

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 265**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2010 E 10714094 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2406279**

54 Título: **Composiciones para prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

09.03.2009 US 202523 P

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

21.03.2016

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
P.O. Box 39296
61392 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**SHALTIEL-KARYO, RONIT y
GAZIT, EHUD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 265 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

Composiciones para prevención y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

5 Campo y antecedentes de la invención

Muchas enfermedades están causadas por modificaciones hereditarias o adquiridas de la estructura de proteínas y polipéptidos. Algunas enfermedades conformacionales aparecen cuando una proteína constituyente experimenta un cambio en el tamaño o variación de la forma con un resultado de autoasociación y deposición de tejido, tal como fibrillas de amiloide. El papel de la deposición de proteínas en enfermedades neurodegenerativas se ha hecho evidente en un gran grupo de enfermedades etiológicamente diversas que incluyen, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, trastornos priónicos y diabetes tipo II. En cada una de las diversas enfermedades, una proteína endógena diferente se autoensambla en estructura fibrilar altamente ordenada. Aunque no hay ninguna homología de secuencia específica entre las proteínas asociadas con cada una de estas enfermedades, se cree que todas ellas implican cambios de conformación importantes en las proteínas, normalmente producen estructuras de lámina [beta] con una fuerte tendencia a agregarse en polímeros fibrosos insolubles en agua. La enfermedad de Parkinson (PD), la segunda forma más común de las enfermedades neurodegenerativas después de la enfermedad de Alzheimer, es una enfermedad neurológica devastadora y sin cura, que afecta a un 1-2 % de la población de edad avanzada. Las evidencias neuropatológicas se caracterizan por pérdida progresiva y profunda de la neuromelanina que se encuentra en las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta con presencia de inclusiones proteicas intracitoplasmáticas, eosinófilas, denominadas cuerpos de Lewy (LB) y neuritis distrófica de Lewy (LN) en las neuronas supervivientes. Entre las características clínicas de PD se encuentran deficiencias motoras que implican temblor en reposo, bradiquinesia, inestabilidad postural y rigidez junto con síntomas no motrices tales como problemas autónomos, cognitivos y psiquiátricos. La causa de estas características patológicas todavía no se entiende completamente, pero se cree que algunos factores ambientales, así como una causalidad genética o una combinación de los dos podrían dar como resultado los síndromes clínicos mencionados anteriormente. Ahora se sabe que menos de un 10 % de los casos de PD tiene una estricta etiología familiar mientras que la mayoría de los casos son esporádicos. Entre las mutaciones asociadas con PD familiar, se han caracterizado ampliamente tres mutaciones de sentido erróneo en el gen de la [alfa]-sinucleína ([alfa]-sin) denominadas A53T, A30P y E46K [Lotharius, J., y Brundin, P. (2002) Nat Rev Neurosci 3 (12), 932-942].

La proteína [alfa]-sin está formada por 140 restos de aminoácidos. Es una proteína sin plegar de forma nativa, altamente cargada, pequeña. Se identificó primero como el componente principal de LB y LN. La [alfa]-sin se puede dividir en tres regiones principales: la región amino terminal que contiene varias repeticiones imperfectas de la secuencia KTKEGV, un dominio central hidrófobo denominado región de componente no amiloide (NAC) y el carboxi terminal caracterizado por sus aminoácidos con carga altamente negativa. Se expresa predominantemente en las neuronas del sistema nervioso central (SNC), en las que se localiza en los terminales presinápticos en las proximidades de las vesículas sinápticas y se pueden asociar con las membranas lipídicas mediante la formación de hélices [alfa] anfipáticas.

[Alfa]-sin es un miembro de la familia de las proteínas sinucleína, junto con la beta sinucleína ([beta]-sin) y gamma sinucleína ([gamma]-sin). [Alfa]-sin y [beta]-sin se encuentran principalmente en los tejidos del cerebro, localizadas principalmente en los terminales nerviosos presinápticos mientras que la [gamma]-sin se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico y la retina, aunque también se ha encontrado que se expresa altamente en algunos tejidos tumorales, incluyendo tejidos de mama, ovario y vejiga. La secuencia de las tres sinucleínas está altamente conservada, en especial dentro de su dominio N terminal. Al comparar las secuencias de [alfa]-sin y [beta]-sin, hay una diferencia importante en el dominio central hidrófobo; [beta]-sin, una proteína de 134 aminoácidos, no se encuentra la región de NAC de [alfa]-sin y no se agrega para formar fibrillas amiloides durante diferentes condiciones de estrés, tales como radicales libres o aumento de la concentración.

En el caso de diversas enfermedades neurodegenerativas, una alteración de la relación cuantitativa entre las sinucleínas individuales se produce en la medida en la que la proporción relativa de alfa-sinucleína aumenta. Fue posible detectar *in vitro* que la beta-sinucleína es capaz de inhibir la agregación de la alfa-sinucleína en una forma dependiente de la dosis (Hashimoto *et al.*, Neuron 32 (2): 213-23 [2001]). Los ensayos en cultivos celulares en los que una interrupción de la proliferación y diferenciación celular normal se desencadenó por la sobreexpresión de la alfa-sinucleína también mostraban una acción ventajosa, en el sentido terapéutico, de beta-sinucleína, que normalizó aún más la adhesión, supervivencia y crecimiento de neuritas en estos cultivos. Los ratones, que son transgénicos para alfa-sinucleína, muestran una producción elevada de esta albúmina y por lo tanto presentan una relación alterada de las cantidades de alfa y beta-sinucleína. En el transcurso del envejecimiento, forman cuerpos de inclusión intraneuronales que son similares a los Cuerpos de de Lewy y también muestran interrupciones motoras progresivas, que se pueden comparar con la interrupción de la función en la enfermedad de Parkinson. Si estos animales con alfa-sinucleína se cruzan con ratones transgénicos para beta-sinucleína, que muestran una expresión elevada de esta albúmina, un nivel significativamente más alto en la expresión general de las sinucleínas puede restaurar una homeostasis. Como resultado, el número de cuerpos de inclusión se reduce de forma altamente significativa, y la pérdida de la función neuronal característica se evita completamente.

Se cree que la alfa-sinucleína desempeña un papel especialmente importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer. Esto se indica por el hecho de que una parte de esta proteína, el dominio de NACP (Proteína de Componentes No Amiloide), se pudo demostrar como parte de las placas seniles (Yoshimoto *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci 92, 9141-5 [1995] y documento WO-9506407), además del hecho de que aproximadamente un 70 % de los

5 pacientes que padecen la enfermedad de Alzheimer presentan Cuerpos de Lewy en diversas áreas del cerebro, en el que también se encuentra la alfa-sinucleína (Eizo *et al.*, Neurosci. Lett. 290 (1), 41-4 [2000]). En un modelo de ratón transgénico, el beta-amiloide aumenta la acumulación y la neurotoxicidad de la alfa-sinucleína (Masliah *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci 98 (21): 12245-50 [2001]).

10 La beta-sinucleína y en particular péptidos derivados de la misma para interrupción de agregados de alfa-sinucleína se han descrito. Véanse por ejemplo, octapéptidos de acuerdo con el documento WO02/04482 y tres péptidos adicionales en el documento WO02/04625. El documento WO02/0020 y el documento WO01/60794 describen el uso de beta-sinucleína como una molécula completa o métodos que aumentan su expresión *in vivo* a la terapia de

15 enfermedades neurológicas que están asociadas con la con alfa-sinucleína. El documento WO-A-01/60794 en particular también enseña el uso de un péptido que corresponde a los aminoácidos N-terminales 1 ha 15 de la beta-sinucleína, para prevenir la agregación de alfa-sinucleína y beta-amiloide. De forma análoga el documento US2006/0036073 y el documento US20080200397 enseña fragmentos de péptidos más cortos derivados de los aminoácidos N-terminales 1 a 15 de la beta-sinucleína, para evitar la unión de alfa-sinucleína y beta-amiloide. El documento U.S. 20010047032 enseña compuestos aromáticos para el tratamiento de amiloidosis y enfermedades

20 de fibrillas de alfa-sinucleína. Windisch *et al.*, enseñan experimentos con votantes de supresión de [beta]-sin que se centran en los aminoácidos N-terminales 1-15 de la proteína. Ellos crearon una biblioteca de péptidos que contiene diferentes variaciones de composición de aminoácidos derivados de esta secuencia de [beta]-sin, con el objetivo específico de encontrar un péptido que se pueda usar para aplicación terapéutica de forma inmediata o que pueda servir como una base para el desarrollo de moléculas peptidomiméticas pequeñas (Windisch *et al.*, 2004, J Mol Neurosci 24 (1), 155-165).

25

Sumario de la invención

30 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un péptido aislado que tiene una longitud de 10 aminoácidos, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 1-4 y 55, péptido que es capaz de inhibir la agregación de alfa-sinucleína.

35 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende como un principio activo del péptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método *in vitro* para inhibir la agregación de alfa-sinucleína, método que comprende poner en contacto la alfa-sinucleína con el péptido de la presente invención, inhibiendo de ese modo la agregación de alfa-sinucleína.

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona el uso de las realizaciones en un método para tratar o prevenir una afección médica asociada con la agregación de alfa-sinucleína, método que comprende la administración a un sujeto con necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido de la presente invención, tratando de ese modo la afección médica asociada con la agregación de alfa-sinucleína.

50 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un método para detectar monómeros de alfa-sinucleína, método que comprende: (a) poner en contacto una muestra biológica seleccionada de la que se sospecha que está formada por los monómeros de alfa-sinucleína con el péptido de la presente invención en condiciones que permiten la formación de complejos entre los monómeros y el péptido; y (b) detectar la presencia o nivel del complejo, detectando de ese modo monómeros de alfa-sinucleína.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el péptido comprende al menos un aminoácido aromático.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el péptido tiene una modificación de protección terminal.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 1, 2, 3 y 4.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la afección médica se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, AD-PD mixta, atrofia de múltiples sistemas y enfermedad de Hallervorden-Spatz.

65 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención.

Breve descripción de las figuras

La invención se describe en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Con referencia específica ahora a las figuras con detalle, se hace hincapié en que las figuras en particular mostradas son solamente a modo de ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de las realizaciones precedentes de la presente invención, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para una comprensión fundamental de la invención, haciendo la descripción tomada con las figuras evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden realizar en la práctica las varias formas de la invención.

En las figuras:

FIGs. 1A-D son ilustraciones esquemáticas de péptidos derivados de [beta] como inhibidores de agregación de [alfa]-sin. Figura 1A. [beta]-sin inhibe la formación de agregados de [alfa]-sin. Figura 1B. Formación de mapas moleculares de secuencias de unión de [beta]-sin a [alfa]-sin usando análisis de matriz de péptidos. Figura 1C. Inhibidores basados en péptidos potenciales para agregación de [alfa]-sin. Figura 1D. Ilustración esquemática de la técnica de matriz de péptidos (<http://worldwidewebdotjptdotcom/products/peptidearrays/pepspotsdothtm>).

FIGs. 2A-B es una fotografía de los resultados de una identificación sistemática para secuencias de unión de [alfa]-sin dentro de la proteína [beta]-sin. Figura 2A: Algunos péptidos decámeros que corresponden a secuencias de solapamiento consecutivas de [beta]-sin se sintetizaron en una membrana de celulosa y se incubaron con [beta]-sin. La secuencia de cada aplicación y su posición dentro de la secuencia de [alfa]-sin se menciona debajo de la aplicación. En los primeros quince aminoácidos hay desplazamiento de aminoácido dentro de los péptidos decámeros. El resto tiene un desplazamiento de cinco aminoácidos. Figura 2B. Se realizó una identificación sistemática adicional usando condiciones rigurosas y un desplazamiento de aminoácidos a lo largo de toda la proteína. En el presente documento, se proporcionan a continuación secuencias de aminoácidos de péptidos, en las que las SEC ID N^{os}: 1 a 4 pertenecen a la presente invención.

MDVFMKGLSM - SEC ID N^o: 23
DVFMKGLSMA - SEC ID N^o: 24

VFMKGLSMAK- SEC ID N^o: 25
FMKGLSMAKE- SEC ID N^o: 26
MKGLSMAKEG- SEC ID N^o: 27
KGLSMAKEGV- SEC ID N^o: 28
GLSMAKEGW- SEC ID N^o: 29

LSMAKEGVVA- SEC ID N^o: 30
SMAKEGVVAA - SEC ID N^o: 31
MAKEGWAAA - SEC ID N^o: 32
AKEGWAAA - SEC ID N^o: 33
KEGVAAA - SEC ID N^o: 34

EGVVAAAEKT - SEC ID N^o: 35
GWAAAETK - SEC ID N^o: 8
VVAAAEKTKQ- SEC ID N^o: 9
VAAAEKTKQG- SEC ID N^o: 10
KTKQGVTEAA- SEC ID N^o: 36

VTEAAEKTKE- SEC ID N^o: 37
EKTKEGVLYV- SEC ID N^o: 38
GVLYVGSKTR- SEC ID N^o: 1
GSKTREGWQ- SEC ID N^o: 40
EGWQGVASV- SEC ID N^o: 41

GVASVAEKT - SEC ID N^o: 7
LGGAVFSGAG - SEC ID N^o: 11
FSGAGNIAAA - SEC ID N^o: 42
NIAAATGLVK - SEC ID N^o: 43
TGLVKREEFP - SEC ID N^o: 44

REEFPTDLKP - SEC ID N^o: 45
TDLKPEEVAQ - SEC ID N^o: 46
EEVAQEAEE - SEC ID N^o: 47
EAAEEPLIEP - SEC ID N^o: 48
PLIEPLMEPE - SEC ID N^o: 49
LMEPEGESYE - SEC ID N^o: 50
GESYEDPPQE - SEC ID N^o: 51

DPPQEEYQEY - SEC ID N°: 52
 EYQEYEPEA - SEC ID N°: 53
 VLYVGSKTRE - SEC ID N°: 2
 5 LYVGSKTREG - SEC ID N°: 3
 YVGSKTREGV - SEC ID N°: 4
 AAATGLVKRE - SEC ID N°: 5
 AATGLVKREE - SEC ID N°: 6

10 FIGs. 3A-K son fotografías y gráficos que ilustran la inhibición *in vitro* de ensamblajes fibrilares de [alfa]-sin. Figura 3A. Se identificaron sistemáticamente péptidos de [beta]-sin a la inhibición en la agregación de [alfa]-sin (proporción molar 20:1 respectivamente). Figura 3B. Análisis cinético de la agregación de [alfa]-sin en presencia de los péptidos 36 y 39 (SEC ID N°: 1 y 4). Control como (◆), péptido [beta]-sin 39 con [alfa]-sin (▲), péptido [beta]-sin 36 con [alfa]-sin (■). Figura 3C. Efecto de la inhibición dependiente de la dosis del péptido [beta]-sin 36 en la agregación de [alfa]-sin. Figuras 3D-K. Imágenes de TEM de fibrillas de [alfa]-sin con varios péptidos; [alfa]-sin solo, [beta]-sin 6corto, 36, 37, 38, 39, 77, 78. Barra de 6 corto, 37 y 38 = 500 nM. Resto de barras de péptidos = 1 µM.

15 FIGs. 4A-B son fotografías de resultados de análisis bioquímico de agregación de [alfa]-sin con y sin inhibidores. Figura 4A. Agregación de [alfa]-sin en el tiempo. Se formaron oligómeros solubles a la vez que se agitaba a 37 [grados] C. La detección se realizó usando análisis de transferencia de Western. Figura 4B. Inhibición de ensamblaje de oligómeros usando péptidos de [beta]-sin después de 24 horas de incubación. La detección se realizó usando análisis de transferencia de Western.

20 FIGs. 5A-B son gráficos que ilustran análisis de péptidos modificados con [beta]-sin. Figura 5A. Inhibición de ensamblajes fibrilares de [alfa]-sin usando Ensayo de Fluorescencia de ThT. Se identificaron sistemáticamente tres péptidos modificados de [beta]-sin 36 para su inhibición en la agregación de [alfa]-sin, [alfa]-sin solo está en color negro, [beta]-sin 36 con [alfa]-sin está en color gris oscuro, y los péptidos modificados con [alfa]-sin están en color gris claro y blanco, ordenados de izquierda a derecha como [beta]-sin 36D, retro-inverso, retro inverso con amidación y acetilación. La proporción molar de [alfa]-sin:

25 péptidos eran 1:20 y 1:10 respectivamente. Figura 5B. La afinidad de [beta]-sin 36 que contiene Triptófano en lugar de Tirosina hacia monómeros de [alfa]-sin se examinó usando el método de anisotropía de fluorescencia. $K_d = 1 \mu\text{M}$.

30 FIGs. 6A-C son espectros de HPLC que ilustran la estabilidad de los péptidos en un extracto de cerebro de ratón. Un extracto de cerebro de ratón de color blanco WT ICR se extrajo y se incubó con péptidos [beta]-sin 36 y [beta]-sin 36 retro inverso durante dos horas y se cargó en columna C18. Figura 6A Espectros de un extracto de cerebro de ratón (rojo). Figura 6B Espectros de péptido [beta]-sin 36 (azul) y [beta]-sin 36 con extracto de cerebro (rojo). Figura 6C Espectros de péptido [beta]-sin 36 retro inverso (azul) y [beta]-sin 36 retro inverso con extracto de cerebro (rojo).

