO: 4). Comprendiendo Leu17, Phe19, Cys21, Cys30, Ile32, Leu34 y Val36 el lado orientado hacia arriba de la estructura; y comprendiendo Val18, Phe20, Ile31 y Met35 el lado orientado hacia abajo de la estructura, este lado también contiene Gly33. La figura 1B representa una representación esquemática de un esquema de agregación hipotético. En esta hipótesis, el péptido A β anfífilo se autoasocia espontáneamente para dar estructuras oligoméricas de tipo micelar de bajo peso molecular que se estabilizan débilmente por fuerzas hidrófobas (oligómeros de tipo helicoidal). La horquilla β sólo se ocupa transitoriamente, pero es estable en las estructuras oligoméricas de alto peso molecular que se forman mediante apilamiento hidrófobo. La codificación por colores de la horquilla es el mismo que en la figura 1A. Se produce fibrillogénesis como resultado de un cambio conformacional mediante el cual se rompen los enlaces de hidrógeno y los enlaces de van der Waals hidrófobos en el oligómero con estructura β y vuelven a formarse para dar una estructura fibrilar mucho más estable, en el que las dos hebras β de color naranja están ahora enfrentadas entre sí en el núcleo fibrilar. Esta etapa conformacional se detiene mediante el enlace disulfuro que conecta las posiciones 21 y 30, permitiendo así que se pueblen los demás estados.

La figura 2 representa ensayos de fibrilación del péptido A β (40) con y sin las sustituciones A21C/A30C, así como el péptido A β (40) A21C/A30C con un enlace disulfuro roto (en tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 5 mM). Se monitorizó la fibrilación mediante la unión a tioflavina T (TFT) (10 μ M) y se llevaron a cabo los ensayos a 37°C con agitación en tampón fosfato a pH 7,2.

La figura 3 representa ensayos de fibrilación del péptido A β (40) A21C/A30C con enlaces disulfuro formados y rotos (mediante TCEP 10 mM) a péptido 30 μ M, 50 μ M, 150 μ M y 250 μ M. La figura 3E representa las líneas base sin péptido. Se monitorizó la fibrilación mediante la unión a TFT (10 μ M) y se llevaron a cabo los ensayos a 37°C con agitación en tampón fosfato a pH 7,2.

La figura 4A representa el perfil de elución de CEM del péptido A β (40) A21C/A30C a bajas concentraciones (aproximadamente 25 μ M), mediante lo cual dicho péptido eluye como aproximadamente una proteína de 8 kDa. La

figura 4B representa un espectro de DC de UV lejano del péptido A β (40) A21C/A30C como una proteína de tipo helicoidal. Este espectro es prácticamente idéntico para todas las preparaciones de tipo helicoidal de dicho péptido. La figura 4C representa un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE) del péptido A β (40) A21C/A30C con enlaces disulfuro formados (-TCEP) y rotos (+TCEP). La figura 4D representa un espectro de RMN de ^{15}N -HSQC de péptido A β (40) A21C/A30C 50 μM .

La figura 5 representa un perfil de elución de CEM de una disolución concentrada (a aproximadamente 1,8 mM) de péptido A β (40) A21C/A30C que se desnaturalizó en cloruro de guanidinio (GdmCl) 6 M antes de la CEM. Según la espectroscopia de DC de UV lejano, las fracciones de alto peso molecular tienen todas estructura β , y las fracciones de bajo peso molecular tienen todas estructura helicoidal.

La figura 6A representa un perfil de elución de CEM de una disolución concentrada (a aproximadamente 1,5-1,8 mM) de péptido A β (40) A21C/A30C que se desnaturalizó en GdmCl 6 M antes de la CEM. En la figura 6B, se pretrató la misma disolución con β -mercaptoetanol antes de la CEM en la misma columna y en el mismo tampón complementado con TCEP 5 mM para mantener las cisteínas reducidas. El péptido eluye en el volumen inicial en estas condiciones (como proteínas de >100 kDa). La figura 6C representa el perfil de elución de CEM de la fracción superior en la figura 6A tras 4 días a 4°C y una concentración de 200 μM . La figura 6D representa el perfil de elución de CEM del pico centrado alrededor de 10,8 ml en la figura 6A concentrado hasta aproximadamente 1 mM.

La figura 7A representa un perfil de elución de CEM de una disolución concentrada (a aproximadamente 1,7 mM) de péptido A β (40) A21C/A30C que se desnaturalizó en GdmCl 6 M antes de la CEM. El péptido eluye como oligómeros de alto peso molecular con estructura β , y como oligómeros de bajo peso molecular y proteína monomérica con estructura helicoidal. La figura 7B representa un espectro de DC de UV lejano de péptido A β (40) A21C/A30C 250 μM como oligómero de péptido con estructura β . Este espectro es prácticamente idéntico para todas las preparaciones de dicho péptido con estructura β , incluyendo estados protofibrilares.

La figura 8 representa un ensayo de fibrilación del péptido A β (40) A21C/A30C como oligómero con estructura β con y sin (en TCEP 10 mM) el enlace disulfuro de restricción. Se monitorizó la fibrilación mediante la unión a TFT (10 μM) y se llevó a cabo el ensayo a 37°C con agitación en tampón fosfato a pH 7,2.

La figura 9 representa un perfil de elución de CEM de una disolución aproximadamente 168 μM de péptido A β (40) A21C/A30C como oligómero con estructura β de alto peso molecular. Los recuadros por debajo de los dos picos representan transferencias puntuales de las fracciones (distribuidas uniformemente en la totalidad de los picos) sometidas a ensayo para detectar la capacidad de unión al anticuerpo A11.

La figura 10A representa un perfil de elución de CEM de una disolución concentrada (a aproximadamente 800 μM) de péptido A β (40) A21C/A30C desnaturalizado en GdmCl 6 M antes de la CEM. El recuadro por debajo del perfil representa una transferencia puntual de las fracciones (distribuidas uniformemente en la totalidad de los picos) sometidas a ensayo para detectar la capacidad de unión al anticuerpo A11. La figura 10B representa un perfil de elución de CEM de la primera fracción en la figura 10A que tenía la mayor afinidad por A11. El recuadro por debajo del perfil representa una transferencia puntual de las fracciones (distribuidas uniformemente en la totalidad de los picos) sometidas a ensayo para detectar la capacidad de unión al anticuerpo A11.

La figura 11A representa espectros de DC de UV lejano del péptido A β (40) A21C/A30C como proteína de tipo helicoidal a alta concentración (1,1 mM), y su transformación en proteína con estructura β tras desnaturalización térmica desde 20°C hasta 80°C y de nuevo hasta 20°C con una pendiente de temperatura de 2°C min $^{-1}$. La figura 11B muestra el perfil de desnaturalización térmica descrito en la figura 11A monitorizado a 220 nm. No estaba presente agregación amorfa ni fibrilar en esta muestra ni antes ni después de la desnaturalización térmica.

La figura 12A representa imágenes de microscopio electrónico de transmisión (MET) de una disolución con tinción negativa (acetato de uranilo) de oligómeros de tipo helicoidal de péptido A β (40) A21C/A30C, que estaba a aproximadamente 500 μM en el momento de la aplicación a la rejilla. Las estructuras esféricas tienen 15-35 nm de diámetro. La figura 12B representa imágenes de MET de la misma disolución que en la figura 12A incubada a 60°C durante 20 min antes de la aplicación a la rejilla. Las estructuras de tipo protofibrilar tienen 6-7 nm de anchura y en promedio aproximadamente 36 nm de longitud. La figura 12C representa imágenes de MET de una disolución con tinción negativa de manera similar de A β (40) A21C/A30C aproximadamente 150 μM como oligómero de alto peso molecular con estructura β . Las estructuras esféricas son similares a las de la figura 12A, teniendo diámetros de 15-35 nm. La barra de escala es de 200 nm en estas figuras.

La figura 13 representa un ensayo de fibrilación del péptido A β (42) A21C/A30C con enlaces disulfuro formados y rotos (mediante TCEP 10 mM) a 117 μM . Se monitorizó la fibrilación mediante la unión a TFT (10 μM) y se llevaron a cabo los ensayos a 37°C con agitación en tampón fosfato a pH 7,2.

La figura 14 representa un perfil de elución de CEM de una disolución concentrada de péptido A β (42) A21C/A30C

que se desnaturalizó en GdmCl 6 M antes de la CEM. Los recuadros por debajo del cromatograma representan transferencias puntuales de las fracciones (la cantidad de muestra aplicada a la membrana se normalizó según la absorbancia a 280 nm) sometidas a ensayo para determinar la capacidad de unión al anticuerpo A11.

5 La figura 15A representa un ensayo dependiente del tiempo de una fracción de CEM de A β (40) A21C/A30C de 80 kDa que se concentró hasta 20 μ M y se incubó a 37°C. Se tomaron puntos de tiempo y se sometieron a ensayo para detectar la presencia del epítipo de A11.

10 La figura 15B representa un ensayo dependiente del tiempo de una fracción de CEM de A β (42) A21C/A30C de 10 kDa que se concentró hasta 50 μ M y se incubó a 37°C. Se tomaron puntos de tiempo y se sometieron a ensayo para detectar la presencia del epítipo de A11.

Descripción detallada de la invención

15 La invención proporciona péptidos A β restringidos covalentemente que tienen sustituciones de enlaces disulfuro A21C/A30C que son resistentes frente a la fibrillogénesis, y su uso en la selección de agentes terapéuticos frente a especies oligoméricas tóxicas implicadas en Alzheimer y otras enfermedades por plegamiento erróneo de proteínas. Los péptidos según la invención también pueden usarse directamente como inmunógenos para generar una respuesta inmunitaria frente a formas tóxicas del péptido A β . La invención es un ejemplo del uso de la modificación por ingeniería genética racional de péptidos para modificar las propiedades de péptidos para adecuarlas a nuevas necesidades; siendo la necesidad en este caso detener la fibrillogénesis del péptido A β a nivel oligomérico tóxico de modo que estas especies puedan aislarse y utilizarse. Los ejemplos presentados a continuación demuestran que los péptidos según la invención comparten muchas propiedades del péptido A β de tipo natural excepto por la alta tendencia del péptido A β de tipo natural a experimentar fibrilación.

25 En el presente documento, el término oligómero se usa como término colectivo para agregados solubles que contienen una pluralidad de monómeros del péptido A β . Estos monómeros son fragmentos peptídicos derivados de la APP (entrada de Swiss-Prot P05067), y comprenden comúnmente de 39 a 43 aminoácidos. La secuencia de longitud completa se describe en Kang, J., *et al.*, Nature 325: 773-776 (1987). La invención proporciona péptidos estabilizados correspondientes a todos los derivados de 39 a 43 residuos de longitud de la APP incluyendo los dos derivados que se encuentran más frecuentemente, A β (40) y A β (42), para los que las secuencias son:

A β (40) humano:

35 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:1)

A β (42) humano:

40 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:2)

Por consiguiente, un aspecto preferido de la invención proporciona péptidos que comprenden las siguientes secuencias:

A β (40) A21C/A30C humano:

45 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFCEDVGSNKGCIIGLMVGGVV (SEQ ID NO:3)

A β (42) A21C/A30C humano:

50 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFCEDVGSNKGCIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO:4)

Los símbolos de una única letra y los símbolos de tres letras son intercambiables y se usan para indicar los aminoácidos. Estos símbolos, que los conoce bien el experto en la técnica, tienen el siguiente significado: A = Ala = alanina, C = Cys = cisteína, D = Asp = ácido aspártico, E = Glu = ácido glutámico, F = Phe = fenilalanina, G = Gly = glicina, H = His = histidina, I = Ile = isoleucina, K = Lys = lisina, L = Leu = leucina, M = Met = metionina, N = Asn = asparagina, P = Pro = prolina, Q = Gln = glutamina, R = Arg = arginina, S = Ser = serina, T = Thr = treonina, V = Val = valina, W = Trp = triptófano e Y = Tyr = tirosina.

60 Los péptidos según la invención se diseñaron específicamente con el fin de impedir la fibrilación de los péptidos A β derivados de la APP. El diseño de los péptidos según la invención (figura 1A) se basa en la estructura de RMN determinada recientemente (n.º de registro de Protein Data Bank 2OTK) del péptido A β (Hoyer, W., *et al.*, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA. 105: 5099-5104 (2008)). El enlace disulfuro de restricción presente en los péptidos de la invención que conecta los residuos 21 y 30 estabiliza esta estructura en horquilla β una vez formada, e inhibe además el cambio conformacional que desencadena la amiloidosis, representándose una hipótesis de un mecanismo de este tipo esquemáticamente en la figura 1B. En consecuencia, los péptidos A β según la invención son muy resistentes frente a la fibrillogénesis incluso a altas concentraciones a menos que se reduzca (altere) el enlace disulfuro para formar tioles (RSH) con, por ejemplo, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol o TCEP, en condiciones fisiológicas, en las que la unión covalente intramolecular entre Cys21 y Cys30 es estable. Es probable que la oxidación adicional de los sulfuros a ácido sulfénico (RSOH), sulfinico (RSO₂H) y sulfónico (RSO₃H) con, por ejemplo, especies reactivas de oxígeno (tales como H₂O₂) o tratamientos duros similares en condiciones no fisiológicas, desencadene la fibrillogénesis de este péptido.

Las posiciones 21 y 30 del péptido A β (tal como se define por ejemplo en SEQ ID NO: 2) son los dos únicos residuos que pueden unirse covalentemente mediante un enlace disulfuro sin alterar dicha estructura en horquilla β . Deben cumplirse dos criterios geométricos para una incorporación satisfactoria de este tipo de un enlace disulfuro estabilizante, concretamente (i) que la distancia C α -C α entre las posiciones que van a unirse estén dentro de 4,4-6,8 Å, y (ii) que la distancia C β -C β entre los mismos dos residuos esté dentro de 3,45-4,50 Å (Clarke, J. y Fersht, A., Biochemistry 32: 4322-4329 (1993)). Además, es probable que pueda aplicarse una modificación por ingeniería genética de péptidos similar en todos los derivados de péptido A β que puedan formar dicha estructura en horquilla o bien como especie monomérica ocupada de manera transitoria o bien como especie oligomérica estable. Por consiguiente, la invención no se limita a péptidos A β A21C/A30C correspondientes a péptidos A β de 39 a 43 residuos de longitud con secuencias de tipo natural, sino que también incluyen péptidos A β A21C/A30C correspondientes a mutantes de péptido A β que se producen de manera natural que conducen a un aumento de la incidencia de EA familiar. Estas mutaciones pueden encontrarse en cualquiera de los derivados de péptido A β de 39-43 residuos de longitud de la APP. Por tanto, la invención incluye pero no se limita a péptidos A β A21C/A30C que portan la mutación ártica E22G (SEQ ID NO: 5), la mutación holandesa E22Q (SEQ ID NO: 6), la mutación de Iowa D23N (SEQ ID NO: 7) y la mutación italiana E22K (SEQ ID NO: 8), y otras mutaciones familiares que es probable que aparezcan. Además, la estructura en horquilla en dichas secuencias que contienen una sulfona o un sulfoxido de metionina en la posición 35 pueden estabilizarse mediante la invención. Muchos creen que esta metionina es esencial para la toxicidad (véase por ejemplo Butterfield, D. A. y Kanski, J., Peptides 23: 1299-1309 (2002)).

