

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 573**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2009 PCT/EP2009/050446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09090227**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2009 E 09702027 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2244718**

54 Título: **Péptidos que tienen afinidad de unión por un anticuerpo que reconoce un epítipo en un bucle 2 de α_1 o bucle 1 de β_2 de un receptor adrenérgico**

30 Prioridad:

15.01.2008 EP 08100510

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

27.10.2017

73 Titular/es:

**MDC MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR
MOLEKULARE MEDIZIN BERLIN - BUCH (50.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin-Buch, DE y
FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUNZE, RUDOLF;
WALLUKAT, GERD;
ROSENTHAL, PETER y
STRAUBE, RICHARD**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 639 573 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

Péptidos que tienen afinidad de unión por un anticuerpo que reconoce un epítipo en un bucle 2 de α_1 o bucle 1 de β_2 de un receptor adrenérgico.

5 La invención se refiere a un péptido que tiene afinidad de unión a un anticuerpo que reconoce un epítipo en un bucle 2 de α_1 o bucle 1 de β_2 de un receptor adrenérgico, a fases sólidas para cromatografía de afinidad o extracción en fase sólida que consisten en polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos o en polímeros mixtos. También se dan a conocer una molécula de ácido nucleico aislada, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico, una célula huésped que comprende el vector, un dispositivo para retirar inmunoglobulinas de líquidos que contienen inmunoglobulina sobre fases sólidas, una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico, un péptido y/o una fase sólida de la invención junto con un portador farmacéuticamente tolerable, un kit que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención, un vector de la invención, una célula huésped de la invención, así como un aparato para cromatografía, que comprende péptidos de la invención.

15 La enfermedad de Alzheimer (EA), que se llama así por su descubridor Alois Alzheimer (1864-1915), es una enfermedad degenerativa progresiva. Se caracteriza por cambios en la estructura y función celular cerebral provocados por depósitos de proteínas agregadas con amplias consecuencias para funciones cerebrales esenciales. Las siguientes características clínicas y cognitivas son esenciales:

- trastornos de la memoria a corto plazo en un principio, y más adelante de la memoria a largo plazo
- trastornos de la percepción de patrones de reconocimiento sencillos
- pérdida progresiva del habla y de la capacidad de articulación
- 20 • pérdida progresiva del sentido del olfato, de la orientación espacial y reducción de la capacidad para realizar tareas rutinarias.

25 El diagnóstico de "EA" se obtiene mediante diferentes métodos, por ejemplo, con métodos de obtención de imágenes, tales como tomografía computarizada (TC) o tomografía por resonancia magnética (TRM) y mediante la determinación química en el laboratorio de las concentraciones de las moléculas patológicas implicadas en el líquido cefalorraquídeo. También puede recurrirse a la electroencefalografía (EEG). Las pruebas cognitivas, tales como el mini-examen cognoscitivo (MEC) están recibiendo cada vez más importancia.

30 Si no se trata, la enfermedad es una "calle de un único sentido" que da inevitablemente como resultado un deterioro de la situación clínica a lo largo de varios años hasta terminar con la muerte. Cuanto más avanzado es el estadio de la enfermedad, más intensos se vuelven los cuidados y el coste del paciente. Esto también es cierto para otras formas de demencia (representando la EA aproximadamente dos tercios de todos los casos de demencia), las cuales sin embargo no se abordarán aquí.

35 La prevalencia de la enfermedad depende en gran medida de la edad. Entre las personas de 60 a 70 años de edad, es de aproximadamente el 1%, y entre las de 70 a 80 años de edad, es de hasta aproximadamente el 10%. Dado que la esperanza de vida de las personas en Alemania está aumentando continuamente, debe esperarse otro aumento del número de casos.

Actualmente, la incidencia anual para la EA en Alemania es de 130000 a 140000 casos (Hallauer, 2003), un número que, sin embargo, requiere interpretación. Dado que la forma leve es poco evidente, la mayoría de los pacientes tendrán probablemente una intensidad media de la enfermedad.

40 Hace algunos años, la enfermedad todavía se consideraba un capricho del destino que no podía curarse. Se han tratado casos intensos con sedantes y neurolépticos para la sedación. Mientras tanto, están disponibles fármacos de primera generación; se emplean principalmente en el estadio medio, moderado. Los ejemplos incluyen productos farmacéuticos aprobados, tales como Axura (principio activo: memantina) o Exelone (principio activo: rivastigmina). Según el estado publicado del estudio, estos agentes tienen una buena eficacia para intensidades leve y media de la EA. Sin embargo, según metanálisis se niega la eficacia clínica de Exelone y otros inhibidores de colina esterasa.

45 Aunque hay medicamentos aprobados disponibles en el mercado y pueden recetarse las preparaciones, no se trata a todos los pacientes ni mucho menos.

50 Parece que se ejerce cierto efecto profiláctico sobre la EA mediante fármacos antiinflamatorios, tales como ácido acetilsalicílico (aspirina), ibuprofeno, indometazina o inhibidores de COX2. Evidentemente, los mediadores de la inflamación o inflamaciones locales y sistémicas desempeñan un papel promotor de la enfermedad en el organismo/cerebro, probablemente debido a una aceleración de la formación de neurofibrillas.