35 FIGs. 7A-F son gráficos y espectros que muestran análisis de RMN. Las desviaciones del desplazamiento químico de átomos de la estructura principal de Ha (gris) y HN (negro) de péptido retro-inverso después de unión a [alfa]-sin (Figura 7A); región de Ha-HN de superposición de espectros de TOCSY de péptido retro-inverso derivado de [beta]-sin (rojo) y [alfa]-sin (azul) después de unión (verde) (Figura 7B) y expansiones de todos los picos de retro-inverso que mostraban desviaciones después de la unión (Figuras 7C-E). Análisis de ThT de [alfa]-sin con y sin [alfa]-sin 36D y [beta]-sin 36D corto que carece de los aminoácidos G, V, L (Figura 7F).

40 FIGs. 8A-E son fotografías que ilustran la internalización de [beta]-sin 36 retro inverso en las células. Células SHSY5Y diferenciadas que sobreexpresan células de WT [alfa]-sin se incubaron con 50 [µ]M y 250 [µ]M de péptido [beta]-sin 36 retro inverso conjugado con FITC durante periodos de 0,5 horas, 2 horas y 4 horas. Después de fijación, la presencia del péptido conjugado con FITC (verde) se detectó dentro de las células. El [alfa]-sin celular se detectó usando anticuerpo conjugado con cy5 (púrpura) y la membrana se marcó con Faloidina (rojo). (Figura 8A) Después de 30 minutos a 37 <0>C no había tinción de péptido (verde). (Figuras 8B-C) Después de 2 horas de incubación, no se detectó péptido o se detectó una pequeña cantidad dentro de las células (verde). (Figuras 8D-E). Después de 4 horas de incubación, el péptido se detectaba claramente dentro de las células. La internalización del péptido se visualizó usando un microscopio con focal LSM-510 de Zeiss.

45 FIG. 9 es un gráfico de barras que ilustra resultados después del análisis de comportamiento de escalada locomotora en moscas. Se analizaron cuatro clases de moscas, conteniendo cada una cinco tubos de diez moscas usando el ensayo de escalada. En color negro, las crías hembra que expresan A53T de [alfa]-sin crecen en un medio regular. En color gris, las crías hembra que expresan A53T de [alfa]-sin crecen en medio que contiene péptido [beta]-sin retro inverso. En línea rayada, las crías hembra de control crecen en un medio regular. En color blanco, las crías hembra de control crecen en medio que contiene péptido [beta]-sin retro inverso. Los resultados muestran el porcentaje de moscas que estarán a lo largo del tubo de ensayo después de 20 segundos.

50 FIG. 10 es un espectro de asignación de RMN de péptido b-sin 36 retro-inverso: La superposición de regiones de interacción de HN-Ha de espectros de TOCSY (rojo) y NOESY (verde) se tomaron en condiciones idénticas de acuerdo con la que se realizó la asignación.

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a composiciones y métodos para tratar y prevenir enfermedades neurodegenerativas.

5 Antes de explicar con detalle al menos una realización de la invención, se debe entender que la invención no se limita necesariamente en su aplicación a los detalles que se establecen en la siguiente descripción o se usan a modo de ejemplo en los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras.

10 La oligomerización intracelular de [alfa]-sinucleína se asocia con la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas y por lo tanto se considera un objetivo importante para tratamiento de la enfermedad modificador de enfermedades.

15 Dado que se ha mostrado que la beta-sinucleína inhibe la agregación de la alfa-sinucleína de una manera dependiente de la dosis, los presentes inventores hicieron mapas de forma sistemática de toda la secuencia de beta-sin para identificar todos los dominios que tienen el potencial de mediar los sucesos de reconocimiento molecular de beta-sin y alfa-sin. Se usó una técnica de matriz de péptidos común y se encontraron varias regiones de interacción (Figura 2A). Una segunda membrana se usó para confirmar estos resultados con condiciones experimentales rigurosas (Figura 2B), que detallaban los puntos que aparecían en ambas membranas. Se sintetizaron péptidos de decámero correspondientes a las formas de interacción y su capacidad para inhibir la agregación de alfa-sin se sometió a ensayo usando ensayos de ThT y TEM. Ambos métodos presentaban resultados de correlación, lo que indica un efecto inhibitorio en la formación de fibrillas por los péptidos (Figuras 3A-K).

20 Los presentes inventores mostraron adicionalmente que aunque algunos péptidos eran capaces de inhibir solamente una forma de los agregados, otros péptidos eran capaces de inhibir los agregados tanto solubles como insolubles de la proteína (Figura 4).

25 Para desarrollar el módulo de reconocimiento molecular en un candidato a fármaco, se diseñó un análogo retro-inverso del mejor inhibidor peptídico. Aunque este péptido muestra actividad indistinguible en comparación con el péptido nativo, se mostró que era estable en suero humano (Figuras 6A-C) y penetra células que sobreexpresan [alfa]-sinucleína (Figuras 8AE). El análisis de RMN formo mapas de la superficie de contacto de interacción entre el péptido del D-aminoácido y la [alfa]-sinucleína (Figuras 7A-F). Por último, la administración del péptido al modelo de Drosophila que expresa mutante A53T [alfa]-sinucleína daba como resultado una recuperación significativa del fenotipo de escalada en las moscas tratadas (Figura 9). Los presentes inventores proponen que algunos péptidos modificados por ingeniería generados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención pueden servir como una guía para el desarrollo de nuevas clases de agentes terapéuticos para tratar enfermedades neurodegenerativas, en general, y enfermedad de Parkinson, en particular. Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un péptido aislado que tiene una longitud de 10 aminoácidos, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N^{os}: 1-4 y 55, siendo el péptido capaz de inhibir la agregación de alfa-sinucleína.

30 Como se usa en el presente documento "Beta-sinucleína" se refiere al producto proteico del gen SNCB, Números de Registro en GenBank NP_001001502.1 (SEC ID N^o: 15) y NP_003076.1 (SEC ID N^o: 16).

35 La expresión "capaz de inhibir la agregación de alfa-sinucleína" se refiere a una capacidad para reducir la agregación de alfa-sinucleína (por ejemplo, oligomerización y/o formación de fibrillas) en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos un 30 %, más preferentemente en al menos un 40 %, más preferentemente en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 60 %, más preferentemente en al menos un 70 %, más preferentemente en al menos un 80 %, más preferentemente en al menos un 90 %, más preferentemente en al menos un 100 %. De acuerdo con una realización el péptido de este aspecto de la presente invención es capaz de inhibir la agregación de alfa-sinucleína.

40 Como se usa en el presente documento, el término "fibrilla" se refiere a una estructura filamentosa similar a una hebra formada por agregados de orden superior que por lo general es visible en un microscopio electrónico.

45 Algunos métodos para controlar la capacidad de los péptidos de la presente invención para regular de forma negativa la agregación de alfa-sinucleína se describen en el Ejemplo 3 (mediante análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)), Ejemplo 4 (mediante análisis de transferencia de Western) y Ejemplo 6 (ensayos de unión a ThT). En la Patente de Estados Unidos Número 6.184.351 y en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Números 2002151464 y 20030027210 se proporcionan otros métodos. El término "aislado" se refiere a que se aísla de un entorno fisiológico o básicamente libre de otro material biológico.

50 El término "péptido" como se usa en el presente documento incluye péptidos nativos (ya sea productos de degradación, péptidos sintetizados de forma sintética o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (por lo general, péptidos sintetizados de forma sintética), así como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptido, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que convierten a los péptidos en las estables mientras que se encuentran en un organismo. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a modificación del extremo N terminal, modificación del extremo C terminal, modificación de enlace peptídico, que incluye, pero no se limita a,

modificaciones la estructura principal de CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, y modificación de restos. En la técnica se conocen bien algunos métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, CA. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). En lo sucesivo no presente documento se proporcionan detalles adicionales a este respecto. Otras modificaciones (por ejemplo, protección terminal) se describen adicionalmente en lo sucesivo en el presente documento. El péptido puede tener una longitud de 10 restos de aminoácidos. Por lo tanto, el péptido puede constar de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, restos de aminoácidos.

Por consiguiente, los péptidos pueden comprender o consistir en los siguientes péptidos a modo de ejemplo:

36-46. GVLYVGSKTR (SEC ID N°: 1)

37-47. VLYVGSKTRE (SEC ID N°: 2)

38-48. LYVGSKTREG (SEC ID N°: 3)

39-49. YVGSKTREGV (SEC ID N°: 4)

Los enlaces peptídico dos (-CO-NH-) dentro del péptido se pueden sustituir, por ejemplo, con enlaces N-metilados (-N(CIB)-CO-), enlaces de éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces de cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces [alfa]-aza (-NH-N(R)-CO-), en los que R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces de hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces de tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefinicos (-CH=CH-), enlaces de retro amida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal", presentada de forma natural en el átomo de carbono. Estas modificaciones se pueden producir en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena péptica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

El aminoácido aromático puede ser cualquier resto aromático de origen natural o sintético que incluye, pero no se limita a, fenilalanina, tirosina, triptófano, fenilglicina, o codificadores, precursores o partes aromáticas funcionales de los mismos. Algunos ejemplos de restos aromáticos que pueden formar parte de los péptidos de la presente invención se proporcionan en la Tabla 2 que sigue a continuación.

Por lo tanto, algunos aminoácidos aromáticos naturales, Tip, Tyr y Phe, se pueden sustituir por aminoácidos no naturales sintéticos tales como Fenilglicina, Tic, naftilalanina (Nal), fenilisoserina, treoninol, derivados metilados en anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

Además de lo mencionado anteriormente, los péptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácido (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc).

Como se usa en el presente documento, en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones que sigue a continuación, se entiende que el término "aminoácido" o "aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; esos aminoácidos a menudo se modifican de forma post-translacional *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos no habituales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D como L-aminoácidos.

El péptido también puede comprender sustituciones de aminoácidos conservadas que pueden incluir sustituciones conservadas de origen natural o sustituciones sintéticas, véase por ejemplo Karlin, S., y Ghandour, G., (1985). Multiple alphabet amino acid sequence comparison of the immunoglobulin Kchain constant domain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82, 8597-8601.

Clases de aminoácidos:

química: ácido (DE), alifático (AGILV), amida (NQ), aromático (FWY), básico (RHK), hidroxilo (ST), imino (P), azufre (CM);

funcional: ácido, básico, hidrófobo (A, I, L, M, F, P, W, V), polar (N, C, Q, G, S, T, Y);

carga: ácido, básico, neutro;

estructural: ambivalente (A, C, G, P, S, T, W, Y), externo (R, N, D, Q, E, H, K), interno (I, L, M, F, V)

A continuación se proporciona el código del aminoácido individual.

Las Tablas 1 y 2 que siguen a continuación enumeran aminoácidos de origen natural (Tabla 1) y aminoácidos no convencionales o modificados (por ejemplo, sintéticos, Tabla 2) que se pueden usar con la presente invención.

ES 2 564 265 T3

<i>Símbolo de Una letra</i>	<i>Abreviatura de Tres letras</i>	<i>Aminoácido</i>
A	Ala	alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido Glutámico
G	Gly	glicina
H	His	Histidina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	triptófano
Y	Tyr	tirosina
V	Val	Valina
X	Xaa	cualquier aminoácido como anteriormente

Tabla 2

<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>
Nmala	L-N-metilalanina	Abu	ácido α -aminobutírico
Nmarg	L-N-metilarginina	Mgab	α -amino- α -metilbutirato
Nmasn	L-N-metilasparagina	Cpro	aminociclopropano-
Nmasp	ácido L-N-metilaspártico		carboxilato
Nmcys	L-N-metilcisteína	Aib	ácido aminoisobutírico
Nmgin	L-N-metilglutamina	Norb	aminonornornilo-
Nmglu	ácido L-N-metilglutámico		carboxilato
Nmhis	L-N-metilhistidina	Chexa	ciclohexilalanina
Nmile	L-N-metilisoleucina	Cpen	ciclopentilalanina
Nmleu	L-N-metilleucina	Dal	D-alanina
Nmlys	L-N-metillisina	Darg	D-arginina
Nmmet	L-N-metilmetionina	Dasp	D-ácido aspártico
Nmnle	L-N-metilnorleucina	Dcys	D-cisteína
Nmnva	L-N-metilnorvalina	Dgln	D-glutamina
Nmorn	L-N-metilornitina	Dglu	ácido D-glutámico
Nmphe	L-N-metilfenilalanina	Dhis	D-histidina
Nmpro	L-N-metilprolina	Dile	D-isoleucina
Nmser	L-N-metilserina	Dleu	D-leucina
Nmthr	L-N-metiltreonina	Dlys	D-lisina
Nmtrp	L-N-metiltriptófano	Dmet	D-metionina
Nmtyr	L-N-metiltirosina	Dorn	D-ornitina
Nmval	L-N-metilvalina	Dphe	D-fenilalanina

ES 2 564 265 T3

<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>
Nmetg	L-N-metiletilglicina	Dpro	D-prolina
Nmtbug	L-N-metil-t-butilglicina	Dser	D-serina
Nle	L-norleucina	Dthr	D-treonina
Nva	L-norvalina	Dtrp	D-triptófano
Maib	a-metil-aminoisobutirato	Dtyr	D-tirosina
Mgabv	α-metil-γ-aminobutirato	Dval	D-valina
Mchexa	α-metilciclohexilalanina	Dmala	D-α-metilalanina
Mcpen	α-metilciclopentilalanina	Dmarg	D-α-metilarginina
Manap	α-metil-α-naftilalanina	Dmasn	D-α-metilasparagina
Mpen	α-metilpenicilamina	Dmasp	D-α-metilaspartato
Nglu	N-(4-aminobutil)glicina	Dmcys	D-α-metilcisteína
Naeg	N-(2-aminoetil)glicina	Dmgln	D-α-metilglutamina
Norn	N-(3-aminopropil)glicina	Dmhis	D-α-metilhistidina
Nmaabu	N-amino-α-metilbutirato	Dmile	D-α-metilisoleucina
Anap	α-naftilalanina	Dmleu	D-α-metilleucina
Nphe	N-bencilglicina	Dmlys	D-α-metillisina
Ngln	N-(2-carbamiletil)glicina	Dmmet	D-α-metilmetionina
Nasn	N-(carbamilmetil)glicina	Dmorn	D-α-metilornitina
Nglu	N-(2-carboxietil)glicina	Dmphe	D-α-metilfenilalanina
Nasp	N-(carboximetil)glicina	Dmpro	D-α-metilprolina
Ncbut	N-ciclobutilglicina	Dmser	D-α-metilserina
Nchep	N-cicloheptilglicina	Dmthr	D-α-metiltreonina
Nchex	N-ciclohexilglicina	Dmtrp	D-α-metiltriptófano
Ncdec	N-ciclododecilglicina	Dmty	D-α-metil tirosina
Ncdod	N-ciclododeclglicina	Dmval	D-α-metilvaline
Ncoct	N-ciclooctilglicina	Dnmala	D-α-metilalnina
Ncpro	N-ciclopropilglicina	Dnmarg	D-α-metilarginina
Ncund	N-cicoundecilglicina	Dnmasn	D-α-metilasparagina
Nbhm	N-(2,2-difeniletil)glicina	Dnmasp	D-α-metilasparatato
Nbhe	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Dnmcys	D-α-metilcisteína
Nhtrp	N-(3-indoliletil) glicina	Dnmleu	D-N-metilleucina
Nmgabu	N-metil-γ-aminobutirato	Dnmlys	D-N-metillisina
Dnmmet	D-N-metilmetionina	Nmchexa	N-metilciclohexilalanina
Nmcpen	N-metilciclopentilalanina	Dnmorn	D-N-metilornitina
Dnmphe	D-N-metilfenilalanina	Nala	N-metilglicina
Dnmpro	D-N-metilprolina	Nmaib	N-metilaminoisobutirato
Dnmser	D-N-metilserina	Nile	N-(1-metilpropil)glicina
Dnmser	D-N-metilserina	Nile	N-(2-metilpropil)glicina
Dnmthr	D-N-metiltreonina	Nleu	N-(2-metilpropil)glicina
Nva	N-(1-metiletil)glicina	Dnmtrp	D-N-metiltriptófano
Nmanap	N-metil-α-naftilalanina	Dnmtyr	D-N-metil tirosina
Nmpen	N-metilpenicilamina	Dnmval	D-N-metilvalina
Nhtyr	N-(p-hidroxifenil)glicina	Gabu	ácido γ-aminobutírico
Ncys	N-(tiometil)glicina	Tbug	L-β-butilglicina
Pen	penicilamina	Etg	L-etilglicina