Otros péptidos A β A21C/A30C que comprenden una o más mutaciones conservativas o sustituciones, alteraciones, inserciones o truncamientos que se hacen conservativos de otra forma (por ejemplo el derivado truncado 9-42; SEQ ID NO: 9) de las secuencias mencionadas anteriormente, que incluyen aminoácidos no convencionales y modificaciones de extremos terminales, tal como cisteinilación, maleimidación, acetilación y amidación, también forman parte de la invención, y son resistentes a la fibrilización. Los aminoácidos fuera de la estructura en horquilla β , es decir los residuos 1 a 16 y 37 a 40 de SEQ ID NO: 3, y 1 a 16 y 37 a 42 de SEQ ID NO: 4, son más resistentes a la sustitución y, por tanto, incluso se toleran sustituciones no conservativas en estas regiones sin afectar gravemente a la función de la invención. Otros péptidos A β A21C/A30C modificados que forman parte de la invención incluyen, pero no se limitan a, péptidos en los que se han invertido uno o más tramos consecutivos de la secuencia de péptido A β , tal como el derivado invertido N-terminal 1-8 (SEQ ID NO: 10). Los péptidos A β según la invención pueden producirse mediante síntesis química seguida por separación de los péptidos oxidados (sulfuros) de los péptidos reducidos (tioles) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de fase inversa tal como se describió previamente para otros derivados de disulfuro de este péptido (Shivaprasad, S. y Wetzels, R., Biochemistry 43: 153-15317 (2004)). La síntesis química es el modo más común para producir los péptidos A β . Puesto que estos péptidos A β se liofilizan habitualmente, puede ser necesario en primer lugar pretratar los péptidos con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) al 100% para eliminar agregados preexistentes antes de la caracterización tal como se comentó previamente (Stine, W. B. *et al.* J. Biol. Chem. 278: 11612-11622 (2003)).

La expresión heteróloga de los péptidos A β según la invención en *Escherichia coli* es una alternativa a la síntesis química, pero requiere que los péptidos se expresen como proteínas de fusión para ayudar a su solubilidad (véase por ejemplo Lee, E. K., *et al.*, Prot. Expr. Purif. 40:183-189 (2005)). Un método de elección para la producción rentable de A β (40) y A β (42) es coexpresar estos péptidos con una proteína de unión por afinidad (Grönwall, C., *et al.*, J. Biotechnol. 128: 162-183 (2007)) en *E. coli*. En resumen, los péptidos se expresan de manera concomitante a la proteína de unión, formando así un complejo soluble que protege al péptido A β frente a la agregación y proteólisis. La proteína de unión contiene una cola de hexa-histidina para ayudar en la purificación del complejo usando cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). Una vez purificado, el complejo puede romperse usando GdmCl, y el péptido A β liberado puede separarse de la proteína de unión por afinidad de nuevo usando IMAC en condiciones desnaturalizantes. Entonces el GdmCl puede separarse por diálisis o retirarse usando CEM. Este protocolo de coexpresión no implica liofilización, y permite la selección directa de los péptidos durante la expresión. Como resultado de la expresión en *E. coli*, todos los péptidos usados en los datos presentados a continuación contienen una metionina N-terminal extra. Se indica en el presente documento esta posición como -1, de modo que la secuencia de aminoácidos en los péptidos A β conserva su numeración original. La metionina extra no limita ni afecta a la propiedad de los péptidos, y se obtienen resultados similares con péptidos A β de tipo natural y péptidos A β A21C/A30C si se sintetizan y se purifican tal como se describió previamente (Shivaprasad, S. y Wetzels, R.,

Biochemistry 43: 153-15317 (2004)).

Se llevaron a cabo ensayos de agregación de A β (40) A21C/A30C en condiciones cercanas a las fisiológicas (tampón fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2) a diversas concentraciones a 37°C con agitación. Estos experimentos demuestran que este péptido es muy resistente frente a la fibrillogénesis, y que las especies completamente fibriladas reducidas (en presencia de TCEP 5 mM) tienen propiedades de unión a TFT comparables a las del péptido de tipo natural (ejemplo 1). Dos características son evidentes cuando se lleva a cabo el mismo experimento a mayores concentraciones de péptido (ejemplo 2): en primer lugar, hay un aumento inicial rápido en la fluorescencia de TFT a concentraciones superiores a 100 μ M que posteriormente disminuye hasta niveles similares en todas las muestras; en segundo lugar, a medida que aumenta la concentración de péptido, también hay un aumento en los tiempos de demora que preceden a la fibrilación en las muestras reducidas. Estas dos observaciones son características de las tendencias oligoméricas de este péptido: el rápido aumento en la fluorescencia es un resultado de la formación inicial de especies de tipo protofibrilar que posteriormente se disocian cuando se establece un nuevo equilibrio, y es probable que el aumento de los tiempos demora sea un resultado de que el enlace disulfuro es más o menos inaccesible en los oligómeros de tipo helicoidal que existen a alta concentración.

Aparte de ser resistentes frente a la fibrillogénesis, el péptido A β (40) A21C/A30C se asemeja al péptido de tipo natural. Los espectros de DC y RMN de la fracción de bajo peso molecular (que eluye a aproximadamente 8 kDa) obtenidos a partir de la CEM demuestran que dicho péptido forma estructuras de tipo helicoidal que son muy similares al péptido de tipo natural (ejemplo 3). A mayores concentraciones, varias especies oligoméricas que contienen una pluralidad de monómeros eluyen de las ejecuciones de CEM. Éstas eluyen frecuentemente dentro del intervalo de >8 a <42 kDa (ejemplo 4), y tienen todas estructuras de tipo helicoidal con espectros de DC idénticos a los del péptido obtenido en la fracción de bajo peso molecular. Estos oligómeros de tipo helicoidal se denominan oligómeros de bajo peso molecular. Sin embargo, el péptido también puede formar oligómeros más grandes con estructuras β . Estas estructuras eluyen de las columnas de CEM como proteínas de tamaños de aproximadamente 75-85 kDa y 170 kDa (ejemplo 5). En el presente documento estos oligómeros con estructura β se denominan oligómeros de alto peso molecular. En ensayos de agregación, estos oligómeros de alto peso molecular son resistentes frente a la fibrillogénesis. Incluso la presencia de TCEP 10 mM no pudo nuclear la polimerización de estos oligómeros a una concentración de péptido de 30 μ M (ejemplo 5). Algunos de estos oligómeros de alto peso molecular también se unen al anticuerpo A11 (ejemplo 6), que es un anticuerpo policlonal generado específicamente contra oligómeros de péptido A β -y se sugiere que es genérico para especies oligoméricas relacionadas con enfermedad (Kayed, R. *et al.* Science 300: 486-489 (2003)).

Pueden prepararse oligómeros de bajo peso molecular de los péptidos de la invención a alta concentración para formar estructuras de tipo protofibrilar rápidamente mediante la aplicación de calor (60°C) (ejemplo 7). Esta etapa no se ha optimizado, y otras temperaturas elevadas (aproximadamente >20°C) tendrán el mismo efecto, aunque es deseable una temperatura por debajo de 80°C para impedir que se produzcan modificaciones covalentes irreversibles del péptido (incluyendo desamidación de Asn27 y Gln15, así como oxidación del enlace disulfuro Cys21-Cys30 y Met35). Según MET, estas protofibrillas tienen una dimensión promedio de aproximadamente 6,7 nm de anchura, y longitudes del orden de aproximadamente 36 nm (aunque las longitudes varían) (ejemplo 8). La transición va acompañada por la formación de estructura β , para la que el espectro de DC es indistinguible del de los oligómeros de alto peso molecular anteriores. Estas estructuras también se unen a TFT. En ensayos de agregación, esta transición estructural da como resultado por tanto un aumento inicial rápido en la fluorescencia, que va seguido por una disminución gradual cuando las protofibrillas se disocian cuando se establece un nuevo equilibrio. Esta observación concuerda con la visión de que las protofibrillas de péptido A β están en equilibrio con especies monoméricas pero al mismo tiempo son precursores de fibrillas (Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 25945-25952 (1999)).

Los péptidos más largos según la invención, es decir los derivados de A β (42) (ejemplo 9) también se protegen frente a la fibrilización, y los oligómeros así obtenidos durante la CEM de A β (42) A21C/A30C tienen una distribución de tamaño similar a la de los oligómeros A β (40) A21C/A30C (ejemplo 10). El epítipo de A11 está presente en el oligómero mayor de los oligómeros de alto peso molecular con estructura β que eluyen de la columna de CEM (ejemplo 10). Este epítipo de unión a A11 es muy estable una vez formado y sólo disminuye un 0,1% al día cuando se incuba a 37°C a lo largo de un periodo de dos meses (ejemplo 11).

Los péptidos según la invención, cuando se usan para la producción de oligómeros estabilizados covalentemente, proporcionan ventajas con respecto a los métodos anteriores ya que esta resistencia del péptido frente a la fibrillogénesis permite que tales oligómeros se preparen en condiciones fisiológicas. Estos oligómeros pueden estudiarse entonces a mayores concentraciones y/o durante tiempos más largos de lo que era posible previamente, ayudando por tanto considerablemente en ensayos de selección de fármacos y estudios de inmunización. Los oligómeros de alto peso molecular de los péptidos A β según la invención pueden producirse (por ejemplo como en el ejemplo 5), concentrarse, y luego usarse en métodos para la identificación de compuestos potencialmente adecuados para el tratamiento de EA. Un compuesto de este tipo debe unirse a oligómeros tóxicos ya formados y disolverlos, y/o impedir su formación. Hay varias técnicas biofísicas que pueden usarse para monitorizar la alteración de estructuras oligoméricas preexistentes o su no existencia, incluyendo DC, RMN, calorimetría isotérmica de

valoración o ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas usando un anticuerpo o proteína de unión específico para las estructuras oligoméricas o monoméricas. Incluso pueden usarse los fluoróforos 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato y TFT, que fluorescen ambos cuando se unan a los oligómeros, en un ensayo de este tipo ya que la fluorescencia se extingue tras la disociación de los oligómeros. Un experto en la técnica se dará cuenta de que hay otras varias posibilidades. En otra realización de la invención, pueden usarse los monómeros u oligómeros estabilizados covalentemente para la preparación de formulaciones de antígeno como inmunógenos para la generación de anticuerpos u otros agentes de unión de proteína. Puede ponerse en entredicho la inmunización tanto activa como pasiva frente a la estructura en horquilla que se muestra en el presente documento que está presente en las formas oligoméricas potencialmente tóxicas de EA.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona animales transgénicos no humanos que expresan una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína precursora de amiloide (APP) que comprende las mutaciones A21C/A30C. Preferiblemente, la APP es una APP humana mutada que comprende las mutaciones A21C/A30C, lo más preferiblemente la APP es la proteína de SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es un gen de APP humana mutada que comprende las mutaciones A21C/A30C. El animal transgénico no humano se selecciona preferiblemente del filo *Chordata* (y *Hemichordata*), tal como un animal vertebrado (que incluye ciclóstomos, peces óseos, tiburones y rayas, anfibios, reptiles, mamíferos y aves). Preferiblemente, el animal transgénico no humano es un mamífero, tal como un ratón, una rata, un cerdo, un conejo o una cobaya. Lo más preferiblemente, el animal transgénico no humano es un ratón.

En otra realización de la invención, pueden usarse animales transgénicos no humanos como sistemas modelo para la patogenia de EA sobreexpresando sólo un péptido A β según la invención que comprende las sustituciones A21C/A30C. Puesto que no se requiere procesamiento proteolítico de APP para generar el péptido A β tóxico en un organismo modelo de este tipo, pueden seleccionarse animales transgénicos no humanos no sólo de dentro de los cordados (y hemicordados), sino que también pueden incluir invertebrados que carecen de APP endógena que comprende el péptido A β (por ejemplo seleccionados de cualquiera de los filos *Annelida*, *Arthropoda*, *Cnidaria*, *Echinodermata*, *Mollusca*, *Nematoda*, *Nematomorpha*, *Platyhelminthes* y *Porifera*). Los modelos de invertebrado de la patogenia de EA tienen la ventaja de una corta duración de vida, bajo coste, pequeño tamaño y genética altamente caracterizada. Los ejemplos de tales sistemas modelo de invertebrados incluyen *Drosophila melanogaster* (Crowther, D.C. *et al.* (2005) *Neuroscience* 132: 123-135) y *Caenorhabditis elegans* (Link, C.D. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9368-9372). Por consiguiente, en aún otro aspecto, la presente invención proporciona animales transgénicos no humanos que expresan una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido A β según la invención que comprende las sustituciones A21C/A30C. Preferiblemente, el péptido A β expresado de manera heterogénea en un sistema modelo de invertebrado de este tipo es el péptido correspondiente a SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO: 10

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica para una APP que comprende las mutaciones A21C/A30C. Preferiblemente, la APP es una APP humana mutada que comprende las mutaciones A21C/A30C, lo más preferiblemente la APP es la proteína de SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es un gen de APP humana mutada que comprende las mutaciones A21C/A30C.

Otro aspecto de la presente invención es un sistema de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para APP que comprende las mutaciones A21C/A30C. Aún otro aspecto de la presente invención es un polipéptido que es una APP que comprende las mutaciones A21C/A30C, preferiblemente una APP humana mutada que comprende las mutaciones A21C/A30C, lo más preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO: 11.

La posición de aminoácido 21 en el péptido A β corresponde a la posición de aminoácido 692 en APP humana, y la posición de aminoácido 30 en el péptido A β humano corresponde a la posición de aminoácido 701 en APP humana. La secuencia de APP humana puede encontrarse en la entrada de Swiss-Prot P05067 (SEQ ID NO: 12). En consecuencia, mediante una APP que comprende las mutaciones A21C/A30C quiere decirse una APP en la que *i*) el aminoácido alanina en la posición 692, tal como se define mediante la secuencia de la APP humana (SEQ ID NO: 12) o la posición correspondiente en una APP homóloga o heteróloga, se sustituye por una cisteína, y *ii*) el aminoácido alanina en la posición 701, tal como se define mediante la secuencia de la APP humana (SEQ ID NO: 12) o la posición correspondiente en una APP homóloga o heteróloga, se sustituye por una cisteína.