Los agentes reductores del colesterol, tales como estatinas, también parecen tener una influencia favorable sobre el riesgo de desarrollar EA. Al menos, los pacientes que reciben agentes reductores del colesterol muestran una menor incidencia de EA. Sin embargo, no se dispone de datos científicos fiables para respaldar esto.

5 La situación es similar con los agentes hipotensores, tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Además de un efecto directo de estos principios activos, la reducción de la tensión arterial sistólica también está asociada generalmente con los efectos preventivos observados.

10 Las inmunizaciones de pacientes con β -amiloide están en la fase experimental de una terapia. En respuesta, el sistema inmunitario produce anticuerpos que después destruyen las placas de amiloide mediante una reacción inflamatoria local. Este enfoque parece ser prometedor, pero no es indiscutible, ya que implica altos riesgos. Probablemente, las respuestas inmunitarias inflamatorias individuales que se usan terapéuticamente no pueden dosificarse con tanta precisión como se requeriría. Otros enfoques terapéuticos experimentales se basan en la compensación de una deficiencia cerebral de iones de cobre, lo que evidentemente desempeña un papel en la formación de placas.

15 Actualmente todavía no se ha encontrado respuesta a la cuestión de si los medicamentos sólo pueden lograr básicamente una parada, o también una mejora clínica del estado cognitivo de los pacientes. Los medios actualmente disponibles estabilizan la situación clínica en vez de mejorarla.

Todavía no se ha aclarado definitivamente la propia patogénesis de la EA. Se han reconocido varios factores de riesgo. Estos incluyen la edad, hipertensión, altos niveles de colesterol, sobrepeso, apolipoproteína E4, deficiencia en cobre, determinadas predisposiciones genéticas y posiblemente estrés oxidativo. El desarrollo de la enfermedad es muy probablemente multifactorial.

20 Existe una gran cantidad de referencias sobre moléculas que desempeñan o pueden desempeñar un papel en el desarrollo y la progresión de la EA. En cuanto a una definición del término, puede mencionarse en este caso que la mayoría de las denominadas moléculas patológicas son componentes de procesos y estructuras fisiológicas en el organismo sano. Se consideran patológicas si superan límites de concentración, en el plasma o localmente en el tejido, a nivel intercelular o intracelular. Esto es cierto tanto para proteínas disueltas como para moléculas agregadas (por ejemplo, β -amiloide en forma de placa).

La agregación o el depósito de dos moléculas de proteínas diferentes, en sí mismas fisiológicas, en el cerebro en espacios intercelulares o intracelulares provoca trastornos fundamentales de la función neuronal en la transmisión de señales y la interacción de neuronas. Estas proteínas son esencialmente el péptido β -amiloide neurotóxico (agregado como polímero en forma de placa de amiloide) y la proteína Tau, un polímero agregado como ovillos neurofibrilares.

30 Los denominados amiloides están evidentemente implicados de manera causal en el desarrollo de la EA. Después de eso, se produce un aumento de la formación de amiloide- β 40/42 mediante escisión enzimática de la molécula a partir de la membrana de las células nerviosas. Esto da como resultado una concentración localmente aumentada de moléculas de β -amiloide individuales, oligómeros de β -amiloide y su agregación para dar placas de amiloide. Estas placas alteran la transmisión normal de estímulos por los nervios y la comunicación entre las células. La escisión de β -amiloides que pueden agregarse a partir de las moléculas precursoras se realiza mediante la denominada γ -secretasa. La actividad de esta enzima está controlada por el receptor β ₂-adrenérgico.

40 Las placas pueden dar como resultado a su vez la generación de ovillos neurofibrilares de la proteína Tau, que normalmente está localizada fisiológicamente en los tramos axónicos de las células nerviosas. El depósito de estos agregados tiene lugar en una amplia variedad de zonas cerebrales. El proceso de formación de placas avanza a lo largo de muchos años desde el comienzo hasta la aparición de la enfermedad.

Tanto las placas como los ovillos neurofibrilares pueden visualizarse bien mediante microscopía en secciones de cerebro de pacientes fallecidos con EA y son una parte importante del diagnóstico.

45 También se comenta en paralelo un papel patomecánico de otras moléculas, incluyendo el papel de la apolipoproteína E4. Además, proteínas plasmáticas reológicamente relevantes parecen estar implicadas en el desarrollo de la situación clínica, al menos de manera indirecta. Estas incluyen un aumento o aumento moderado de niveles sistémicos y concentraciones locales de alfa-2-macroglobulina, fibrinógeno, pero también proteínas plasmáticas oxidadas a partir de reacciones de estrés oxidativo, tales como lipoproteína de baja densidad oxidadada (oxLDL).

50 La suma de efectos de estas moléculas puede contribuir a una circulación en sangre reducida a través de las zonas cerebrales y, por tanto, inducir el comienzo de la enfermedad y fomentar su desarrollo y mantenimiento. La tabla 1 proporciona un estudio de moléculas patológicas importantes.