<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>	<i>Código</i>	<i>Aminoácido no convencional</i>
Mala	L- α -metilalanina	Hphe	L-homofenilalanina
Masn	L- α -metilasarparagina	Marg	L- α -metilarginina
Mtbug	L- α -metil- β -butilglicina	Masp	L- α -metilaspártato
Metg	L-metiletilglicina	Mcys	L- α -metilcisteína
Mglu	L- α -metilglutamato	Mgln	L- α -metilglutamina
Mhphe	L- α -metilhomofenilalanina	Mhis	L- α -metilhistidina
Nmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Mile	L- α -metilisoleucina
Narg	N-(3-guanidinopropil)glicina	Dnmgln	D-N-metilglutamina
Nthr	N-(1-hidroxietil)glicina	Dnmglu	D-N-metilglutamato
Nser	N-(hidroxietil)glicina	Dnmhis	D-N-metilhistidina
Nhis	N-(imidazoliletíl)glicina	Dnmile	D-N-metilisoleucina
Nhtrp	N-(3-indoliletíl)glicina	Dnmleu	D-N-metilleucina
Nmgabu	N-metil- γ -aminobutirato	Dnmlys	D-N-metillisina
Dnmmet	D-N-metilmetionina	Nmchexa	N-metilciclohexilalanina
Nmcpn	N-metilciclopentilalanina	Dnmorn	D-N-metilornitina
Dnmphe	D-N-metilfenilalanina	Nala	N-metilglicina
Dnmpro	D-N-metilprolina	Nmaib	N-metilaminoisobutirato
Dnmser	D-N-metilserina	Nile	N-(1-metilpropil)glicina
Dnmthr	D-N-metiltreonina	Nleu	N-(2-metilpropil)glicina
Nval	N-(1-metiletíl)glicina	Dnmtrp	D-N-metiltriptófano
Nmanap	N-metil- α -naftilalanina	Dnmtyr	D-N-metil tirosina
Nmpn	N-metilpenicilamina	Dnmval	D-N-metilvalina
Nhtyr	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Gabu	ácido γ -aminobutírico
Ncys	N-(tiometil)glicina	Tbug	L- β -butilglicina
Pen	penicilamina	Etg	L-etilglicina
Mala	L- α -metilalanina	Hphe	L-homofenilalanina
Masn	L- α -metilasarparagina	Marg	L- α -metilarginina
Mtbug	L- α -metil- β -butilglicina	Masp	L- α -metilaspártato
Metg	L-metiletilglicina	Mcys	L- α -metilcisteína
Mglu	L- α -metilglutamato	Mgln	L- α -metilglutamina
Mhphe	L- α -metilhomofenilalanina	Mhis	L- α -metilhistidina
Nmet	N-(2-metiltioetil)glicina	Mile	L- α -metilisoleucina
Mlys	L- α -metillisina	Mleu	L- α -metilleucina
Mnle	L- α -metilnorleucina	Mmet	L- α -metilmetionina
Morn	L- α -metilornitina	Mnva	L- α -metilnorvalina
Mpro	L- α -metilprolina	Mphe	L- α -metilfenilalanina
Mthr	L- α -metiltreonina	mser	L- α -metilserina
Mtyr	L- α -metil tirosina	Mtrp	L- α -metilvalina
Nmhphe	L-N-metilhomofenilalanina	Mval Nnbhm	L- α -metilleucina
	N-(N-(3,3-difenilpropil)		N-(N-(2,2-difeniletilo)
Nnbhe	carbamilmetil(1)glicina	Nnbhm	carbamilmetil-glicina
		Nmbc	1-carboxi-1-(2,2-difenil etilamino)ciclopropano

Dado que los presentes péptidos se utilizan preferentemente en agentes terapéuticos o de diagnóstico que requieren que los péptidos se encuentren en forma soluble, los péptidos de la presente invención pueden incluir uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, que incluyen, pero no se limitan a, serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del péptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

El péptido de algunas realizaciones de la presente invención comprende al menos 1, 2, 3, 4 o más restos de aminoácidos básicos para aumentar la unión a la alfa-sinucleína. De acuerdo con realizaciones a modo de ejemplo, el aminoácido básico se coloca en el extremo del péptido (C y/o N).

5 Los péptidos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención incluyen al menos un resto de aminoácido de ruptura de la lámina [beta], que se coloca en la secuencia del péptido como se describe a continuación. Los péptidos que incluyen tales aminoácidos de ruptura de la lámina [beta] retienen el reconocimiento de polipéptidos de alfa-sinucleína pero evitan la agregación de los mismos. De acuerdo con una realización de la presente invención, el aminoácido de ruptura de la lámina [beta] es un aminoácido de origen natural tal como prolina,
10 que se caracteriza por un ángulo phi limitado de aproximadamente -60 a +25 en lugar del ángulo phi habitual de la lámina beta de aproximadamente -120 a -140 grados, interrumpiendo de este modo la estructura de la lámina beta de la fibrilla de alfa-sinucleína. Otros restos de aminoácidos de ruptura de la lámina [beta] incluyen, pero no se limitan a ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina y serina (de acuerdo con Chou y Fasman (1978) Annu. Rev. Biochem. 47, 258).

15 De acuerdo con otra realización de este aspecto de la presente invención, el resto de aminoácido de ruptura de la lámina [beta] es un aminoácido sintético tal como un aminoácido C[alfa]-metilado, cuyas restricciones de conformación están limitadas [Balaram, (1999) J. Pept. Res. 54, 195-199]. A diferencia de los aminoácidos naturales, los aminoácidos C[alfa]-metilados tienen un átomo de hidrógeno unido al C[alfa], que influye ampliamente en sus propiedades estéricas con respecto a los ángulos [phi] y [psi] del enlace de amida y media en sus efectos terapéuticos de forma más eficaz.

20 El aminoácido de ruptura de la lámina [beta] o aminoácido aromático se puede localizar en cualquier parte en el péptido (N-terminal, C-terminal, o una región flanqueada por los extremos N o C terminales).

25 De acuerdo con realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, el péptido tiene una modificación de protección terminal.

30 La expresión "péptido modificado con protección terminal", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que se ha modificado en el extremo N-(amino) terminal y/o en el extremo C-(carboxilo) terminal del mismo. La modificación de protección terminal se refiere a la unión de un resto támico en el extremo, con el fin de formar una protección. Al resto químico se denomina en el presente documento resto de protección terminal y por lo general en el presente documento y en la técnica también se denomina, indistintamente, resto o un grupo de protección de péptido.

35 La expresión "resto de protección terminal", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que cuando se une al extremo del péptido, modifica la protección terminal. La modificación de protección terminal por lo general da como resultado el enmascaramiento de la carga del extremo del péptido, y/o la alteración de las características químicas del mismo, tales como, hidrofobia, hidrofilia, reactividad, solubilidad y similares. Algunos ejemplos de restos adecuados para la modificación de protección terminal de péptidos se pueden encontrar, por ejemplo, en Green *et al.*, "Protective Groups in Organic Chemistry", (Wiley, 2.sup.nd ed. 1991) y Harrison *et al.*, "Compendium of Synthetic Organic Methods", Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996).

40 Los ejemplos representativos de restos de protección terminal del extremo N-terminal incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo (también denominado "Ac" en el presente documento), trifluoroacetilo, bencilo, benciloxycarbonilo (también denominado "Cbz" en el presente documento), terc-butoxicarbonilo (también denominado "Boc" en el presente documento), trimetilsililo (también denominado "TMS"), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (también denominado "SES"), tritilo y grupos tritilo sustituido, aliloxycarbonilo, 9- fluorenilmetiloxycarbonilo (también denominado en el presente documento "Fmoc"), y nitro-veratriloxy-carbonilo ("NVOC").

45 Los ejemplos representativos de restos de protección terminal del extremo C-terminal por lo general son restos que conducen a acilación del grupo carboxilo en el extremo C-terminal e incluyen, pero no se limitan a, bencilo y tritilo éteres así como alquil éteres, tetrahidropiranyl éteres, trialkylsilyl éteres, alil éteres, monometoxitritilo y dimetoxitritilo. Como alternativa, el grupo -COOH de la protección terminal del extremo C-terminal se puede modificar a un grupo amida.

50 Otras modificaciones de protección terminal de péptidos incluyen sustitución de la amina y/o carboxilo con un resto diferente, tal como hidroxilo, tiol, haluro, alquilo, arilo, alcoxi, ariloxy y similares, tal como estos términos se definen en el presente documento.

55 Los restos de protección terminal se pueden clasificar adicionalmente por su aromaticidad. Por lo tanto, algunos restos de protección terminal pueden ser aromáticos o no aromáticos.

60 Los ejemplos representativos de restos de protección terminal no aromáticos adecuados para modificación del extremo N-terminal incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetil trifluoroacetilo, terc-butoxicarbonilo, trimetilsililo, y 2-trimetilsilil-etanosulfonilo. Los ejemplos representativos de restos de protección terminal o aromáticos adecuados

65

para modificación del extremo C-terminal incluyen, pero no se limitan a, amidas, aliloxicarbonilo, trialkilsilil éteres y alil éteres.

5 Los ejemplos representativos de restos de protección terminal aromáticos adecuados para modificación del extremo N-terminal incluyen, pero no se limitan a, fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). Los ejemplos representativos de resto de protección terminal aromáticos adecuados para modificación del extremo C-terminal incluyen, pero no se limitan a, bencilo, benciloxicarbonilo (Cbz), tritilo y grupos tritilo sustituido.

10 Se observará que dado que uno de los principales obstáculos para el uso de péptidos cortos en terapia es su degradación proteolítica mediante proteasas celulares estereoespecíficas, los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar a partir de isómeros D de aminoácidos naturales [es decir, análogos de péptido inverso, Tjernberg (1997) J. Biol. Chem. 272: 12601-5, Gazit (2002) Curr. Med. Chem. 9: 1667-1675].

15 Además, los péptidos de la presente invención incluyen análogos retro, inverso y retro-inverso de los mismos. Se observada que por lo general se han encontrado que algunos análogos retro-inverso parciales completos o extendidos de hormonas retienen o aumentan la actividad biológica. La retro-inversión también ha encontrado aplicación en el área del diseño racional de inhibidores enzimáticos (véase la Patente de Estados Unidos N.º 6.261.569).

20 Como se usa en el presente documento, un "péptido retro" se refiere a péptidos que constan de restos de L-aminoácidos que se ensamblan en dirección opuesta a la secuencia del péptido nativo.

25 La modificación retro-inverso de polipéptidos de origen natural implican ensamblajes sintético de aminoácidos con estereoquímica de [alfa]-carbono opuesta a la de los correspondientes L-aminoácidos, es decir, D- o D-allo-aminoácidos en orden inverso al de la secuencia del péptido nativo. Un análogo retro inverso, por lo tanto, tiene extremos invertidos y dirección invertida de enlace específicos, aunque mantiene básicamente la topología de las cadenas laterales como la secuencia del péptido nativo.

30 Se observará adicionalmente que además de grupos orgánicos tales como grupos colilo con respecto al extremo N-terminal o C-terminal de los péptidos de la presente invención pueden aumentar la potencia y la biodisponibilidad (por ejemplo, cruzando la barrera hematoencefálica) de péptidos terapéuticos [Findeis (1999) Biochemistry 38: 6791-6800].

35 Un sistema desarrollado recientemente presente para cruzar la BBB se denomina Transporte Mediado por Receptor (RMT). Este sistema usa anticuerpos peptidomiméticos monoclonales (MAb) para ayudar a las moléculas grandes a cruzar la BBB [Pardridge WM. Pharm Res 2007; 24 (9): 1733-44]. Estos MAb se conjugan o se fusionan con un péptido de interés y a continuación usan receptores endógenos para conseguir la entrada a través de la BBB.

40 De acuerdo con una realización, los péptidos de la presente invención se unen a un agente potenciador de liberación sostenida. Algunos agentes potenciadores de liberación sostenida a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a ácido hialurónico (HA), ácido alginico (AA), metacrilato de polihidroxietilo (Poli-HEMA), polietilenglicol (PEG), glyme y poliisopropilacrilamida.

45 La unión del componente de la secuencia de aminoácidos de los péptidos de la invención a otros agentes que no son aminoácidos se puede realizar mediante unión covalente, mediante formación de complejos no covalente, por ejemplo, mediante formación de complejo con un polímero hidrófobo, que se puede degradar o escindir produciendo un compuesto capaz de liberación sostenida; a tratamiento de la parte de aminoácidos del péptido en liposomas o micelas para producir el péptido final de la invención. La asociación se puede realizar mediante acaparamiento de la secuencia de aminoácidos dentro del otro componente (liposoma, micela) o la impregnación de la secuencia de aminoácidos dentro de un polímero para producir el péptido final de la invención.

50 Los compuestos de la invención pueden ser lineales o cíclicos (el ciclado puede aumentar la estabilidad). El ciclado se puede producir mediante cualquier medio conocido en la técnica. Cuando el compuesto está formado predominantemente por aminoácidos, el citado se puede realizar a través del extremo N- a C- terminal, N-terminal a cadena lateral y N-terminal a estructura principal, C-terminal a cadena lateral, C-terminal a estructura principal, cadena lateral a estructura principal y cadena lateral a cadena lateral, así como de estructura principal a ciclado de estructura principal. El ciclado del péptido también se puede producir a través de restos orgánicos que no son aminoácidos comprendidos en el péptido.

60 Los péptidos de la presente invención se pueden sintetizar de forma bioquímica tal como mediante el uso de técnicas convencionales en fase sólida. Estos métodos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, métodos de síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución. En la técnica se conocen bien algunos procedimientos de síntesis de polipéptidos en fase sólida y se describen adicionalmente en John Morrow Stewart y Janis Dillaha Young, Solid Phase Polypeptide Syntheses (2ª Ed., Pierce Chemical Company, 1984). Synthetic peptides can be purified by preparative high performance liquid chromatografía [Creighton T. (1983) Proteins, structures and molecular principles. WH Freeman y Co. N.Y.] y cuya composición se puede confirman a través de secuenciación de amino.

Para generar los péptidos de la presente invención también se pueden usar técnicas recombinantes. Para producir un péptido de la presente invención usando tecnología recombinante, un polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención se liga en un vector de expresión de ácido nucleico, que comprende la secuencia de polinucleótidos bajo el control transcripcional de una secuencia cis-reguladora (por ejemplo, secuencia promotora) adecuada para dirigir la transcripción constitutiva, específica de tejido o inducible de los polipéptidos de la presente invención en las células hospedadoras.

Además de poderse sintetizar en células hospedadoras, el polipéptido de la presente invención también se puede sintetizar usando sistemas de expresión *in vitro*. Estos métodos se conocen bien en la técnica y los componentes del sistema están disponibles en el mercado.

Los péptidos de algunas realizaciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir afecciones médicas asociadas con la alfa-sinucleína (es decir, afecciones médicas en las que la agregación de la alfa sinucleína está asociada con inicio o evolución). Algunos ejemplos de tales afecciones médicas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neurodegenerativas en particular enfermedad de Alzheimer, la variante de Cuerpos de Lewy de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la atrofia de múltiples sistemas, la demencia de Cuerpos de Lewy y corea de Huntington.

Los péptidos se pueden proporcionar a un individuo *per se*, o como parte de una composición farmacéutica en la que se mezclan con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos que se describen en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere a la preparación de péptido, que se puede tener en cuenta para el efecto biológico.

En lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se pueden usar de forma indistinta se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa ha un organismo y no elimina la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. En las expresiones se incluye un adyuvante. Uno de los ingredientes incluidos en el vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo polietilenglicol (PEG), un polímero biocompatible con un amplio intervalo de solubilidad en medios tanto orgánicos como acuosos (Mutter *et al.*, (1979).

En el presente documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Algunos ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Algunas técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Algunas vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

Como alternativa, se puede administrar una preparación de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de inyección de la preparación directamente en una región específica del cerebro.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden hacer con procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que se pueden usar de forma farmacéutica. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

Para inyección, los principios activos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Por lo general, tales agentes penetrantes se conocen en la técnica.

5 Para administración oral, los compuestos se pueden formular fácilmente combinando los compuestos activos con
vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que los compuestos
de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas,
suspensiones, y similares, para ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se
10 pueden preparar usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla
de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de
grageas. Algunos excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa,
sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo,
almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa,
15 carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se
desea, se pueden añadir agentes de desintegración, tales como polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido
algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

15 Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para esta finalidad, se pueden usar
soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel
de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes
adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimido o gragea para identificar o
para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

20 Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas
de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o
sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con una carga tal
como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y,
25 opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos se pueden disolver o suspender en
líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden
añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas
para la vía de administración elegida.

30 Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar
formulados de una manera convencional.

35 Para administración mediante inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente
invención se administran de forma conveniente en forma de una presentación de pulverización de aerosol desde un
envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano,
triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de
dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden
formular cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para uso en un dispensador que contengan una mezcla en
polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

40 Las preparaciones que se describen en el presente documento se pueden formular para administración parenteral,
por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar
en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis opcionalmente con un
conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o
acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o
45 dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación
activa en forma soluble en agua. Además, se pueden preparar suspensiones de los principios activos en forma de
50 suspensiones de inyección de base oleosa o acuosa apropiadas. Algunos disolventes o vehículos lipófilos
adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres sintéticos de ácidos grasos tales como
oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que
aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano.
Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la
solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas. Como alternativa,
55 el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, solución, por
ejemplo, solución a base de agua sin pirógenos, estéril, antes de su uso.