Por una APP homóloga o heteróloga quiere decirse una APP derivada de un animal, tal como un vertebrado, así como una APP sintética, mutada y/o que no se produce de manera natural, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, tal como al menos el 90% o al menos el 95% en comparación con APP humana (SEQ ID NO: 12). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina tal como sigue. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos con, por ejemplo, SEQ ID NO: 12 usando el programa BLAST 2 Sequences (BL2seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ puede obtenerse del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica del gobierno de los EE.UU. en ncbi.nlm.nih.gov. Pueden encontrarse instrucciones que explican cómo usar el programa BL2seq en el archivo léame que acompaña a BLASTZ. BL2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las

opciones de BL2seq se ajustan tal como sigue: se ajusta -i a un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que va a compararse (por ejemplo, C:\seq1.txt); se ajusta -j a un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que va a compararse (por ejemplo, C:\seq2.txt); se ajusta -p a blastp; se ajusta -o a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y se dejan todas las demás opciones en sus parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\BL2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida diseñado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida diseñado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en las que está presente un residuo de aminoácido o nucleótido idéntico en ambas secuencias. Se determina el porcentaje de identidad dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada seguido por la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, si se compara una secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 (la longitud de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12 es 770) y el número de coincidencias es de 693, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad de 90 (es decir, $693 \div 770 \times 100 = 90$) con respecto a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12.

Producción de animales transgénicos

En la técnica se conocen bien métodos para generar animales transgénicos de la presente invención (véase, en general, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000)). En una realización, la generación del ratón transgénico puede implicar opcionalmente la alteración de los genes de APP murina y la introducción de una o más copias del gen que codifica para una APP humana mutada en el genoma murino, preferiblemente en la misma ubicación que el gen de APP murina endógeno.

Los animales no humanos transgénicos de la invención se producen preferiblemente introduciendo transgenes en la línea germinativa del animal. Pueden usarse células diana embrionarias en diversas fases de desarrollo para introducir los transgenes. Se usan diferentes métodos dependiendo de la fase de desarrollo de la célula diana embrionaria. La(s) línea(s) específica(s) de cualquier animal usado para poner en práctica esta invención se selecciona(n) para lograr una buena salud general, buenos rendimientos de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión y buena capacidad reproductora. Cuando van a producirse ratones transgénicos, se usan a menudo variedades tales como C57BL/6 o C57BL/6 x DBA/2 F1, o líneas FVB (obtenidas comercialmente de Charles River Labs, Boston, Mass., The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, o Taconic Labs.).

La introducción del transgén en el embrión puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la técnica tal como, por ejemplo, microinyección, electroporación o lipofección. Por ejemplo, el transgén puede introducirse en un mamífero mediante microinyección del constructo en los pronúcleos del/de los óvulo(s) de mamíferos fertilizado(s) para hacer que una o más copias del constructo se conserven en las células del/de los mamífero(s) en desarrollo. Tras la introducción del constructo de transgén en el óvulo fecundado, el óvulo puede incubarse *in vitro* durante cantidades variables de tiempo, o reimplantarse en el huésped sustituto, o ambos. Un método común es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de la especie, y luego reimplantarlos en el huésped sustituto. La reimplantación se logra usando métodos convencionales. Habitualmente, el huésped sustituto se anestesia, y se insertan los embriones en el oviducto. El número de embriones implantados en un huésped particular variará según la especie, pero será habitualmente comparable al número de crías que la especie produce de manera natural.

También puede usarse infección por retrovirus para introducir transgenes en animales no humanos. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta la fase de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para infección por retrovirus (Jaenich, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264). Se obtiene una infección eficaz de los blastómeros mediante tratamiento enzimático para eliminar la zona pelúcida (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es normalmente un retrovirus de replicación defectuosa que porta el transgén (Jahner *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6927-6931; Van der Putten *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-6152). La transfección se obtiene fácil y eficazmente cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células que producen virus (Van der Putten, citado anteriormente; Stewart *et al.* (1987) EMBO J. 6:383-388). Alternativamente, la infección puede realizarse en una fase posterior. Pueden inyectarse virus o células que producen virus en el blastocisto (Jahner *et al.* (1982) Nature 298:623-628). La mayoría de los fundadores serán un mosaico para el transgén puesto que la incorporación se produce sólo en un subconjunto de las células que formaron el animal no humano transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones por retrovirus del transgén en diferentes posiciones en el genoma que se segregarán generalmente en las crías. Además, es posible introducir transgenes en la línea germinal mediante infección por retrovirus intrauterina del embrión a mediados de la gestación (Jahner *et al.* (1982) citado anteriormente).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción de transgenes es la célula madre embrionaria (ES). Pueden introducirse eficazmente transgenes en las células ES mediante transfección de ADN o mediante transfección mediada por retrovirus. Tales células ES transformadas pueden combinarse después de eso con blastocistos de un

animal no humano. Las células ES colonizan después de eso el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

5 En una realización de la invención, un gen de APP endógeno en un huésped no humano se altera funcionalmente mediante integración homóloga de un gen de APP heterólogo que comprende las mutaciones A21C/A30C, que
 10 manera que el gen de APP heterólogo sustituye sustancialmente el gen de APP endógeno, y preferiblemente sustituye completamente las secuencias codificantes del gen de APP endógeno. Preferiblemente, el gen de APP heterólogo está unido, como consecuencia de integración homóloga, a secuencias reguladoras (por ejemplo, un potenciador/promotor) del gen de APP endógeno, respectivamente, de modo que el gen heterólogo se expresa bajo
 15 el control transcripcional de elementos reguladores del locus del gen de APP endógeno. Pueden producirse huéspedes no humanos que son homocigotos para tales alelos de sustitución según métodos descritos en el presente documento. Tales huéspedes no humanos homocigotos expresarán generalmente una APP heteróloga pero no expresan la proteína APP endógena. Habitualmente, el patrón de expresión del gen de APP humanizado heterólogo imitará sustancialmente el patrón de expresión del gen de APP endógeno, en el huésped no humano que se produce de manera natural (no transgénico).

Por ejemplo, puede generarse un ratón transgénico que tiene secuencias de gen de APP que comprenden las mutaciones A21C/A30C en lugar de las secuencias de gen de APP murino endógeno y que están controladas de
 20 manera transcripcional por secuencias reguladoras murinas endógenas. Las secuencias de gen de APP que comprenden las mutaciones A21C/A30C se expresarán generalmente de manera similar a la APP murina en ratones no transgénicos que se producen de manera natural.

Generalmente, se emplea un constructo de direccionamiento de tipo sustitución para la sustitución génica homóloga. La recombinación homóloga de doble cruzamiento entre secuencias de gen de APP endógeno del constructo de
 25 direccionamiento da como resultado la integración dirigida de segmentos de gen de APP heterólogo. Habitualmente, las regiones de direccionamiento de homología del transgén comprenden secuencias que flanquean a los segmentos de gen de APP endógeno, de modo que la recombinación homóloga da como resultado la delección concomitante de la APP endógena, y la integración homóloga de los segmentos de gen de APP heterólogo. Sustancialmente puede sustituirse un gen de APP endógeno completo por una APP heteróloga mediante un único
 30 acontecimiento de direccionamiento o mediante múltiples acontecimientos de direccionamiento (por ejemplo, sustitución secuencial de exones individuales). Uno o más marcadores seleccionables, habitualmente en forma de casetes de expresión de selección positiva o negativa, pueden colocarse en el constructo de direccionamiento. Se prefiere habitualmente que los marcadores seleccionables estén ubicados en regiones de intrón de la región de sustitución heteróloga.

35 Pueden cruzarse animales transgénicos que comprenden secuencias de gen de APP transgénicas que comprenden las mutaciones A21C/A30C con otros animales transgénicos, generando animales transgénicos que comprenden múltiples transgenes. Una manera de preparación es generar una serie de mamíferos, cada uno conteniendo uno de los transgenes o constructos de desactivación deseados. Tales mamíferos se reproducen entre sí a través de una
 40 serie de cruzamientos, retrocruzamientos y selecciones, para generar en última instancia un único mamífero que contiene todos los transgenes y/o constructos de desactivación deseados, donde el mamífero es por lo demás congénico (genéticamente idéntico) al tipo natural excepto por la presencia de la(s) desactivación/desactivaciones y/o transgén/transgenes. Normalmente, el cruzamiento y retrocruzamiento se logran mediante el apareamiento de hermanos a una variedad antecesora con crías, dependiendo del objetivo de cada etapa particular en el proceso de reproducción. En determinados casos, puede ser necesario generar un gran número de crías con el fin de generar una única cría que contiene cada uno de los constructos de desactivación y/o transgenes en la ubicación cromosómica apropiada. Además, puede ser necesario realizar cruzamientos o retrocruzamientos a lo largo de
 45 varias generaciones para obtener en última instancia el genotipo deseado.

50 Ejemplos

Ejemplo 1. Ensayo de fibrilación de A β (40) de tipo natural y A β (40) A21C/A30C.

55 Se llevaron a cabo todas las determinaciones de concentración espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción de 1424 cm⁻¹ M⁻¹ para determinar la diferencia de absorción a 280 nm y 300 nm. La disolución tamponada usada en los ejemplos fue fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, a menos que se establezca otra cosa. Este tampón también fue el tampón de almacenamiento para los péptidos A β . Se prepararon todas las muestras de péptido de manera reciente, se mantuvieron a 4°C y se usaron en el plazo de 3-4 días.

60 Se llevaron a cabo ensayos de fibrilación monitorizando la fluorescencia potenciada del colorante TFT tras su unión a las fibrillas (Levine, H., Methods Enzymol. 309: 274-284 (1999)). Se registró la fluorescencia en placas de 96 pocillos (Nunc) usando un lector FLUOstar Optima (BMG) equipado con filtros de excitación a 440 nm y emisión a 480 nm. Se mantuvieron las muestras de péptido a 30 μ M y se complementaron con TFT 10 μ M. Además, se añadió TCEP 5 mM a una muestra de referencia de la invención para someter a ensayo el efecto del enlace disulfuro
 65 formado. TCEP es un reductor más estable que el más comúnmente usado DTT a pH básico. Reduce los enlaces disulfuro a tioles, alterando así el enlace covalente de restricción de la invención. Antes de las mediciones, se

sellaron las placas con cinta de poliolefina (Nunc) para impedir la evaporación. Se llevó a cabo el ensayo a 37°C, y se registraron puntos de datos cada 6 min con 2 min de agitación orbital (anchura de 5 mm) precediendo a cada medición.

5 El resultado de este ensayo de agregación se presenta en la figura 2. Se producen nucleación y fibrilación rápidamente en la muestra de tipo natural. Para el péptido A21C/A30C reducido con TCEP, el tiempo de demora es aproximadamente 5 h más largo, pero la fluorescencia de TFT del estado final completamente fibrilado es idéntica a la de la fibrilla de tipo natural. Por otro lado, para el péptido A21C/A30C oxidado no está produciéndose fibrilación.

10 Ejemplo 2. Ensayos de fibrilación de A β (40) A21C/A30C a concentraciones crecientes.

Se llevó a cabo el ensayo de fibrilación como en el ejemplo 1, excepto porque también se sometió a ensayo la concentración de péptido a 50, 150 y 250 μ M, y se aumentó la concentración de TCEP hasta TCEP 10 mM en las muestras de referencia. Además, se registraron puntos de datos cada 15 min con 5 min de agitación orbital (anchura de 5 mm) precediendo a cada medición. Se analizaron muestras dobles a cada concentración, y el resultado se presenta en la figura 3.

El resultado es similar al resultado obtenido en el ejemplo 1. Sin embargo, hay un rápido aumento en la fluorescencia para las muestras con un enlace disulfuro intacto a las concentraciones de 150 y 250 μ M, que luego disminuye hasta decline niveles similares con velocidades mucho más lentas. Tal como se demuestra en los ejemplos 7 y 8 más adelante, puede hacerse que los oligómeros de tipo helicoidal formen estructuras de tipo protofibrilar cuando se someten a temperaturas elevadas, y éstas se unen a TFT débilmente dando lugar así a una fluorescencia potenciada. A medida que pasa el tiempo, se alcanza un nuevo equilibrio en estas muestras. Las observaciones realizadas por Walsh *et al.* para el péptido A β de tipo natural son aplicables a los datos en la figura 3 (Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 25945-25952 (1999)). Muestran datos que sugieren que las protofibrillas son precursores de las fibrillas, y que las constantes de velocidad de competencia para la disociación de protofibrillas y la formación de fibrillas son de magnitud similar. Pero el cambio conformacional que desencadena la fibrilación en el péptido A β de tipo natural se inhibe en el péptido A β A21C/A30C, que es por lo que no pueden detectarse fibrillas en estas muestras altamente concentradas a menos que se rompa el enlace disulfuro. Es probable que el aumento más lento de la fluorescencia en la muestra de 50 μ M se deba al hecho de que las protofibrillas no están nucleadas a esta menor concentración, pero la transición estructural de la estructura helicoidal a β se produce no obstante como resultado de la mayor temperatura y/o agitación de la muestra. Se ha mostrado de hecho previamente que la unión de TFT depende de la presencia de estructura de lámina β (DeLellis, R. A., *et al.*, J. Histochem. Cytochem. 16: 663-665 (1968)).

Otra característica del aumento de la concentración de péptido es el aumento en los tiempos de demora que preceden a la nucleación para el péptido A β A21C/A30C con enlaces disulfuro rotos. Es probable que esto sea el resultado combinado de (i) que los oligómeros de tipo helicoidal presentes en estas muestras (véase el ejemplo 4) tienen enlaces disulfuro más o menos protegidos, y (ii) que más péptido requiere más tiempo para reducirse con TCEP.

40 Ejemplo 3. Estructura similar al tipo natural de A β (40) A21C/A30C.

Se llevó a cabo CEM en una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml min⁻¹, y se hizo funcionar la columna mediante una unidad ÄKTA Explorer (GE Healthcare). Todas las ejecuciones de la columna se llevaron a cabo a temperatura ambiente (21°C). Se calibró la columna con un kit de calibración de filtración en gel de bajo peso molecular (Amersham Biosciences) en condiciones similares. Normalmente, se inyectaron 500 μ l de péptido en esta columna durante cada ejecución.

A bajas concentraciones de péptido, por ejemplo 25 μ M, el péptido A β (40) A21C/A30C eluye normalmente como una proteína de aproximadamente 8-10 kDa. Aunque el péptido A β es una proteína de aproximadamente 4,5 kDa, no se interpreta esto como que este péptido eluye como un dímero debido a las estructuras posiblemente extendidas de proteínas de tipo helicoidal no plegadas en comparación con las proteínas bien plegadas usadas en el kit de calibración (ribonucleasa A, quimotripsinógeno A, ovoalbúmina y albúmina). En el experimento mostrado en la figura 4A, se inyectaron 25 μ M de péptido A β (40) A21C/A30C en la columna, generando así un único pico simétrico correspondiente a una proteína de aproximadamente 8 kDa. La CEM de péptido de tipo natural A β (40) produce resultado idénticos en esta columna (no mostrado), y el tamaño aparente de 8-10 kDa es del orden de lo que se ha demostrado previamente (por ejemplo en Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 22364-22372 (1997)).

Se recogió un espectro de DC de UV lejano en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Corporation) a 20°C usando una velocidad de barrido de 50 nm min⁻¹. En el experimento presentado en la figura 4B, se sometieron a barrido 20 μ M de péptido A β (40) A21C/A30C entre 190-260 nm en una cubeta de 1,0 mm. El espectro presenta un mínimo alrededor de 200 nm que es típico de estructuras de tipo helicoidal, y es muy similar a los espectros de DC de péptido de tipo natural A β (42) y A β (40) no agregado (no mostrado; para ejemplos véase por ejemplo Walsh, D.

M., *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 25945-25952 (1999)).

Se llevó a cabo SDS PAGE usando el sistema de gel Criterion (Bio-Rad) y geles de Tris-Tricina al 16,5% prefabricados (Bio-Rad) a un voltaje constante de 120 V. El medio de ejecución fue Tris-HCl 100 mM, Tricina 100 mM y SDS al 0,1% (pH 8,3). En la figura 4C, se mezcló una muestra 300 μ M de péptido A β (40) A21C/A30C en una razón 1:1 con tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, SDS al 1%, glicerol al 20% y azul de bromofenol al 0,23%), y también se preparó una muestra con TCEP 2,5 mM. Se incubó la muestra que contenía TCEP a 95°C durante 5 min, mientras que se incubó la muestra que carecía de TCEP a temperatura ambiente (21°C) durante aproximadamente 20 min. Entonces se cargó un volumen de 6 μ l sobre el gel junto con marcadores peptídicos. Se ejecutó el gel, se fijó en metanol al 50% y ácido acético al 10% (durante aproximadamente 1 h), y se tiñó con azul brillante de Coomassie durante 16 h (Coomassie al 0,1%, 2-propanol al 2,5%, ácido acético al 10%). Tras eliminar la tinción (metanol al 5%, ácido acético al 7%) se analizaron los geles. Tal como se muestra en la figura 4C, ambas muestras migran próximas a la banda del marcador peptídico de 6,2 kDa, demostrando así que sólo se ha formado un enlace disulfuro intramolecular en el péptido A β (40) A21C/A30C.

Se midió la espectroscopía de RMN de 15 N-HSQC en un espectrómetro Varian Inova 800 MHz con péptido A β (40) A21C/A30C marcado con 15 N a concentraciones de 50 μ M y 1,9 mM de oligómeros de bajo peso molecular (con estructura helicoidal), y con una muestra de 50 μ M y 450 μ M de oligómeros de alto peso molecular (con estructura β). El espectro en la figura 4D con péptido 50 μ M es indicativo de un péptido de tipo helicoidal no estructurado, y es similar a los espectros publicados del péptido A β de tipo natural (Hou, L., *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 126: 1992-2005 (2003)). Ambos espectros de 50 μ M son casi idénticos (no mostrado). El espectro de 1,9 mM de oligómeros de bajo peso molecular y el de oligómeros de alto peso molecular 450 μ M también eran idénticos con sólo unos cuantos picos visibles (no mostrado), indicando que estas estructuras son demasiado grandes para RMN en disolución. Los picos visibles en los dos últimos espectros provienen probablemente de las partes móviles de estos oligómeros.

Tomado conjuntamente, es ejemplo demuestra por tanto que los péptidos según la invención tienen propiedades estructurales muy similares a las del péptido A β de tipo natural a pesar de la presencia de un enlace disulfuro intramolecular. Se demuestra que se forma el enlace disulfuro en los ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4. Análisis de CEM de las tendencias oligoméricas del A β (40) A21C/A30C.

Se llevó a cabo CEM en la columna Superdex 75 10/300 como en el ejemplo 3. Se hizo funcionar la columna Superdex 75 16/60 columna (GE Healthcare) más grande de manera similar a la columna 10/300 más pequeña, excepto porque se ejecutó a 1,0 ml min⁻¹ y que se cargó 1 ml.

La figura 5 muestra un experimento para someter a ensayo la distribución de oligómeros a una concentración de péptido mayor que la usada en la figura 4A. Se desnaturalizó el péptido A β (40) A21C/A30C en cloruro de guanidinio (GdmCl) 6 M, fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM (pH 7,2), lo que destruye los oligómeros preexistentes. GdmCl es un compuesto usado de manera rutinaria como desnaturalizante de proteínas. Se inyectó una disolución de péptido desnaturalizado aproximadamente 1,8 mM en la columna Superdex 75 16/60. En la columna, las moléculas de péptido se separan del GdmCl y pueden oligomerizarse libremente. En estas condiciones, el péptido A β (40) A21C/A30C eluye como una distribución de estructuras solubles. El pico predominante eluye en una posición que, según el kit de calibración de proteínas (igual que en el ejemplo 3), corresponde a una proteína globular de aproximadamente 42 kDa. De nuevo, se cree que la CEM no proporciona una determinación precisa de los tamaños de péptido A β , y estos números sólo pueden usarse en un sentido relativo. La espectroscopía de DC demostró que los oligómeros en este pico tienen una estructura de tipo helicoidal (no mostrado; el espectro de DC de UV lejano es prácticamente idéntico al de la figura 4B). La distribución de estas estructuras helicoidales se extiende hasta especies que eluyen como proteínas de aproximadamente 8 kDa. La especie oligomérica más grande que eluye como una especie de 85 kDa tiene un espectro de DC de UV lejano que concuerda con la estructura β (no mostrado; el espectro de DC de UV lejano de esta fracción es prácticamente idéntico al de la figura 7B).

En un experimento relacionado mostrado en la figura 6A, se cargó una concentración similar de péptido A β (40) A21C/A30C desnaturalizado sobre una columna Superdex 10/300. El perfil de elución presenta las mismas características que en la figura 5, aunque con menor resolución. Como comparación, la CEM con la misma muestra desnaturalizada pretratada en primer lugar con β -mercaptoetanol aproximadamente 35 mM durante 10 min a temperatura ambiente (21°C) y sometida a filtración en gel en el mismo tampón complementado con TCEP 5 mM proporciona casi exclusivamente oligómeros de alto peso molecular o protofibrillas que eluyen en el volumen inicial (>100 kDa) (figura 6B). En el espectro de DC de esta fracción predomina la estructura β (no mostrado; el espectro de DC de UV lejano de esta fracción es prácticamente idéntico al de la figura 7B).

La fracción superior del pico oligomérico alrededor de 10,8 ml en la figura 6A, que tiene una concentración de 200 μ M, se incubó durante 4 días a 4°C y luego se sometió a filtración en gel de nuevo. El perfil de elución de esta muestra en la figura 6C muestra que se ha establecido un nuevo equilibrio durante este tiempo, y que ahora predomina la especie que eluye como una proteína de 8 kDa. En cambio, la agrupación de todas las fracciones del

pico oligomérico en la figura 6A tras 4 días a 4°C y la concentración de esta disolución hasta aproximadamente 1,0 mM y su análisis de nuevo en la misma columna da lugar a un perfil en el que de nuevo predominan estructuras oligoméricas más grandes.

5 Tomados conjuntamente, los experimentos de CEM demuestran que al bloquear la etapa de fibrilación, el péptido A β A21C/A30C péptido forma fácilmente varios tipos de oligómeros que contienen diferentes pluralidades de monómeros. Las fracciones de bajo peso molecular que eluyen como proteínas de >8 kDa a <42 kDa tienen todas espectros de DC de UV lejano de tipo helicoidal similares (un ejemplo de un espectro de este tipo se muestra en la figura 4B). Las fracciones de alto peso molecular eluyen como proteínas de >75 kDa y tienen todas espectros de DC de UV lejano similares que concuerdan con la estructura β (un ejemplo de un espectro de este tipo se muestra en la figura 7B).

Ejemplo 5. Preparación y caracterización de oligómeros de alto peso molecular de A β (40) A21C/A30C.

15 Se llevó a cabo CEM como en el ejemplo 3, con una columna Sephacryl S-300 26/60 (GE Healthcare) en la que se inyectó 1 ml en la columna, que se ejecutó a 1,3 ml min⁻¹. La columna se había calibrado previamente como en el ejemplo 3. Se inyectó una disolución de péptido A β (40) A21C/A30C aproximadamente 1,7 mM desnaturalizada en GdmCl 6 M, fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, en esta columna más grande y el perfil de elución se presenta en la figura 7A. En estas condiciones, las fracciones de alto peso molecular eluyen como oligómeros con estructura β a aproximadamente 170 kDa y 80 kDa, mientras que los oligómeros helicoidales eluyen como proteínas más pequeñas.

25 Se recogió un espectro de DC de UV lejano de péptido A β (40) A21C/A30C como en el ejemplo 3. En el experimento presentado en la figura 7B, se sometieron a barrido 250 μ M de péptido A β (40) A21C/A30C que eluyó de una ejecución de CEM a volúmenes correspondientes a 75-85 kDa entre 185-260 nm en una cubeta de 0,1 mm. El espectro presenta un mínimo alrededor de 210 nm y elipticidad positiva alrededor de 190 nm que es típico de estructuras de tipo β de los péptidos A β (40) y A β (42) cuando se oligomerizan y se agregan (por ejemplo Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 25945-25952 (1999)). Tanto la especie de 170 kDa como la de 80 kDa en la figura 7A presentaron espectros de DC de UV lejano casi idénticos al espectro de la figura 7B.

30 Se llevaron a cabo ensayos de fibrilación de oligómeros de alto peso molecular 30 μ M (concentración de péptido monomérico) del péptido A β (40) A21C/A30C como en el ejemplo 2, con muestras dobles con y sin TCEP 10 mM (figura 8). Durante el transcurso del experimento, no aparecieron fibrillas en ninguna de las muestras. La línea base es la misma que en la figura 3E.

Ejemplo 6. Oligómeros de alto peso molecular de A β (40) A21C/A30C se unen al anticuerpo policlonal A11.

40 Se ha mostrado que inmunoglobulinas de conejo purificadas que reconocen un compuesto mimético molecular sintético de oligómeros de péptido A β solubles (el anticuerpo policlonal A11) también reconoce oligómeros similares en otras proteínas implicadas en enfermedades por plegamiento erróneo de proteínas (Kayed, R., *et al.*, Science 300: 486-489 (2003)). Puesto que se cree que las estructuras oligoméricas son la especie tóxica en estas enfermedades, esto sugiere un mecanismo común de patogénesis y, por tanto, probablemente también que están implicadas estructuras tóxicas similares (Haass, C., y Selkoe, D. J., Nature Reviews Mol. Cell. Biol. 8: 101-112 (2007); Glabe, C. G., Trends Biochem. Sci. 29: 542-547 (2004)).

45 La figura 9 muestra una ejecución de CEM de 1 ml de disolución de péptido A β (40) A21C/A30C de oligómero aislado y concentrado (hasta aproximadamente 168 μ M) obtenido como en el ejemplo 5. Se llevó a cabo CEM como en el ejemplo 3, usando una columna Superdex 75 16/60 (GE Healthcare) ejecutada a 1 ml min⁻¹. En estas condiciones la muestra eluye parcialmente en el volumen inicial (aproximadamente 42 ml para esta columna, que corresponde a proteínas de >100 kDa) y como oligómeros de alto peso molecular (que corresponde a proteínas de aproximadamente 87 kDa). Una fracción más pequeña también eluye como una proteína de 7-8 kDa.

55 Se sometieron a ensayo todas las fracciones del pico inicial y del pico final para detectar la unión a A11 (Biosource) según las instrucciones del fabricante. Se sometieron a transferencia puntual 3 μ l de cada fracción sobre una membrana de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) Immobilion-P^{SO} (Millipore) y se dejaron secar. Entonces se bloqueó la membrana durante la noche (aproximadamente 14 h) a 4°C en leche desnatada en polvo al 10% disuelta en Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 al 0,01%, pH 7,4 (tampón TBST). Entonces se lavó la membrana tres veces con tampón TBST durante cinco minutos, y se aplicó a la membrana durante 1 h a temperatura ambiente (21°C) anticuerpo primario A11 (Biosource) a 0,5-0,8 μ g ml⁻¹ en leche desnatada en polvo al 5% disuelta en tampón TBST. Tras eliminar por lavado el anticuerpo no unido tres veces con tampón TBST durante cinco minutos, se añadió a la membrana durante 45-60 min a temperatura ambiente (21°C) el anticuerpo secundario (un conjugado de anticuerpo de asno anti-IgG de conejo ECLTM-peroxidasa del rábano de GE Healthcare) a 0,1 μ g ml⁻¹ en leche desnatada en polvo al 5% disuelta en tampón TBST. Tras eliminar por lavado el anticuerpo no unido como anteriormente, se añadió el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce) según las instrucciones del fabricante, y se detectó la actividad de enzima peroxidasa del rábano mediante una cámara CCD (Fujifilm LAS-1000) acoplada a

una caja oscura. Tal como se muestra en la figura 9, la detección es máxima en la fracción que aparece más temprano, que corresponde por tanto a la más grande de las especies oligoméricas de alto peso molecular, mientras que el pico de 7-8 kDa no reacciona con el anticuerpo A11.

- 5 En un experimento similar mostrado en la figura 10A, se aplicaron 500 μl de una disolución de péptido A β (40) A21C/A30C aproximadamente 800 μM en GdmCl 6 M, fosfato de K^+ 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, a una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare), y se transfirieron las fracciones como anteriormente. De nuevo, el anticuerpo A11 reacciona con la más grande de las especies oligoméricas con estructura β . Sin embargo, no reconoce los oligómeros helicoidales. La primera fracción que tenía la capacidad de unión a A11 máxima contenía
- 10 aproximadamente 20 μM de péptido A β (40) A21C/A30C. Se incubó esta fracción durante 16 h a 4°C y luego volvió a analizarse en la misma columna, produciendo el perfil de elución mostrado en la figura 10B que también se sometió a ensayo para determinar la capacidad de unión a A11. Como anteriormente, el anticuerpo A11 tiene una mayor reactividad hacia la más grande de las especies oligoméricas. La figura 10B también demuestra que la formación de oligómeros con estructura β es al menos parcialmente reversible, y que son relativamente estables una vez
- 15 formados (en analogía con el ensayo de agregación en la figura 8).

Ejemplo 7. Transición de helicoidal a β en A β (40) A21C/A30C.

- 20 La transición de estructura helicoidal a β está íntimamente relacionada con la oligomerización y fibrilización del péptido A β de tipo natural, y con su toxicidad. En disoluciones de péptido A β 20-100 μM a 4°C, esta transición se produce espontáneamente en el plazo de 24 horas para A β (42) y días para A β (40) (Stine, W. B., *et al.*, J. Biol. Chem. 278: 11612-11622 (2003)). Para el péptido A β (40) A21C/A30C, esta transición estructural puede acelerarse mediante calor sin que se produzca fibrillogénesis. La figura 11A muestra los dos espectros de DC de un péptido
- 25 A β (40) A21C/A30C 1,1 mM antes (estructura helicoidal) y después (estructura β) de desnaturizarse mediante un gradiente de 2°C min^{-1} de temperatura creciente desde 20 hasta 80°C y viceversa. La transición se muestra en la figura 11B tal como se monitoriza a 220 nm. En el ejemplo 8 a continuación, se demuestra que las estructuras β así formadas son de tipo protofibrillar. Muchos creen que las protofibrillas son los precursores de las fibrillas (por ejemplo Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 25945-25952 (1999)). Debe indicarse que esta muestra no presenta precipitación amorfa ni fibrillas incluso tras este tratamiento duro y a esta concentración. Esta resistencia frente a la
- 30 fibrillogénesis no tiene precedentes para todos los derivados del péptido A β .