60 La preparación de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales tales como
supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca
de cacao u otros glicéridos.

65 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen
composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir la finalidad
pretendida. De forma más específica, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad de principios
activos eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de la enfermedad o prolongar la supervivencia del
sujeto que está siendo tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Después de la determinación del cálculo inicial, una dosis se puede formular en modelos animales y tal información se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los presentes inventores han demostrado que se pueden usar moscas como un modelo *in vivo* para analizar los efectos de los péptidos de la presente invención - véase el Ejemplo 9 y Crowther *et al.*, *Current Opinion in Pharmacology*; 2004, 4: 513-516.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos que se describen en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivo celular y estudios animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación usada y la vía de administración usada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación las puede elegir el médico individual en vista de la afección del paciente. [Véase, por ejemplo, Fingl, *et al.*, (1975) "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 p.1].

Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola o una pluralidad de administraciones, con el transcurso del tratamiento durando desde varios días a varias semanas o hasta que la curación se produzca o se consiga la disminución de la patología.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

Las composiciones que incluyen la preparación de la presente invención formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada.

Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede estar formado, por ejemplo, por lámina de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador se puede ajustar mediante un anuncio asociado con el envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o administración a seres humanos o veterinaria. Tal aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado probado por la U.S. Food and Drug Administration para medicamentos recetados o de un prospecto de producto aprobado.

Así como en las aplicaciones terapéuticas, los péptidos de algunas realizaciones de la presente invención se pueden usar para detectar la presencia o el nivel de monómeros de alfa sinucleína. Esto se basa en la capacidad del péptido para unirse a la forma de alfa sinucleína monomérica. Como tal, esto se puede usar para eficacia del tratamiento de diagnóstico o seguimiento, mediante la determinación indirecta del nivel de la forma agregada perjudicial de la proteína.

Se observará que los péptidos también pueden servir como herramientas para el estudio de las interacciones entre [alfa]-sin y [beta]-sin, así como para ayudar en la comprensión de la función y/o mecanismo de [beta]-sin.

Con este fin, el péptido se puede unir a un resto identificable.

El resto identificable puede ser un miembro de un par de unión, que se puede identificar a través de su interacción con un miembro adicional del par de unión y una etiqueta que se visualiza directamente. En un ejemplo, el miembro del par de unión es un antígeno que se identifica por un anticuerpo etiquetado correspondiente. En un ejemplo, la etiqueta es una proteína fluorescente o una enzima que produce una reacción colorimétrica. La Tabla 3 que sigue a continuación proporciona ejemplos de secuencias de restos identificables.

Tabla 3

Secuencia de ácidos nucleicos (N.º de Registro en Genbank)	Secuencia de aminoácidos (N.º de Registro en Genbank)	Resto Identificable
AF435427	AAL33912	Proteína Fluorescente Verde
AY042185	AAK73766	Fosfatasa alcalina
NM_124071	NP_568674	Peroxidasa
AF329457	AAK09208	Etiqueta de histidina
AF329457	AF329457	Etiqueta de Myc

<i>Secuencia de ácidos nucleicos (N.º de Registro en Genbank)</i>	<i>Secuencia de aminoácidos (N.º de Registro en Genbank)</i>	<i>Resto Identificable</i>
NC_003366	NP_561589	Etiqueta de biotina ligasa
AF435432	AAL33917	proteína fluorescente naranja
NM_125776	NM_125776	Beta galactosidasa
AF098239	AAF22695	Isotiocianato de Fluoresceína
S11540	S11540	Estreptavidina

5 Se observará que tales fusiones se pueden realizar usando tecnología de conjugación química o de ADN recombinante. El nivel de la forma monomérica se compara con una muestra de control (por ejemplo, de sujetos sanos, mismo sujeto antes del tratamiento, y similares). Para fines de investigación y desarrollo de fármacos, por ejemplo, el efecto de algunos agentes en la agregación de alfa-sinucleína, el nivel de la forma monomérica se determina siguiendo y opcionalmente antes del tratamiento con el agente, por lo que el agente puede ser un péptido de la presente invención.

10 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados se refieren a "que incluye, pero no se limita a". Este término incluye los términos "que consiste en" y " que consiste básicamente en".

15 La expresión "que consiste básicamente en" se refiere a que la composición o método pueden incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solamente si los ingredientes y/o adicionales no alteran de forma material las características básicas y nuevas de la composición o métodos reivindicados.

20 Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo dicte claramente de otro modo. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

25 En toda la presente solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de esta invención en formato de intervalos. Se debería entender que la descripción en formato de intervalos es simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debería considerar que la descripción de un intervalo ha desvelado de forma específica todos los posibles subintervalos así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debería considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado de forma específica subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

30 Cada vez que en el presente documento se indica un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número mencionado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente en el presente documento y pretenden incluir el primer y el segundo números indicados todos los numerales fraccionarios e integrales entre los mismos.

35 Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada que incluye, pero no se limita, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los practicantes de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "que trata" incluye anulación, básicamente inhibir, ralentizar o revertir la progresión de una afección, básicamente mejorar los síntomas clínicos o estéticos de una afección o básicamente prevenir la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

45 En el presente documento, la expresión "a modo de ejemplo" se usa para hacer referencia a "que sirve como un ejemplo, caso o ilustración". No es necesario que cualquier realización descrita que se describe como "a modo de ejemplo" se interprete como preferente o ventajosa con respecto a otras realizaciones y/o que excluye la incorporación de características de otras realizaciones.

50 En el presente documento, el término "opcionalmente" se usa para hacer referencia a que "se proporciona en algunas realizaciones y no se proporcionan otras realizaciones". Cualquier realización en particular de la invención puede incluir una pluralidad de características "opcionales" a menos que tales características entren en conflicto.

55 Anteriormente en el presente documento se han definido diversas realizaciones y aspectos de la presente invención y tal como se reivindican en la sección de reivindicaciones que sigue a continuación encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones mencionadas anteriormente, ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones mencionadas anteriormente, ilustran la invención de una manera no limitante.

Por lo general, la nomenclatura usada en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.*, (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías que se establecen en las Patentes de Estados Unidos N.ºs 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.*, (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., New York (1980); algunos inmunoensayos disponibles se describen extensamente en patentes y bibliografía científica, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.ºs 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). En todo este documento se proporcionan otras referencias generales general. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Materiales generales y métodos

Matriz peptídica: La formación de mapas moleculares de secuencias de unión de [beta]-sin se realizó usando tecnología de matriz peptídica. Se sintetizaron péptidos decámeros correspondientes a las secuencias de superposición de proteína [beta]-sin con una longitud completa de 134 aminoácidos en una matriz de membrana de celulosa. Los péptidos se unen covalentemente a un soporte de celulosa Whatman 50 mediante los restos de aminoácido C-terminal. Después del bloqueo, la membrana se incubó en presencia de [alfa]-sin recombinante etiquetada con histidina N-terminal, seguido de anticuerpo monoclonal anti His conjugado con HRP. Se realizó un control negativo. Las inmunotransferencias en la membrana de celulosa se desarrollaron usando análisis de transferencia de Western. Una vez que se identificaron los sitios de unión de [beta]-sin en [alfa]-sin, los péptidos derivados de [beta]-sin pequeña se sintetizaron.

Expresión y purificación de a-sin: La proteína se expresó en bacterias BL21 pT7-7. Para la expresión, se cultivaron cultivos de bacterias a la fase logarítmica con ampicilina (100 mg/l) y la expresión de proteínas se indujo con IPTG (1 mM) durante 3 horas. El sedimento de bacterias se volvió a suspender con tampón TEN (Tris 50 mM a pH 8,0, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM), y se congeló a -80 °C hasta purificación.

La purificación se realizó usando un método no cromatográfico como lo describen Voiles y Lansbury (Voiles y Lansbury, 2007, J Mol Biol 366 (5), 1510-1522). En resumen, después de ebullición y centrifugación de las bacterias, el sobrenadante se retiró a un tubo nuevo y se añadieron sulfato de estreptomina (136 µl de una solución al 10 %/ml de sobrenadante) y ácido acético (glacial, 228 µl/ml de sobrenadante), seguido de una centrifugación adicional durante 2 minutos. El sobrenadante se retiró de nuevo y a continuación se precipitó con sulfato de amonio (se usó sulfato de amonio saturado a 4 °C 1:1 en vol:vol con sobrenadante). La proteína precipitada se recogió por centrifugación (en esta etapa se observan clones que no producen proteína purificable para formar ningún precipitado), y el sedimento se lavó una vez con 1 ml de solución de sulfato de amonio (4 °C; 1:1 en vol:vol de sulfato de amonio saturado (4 °C): agua). El sedimento lavado se volvió a suspender en 900 µl de acetato de amonio 100 mM (para formar una solución turbia) y se precipitó mediante la adición de un volumen igual de etanol a temperatura ambiente. La precipitación con etanol se repitió una vez más, seguida de una nueva suspensión final en acetato de amonio 100 mM, diálisis de O.N. diálisis a agua a 4 °C, congelación en nitrógeno líquido, y liofilización.

Para comparación, la proteína se purificó después con un método adicional usando cromatógrafos y se sometió a ensayo para inhibición de la agregación usando los mismos péptidos. En resumen, el sedimento de bacterias se volvió a suspender en Tris 50 mM, KCl 50 mM, MgAc 5 mM, NaN al 0,1 %, pH 8,5 y complementado con inhibidores de PMSF 300 µM. A continuación, la solución se sometió a ultrasonidos y se ultracentrifugó durante 30 minutos a 14000 RPM a 4 °C. A continuación, el sobrenadante se llevó a ebullición durante 15 minutos en un baño de agua.

Para separar las proteínas precipitadas de la solución, la muestra se centrifugó durante 20 minutos a una velocidad de 7000 RPM a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se mantuvo para purificación adicional.

5 El sobrenadante filtrado se sometió a una columna de intercambio aniónico HiPrep 16/10 QFF. En Tris 20 mM, pH 8, [alfa]-sin tiene una carga neta negativa, y por lo tanto puede interactuar con los restos con carga positiva (NH⁺) de la columna de intercambio aniónico. La proteína se eluyó usando de un 30 % a 40 % de solución de Tris 20 mM y solución de NaCl 1 M (pH 8) y se carga en una columna de exclusión por tamaño HiLoad 26/20 Superdex 200. Las fracciones de intercambio aniónico se cargaron con Tris 50 mM/HCl y tampón de NaCl 150 mM (pH 7,5), y la fracción de monómero se analizó mediante SDS-PAGE y se recogió, se dializó con O.N. a agua a 4 °C, se congeló en nitrógeno líquido, y se liofilizó.

15 *Ensayo de fluorescencia de ThT*: [alfa]-sin se disolvió a una concentración de 200 µM en tampón Tris 100 mM (pH 7,4). Con el fin de obtener la fracción monomérica, la proteína se filtró a través de un Centricon de 100 kDa. Dado que [alfa]-sin no es una proteína globular sino una forma nativa sin plegar, solamente los monómeros y algunos dímeros pasan a través del filtro. La proteína monomérica se mezcló inmediatamente con o sin diferentes péptidos derivados de [beta]-sin en una proporción de 1:1 hasta una concentración final de 100 µM. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación de 850 RPM como se describe en Tsigelny *et al.*, (Tsigelny *et al.*, 2007 Febs J 274 (7), 1862-1877) y la tasa de fibrillogénesis fue seguida de ensayo de fluorescencia con tioflavina T (ThT) (excitación a 20 450 nm, rendija de 2,5 nm, y emisión a 480 nm, rendija de 5 nm), después de tres días de incubación. La ThT se añadió a una muestra diluida 500 veces y se midió usando un fluorímetro Fluoromax 3 de Jobin Yvon Horiba.

25 *Microscopía electrónica de transmisión*: Las muestras (10 µl) del ensayo de fluorescencia con ThT de [alfa]-sin (con y sin inhibidores) se colocaron en rejillas de cobre de malla 400 cubiertas por la película de Formvar estabilizada con carbono (SPI Supplies, West Chester, PA). Después de 1,5 minutos, el exceso de líquido se eliminó, y las rejillas se tiñeron negativamente con 10 [mu]l de solución de acetato de uranilo al 2 % durante 2 minutos. Por último, el exceso de líquido se retiró y las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico JEOL 1200EX funcionando a 80 kV.

30 *Determinación de formación de oligómero soluble*: La [alfa]-sin monomérica se disolvió a una concentración de 200 µM en tampón Tris 100 mM (pH 7,4) y se mezcló inmediatamente con o sin diferentes péptidos derivados de [beta]-sin a una proporción de 1:1 hasta una concentración final de 100 µM, como se ha descrito anteriormente para el ensayo de agregación. Después de agitar las muestras a 37 °C durante varios días, se centrifugaron 10 µl de la proteína a 13000 RPM durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se sometió a electroforesis en gel de acrilamida usando tampón de carga nativo sin [beta]-mercaptoetanol y se llevó a ebullición. El gel se lavó 3 veces en ddH₂O y a continuación las muestras se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa usando la técnica de transferencia semiseca aplicando una corriente de 323 mA durante 30 minutos. La membrana se bloqueó durante 35 1 hora usando un 5 % de leche diluida en TBS (Tween al 0,3 %) mientras se agitaba. Se añadió anti [alfa]-sin diluida a 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology) en un 5 % de leche en TBS (Tween al 0,3%) a la membrana durante 2 horas de incubación seguido de varios lavados con TBS (Tween al 0,3 %). Se administró IgG de conejo anti ratón (específica de Fc)-anticuerpo conjugado con HRP diluido a 1:5000 en un 5 % de leche diluida en TBS (Tween al 40 0,3 %) durante 1 hora a TA con agitación. Las transferencias se desarrollaron después de lavados a fondo con TBS (Tween al 0,3 %) usando Sistema de Quimioluminiscencia Mejorada (ECL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 *Estudios de anisotropía de fluorescencia*: se disolvió [beta]-sin 36 en la que la tirosina se sustituyó con triptófano (SEC ID N°: 22 - GVLWVGSKTR) hasta una concentración de 50 µM. La solución se mezcló inmediatamente con solución de reserva de monómero de [alfa]-sin hasta concentraciones finales variables. Las medidas de polarización de péptidos se realizaron utilizando un fluorómetro ISS K2. Las soluciones se excitaron a 280 nm y la emisión se controló a 350 nm. Para cada punto individual, se recogieron al menos cinco medidas y sus valores medios se usaron para el cálculo. Todos los experimentos se realizaron con agua ultra pura. *Análisis de RMN*: Las muestras se prepararon a partir de péptidos en forma liofilizada disueltos en una solución que contenía óxido de deuterio al 10 % en tampón fosfato 20 mM y NaCl 50 mM en DDW. Cuando se usaba [alfa]-sin, la muestra se preparaba en solución de fosfato 20 mM como se ha descrito anteriormente, y se añadieron NaCl y óxido de deuterio para conseguir las concentraciones mencionadas anteriormente, y se añadió el péptido liofilizado en la proporción molar designada. El pH se midió para todas las muestras. Las muestras se prepararon en tubos Shigemi con un volumen final de 260 µl.

Los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro de Bruker Avance DMX 600 MHz que funciona a la frecuencia de protones de 600,13 MHz usando una sonda selectiva de 5 mm equipada con una bobina de gradiente xyz autoprottegida. La frecuencia del transmisor se encuentra en la señal de HDO, que se calibró de acuerdo con la temperatura (4 °C - 4,974 ppm; 10 °C - 4,821 ppm; 15 °C - 4,773 ppm; 37 °C - 4,658 ppm). Los experimentos de TOSCY (44) y NOESY (46) se adquirieron para cada conjunto de temperatura y muestra.

Los espectros se procesaron y analizaron con el software TOPSPIN (Bruker Analytische Messtechnik GmbH). El llenado cero en la dimensión indirecta y la apodización de datos con funciones de ventana de campana sinusoidal al cuadrado en ambas dimensiones se aplicó antes de la transformación de Fourier para una resolución óptima. La medida inicial se corrigió adicionalmente en la dimensión directa con una función polinómica cuadrática.

La asignación de resonancia se hizo de acuerdo con la metodología de asignación secuencial desarrollada por Wuthrich basándose en los espectros de TOCSY y NOESY medidos en condiciones experimentales idénticas. Las desviaciones de los desplazamientos químicos de los picos HN- Ha se leyeron a partir de espectros de 2D superpuestos fuertemente apodizados, altamente resueltos, cuidadosamente calibrados.

Ensayo in vitro de estabilidad peptídica: Los péptidos se disolvieron para formar una solución 1 mM en tampón Tris 50 μ M (pH = 7,6). Se diluyeron 120 μ l de la solución de péptido en un homogenado de cerebro de ratón recién preparado al 10 % sin el cerebelo (en tampón Tris 1x y Triton X-100 al 0,5 %). Una mezcla que contenía solución de péptido al 20 % y homogenado de cerebro de ratón al 80 % se incubó a 37 °C con agitación delicada durante 2 horas. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de una solución de HCl 0,1 M, seguido de desnaturalización de la proteína usando CH₃OH e incubación a 20 < °C durante 1 hora. Las proteínas precipitadas se centrifugaron a 29.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sobrenadante que contenía el péptido se concentró a vacío y se separó usando una columna C18 de HPLC. El área del pico (absorbancia de UV a 280 nm) que corresponde al péptido intacto se comparó con una muestra equivalente incubada en tampón Tris 50 μ M.