Ejemplo 8. Análisis de TEM de oligómeros con estructura helicoidal y β de A β (40) A21C/A30C, y especies de tipo protofibrillar.

- 35 Se obtuvieron imágenes de TEM mediante un microscopio electrónico LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss SMT AG) equipado con una cámara MegaView CCD (Olympus). Se usó tinción negativa con acetato de uranilo en todas las muestras. Se activaron rejillas de níquel recubiertas con Formvar/carbono con luz UV durante 5 minutos, tras lo cual se aplicaron 5-10 μl de muestra de proteína a cada rejilla durante 2 minutos. Dos etapas de lavado con
- 40 aproximadamente 10 μl de H_2O desionizada filtrada precedieron a la tinción. Un tratamiento de dos minutos con disolución de acetato de uranilo al 2% en H_2O desionizada filtrada completó la preparación de las rejillas, que se permitió que se secan al aire durante unos cuantos minutos antes de su almacenamiento o análisis inmediato.

- 45 En la figura 12A, se aplicó a las rejillas una disolución aproximadamente 500 μM que contenía A β (40) A21C/A30C en conformación helicoidal. En la figura 12B, se desnaturizó a 60°C durante 20 minutos la misma disolución usada para preparar la muestra en la figura 12A antes de aplicarse a la rejilla. En la figura 12C, se analizó una disolución aproximadamente 150 μM de oligómeros de A β (40) A21C/A30C con estructura β (obtenida como en el ejemplo 5).

- 50 La barra de escala es de 200 nm en la figura 12. Las estructuras esféricas observadas en la figura 12A y la figura 12C son similares en morfología y dimensiones entre sí, teniendo diámetros de 15 nm a 35 nm. También son similares a imágenes de TEM publicadas anteriormente que han usado la misma técnica de tinción. Estas estructuras esféricas de péptido A β (40) de tipo natural se observaron recientemente para oligómeros de A β (40) que tenían estructura β (Chimon, S., *et al.*, Nature Struct. Mol. Biol. 14: 1157-1164 (2007)). En esta publicación, Chimon *et al.* reivindican que estas estructuras son la especie tóxica.

- 55 Las estructuras observadas en la figura 12B son de tipo protofibrillar, con una dimensiones promedio de 6-7 nm de anchura y aproximadamente 36 nm de longitud (aunque las longitudes varían). Son muy similares en morfología y dimensiones a las protofibrillas de A β (40) de tipo natural, que tienen anchuras promedio de 6-10 nm y longitudes de 5-160 nm (Walsh, D. M., *et al.*, J. Biol. Chem. 272: 22364-22372 (1997)).

Ejemplo 9. Ensayo de fibrilación de A β (42) A21C/A30C.

El ensayo de fibrilación se llevó a cabo como en el ejemplo 2 con la excepción de que se registraron puntos de datos cada 10 min. La concentración de A β (42) A21C/A30C era de aproximadamente 117 μM . El resultado se presenta en la figura 13.

5 La fibrilación de la muestra reducida comienza inmediatamente, mientras que las dos muestras oxidadas permanecen sin fibrilar a lo largo de todo el ensayo de 42 h. Este experimento demuestra que el enlace disulfuro de A21C/A30C también es eficaz en impedir la fibrilación en el derivado de A β (42), que tiene una tendencia inherente mucho mayor a fibrilarse en comparación con el péptido A β (40).

Ejemplo 10. Análisis de CEM del A β (42) A21C/A30C con una transferencia puntual de las diferentes fracciones frente al anticuerpo policlonal A11.

10 La CEM se llevó a cabo en una columna Sephacryl S300 16/60 como en el ejemplo 5, y la transferencia puntual se llevó a cabo como en el ejemplo 6. El resultado se presenta en la figura 14.

15 La comparación del cromatograma en la figura 14 con el cromatograma en la figura 7A para el péptido A β (40) A21C/A30C demuestra que el péptido A β (42) A21C/A30C tiene una mayor tendencia a oligomerizarse para dar oligómeros de alto peso molecular. Pero las formas oligoméricas de péptidos tanto A β (42) A21C/A30C como A β (40) A21C/A30C tienen tamaños similares. La especie que se une a A11 eluye en el volumen inicial en esta columna que tiene un punto de corte de aproximadamente ≥ 1500 kDa.

Ejemplo 11. Estabilidad del epítipo de unión a A11.

20 Se concentró una fracción de 80 kDa de péptido A β (40) A21C/A30C obtenida como en el ejemplo 5 hasta 20 μ M y se incubó a 37°C en tampón fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM y azida al 0,05%. Se retiraron muestras a intervalos regulares durante un periodo de dos meses y se almacenaron a -24°C hasta su análisis. Se llevó a cabo la transferencia puntual como en el ejemplo 6, y el resultado se presenta en la figura 15A. El epítipo de A11 ya se formó rápidamente durante la etapa de concentración, y permaneció estable durante el transcurso completo del experimento (durante aproximadamente 60 días). La intensidad de fluorescencia sólo disminuyó un 0,1% al día.

25 Un experimento relacionado con una fracción monomérica de péptido A β (40) A21C/A30C obtenida de la misma CEM que anteriormente se concentró hasta 90 μ M y se incubó a 37°C en tampón fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM, y azida al 0,05%. Muestras retiradas a los mismos intervalos que anteriormente durante un periodo de dos meses no presentaron ninguna unión a A11 (no mostrado).

30 Se incubó una muestra similar de péptido A β (42) A21C/A30C monomérico obtenido como en el ejemplo 5 y concentrado hasta 50 μ M a 37°C en tampón fosfato de K⁺ 50 mM, NaCl 50 mM y azida al 0,05%, y se investigó para detectar la unión a A11. Esta muestra ya presentaba el epítipo de A11 tras unos cuantos días (figura 15B). Una vez nucleados, la oligomerización para dar los oligómeros de alto peso molecular se produjo con un $t_{1/2}$ de 2,2 días en este experimento.

35 Tomados en conjunto, estos experimentos demuestran que los oligómeros de alto peso molecular se forman espontáneamente en el péptido A β (42) A21C/A30C mientras que el péptido A β (40) A21C/A30C más corto es más resistente frente al cambio conformacional para dar la estructura β que está íntimamente asociada con la oligomerización para dar los oligómeros de alto peso molecular. Una vez formados, los oligómeros que se unen a A11 son notablemente estables, demostrando de nuevo la capacidad de la invención para detener completamente la etapa de fibrilación.

40 **Lista de secuencias**

<110> MIVAC Development AB

50 <120> Monómeros y oligómeros de beta amiloide estables

<130> 90172.1000

55 <150> Documento SE 0800842-7

<151> 14-04-2008

<150> Documento SE 0802433-3

<151> 20-11-2008

60 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

65 <211> 40

ES 2 562 224 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 1
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

5 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 2
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

15 <210> 3
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30

25 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 4
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 4

ES 2 562 224 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

5 <210> 5
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 5
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Gly Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

15 <210> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 6
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Gln Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

25 <210> 7
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 7

ES 2 562 224 T3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Glu Asn Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

5 <210> 8
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 8
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Lys Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

15 <210> 9
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 9
 Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Cys Glu Asp Val
 1 5 10 15

Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 20 25 30

25 Ile Ala
 <210> 10
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia derivada de beta amiloide humano

<400> 10

ES 2 562 224 T3

Ser Asp His Arg Phe Glu Ala Asp Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Cys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 11

<211> 770

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro

ES 2 562 224 T3

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

ES 2 562 224 T3

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365

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

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510

ES 2 562 224 T3

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660 665 670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675 680 685

Val Phe Phe Cys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Cys Ile Ile Gly
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

ES 2 562 224 T3

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765

Gln Asn
 770

<210> 12

<211> 770

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190

ES 2 562 224 T3

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220

Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu
 245 250 255

Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile
 260 265 270

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg
 275 280 285

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
 290 295 300

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
 305 310 315 320

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
 325 330 335

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr
 340 345 350

Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala
 355 360 365

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

Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala
 385 390 395 400

Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala
 405 410 415

Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile
 420 425 430

ES 2 562 224 T3

Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn
 435 440 445

Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met
 450 455 460

Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu
 465 470 475 480

Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys
 485 490 495

Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe
 500 505 510

Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser
 515 520 525

Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser
 530 535 540

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
 545 550 555 560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
 565 570 575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
 580 585 590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
 595 600 605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
 610 615 620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
 625 630 635 640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
 645 650 655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
 660 665 670

ES 2 562 224 T3

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675 680 685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690 695 700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765

Gln Asn
770

REIVINDICACIONES

1. Péptido beta amiloide que comprende la secuencia de aminoácidos L-V-F-F-C correspondiente a los aminoácidos 17 a 21 de SEQ ID NO: 4 y la secuencia de aminoácidos C-I-I-G-L-M-V correspondiente a los aminoácidos 30 a 36 de SEQ ID NO: 4, comprendiendo además dicho péptido beta amiloide un enlace disulfuro entre residuos de cisteína correspondientes a los aminoácidos 21 y 30 de SEQ ID NO: 4, o variante de dicho péptido beta amiloide en la que uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han deletado, o uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han insertado, teniendo dicho péptido beta amiloide o dicha variante de dicho péptido beta amiloide exactamente dos cisteínas, correspondiendo dichas cisteínas a Cys21 y Cys30 en SEQ ID NO: 4.
2. Péptido beta amiloide según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos L-V-F-F-C-E-D-V-G-S-N-K-G-C-I-I-G-L-M-V correspondiente a los aminoácidos 17 a 36 de SEQ ID NO: 4, o variante de dicho péptido beta amiloide en la que uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han deletado, o uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han insertado.
3. Péptido beta amiloide según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, o secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO: 4, o variante de dicho péptido beta amiloide en la que uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han sustituido mediante sustitución conservativa, uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han deletado, o uno, dos, tres, cuatro o cinco aminoácidos se han insertado.
4. Péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, que comprende una sustitución de glicina en la posición correspondiente al aminoácido 22 en SEQ ID NO: 4.
5. Péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una sustitución de residuo de sulfóxido de metionina en la posición correspondiente al aminoácido 35 en SEQ ID NO: 4.
6. Péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que,
 - (a) uno o dos aminoácidos terminales se han maleimidado;
 - (b) el aminoácido N-terminal se ha acetilado; y/o
 - (c) el aminoácido C-terminal se ha amidado.
7. Oligómero soluble que contiene una pluralidad de péptidos beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Método para la identificación de un compuesto adecuado para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral; una enfermedad priónica, tal como enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, encefalopatía espongiiforme bovina o tembladera de las ovejas; enfermedad de Parkinson; o enfermedad de Alzheimer, comprendiendo dicho método
 - a) proporcionar un compuesto de prueba,
 - b) poner dicho compuesto de prueba en contacto con péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,
 - c) determinar si dicho compuesto de prueba se une a dicho péptido beta amiloide y/o inhibe la formación de oligómeros del péptido,
 - d) identificar dicho compuesto de prueba como adecuado para el tratamiento de dicha enfermedad si dicho compuesto de prueba se une a dicho péptido amiloide y/o inhibe la formación de oligómeros del péptido tal como se determina en la etapa (c).
9. Método para seleccionar proteínas de unión que reaccionan específicamente con un péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un oligómero soluble según la reivindicación 7, comprendiendo dicho método el uso de un péptido amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un oligómero soluble que consiste en una pluralidad de péptidos beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha proteína de unión se selecciona de un fragmento de

- anticuerpo, tal como un fragmento Fab, un fragmento (Fab)₂, un fragmento Fab de cadena sencilla, un fragmento Fv de cadena sencilla, un dímero de Fv de cadena sencilla, derivados de receptores no naturales modificados por ingeniería genética, tales como derivados de la anticalina, un Affibody, FNfn10, neocarzinostatina, proteína con repeticiones de anquirina, dedo de PDH, proteína fluorescente verde con injerto de CDR3 y armazones de proteína de unión periplásmica de *E. coli*.
- 5
11. Uso de un péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un oligómero soluble que consiste en una pluralidad de péptidos beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la preparación de un medicamento para la inmunización para el tratamiento profiláctico de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral; una enfermedad priónica, tal como enfermedad Creutzfeld-Jacob, encefalopatía espongiiforme bovina o tembladera de las ovejas; enfermedad de Parkinson; o enfermedad de Alzheimer, opcionalmente en combinación con un adyuvante.
- 10
12. Preparación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un oligómero soluble que consiste en una pluralidad de péptidos beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente en combinación con un adyuvante.
- 15
13. Vacuna para la inmunización de mamíferos, incluyendo seres humanos, frente a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una amiloidosis, tal como una neuropatía amiloide o angiopatía amiloide cerebral; una enfermedad priónica, tal como enfermedad de Creutzfeld-Jacob, encefalopatía espongiiforme bovina o tembladera de las ovejas; enfermedad de Parkinson; o enfermedad de Alzheimer que comprende un péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un oligómero soluble que consiste en una pluralidad de péptidos beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente en combinación con un adyuvante.
- 20
14. Polipéptido que es una proteína precursora de amiloide (APP), en el que
- 25
- 30 *i*) el aminoácido alanina en la posición 692, tal como se define mediante la secuencia de la APP humana en SEQ ID NO: 12 o la posición correspondiente en una APP homóloga o heteróloga, se sustituye por una cisteína, en el que la APP homóloga o heteróloga es una APP derivada de un animal o una APP sintética, mutada y/o que no se produce de manera natural que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, tal como al menos el 90%, o al menos el 95% en comparación con la APP humana en SEQ ID NO: 35
- 35 *ii*) el aminoácido alanina en la posición 701, tal como se define mediante dicha secuencia de dicha APP humana en SEQ ID NO: 12 o dicha posición correspondiente en dicha APP homóloga o heteróloga, se sustituye por una cisteína, y
- 40 *iii*) dicha APP tiene exactamente dos cisteínas.
- 45
15. Polipéptido según la reivindicación 14, que es una APP humana mutada, preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO: 11.
- 50
16. Secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15.
- 55
17. Sistema de expresión no humano que comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 16.
- 60
18. Animal transgénico no humano que expresa una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína precursora de amiloide (APP) según la reivindicación 14 ó 15.
19. Animal transgénico no humano según la reivindicación 18, en el que dicha APP es una APP humana mutada, preferiblemente en el que dicha APP es la proteína de SEQ ID NO: 11.
20. Animal transgénico no humano que expresa una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido de beta amiloide según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, preferiblemente un péptido beta amiloide seleccionado de los péptidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.
21. Animal transgénico no humano según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que se selecciona de un animal cordado, preferiblemente un ratón transgénico.

FIGURA 1

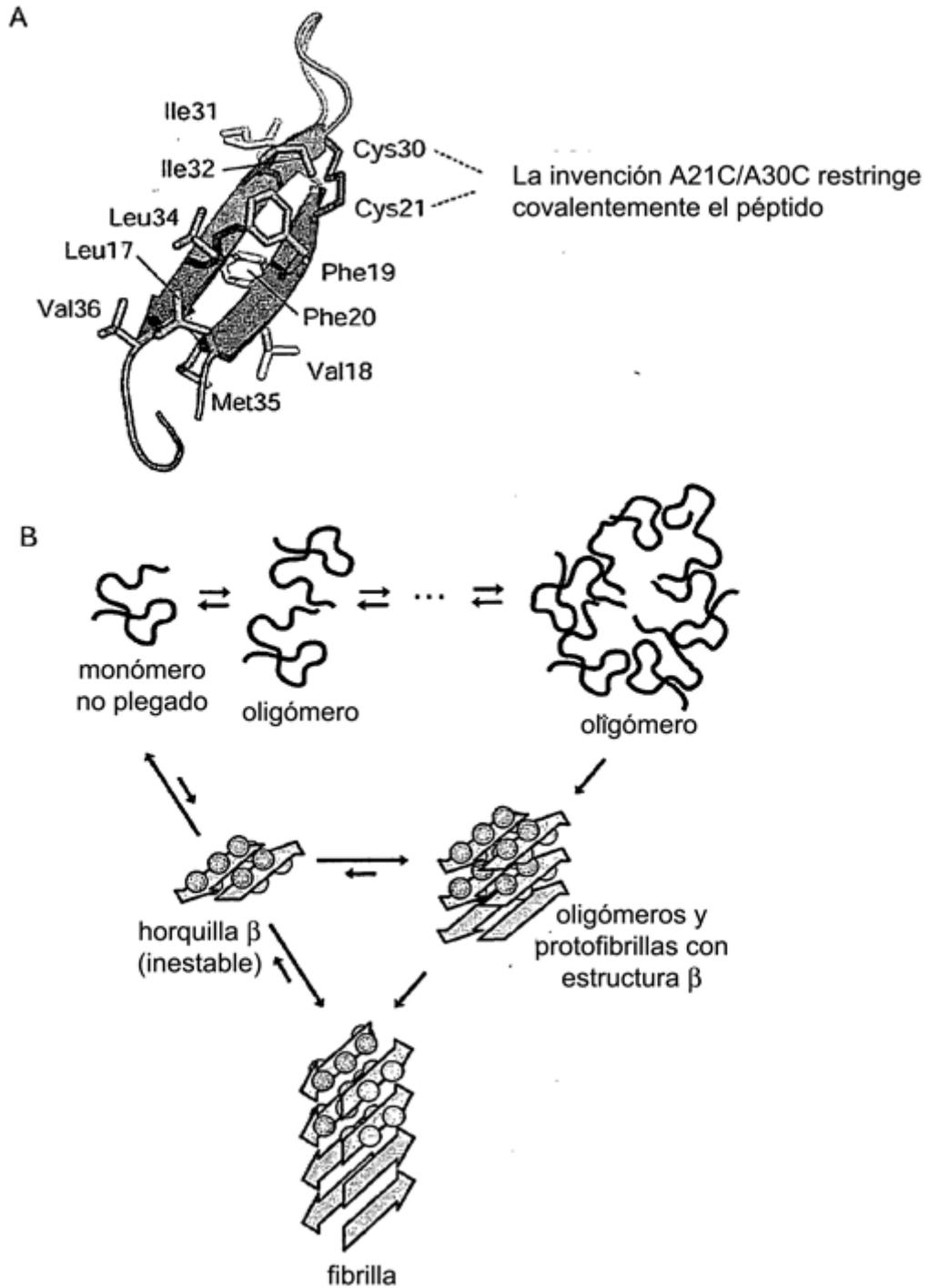


FIGURA 2

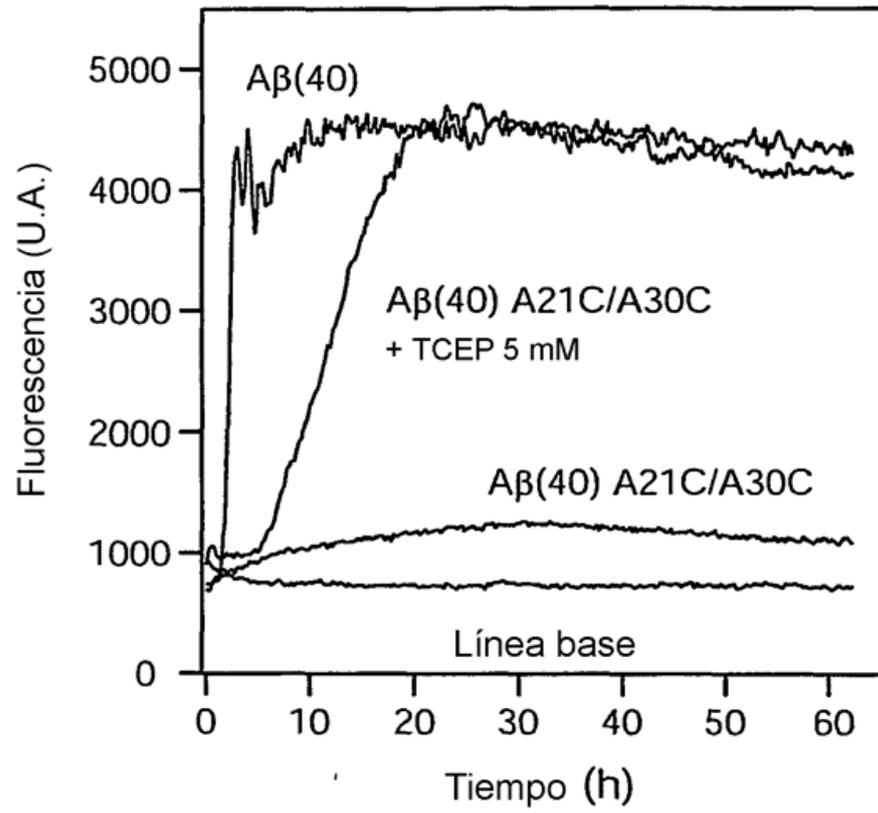


FIGURA 3

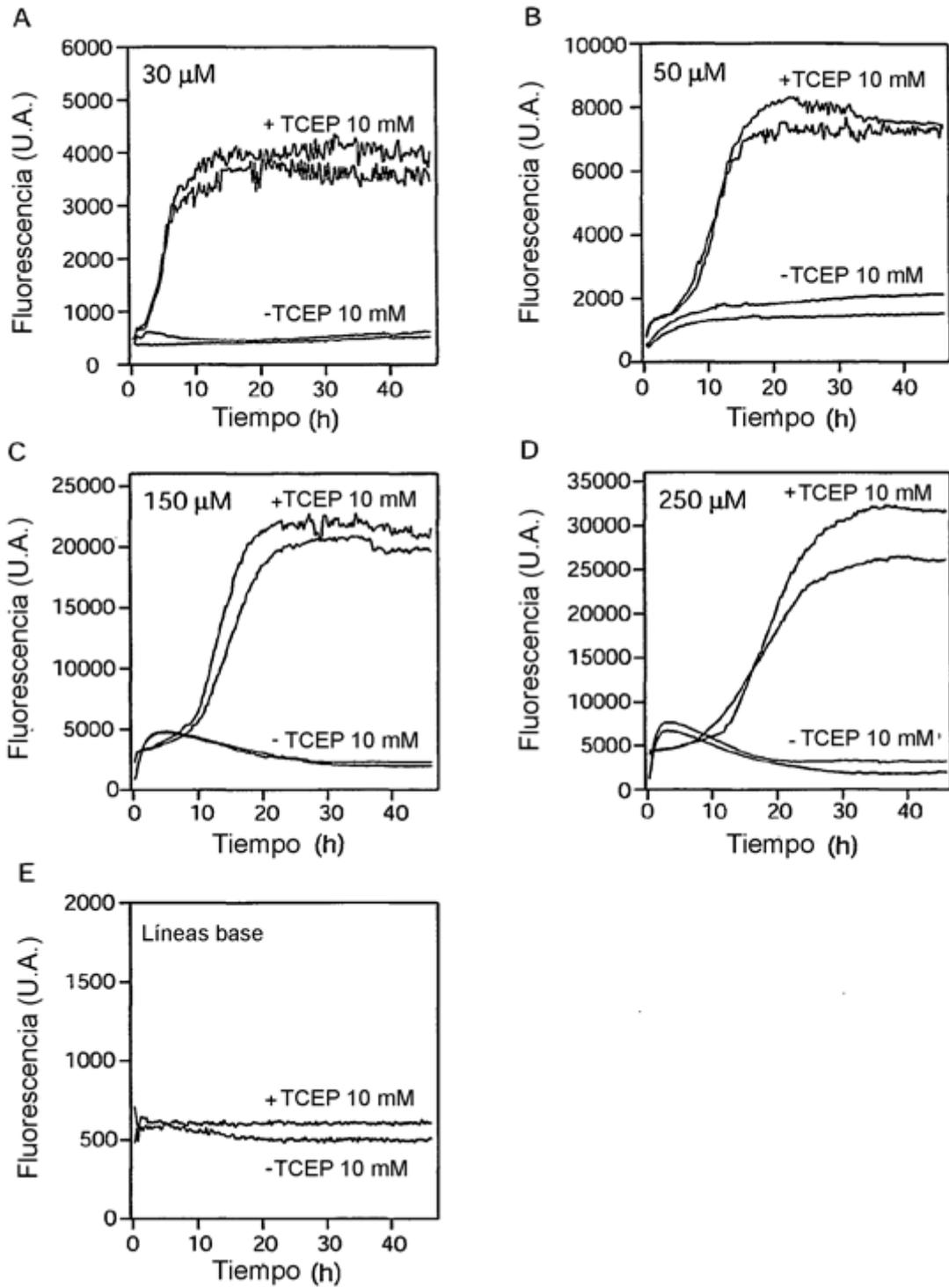


FIGURA 4

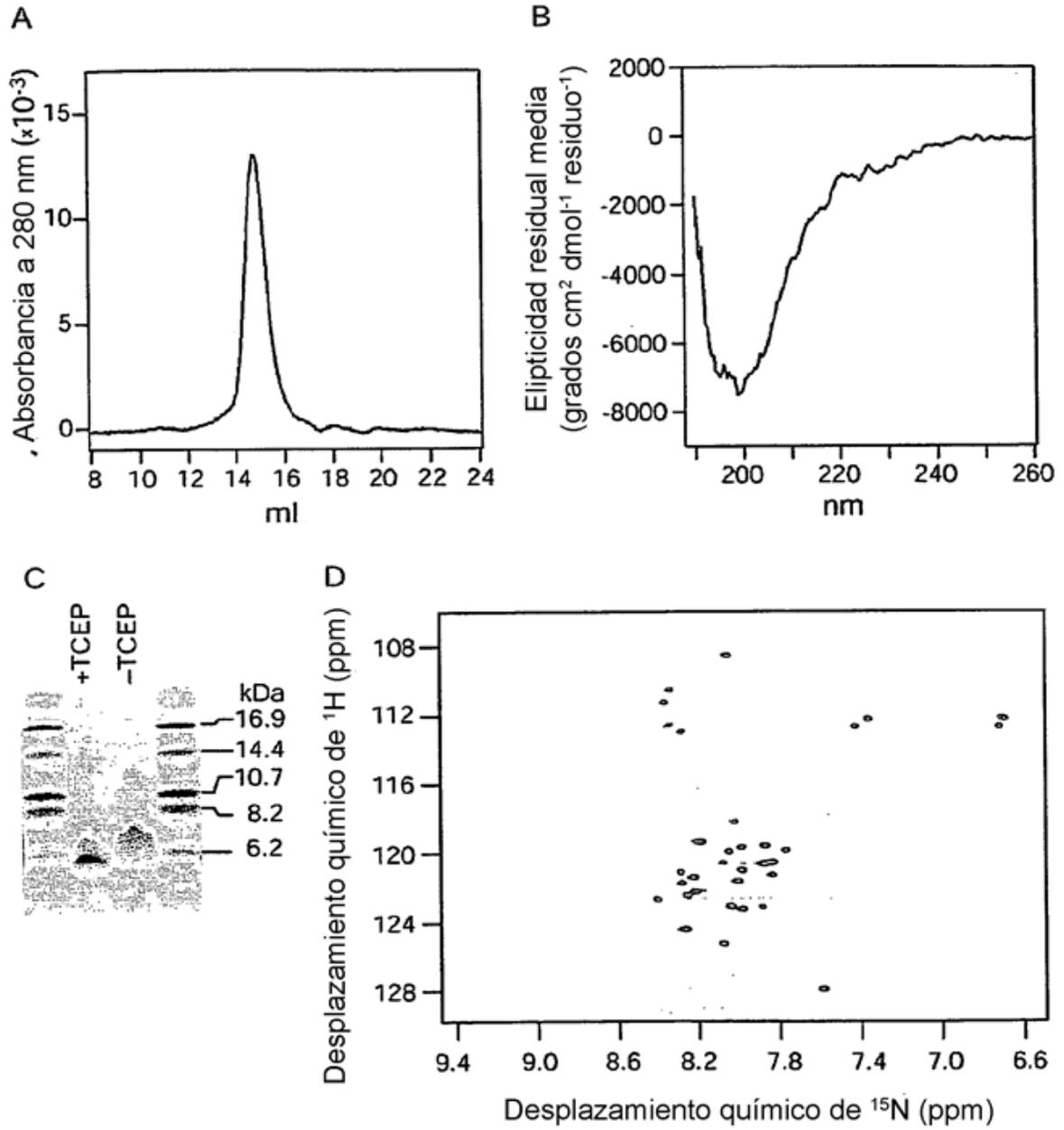


FIGURA 5

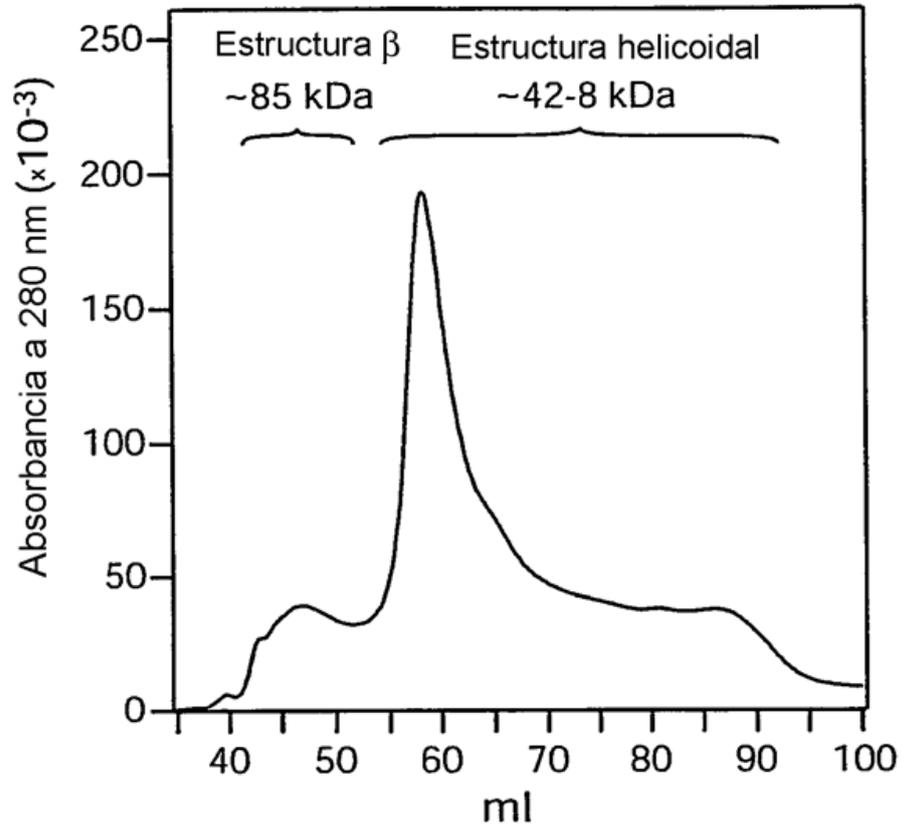


FIGURA.6

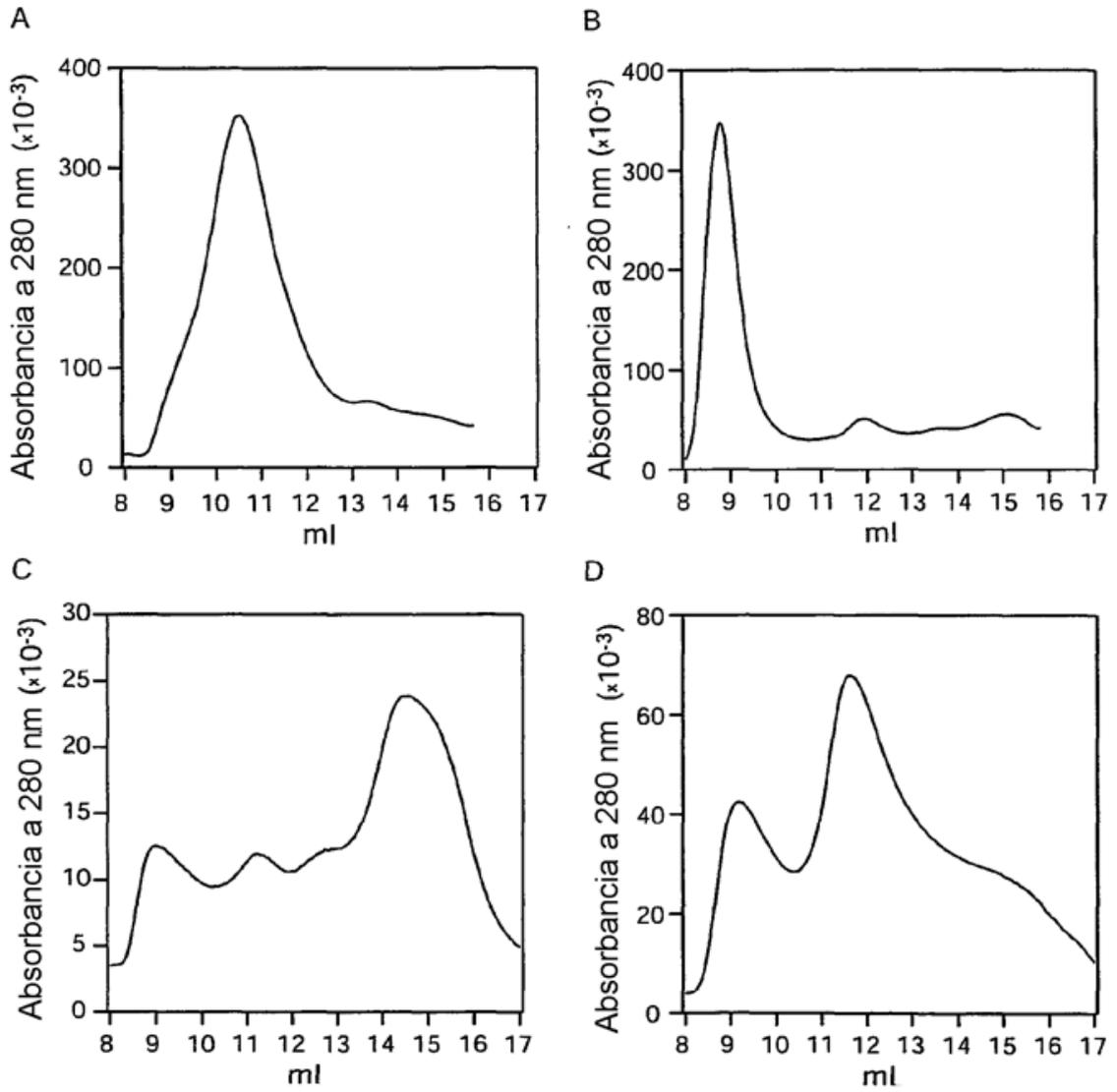
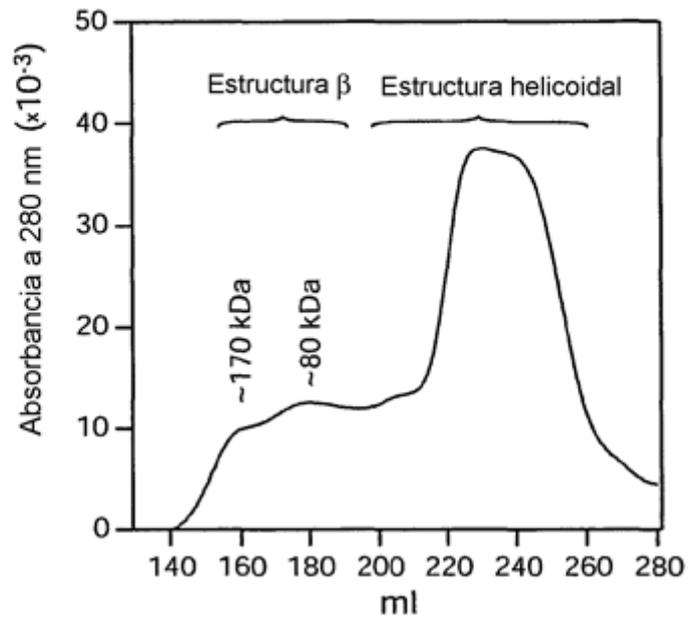