Línea celular: las células SH-SY5Y, transfectadas de forma estable con [alfa]-sin de tipo silvestre, se mantuvieron con DMEM: F12 a 1:1 que contenía suero bovino fetal al 5 %, 2 raM de 1-glutamina, 1000 U/ml de penicilina G sódica, 1 mg/ml de sulfato de estreptomocina y piruvato sódico 1 mM en condiciones selectivas con G-418 100 μ M a 37 < 0 °C con un 5 % de CO₂. Las células se sometieron a diferenciación con ácido retinoico 10 μ M (Sigma) en medio de crecimiento completo, sustituido cada dos días durante un periodo de ocho días.

Internalización de péptido en células SH-SY5Y: la internalización de péptido en células SH-SY5Y se visualizó mediante tinción inmunocitoquímica. Se sembraron 10<4> células en un cubre objetos revestidos con poli-L-lisina (0,1 %) en una placa de 24 pocillos y se sometieron a diferenciación como se ha descrito. Las células diferenciadas se incubaron con el péptido en el medio de crecimiento celular de 30 minutos a cuatro horas a 37 °C. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS durante 30 minutos a TA y después se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con Triton al 0,1 % en PBS durante 2 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células se bloquearon con suero de cabra normal al 10 % en BSA al 3 % durante 30 minutos y se incubaron con anticuerpo anti [alfa]-sin (Santa Cruz Biotechnology) diluido a 1:1000 y 4 μ g/ml de Faloidina (Sigma) durante una hora, seguido por una hora adicional de incubación con inmunoglobulina de cabra anti-conejo incubada con Cy5 (Jackson ImmunoResearch). Después de lavarse minuciosamente con PBS, las células se montaron usando Pro largo Antifade (Invitrogene). Las imágenes se tomaron con microscopio confocal LSM510 (Zeiss).
Mantenimiento de la mosca: Las moscas se criaron en medio convencional corneal-melazas y se mantuvieron a 25 °C. Las moscas macho se cruzaron con hembras vírgenes recogidas no más de 8 horas o 18 horas después de la eclosión a 25 °C o 18 °C, respectivamente. La descendencia adulta (F1) de los cruces se recogió hasta 9 días después del comienzo de su eclosión a 25 °C para evitar la descendencia de la próxima generación (F2).

Cruce de moscas: las moscas macho que portaban el elav-Gal4 conductor en su cromosoma X se cruzaron con hembras que portaban el transgén de A53T [alfa]-sin situado en su cromosoma X bajo el promotor de UAS. Esto dio lugar a la descendencia femenina de primera generación (F1) que expresaba A53T [alfa]-sin en su sistema nervioso, que sirvió de modelo de Drosophila de PD. La descendencia de las moscas macho que portaba el elav-Gal4 conductor cruzado con hembras WT OR sirvió como control.

Alimentación especial de mosca: Se añadió péptido [beta]-sin retro-inverso a medio convencional corneal - melazas a una concentración de 0,75 mg/ml. El péptido se mezcló de forma minuciosa en el medio a 40 °C y se tomaron alícuotas de la mezcla en viales de cría. Los viales se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Los cruces se realizaron en un medio de Drosophila regular (control) o en medio complementado con el péptido. Los animales se alimentaron con el medio apropiado desde el inicio de la fase larvaria. Después de la eclosión, las crías se transfirieron a un nuevo vial que se goteó previamente con 0,75 mg/ml de solución de péptido cada dos días.

Ensayo de locomoción (escalada): los tubos de ensayo, cada uno con 10 moscas, se golpearon suavemente sobre la mesa y se dejaron reposar durante 20 segundos. El porcentaje de moscas que escaló aproximadamente un centímetro desde la parte inferior del tubo de ensayo se calculó a continuación en el tiempo. Cada clase tenía cinco repeticiones en tubos de ensayo independientes.

EJEMPLO 1

Identificación del sitio de reconocimiento entre a y [beta]-sin

RESULTADOS

Con el fin de determinar los sitios de interacción entre las dos proteínas, se hicieron mapas de forma sistemática de ambas proteínas usando un análisis recíproco de matriz péptica (Figuras 1A-D).

Lo lógico detrás de este ensayo era identificar dominios que tuvieran el potencial de facilitar los sucesos de reconocimiento molecular que conducen a interacción. Los dominios serán la base para la síntesis de péptidos pequeños derivados que se podrían usar de forma terapéutica para inhibición de agregación de [alfa]-sin. La

formación de mapas moleculares de secuencias de unión de [alfa] y [beta]-sin se realizó usando tecnología de matriz etílica. Los péptidos decámeros que corresponden a las secuencias de solapamiento de las proteínas de longitud completa [alfa]-sin de 140 aminoácidos y [beta]-sin de 134 aminoácidos se sintetizaron en una matriz de membrana de celulosa (véanse las Figuras 2A-B). Los péptidos se unieron de forma covalente a un soporte de celulosa

Después del bloqueo, las membranas de celulosa de [alfa] y [beta]-sin se incubaron en presencia de [alfa]-sin y [beta]-sin recombinante etiquetadas con histidina N-terminal, respectivamente, seguido de anticuerpo monoclonal anti His conjugado con HRP. Se realizó un control negativo. Las inmunotransferencias en la membrana de celulosa se desarrollaron usando análisis de transferencia de Western. Una vez que se identificaron los sitios de unión de [beta]-sin en [alfa]-sin, se sintetizaron péptidos pequeños derivados de [beta]-sin. Se seleccionaron varios péptidos decámeros y se sintetizaron para su análisis posterior. Estos péptidos se denominaron [beta]-sin 6, 14, 36, 37, 38, 39, 77, y 78 de acuerdo con la ubicación de su primer aminoácido en la membrana (Tabla 4, a continuación en el presente documento). Un péptido de siete aminoácidos (denominado [ómicron]corto), se usó como control positivo seleccionado como un buen candidato inhibidor por Windisch *et al.*, (Windisch *et al.*, 2004 (2004) J Mol Neurosci 24 (1), 155- 165) – SMAKEGV (SEC ID N°: 39).

Tabla 4

Posición del aa dentro de la proteína β -sin	Secuencia de aa	Nombre del péptido
9-15	SMAKEGV (SEC ID N°: 39)	β -sin 6corto (control)
14-23	GVVAAAEKTK (SEC ID N°: 8)	β -sin 14
36-45	GVLYVGSKTR (SEC ID N°: 1)	β -sin 36
37-46	VLYVGSKTRE (SEC ID N°: 2)	β -sin 37
38-47	LYVGSKTREG (SEC ID N°: 3)	β -sin 38
39-48	YVGSKTREGV (SEC ID N°: 4)	β -sin 39
77-86	AAATGLVKRE (SEC ID N°: 5)	β -sin 77
78-87	AATGLVKREE (SEC ID N°: 6)	β -sin 78
36 modificaciones de β -sin (todos los aa son enantiómeros D)		
36-45	GVLYVGSKTR (SEC ID N°: 54)	D aa β -sin 36
36-45	RTKSGVYLVG (SEC ID N°: 55)	Retro inverso β -sin 36
36-45	Acetil -RTKSGVYLVG- amida (SEC ID N°: 56)	β -sin 36 retro inverso acetilada y amidada
39-45	YVGSKTR (SEC ID N°: 57)	D aa β -sin 36 corto

Se prestó atención especial a los péptidos 36-39 (SEC ID N°s: 1-4) debido a la presencia de tirosina. Un papel fundamental de los aminoácidos aromáticos se ha identificado en la formación de fibrillas de amiloide a través de interacciones de apilamiento [pi] [Azriel, R., y Gazit, E. (2001) J. Biol. Chem. (276), 34156-34161; Gazit, E. (2002) Bioinformatics (18), 880- 883; Porat, Y., Kolusheva, S., Jelinek, R., y Gazit, E. (2003) Biochemistry (42), 10971-10977; Mazor, Y., Gilead, S., Benhar, L, y Gazit, E. (2002) J. Mol. Biol. (322), 1013-1024; Reches, M., y Gazit, E. (2003) Science (300), 625-627; Reches, M., y Gazit, E. (2004) Amyloid (11), 81-89]. Por lo tanto, la presencia de tirosina dentro de los péptidos inhibidores podría estimular la interferencia con el autoensamblaje de las estructuras de amiloide.

EJEMPLO 2

Inhibición de la formación de fibrillas de amiloide con péptidos derivados de [beta]-sin

Para examinar el efecto inhibidor de los péptidos en la formación de fibrillas de [alfa]-sin, se usó el ensayo de unión de Tioflavina-T (ThT). Este método proporciona información cuantitativa sobre el crecimiento de fibrillas de amiloide, la [alfa]-sin se incubó durante varios días a 37 <0>C con agitación vigorosa para permitir la formación de fibrillas de amiloide con o sin los diferentes péptidos derivados de [beta]-sin. El proceso de formación de fibrillas se controló durante tres días. La Figura 3A muestra que la formación de fibrillas de amiloide se reducía de forma significativa en presencia de varios inhibidores de péptidos. Un análisis cinético se realizó para los dos inhibidores potenciales [beta]-sin 36 y [beta]-sin 39 ya que estos dos péptidos representan el primer y el último péptidos identificados sistemáticamente dentro de la región aromática (Figura 3B). [Beta]-sin 36 mostraba mejor inhibición los ensayos de inhibición dependiente de la dosis revelaban que el péptido todavía es eficaz con un exceso de 10:1 (proporción molar) pero menos eficaces con un exceso de 5:1 (Figura 3C).

EJEMPLO 3

Análisis de TEM de una agregación de a-sin

5 El análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en muestras de [alfa]-sin con y sin los inhibidores de [beta]-sin. Las muestras se tomaron del experimento de ThT (presentado en la Figura 3A. Aunque las fibrillas formadas por [alfa]-sin sola eran fibrillas grandes similares a una cinta ancha (Figura 3D), solamente se detectaban fibrillas cortas o ninguna fibrilla en presencia de péptidos de [beta]-sin, [beta]-sin 36 inhibía casi completamente la formación de fibrillas (Figura 3F). Estos resultados se correlacionan en gran medida con los resultados del ensayo de ThT.

EJEMPLO 4

Identificación sistemática para inhibición de formación de oligómeros

15 Para examinar la capacidad de los péptidos para inhibir la etapa inicial de agregación, algunas fracciones solubles de [alfa]-sin se recogieron después de incubación con los péptidos de [beta]-sin. Las mezclas de reacción se separaron usando SDS-PAGE seguido de análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo anti [alfa]-sin específico (Santa-Cruz) (Figura 4A). Un ensayo preliminar de formación de oligómero en el tiempo revelaba que se detectaban oligómero superiores después de ~20 horas de incubación; por lo tanto, las muestras se recogieron después de este periodo de tiempo. El péptido [beta]-sin [ómicon]corto (el péptido de control positivo de los inventores) y el péptido [beta]-sin 37 inhibían las fibrillas pero no la formación de oligómeros, mientras que el péptido [beta]-sin 78 inhibía oligómeros pero no la formación de fibrillas. El péptido [beta]-sin 36 inhibía casi completamente la formación de ambos tipos de agregación (Figura 4B).

EJEMPLO 5

Caracterización de la afinidad entre péptido [beta]-sin 36 y a-sin

30 Para determinar la afinidad de la interacción entre monómeros de [beta]-sin 36 y [alfa]-sin, se usó un péptido que contenía triptófano en lugar de tirosina en la posición 39 dentro de [beta]-sin, explotando su fluorescencia intrínseca en un ensayo de anisotropía de fluorescencia. Se encontró que este péptido inhibía la agregación de [alfa]-sin de una manera similar a la de [beta]-sin 36

35 (los datos no se muestran). Cantidades crecientes de monómeros de [alfa]-sin se valoraron en una solución de péptido [beta]-sin 36 y se determinó la anisotropía (Figura 5B). La constante de afinidad se calculó como ~1 mM.

EJEMPLO 6

40 *Péptidos modificados de [beta]-sin 36 inhiben la agregación de a-sin y aumentan la estabilidad en suero*

Para aumentar la vida media de un péptido en suero, este se puede alterar para reducir la degradación con proteasas y peptidasas en tejido y suero, [beta]-sin 36 es un péptido decámero que comprende L-aminoácidos naturales. Dado que el péptido es susceptible a la degradación proteolítica, los presentes inventores diseñaron un derivado más estable (véase la Tabla 1 mencionada anteriormente en el presente documento). Para esta finalidad, se diseñaron tres péptidos modificados; el primero está formado por aminoácidos D en lugar de L, denominados [beta]-sin 36D, el segundo era análogo con retro-inversión de la secuencia de aminoácidos, denominado retro-inverso. Para negar las cargas terminales negativas y positivas del péptido retro-inverso, se sintetizó un tercer péptido modificado N-terminal acetila. y C-terminal amidado, el péptido retro-inverso con amidación y acetilación. Se sospechaba que las modificaciones de estos péptidos alteraban la eficacia del péptido director pero eran necesarios para restablecer su actividad biológica. Para esa finalidad, los tres péptidos se sometieron a ensayo para inhibición de formación de fibrillas de [alfa]-sin usando el ensayo de unión de ThT con una proporción molar de 1:20, 1:10 a favor de los péptidos, y presentaban un efecto biológico similar al de [beta]-sin 36 (Figura 5A).

55 Posteriormente, la estabilidad del péptido [beta]-sin 36 y el péptido retro-inverso modificados se comparó usando homogenado del cerebro de ratón recién preparado para modelar la degradación en suero durante un periodo de 2 horas. Los resultados presentados en las Figuras 6A-C indican un aumento de la estabilidad dentro del péptido modificado.

EJEMPLO 7

Análisis de RMN

65 Los restos que participan en las interacciones intermoleculares de [alfa]-sin se determinaron siguiendo cambios en el desplazamiento químico después de la unión. El solapamiento evidente entre dos moléculas idénticas se superó usando el péptido [beta]-sin 36 retro-inverso (todos los D aminoácidos; R4ST44K43S42G41V40Y3QL3SV37G36) en interacción con [alfa]-sin.

Todos los restos del péptido se identificaron y asignaron (Figura 10). R45 y T44 no se observaban en la región de amida, pero se identificaban en la región alifática. El espectro del péptido solo y en interacción con [alfa]-sin se determinó en un número de condiciones: Proporciones molares de 1:1 y 1:5 de péptido a proteína; concentraciones de péptido de 160 y 400 [mu]M; temperaturas de 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, y 37 °C; y usando el análogo retro-inverso de Y39W [beta]-sin 36. En todas las muestras, algunas de las señales de amida de la región N-terminal se perdieron entre R45 y G41, sin embargo, todas las muestras presentaban la tendencia general encontrada para la muestra de [beta]-sin 36 retro-inverso con [alfa]-sin a una proporción molar a 1:1, 160 μM, 4 °C, a pH (Fig 7A y B-E y Tabla 4, anteriormente en el presente documento). Los desplazamientos químicos presentaban desviaciones más acusadas en los restos K43, V40, L3g y G36. Para destacar adicionalmente la importancia de L3g y G36, el péptido [beta]-sin 36D que carece de los primeros tres aminoácidos - G, V y L se sintetizó y no presentaba efecto de inhibición en la agregación de [alfa]-sin usando el ensayo de ThT (Figura 7F).

EJEMPLO 8

15 *Internalización del péptido en células de mamífero*

Para conseguir un modelo celular de PD, las células SH-SY5Y5 que sobreexpresan [alfa]-sin de tipo silvestre se sometieron primero a tratamiento con ácido retinoico para inducir diferenciación celular (Lev *et al.*, (2006) *Neurosci Lett* 399 (1-2), 27-32). Después de 8 días de tratamiento, las células se cultivaron en medios de crecimiento recién preparados durante 0,5-4 horas seguido de incubación con péptido [beta]-sin 36 retro-inverso conjugado con FITC (fluorescencia de color verde). Después de incubación, las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron. La sobreexpresión de [alfa]-sin de tipo silvestre se detectó usando anticuerpo de cabra anti conejo conjugado con cy5 (fluorescencia de color púrpura) y la membrana celular se marcó usando reactivo de Faloidina (fluorescencia de color rojo). El etiquetado fluorescente se visualizó usando un microscopio confocal LSM-510 de Zeiss (Figuras 8A-E). Se examinaron dos concentraciones diferentes del péptido - 50 μM y 250 μM, mostrando resultados similares. Después de 30 minutos de incubación, el péptido no entraba en las células. Sin embargo, no se detectó unión a las células. Después de 2 horas de incubación, el péptido se detectó en mayor medida en la superficie celular. Se detectó poca cantidad dentro de la célula en la concentración de 250 μM. Después de 4 horas de incubación, el péptido se observaba claramente dentro de las células.

EJEMPLO 9

El efecto de péptido [beta]-sin 36 retro-inverso en un sistema de mosca transgénica in vivo

Para evaluar el efecto del péptido en [alfa]-sin en el organismo vivo, se usó un modelo de *Drosophila* de PD. Las moscas transgénicas sobreexpresan la A53P [alfa]-sin mutada en su sistema nervioso, a través del sistema GaW-UAS. Un fenotipo de comportamiento común de estas moscas es la locomoción defectuosa; mientras que las moscas normales tienden a escalar a lo largo del tubo, estas moscas permanecen en el fondo (Ueda *et al.*, (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (23), 11282-11286). El cruce de moscas macho que portan el director *elav-Gal4* pan-neuronal (en su cromosoma X) con hembras que portan el transgén de A53T [alfa]-sin regulado por UAS dio como resultado una descendencia femenina que expresaba A53T [alfa]-sin en su sistema nervioso. Este cruce se realizó en medio regular de *Drosophila* o en medio complementado con 0,75 mg/ml de péptido [beta]-sin 36 retro-inverso. La capacidad de escalada de las moscas se controló durante 27 días, mostrando una escalada de un 37 % de las moscas con PD sin tratar el día 27 en comparación con un 66 % de las moscas tratadas, lo que revela un aumento de un 30 % en comparación con el grupo sin tratar. El péptido no tenía efecto significativo en la locomoción de las moscas de control. Estos resultados revelaban una gran recuperación fenotípica de las moscas de A53T [alfa]-sin usando el péptido [beta]-sin 36 retro-inverso.

Referencias

(en todo el texto se mencionan otras Referencias)

1. Sipe, J. D. (1992) *Annu Rev Biochem* 61, 947-975
2. Wetzel, R. (1994) *Trends Biotechnol* 12 (5), 193-198
3. Harrison, R. S., Sharpe, P. C., Singh, Y., y Fairlie, D. P. (2007) *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (159), 1-77
4. Sipe, J. D., y Cohen, A. S. (2000) *J. Struct. Biol.* (130), 88-98
5. Rochet, J. C., Conway, K. A., y Lansbury, P. T., Jr. (2000) *Biochemistry* 39 (35), 10619-10626
6. Serpell, L. C. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* (1502), 16-30
7. Dobson, C. M. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* (356), 133-144
8. Gazit, E. (2002) *Faseb J* 16 (1), 77-83
9. Sacchettini, J. C., y Kelly, J. W. (2002) *Nat Rev Drug Discov.* (1), 267-275
10. Kaytor, M. D., y Warren, S. T. (1999) *J Biol Chem* 274 (53), 37507-37510
11. Ferrone, F. (1999) *Methods Enzymol* 309, 256-274
12. Bertonecini, C. W., Rasia, R. M., Lamberto, G. R., Binolfi, A., Zweckstetter, M., Griesinger, C., y Fernandez, C. O. (2007) *Mol Biol* 372(3), 708-722
13. Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., y Mucke, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (96), 3228-3233

14. Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., y McConlogue, L. (2000) *J. Neurosci.* (20), 4050-4058
15. Ashe, K. H. (2001) *Learn. Mem.* (8), 301-308
16. Klein, W. L., Krafft, G. A., y Finch, C. E. (2001) *Trends Neurosci.* (24), 219- 224
- 5 17. Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G., y Ashe, K. H. (2002) *J Neurosci* (22), 1858-1867
18. Lesne, S., Koh, M., T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., y Ashe, K. H. (2006) *Nature* (440), 352-357
19. Forno, L. S. (1996) *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (3), 259-272
- 10 20. Thomas, B., y Beal, M. F. (2007) *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R183-194
21. Lotharius, J., y Brundin, P. (2002) *Nat Rev Neurosci* 3 (12), 932-942
22. Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., y Goedert, M. (1997) *Nature* 388(6645), 839-840
- 15 23. Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G. Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. L. y Nussbaum, R. L. (1997) *Science* 276 (5321), 2045-2047
24. Waxman, E. A., y Giasson, B. I. (2008) *Biochim Biophys Acta*
25. Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., y George, J. M. (1998) *J Biol Chem* 273 (16), 9443-9449
- 20 26. Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., y Lansbury, P. T., Jr. (1996) *Biochemistry* 35 (43), 13709-13715
27. El-Agnaf, O. M., Paleologou, K. E., Greer, B., Abogreïn, A. M., King, J. E., Salem, S. A., Fullwood, N. J., Benson, F. E., Hewitt, R., Ford, K. J., Martin, F. L., Harriott, P., Cookson, M. R., y Allsop, D. (2004) *Faseb J* 18(11), 1315-1317
- 25 28. Biere, A. L., Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Jiang, Y., Anafi, D., Jacobsen, F. W., Jarosinski, M. A., Wu, G. M., Louis, J. C., Martin, F., Narhi, L. O., y Citron, M. (2000) *J Biol Chem* 275 (44), 34574-34579
29. Hashimoto, M., Hsu, L. J., Xia, Y., Takeda, A., Sisk, A., Sundsmo, M., y Masliah, E. (1999) *Neuroreport* 10 (4), 717-721
30. Jensen, P. H., Sorensen, E. S., Petersen, T. E., Gliemann, J., y Rasmussen, L. K. (1995) *Biochem J* 310 (Pt 1), 91-94
31. Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R., Goedert, M., y Fink, A. L. (2002) *J Biol Chem* 277(14), 11970-11978
32. Windisch, M., Hutter-Paier, B., Schreiner, E., y Wronski, R. (2004) *J Mol Neurosci* 24 (1), 155-165
33. Voiles, M. J., y Lansbury, P. T., Jr. (2007) *J Mol Biol* 366 (5), 1510-1522
- 35 34. Tsigelny, I. F., Bar-On, P., Sharikov, Y., Crews, L., Hashimoto, M., Miller, M. A., Keller, S. H., Platoshyn, O., Yuan, J. X., y Masliah, E. (2007) *Febs J* 274 (7), 1862-1877
35. Azriel, R., y Gazit, E. (2001) *J. Biol. Chem.* (276), 34156-34161
36. Gazit, E. (2002) *Bioinformatics* (18), 880-883
37. Porat, Y., Kolusheva, S., Jelinek, R., y Gazit, E. (2003) *Biochemistry* (42), 10971-10977
- 40 38. Mazar, Y., Gilead, S., Benhar, L. y Gazit, E. (2002) *J. Mol. Biol.* (322), 1013-1024
39. Reches, M., y Gazit, E. (2003) *Science* (300), 625-627
40. Reches, M., y Gazit, E. (2004) *Amyloid* (11), 81-89
41. Lev, N., Melamed, E., y Offen, D. (2006) *Neurosci Lett* 399 (1-2), 27-32
42. Feany, M. B., y Bender, W. W. (2000) *Nature* 404 (6776), 394-398
- 45 43. Ueda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D. A., Kondo, J., Ihara, Y., y Saitoh, T. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (23), 11282-11286
44. Kessler, J. C., Rochet, J. C., y Lansbury, P. T., Jr. (2003) *Biochemistry* 42 (3), 672-678
45. Lee, H. J., Patel, S., y Lee, S. J. (2005) *J Neurosci* 25 (25), 6016-6024
46. Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R., y Lee, S. J. (2008) *Int J Biochem Cell Biol* 40 (9), 1835-1849.

Aunque la invención se ha descrito en conjunto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Por consiguiente, se pretende incluir todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Además, la mención o identificación de cualquier referencia en la presente solicitud no se deberá interpretar como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en la que se usa en títulos de sección, no se deberían interpretar como necesariamente limitantes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ramot At Tel Aviv University Ltd. Shaltiel-Karyo, Ronit Gazit, Ehud

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

ES 2 564 265 T3

<130> 48294
 <150> US 61/202.523
 <151> 09-03-2009
 5
 <160> 60
 <170> PatentIn versión 3.5
 10
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 1
 Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg
 1 5 10
 20
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400>2
 Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu
 1 5 10
 30
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 3
 Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly
 1 5 10
 40
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 4
 Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
 1 5 10
 50
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 5

ES 2 564 265 T3

		Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu 1 5 10
5	<210> 6 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético <400> 6	
10		Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu 1 5 10
15	<210> 7 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético <400> 7	
20		Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys 1 5 10
25	<210> 8 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético <400> 8	
30		Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys 1 5 10
35	<210> 9 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético <400> 9	
40		Val Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln 1 5 10
45	<210> 10 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético <400> 10	
50		Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly 1 5 10
	<210> 11 <211> 10 <212> PRT	

ES 2 564 265 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5
 <400> 11
 Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 13
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 15 <400> 12
 Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 13
 Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 35 <400> 14
 Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 134
 40 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15
 Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val

ES 2 564 265 T3

```

1             5             10             15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
      20                               25                               30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
      35                               40                               45

Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
      50                               55                               60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
      65                               70                               75                               80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
      85                               90                               95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
      100                               105                               110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
      115                               120                               125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
      130

```

<210> 16
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

```

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
1           5                               10                               15

Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys
      20                               25                               30

Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val
      35                               40                               45

Val Gln Gly Val Ala Ser Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Ala Ser
      50                               55                               60

His Leu Gly Gly Ala Val Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
      65                               70                               75                               80

Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro Glu
      85                               90                               95

Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met
      100                               105                               110

Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln
      115                               120                               125

Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
      130

```

ES 2 564 265 T3

5
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 17
 Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val Val
 1 5 10

10
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 18
 Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val
 1 5 10

15
 <210> 19
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 19
 Leu Ser
 1

20
 <210> 20
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 20
 Gly Leu
 1

25
 <210> 21
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 21
 Lys Glu Gly
 1

30
 <210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

35
 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

40
 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

45
 <210> 25
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

50
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

55
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 564 265 T3

	<400> 22		
		Gly Val Leu Trp Val Gly Ser Lys Thr Arg 1 5 10	
5	<210> 23 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Péptido sintético <400> 23		
		Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met 1 5 10	
15	<210> 24 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Péptido sintético <400> 24		
		Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala 1 5 10	
25	<210> 25 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Péptido sintético <400> 25		
		Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys 1 5 10	
35	<210> 26 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
40	<220> <223> Péptido sintético <400> 26		
		Phe Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu 1 5 10	
45	<210> 27 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Péptido sintético <400> 27		
		Met Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly 1 5 10	
55	<210> 28 <211> 10 <212> PRT		

ES 2 564 265 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5 <400> 28
 Lys Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 15 <400> 29
 Gly Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 25 <400> 30
 Leu Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val Ala
 1 5 10
 <210> 31
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 35 <400> 31
 Ser Met Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala
 1 5 10
 <210> 32
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 45 <400> 32
 Met Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala
 1 5 10
 <210> 33
 <211> 10
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 55 <400> 33

ES 2 564 265 T3

		Ala Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu 1 5 10
	5	<210> 34 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético
	10	<400> 34 Lys Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys 1 5 10
	15	<210> 35 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético
	20	<400> 35 Glu Gly Val Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr 1 5 10
	25	<210> 36 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético
	30	<400> 36 Lys Thr Lys Gln Gly Val Thr Glu Ala Ala 1 5 10
	35	<210> 37 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético
	40	<400> 37 Val Thr Glu Ala Ala Glu Lys Thr Lys Glu 1 5 10
	45	<210> 38 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Péptido sintético
	50	<400> 38 Glu Lys Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val 1 5 10
		<210> 39 <211> 7 <212> PRT

ES 2 564 265 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 5
 <400> 39

 Ser Met Ala Lys Glu Gly Val
 1 5

 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10

 <220>
 <223> Péptido sintético
 15
 <400> 40

 Gly Ser Lys Thr Arg Glu Gly Val Val Gln
 1 5 10

 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

 <220>
 <223> Péptido sintético
 25
 <400> 41

 Glu Gly Val Val Gln Gly Val Ala Ser Val
 1 5 10

 <210> 42
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

 <220>
 <223> Péptido sintético
 35
 <400> 42

 Phe Ser Gly Ala Gly Asn Ile Ala Ala Ala
 1 5 10

 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <223> Péptido sintético
 45
 <400> 43

 Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Leu Val Lys
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Péptido sintético
 55

ES 2 564 265 T3

	<code><400> 44</code>		
		<code>Thr Gly Leu Val Lys Arg Glu Glu Phe Pro</code> <code>1 5 10</code>	
5	<code><210> 45</code> <code><211> 10</code> <code><212> PRT</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
10	<code><223> Péptido sintético</code>		
	<code><400> 45</code>		
		<code>Arg Glu Glu Phe Pro Thr Asp Leu Lys Pro</code> <code>1 5 10</code>	
15	<code><210> 46</code> <code><211> 10</code> <code><212> PRT</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
20	<code><223> Péptido sintético</code>		
	<code><400> 46</code>		
		<code>Thr Asp Leu Lys Pro Glu Glu Val Ala Gln</code> <code>1 5 10</code>	
25	<code><210> 47</code> <code><211> 10</code> <code><212> PRT</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
30	<code><223> Péptido sintético</code>		
	<code><400> 47</code>		
		<code>Glu Glu Val Ala Gln Glu Ala Ala Glu Glu</code> <code>1 5 10</code>	
35	<code><210> 48</code> <code><211> 10</code> <code><212> PRT</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
40	<code><223> Péptido sintético</code>		
	<code><400> 48</code>		
		<code>Glu Ala Ala Glu Glu Pro Leu Ile Glu Pro</code> <code>1 5 10</code>	
45	<code><210> 49</code> <code><211> 10</code> <code><212> PRT</code> <code><213> Secuencia artificial</code>		
	<code><220></code>		
50	<code><223> Péptido sintético</code>		
	<code><400> 49</code>		
		<code>Pro Leu Ile Glu Pro Leu Met Glu Pro Glu</code> <code>1 5 10</code>	
	<code><210> 50</code>		

ES 2 564 265 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 50

Leu Met Glu Pro Glu Gly Glu Ser Tyr Glu
 1 5 10

10

<210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 51

Gly Glu Ser Tyr Glu Asp Pro Pro Gln Glu
 1 5 10

20

<210> 52
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 52

Asp Pro Pro Gln Glu Glu Tyr Gln Glu Tyr
 1 5 10

30

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Péptido sintético

40

<400> 53

Glu Tyr Gln Glu Tyr Glu Pro Glu Ala
 1 5

<210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido sintético

50

<400> 54

Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg
 1 5 10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

55

ES 2 564 265 T3

<223> Péptido sintético

<400> 55

Arg Thr Lys Ser Gly Val Tyr Leu Val Gly
1 5 10

5 <210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

15 <220>
<221 > misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> péptido N' acetilado

20 <220>
<221 > misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> amida C'

<400> 56

Arg Thr Lys Ser Gly Val Tyr Leu Val Gly
1 5 10

25 <210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 57

Tyr Val Gly Ser Lys Thr Arg
1 5

35 <210> 58
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 58

Lys Thr Arg
1

45 <210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 59

Lys Thr Arg Glu
1

55 <210> 60
<211> 4

ES 2 564 265 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 60

Lys Thr Arg Gly
1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado que tiene una longitud de 10 aminoácidos, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°: 1-4 y 55, péptido que es capaz de inhibir la agregación de alfa-sinucleína.
2. El péptido de la reivindicación 1, que tiene una modificación de protección terminal.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, el péptido de la reivindicación 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un método *in vitro* para inhibir la agregación de alfa-sinucleína, método que comprende poner en contacto la alfa-sinucleína con el péptido de la reivindicación 1 o 2, inhibiendo de ese modo la agregación de alfa-sinucleína.
- 15 5. El péptido de la reivindicación 1 o 2, para uso en el tratamiento o prevención de una afección médica asociada con agregación de alfa-sinucleína.
- 20 6. El péptido de la reivindicación 1 o 2, para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha afección médica se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de cuerpos de Lewy difusos, AD-PD mixta, atrofia de múltiples sistemas y enfermedad de Hallervorden-Spatz.
7. Un método para detectar monómeros de alfa-sinucleína, método que comprende:
- 25 (a) poner en contacto una muestra biológica de la que se sospecha que comprende dichos monómeros de alfa-sinucleína con el péptido de la reivindicación 1 en condiciones que permiten la formación de complejos entre dichos monómeros y dicho péptido; y
(b) detectar la presencia o nivel de dicho complejo, detectando de ese modo, monómeros de alfa-sinucleína.