FIGURA 7

A



B

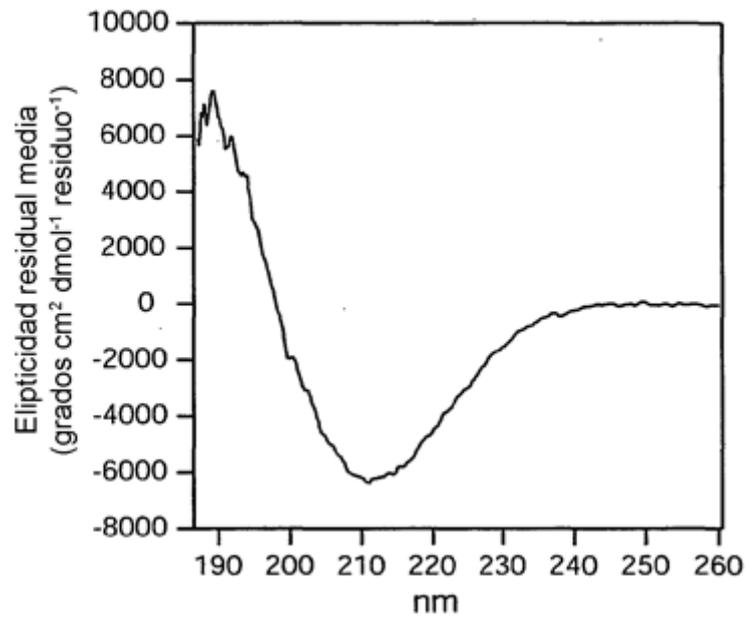


FIGURA 8

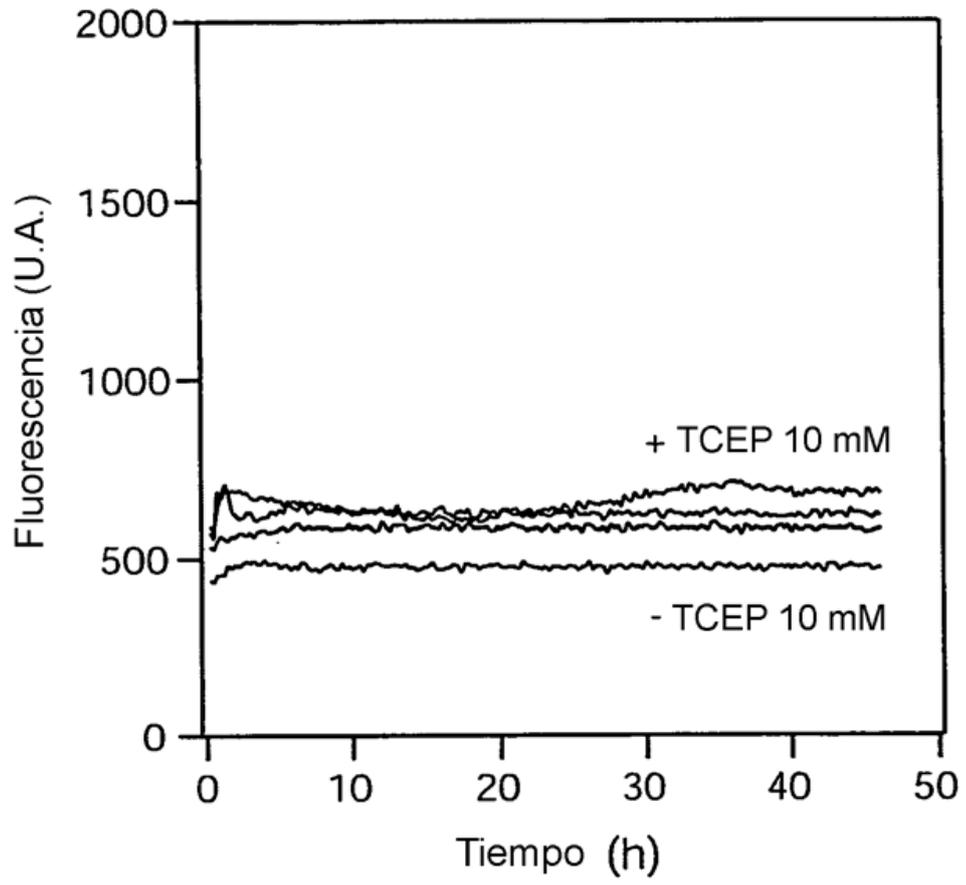


FIGURA 9

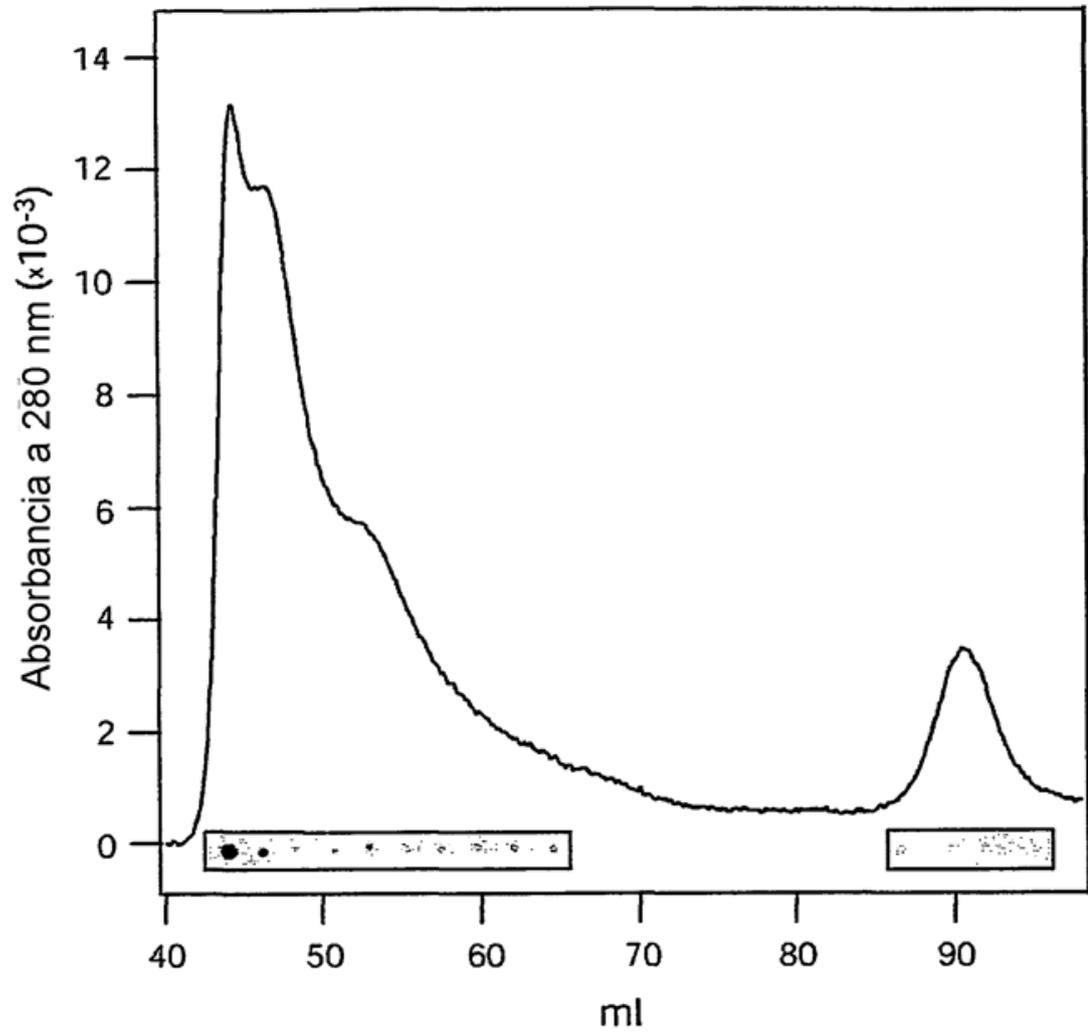


FIGURA 10

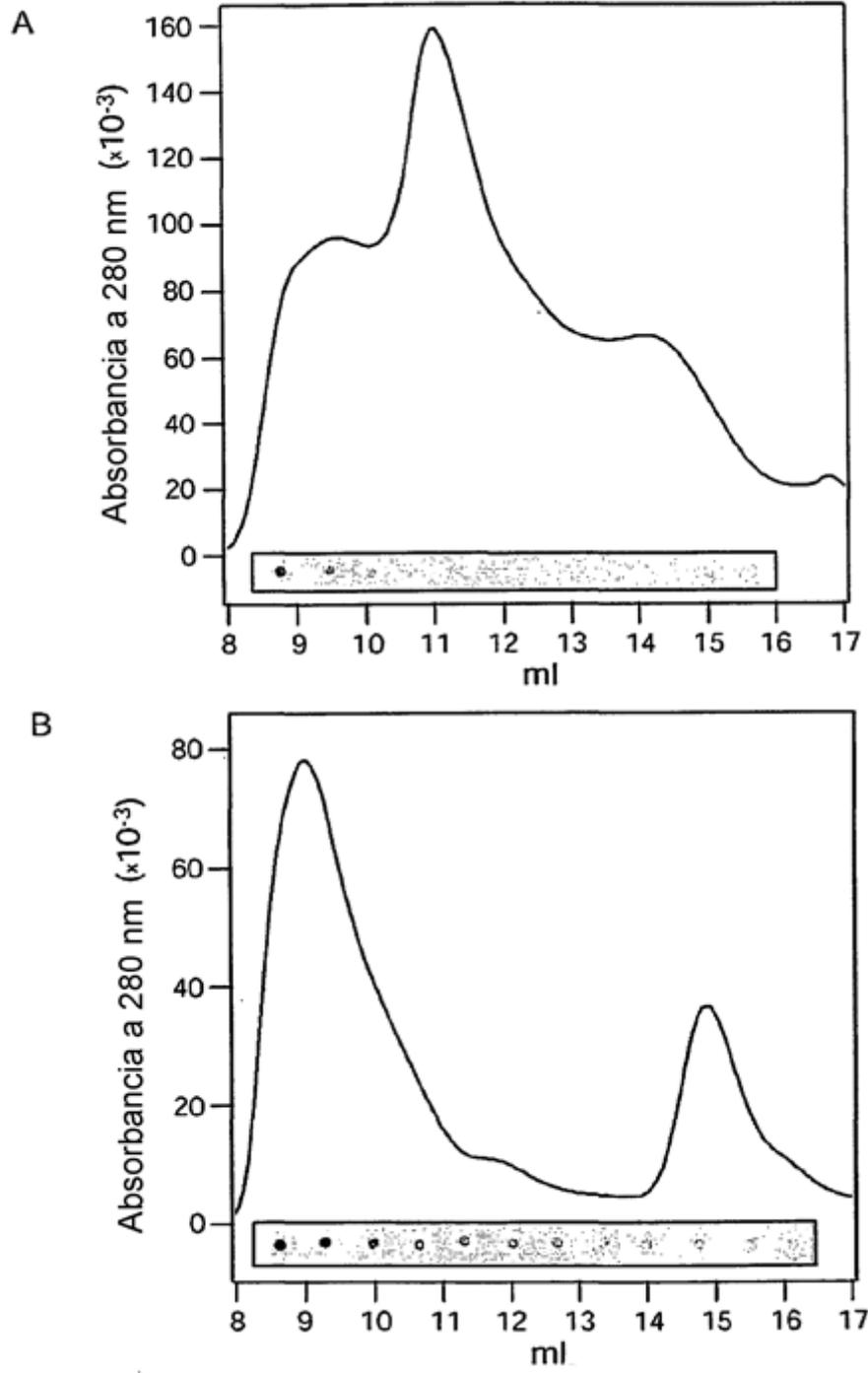
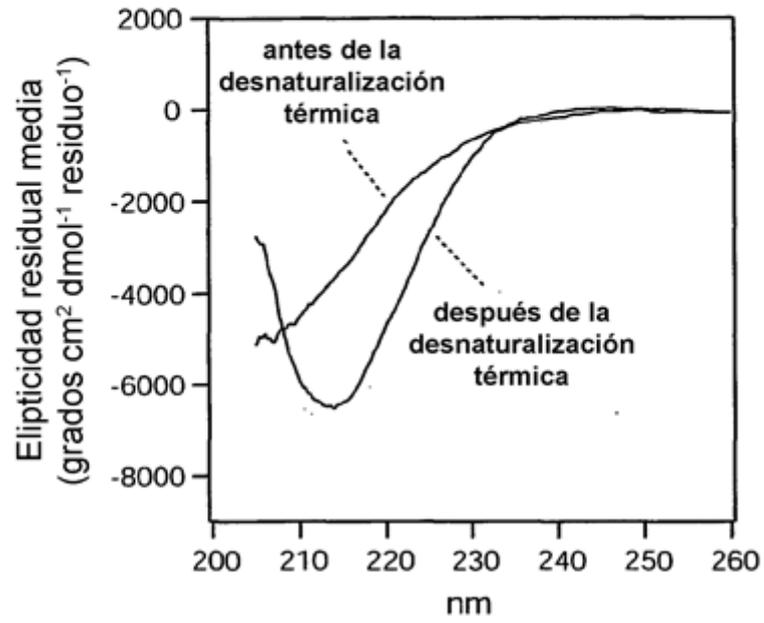