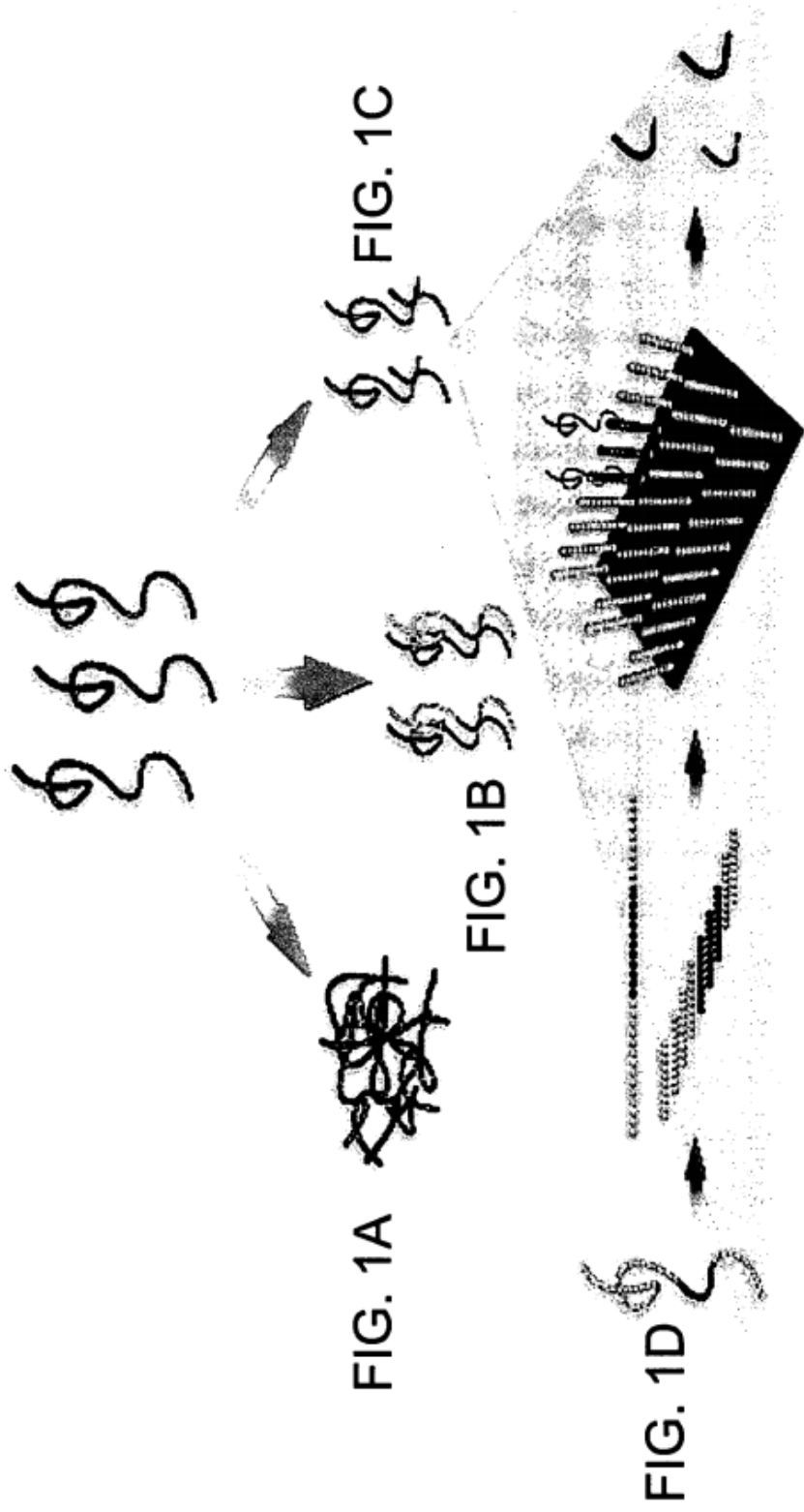
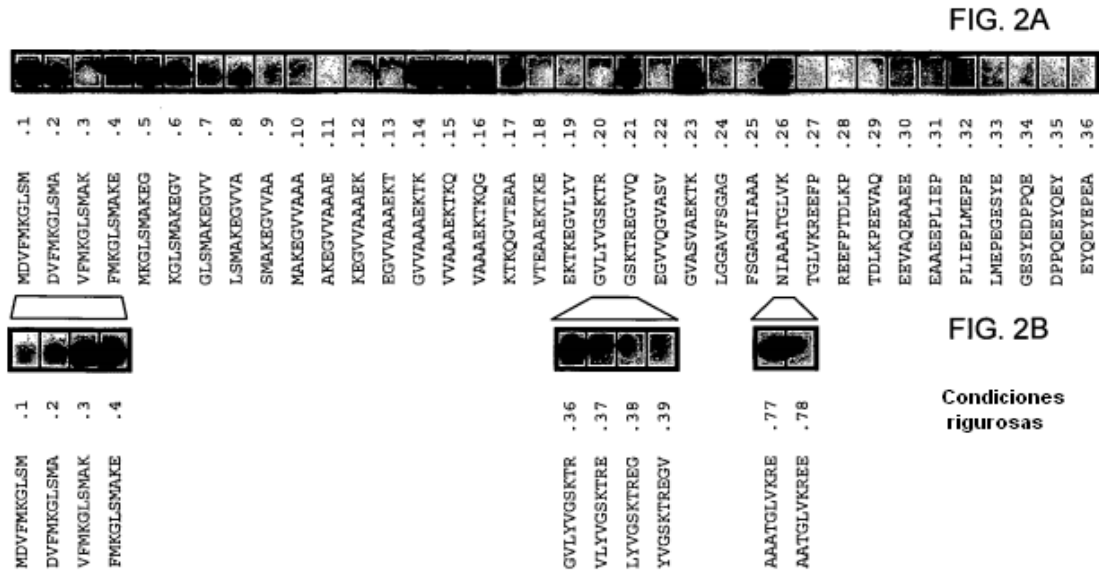


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

FIG. 1D



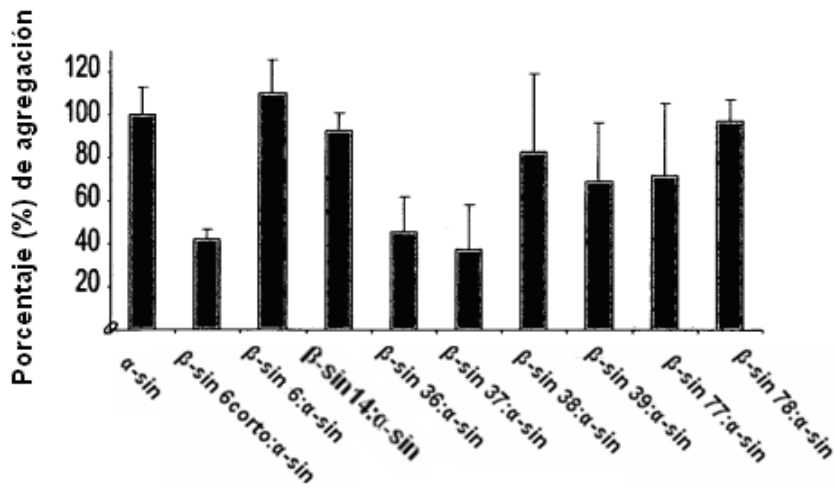


FIG. 3A

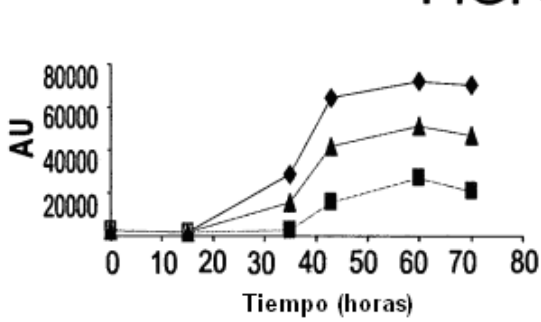


FIG. 3B

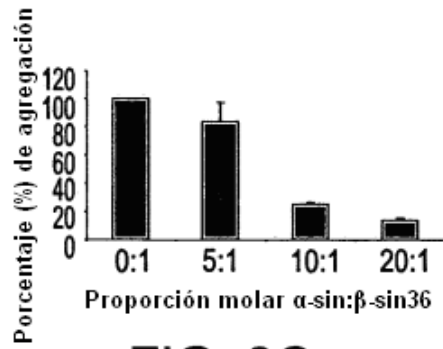


FIG. 3C

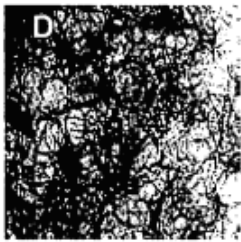


FIG. 3D

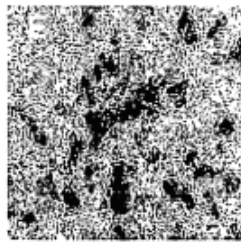


FIG. 3E

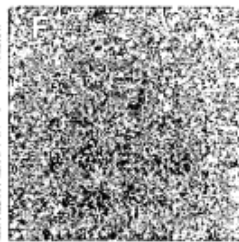


FIG. 3F

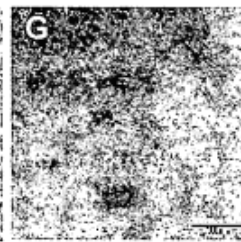


FIG. 3G

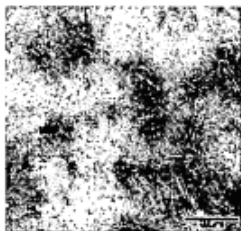


FIG. 3H

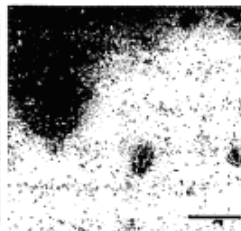


FIG. 3I



FIG. 3J

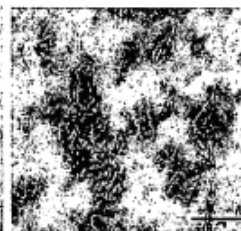


FIG. 3K

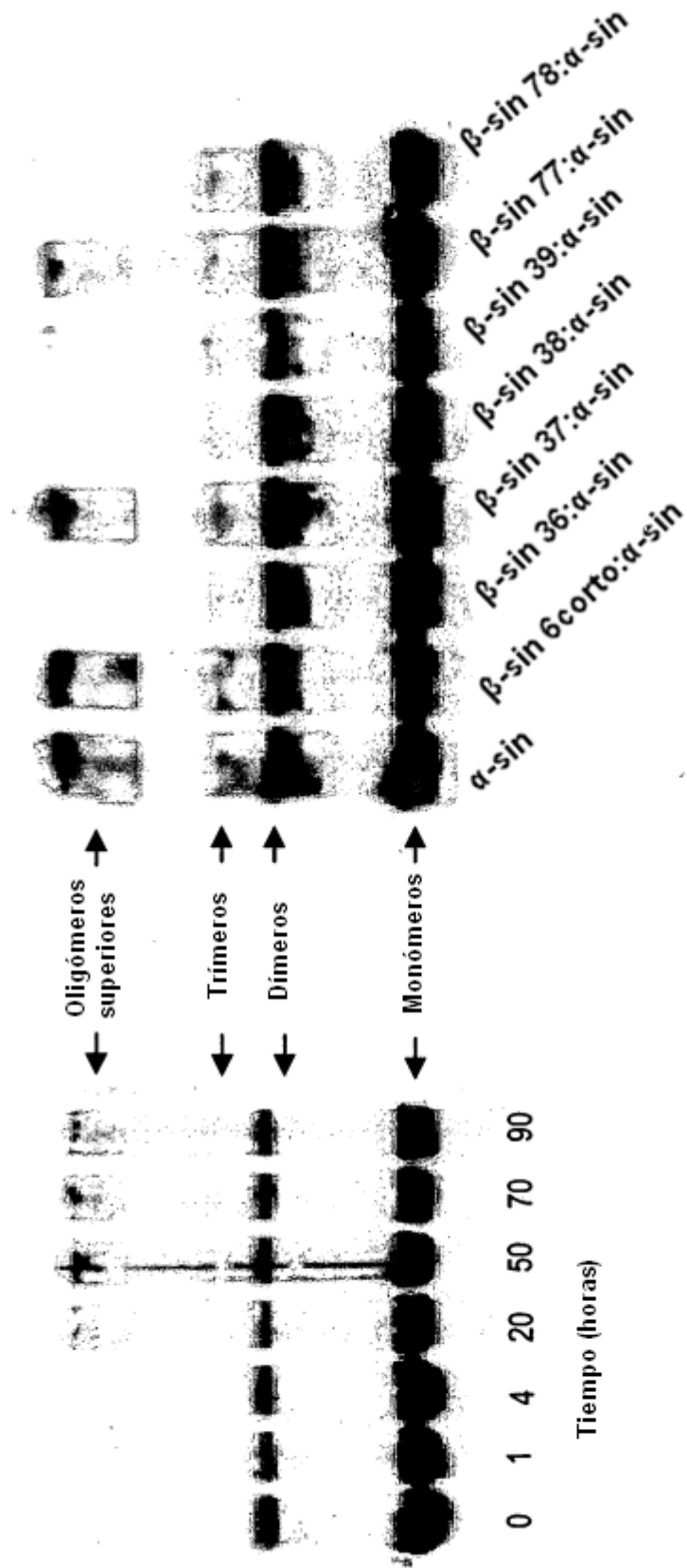


FIG. 4B

FIG. 4A

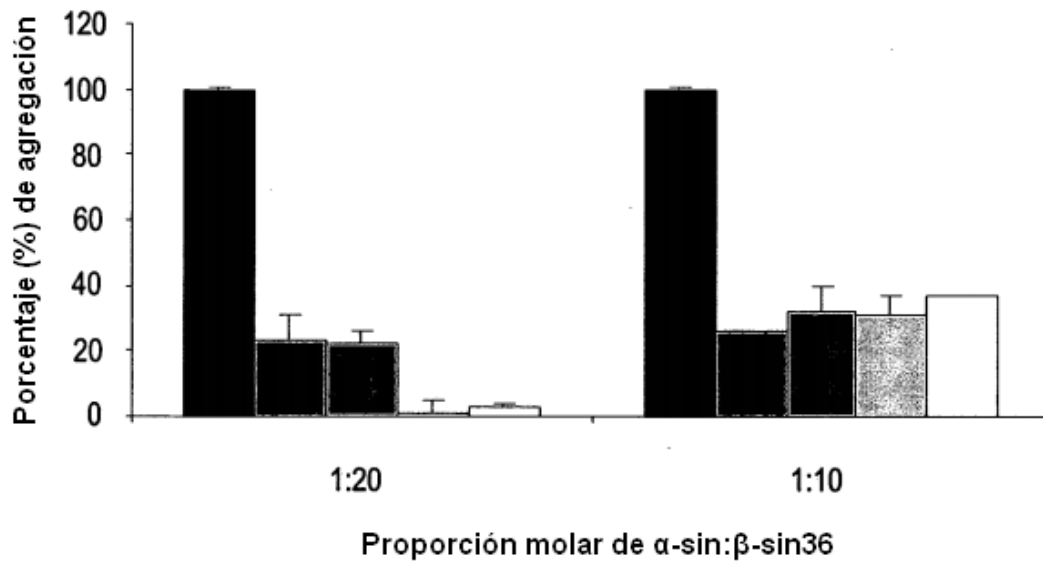


FIG. 5A

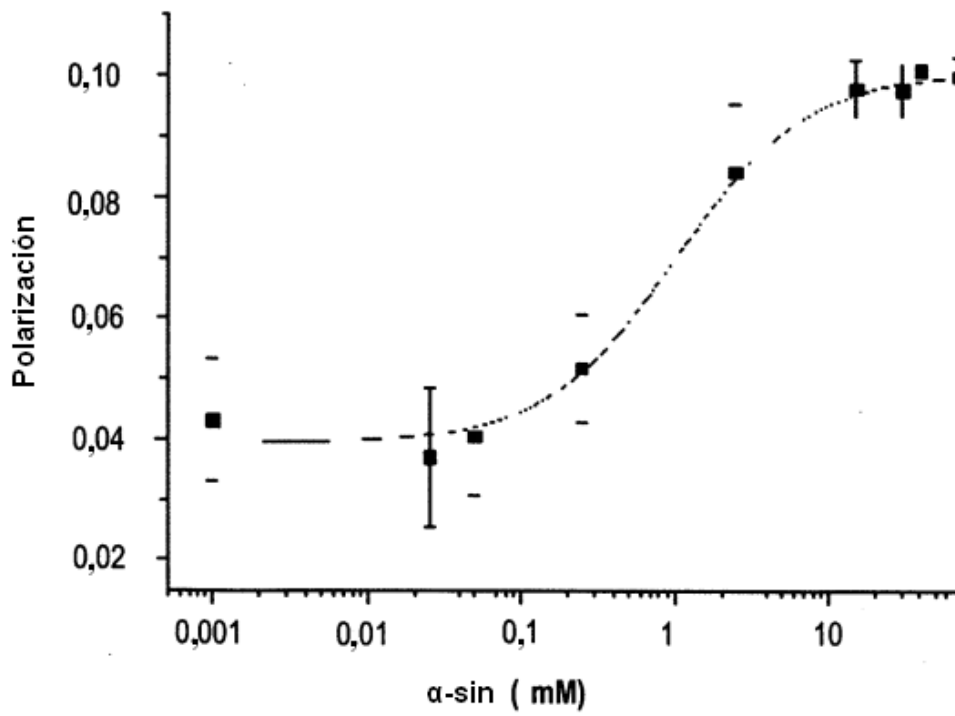


FIG. 5B

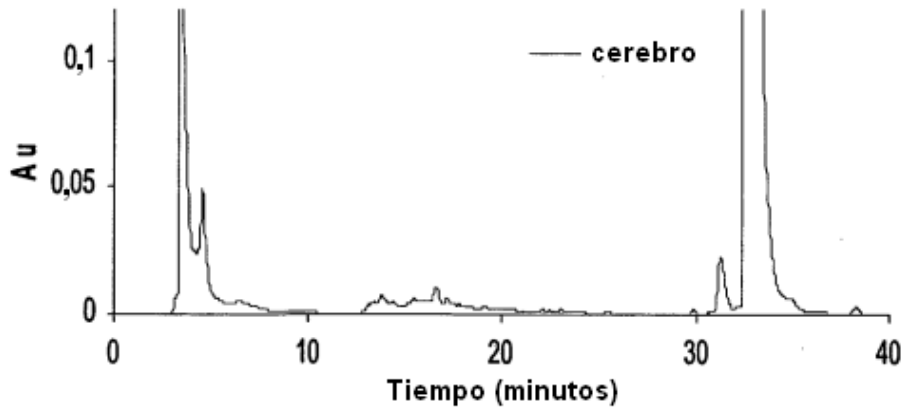


FIG. 6A

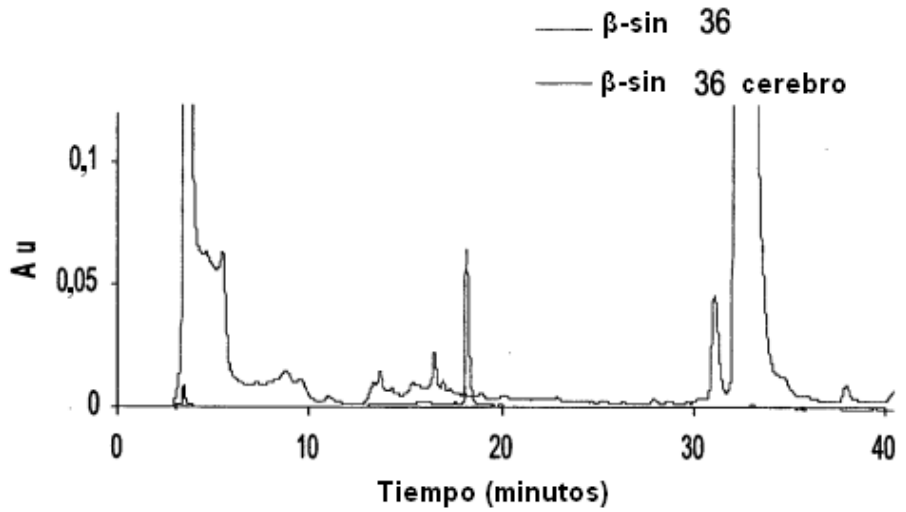


FIG. 6B

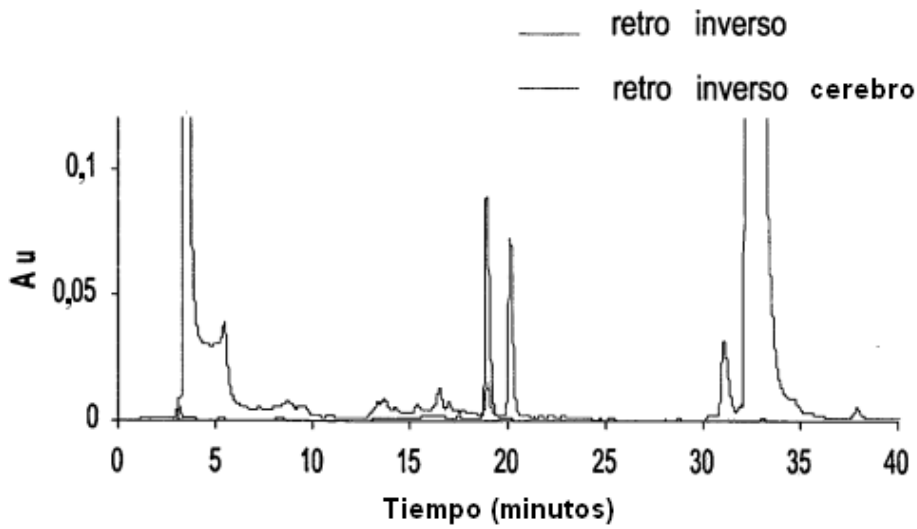


FIG. 6C

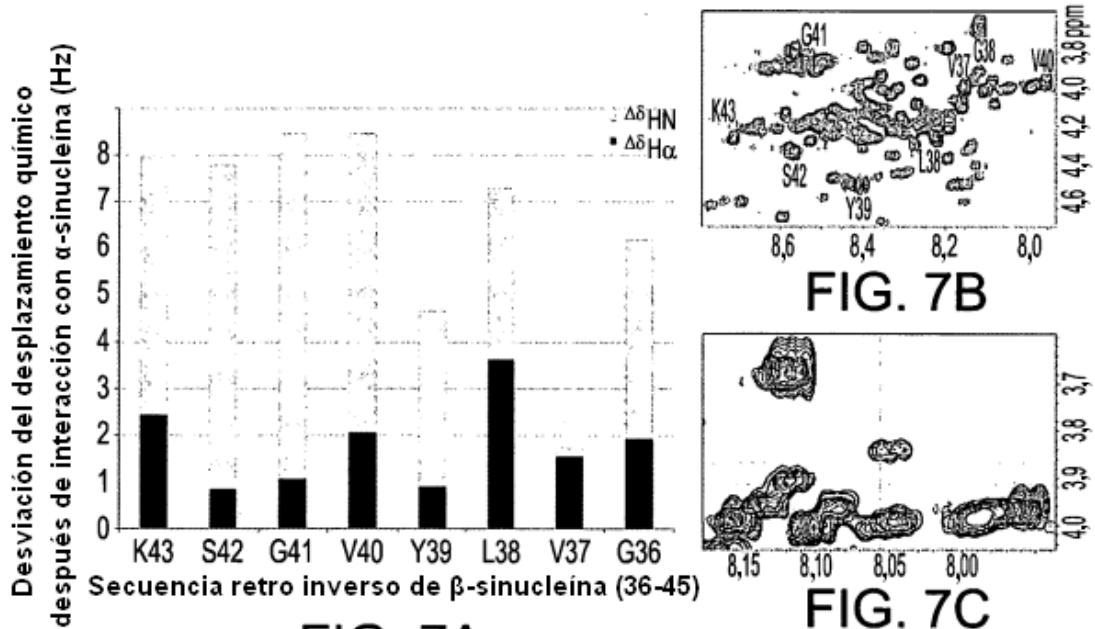


FIG. 7A

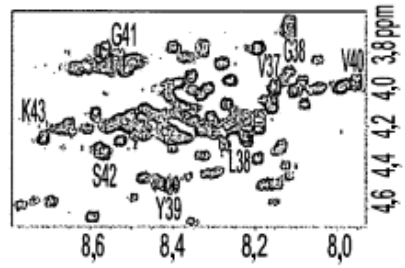


FIG. 7B

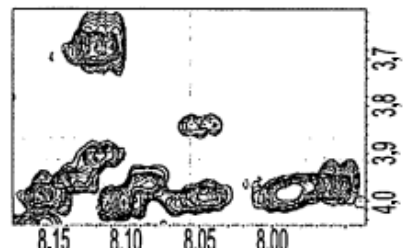


FIG. 7C

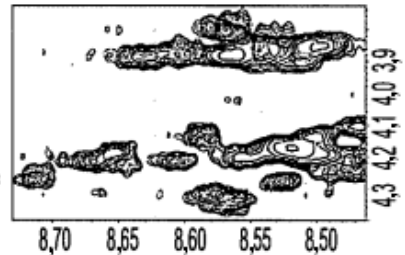


FIG. 7D

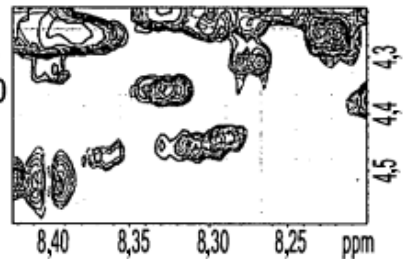


FIG. 7E

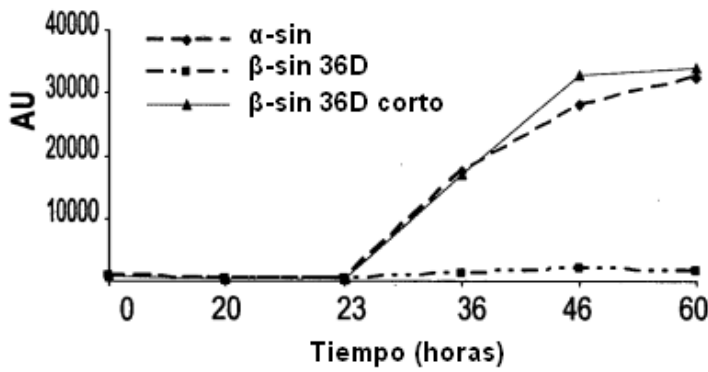


FIG. 7F

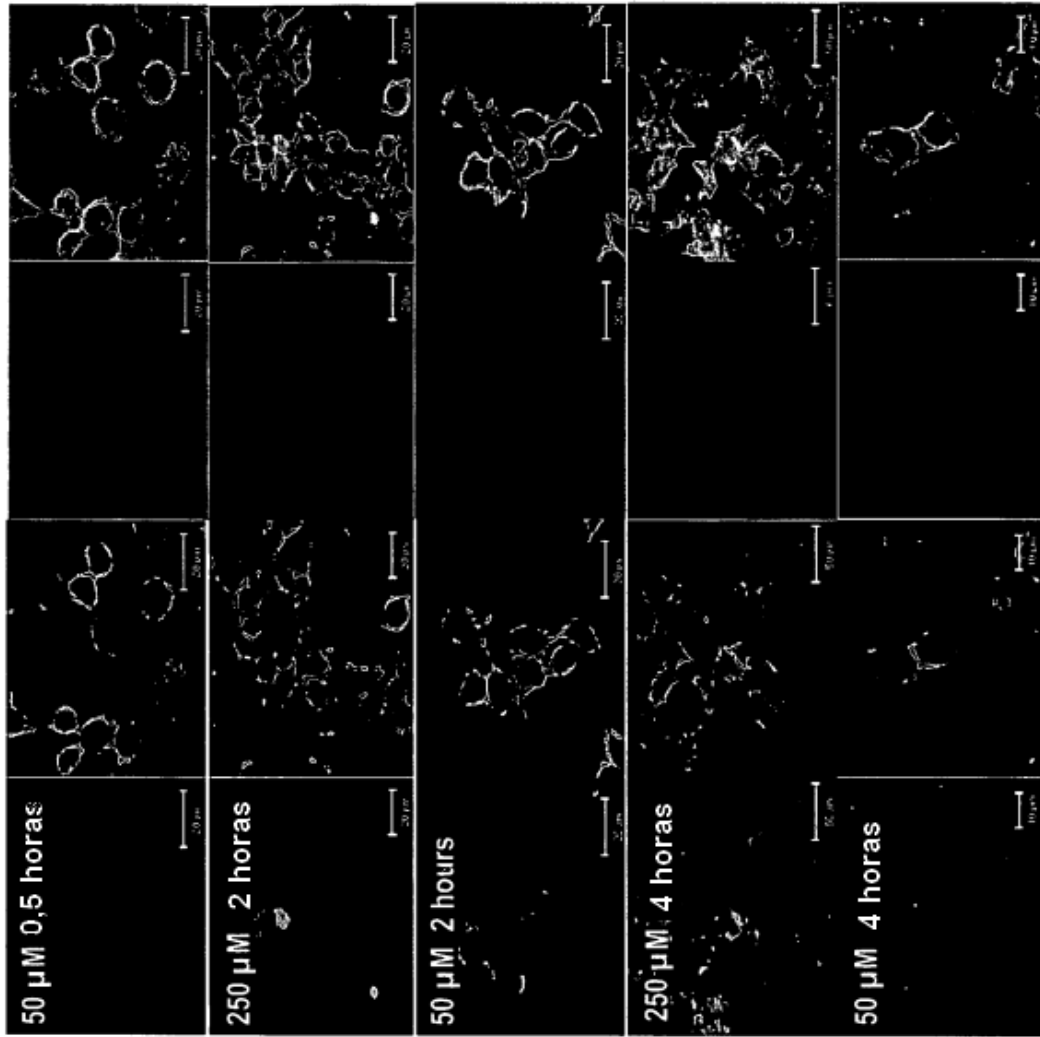


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

FIG. 8D

FIG. 8E

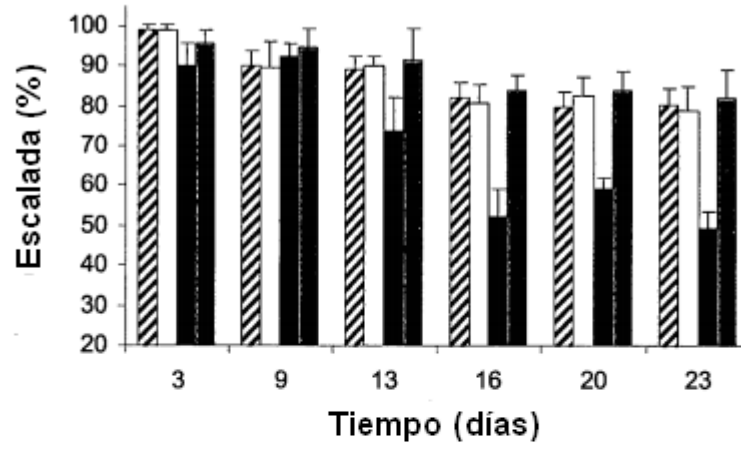


FIG. 9

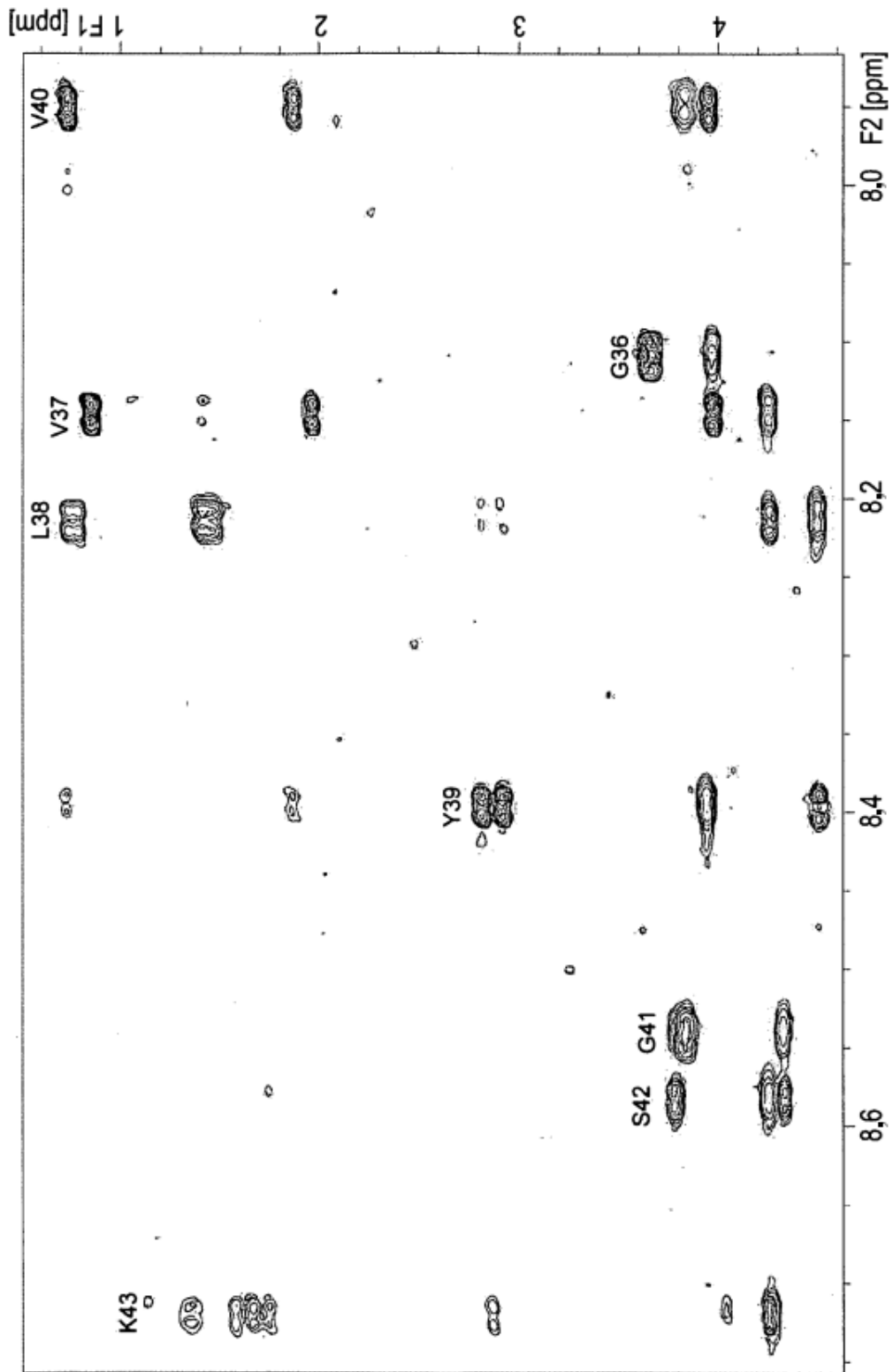


FIG. 10