FIGURA 11

A



B

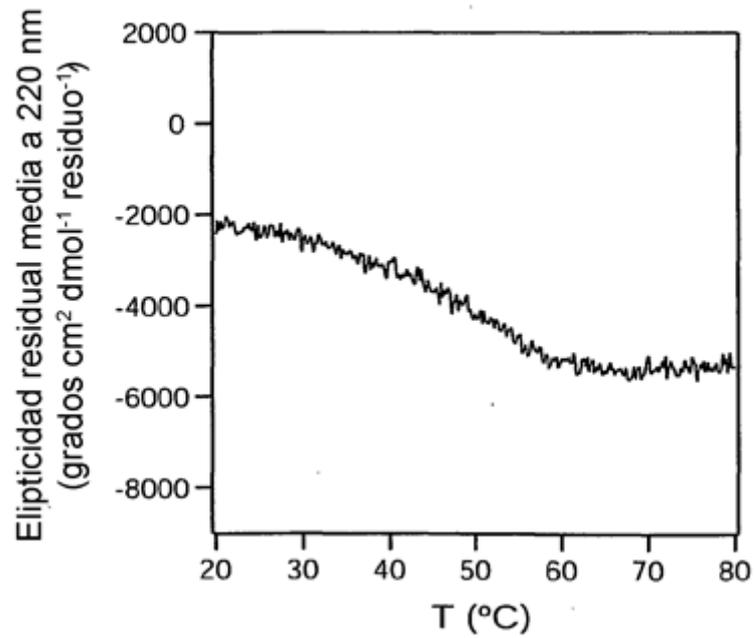


FIGURA 12

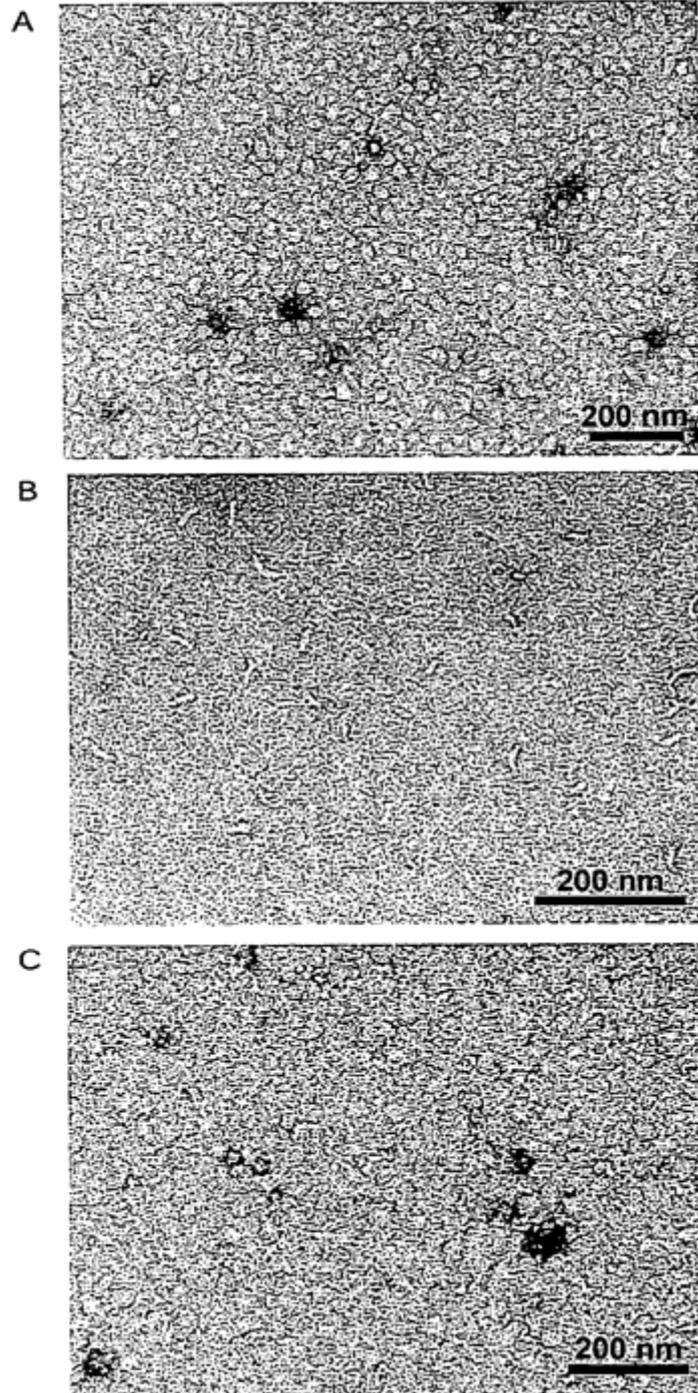


FIGURA 13

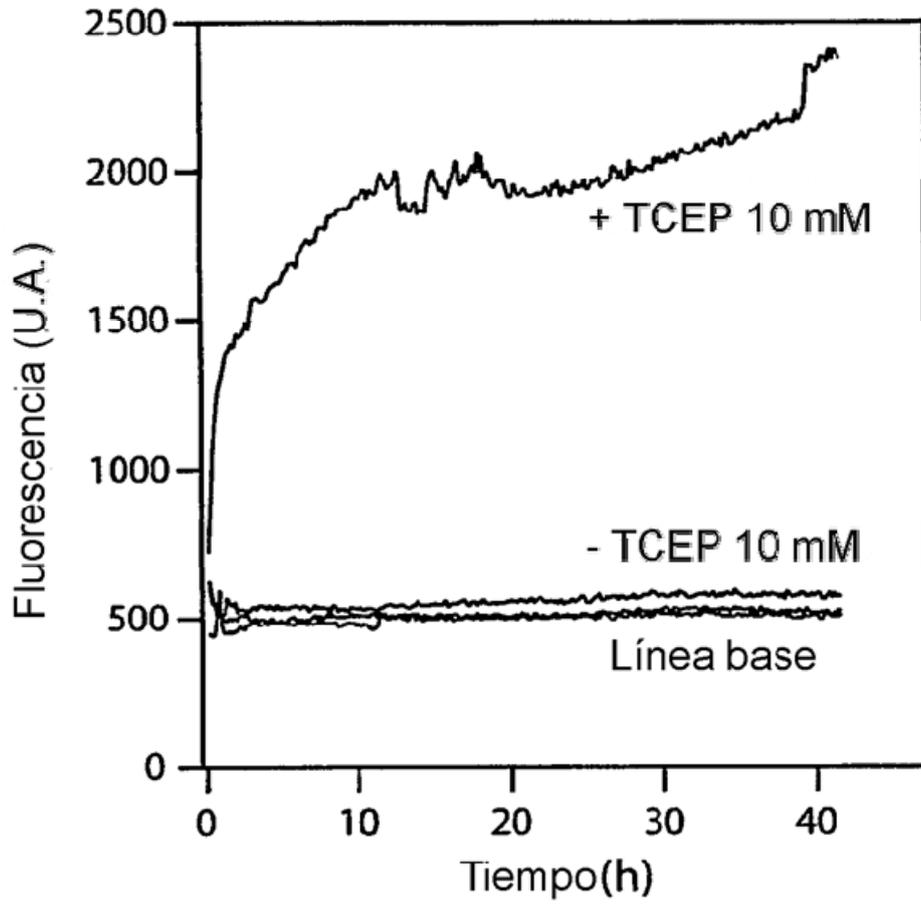


FIGURA 14

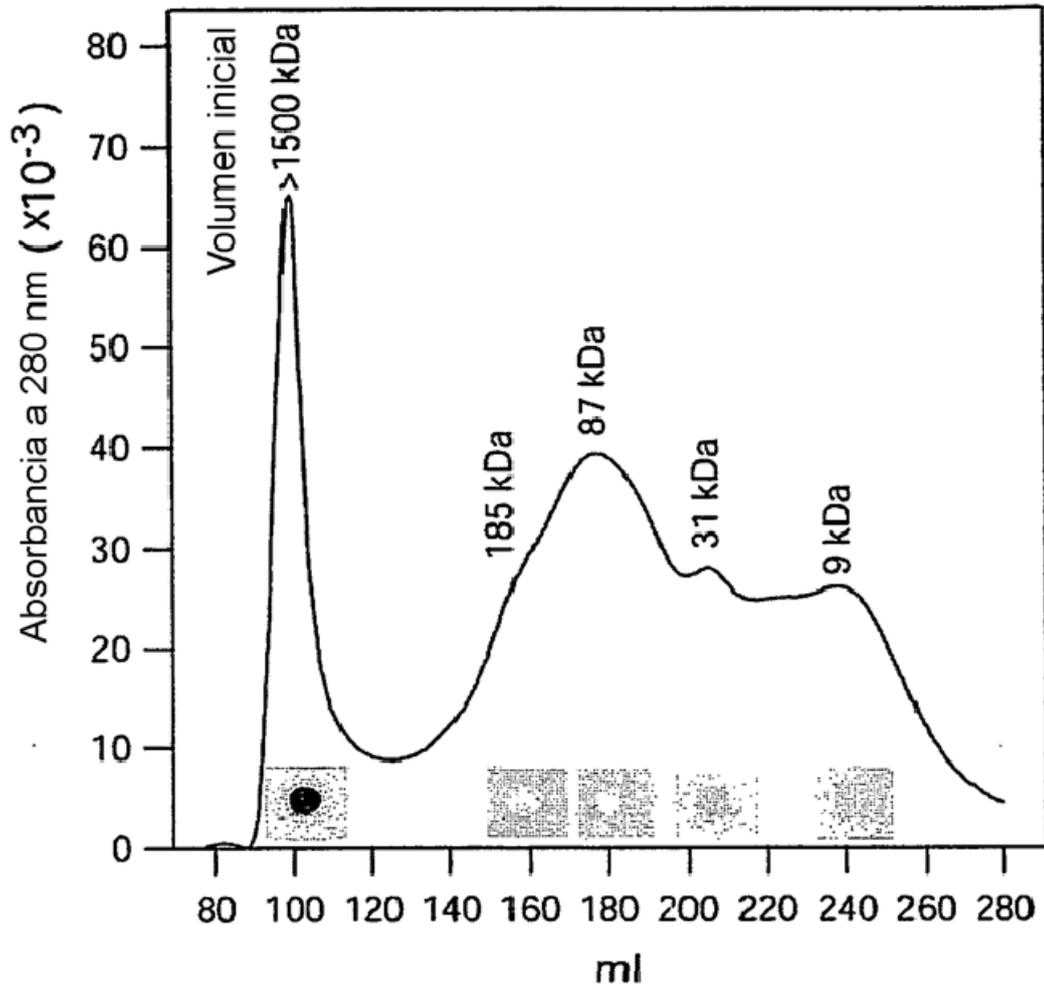


FIGURA 15