Tabla 1: Estudio de moléculas patológicas de la enfermedad de Alzheimer en el plasma sanguíneo

Moléculas patológicas en la EA	PM	Comentario
fragmentos de β -amiloide oligómeros de β -amiloide	< 4.000 > 4.000	fragmentos de β -amiloide que tienen propiedades neurotóxicas
β -amiloide o fragmentos del mismo unidos a albúmina	> 70.000	la albúmina es la proteína plasmáticas más importante para el aclaramiento fisiológico de sustancias nocivas
apolipoproteína E, especialmente E4	aproximadamente 34.000 (monómero)	predispuesta para EA, puede estar contenida en placas
citocinas proinflamatorias IL1 β , IL6, TNF α	16.000-50.000 (monómero y trímero, respectivamente)	niveles aumentados en el cerebro, neurotóxicas
proteína C reactiva (CRP)	120.000	implicada en la formación de placas, potencia la degradación celular en necrosis
fibrinógeno	340.000	reológicamente eficaz debido a su tamaño, reduce la circulación a través de capilares
L-quinurenina	208	precursor neurotóxico de 3OH-K, interacciona con receptores de glutamato
homocisteína, no unida	268	inhibe la degradación de ADMA y por tanto reduce la vasodilatación
dimetilarginina asimétrica (ADMA)	202	inhibe la NO sintetasa y por tanto da como resultado hipoperfusión
estrés oxidativo (productos de reacción)	variable, también micropartículas	puede inducirse directamente por β -amiloide, pero también se forman mediante hipoperfusión

El grupo más ampliamente estudiado de enfermedades asociadas con agAAB contra GPCR son las enfermedades cardiacas. En la miocarditis, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía del periparto, enfermedad de Chagas y arritmias ventriculares, pueden detectarse agAAB contra el β_1 -AR en los sueros de pacientes con enfermedades con diagnóstico clínico.

5 DCM y miocarditis son trastornos cardiacos graves, y se ha planteado la hipótesis de que una miocarditis crónica puede evolucionar para dar DCM. En ambas enfermedades, una infección con un enterovirus u otros agentes puede ser el agente etiológico primario, pero la respuesta inflamatoria puede haber evolucionado para dar una enfermedad autoinmunitaria. En un estadio posterior, el agente infeccioso puede no ser detectable, e incluso puede haberse reducido la respuesta inflamatoria, sin embargo, se diagnostica una insuficiencia cardiaca progresiva crónica. La DCM se caracteriza por una insuficiencia cardiaca intensa. En un subconjunto de DCM, la DCM idiopática, en la que pueden excluirse otros agentes etiológicos, la prevalencia del AAB β_1 -adrenérgico de hasta el 80% es notable. La miocarditis y DCM se tratan preferiblemente mediante antagonistas del receptor β_1 -adrenérgico y del sistema renina-angiotensina y reposo físico.

15 El objetivo terapéutico es reducir la sobreestimulación cardiaca y prevenir arritmias. El uso terapéutico de betabloqueantes en la reducción de la sobreestimulación adrenérgica va acompañado por una reducción significativa de la muerte por causa cardiaca y hospitalización en los pacientes sujetos del estudio. Las arritmias ventriculares son una causa principal de muerte súbita en DCM dilatada y se ha mostrado que las taquicardias ventriculares están fuertemente relacionadas con la detección de agAAB contra el β_1 -AR.

20 La progresión crónica de la insuficiencia cardiaca en DCM conduce a un estadio de la enfermedad en el que ya no es posible una medicación satisfactoria. En este estadio, sólo puede considerarse un trasplante de corazón como terapia sostenible durante algunos años. La DCM es la causa de aproximadamente la mitad de los trasplantes de corazón. Una ampliación de las opciones terapéuticas podría muy probablemente prevenir un número sustancial de muertes prematuras en el caso de insuficiencia cardiaca intensa.

25 De manera similar a la DCM, la miocardiopatía del periparto se caracteriza por una dilatación del ventrículo izquierdo y puede evolucionar para dar un trastorno potencialmente mortal. La incidencia es de aproximadamente 1:1000 en mujeres sudafricanas, mientras que la enfermedad es rara entre las poblaciones de raza blanca en países occidentales. La etiología de la miocardiopatía del periparto se desconoce en gran medida. Por definición, se diagnostica entre el último mes antes del parto y el 4º mes después del parto. Recientemente se mostró la presencia de agAAB contra el β_1 -AR en todos los sueros de una muestra de 10 pacientes que padecían miocardiopatía del periparto.

30 La enfermedad de Chagas está provocada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y es muy común en Sudamérica. Entre otros síntomas, los pacientes desarrollan con frecuencia una miocarditis como parte del síndrome disautónomo que

afecta a todo el sistema colinérgico. Hay muchas evidencias de que el síndrome disautónomo también está provocado por AAB funcionales contra el receptor M₂ muscarínico de acetilcolina. La prevalencia de agAAB contra el receptor M₂ oscila entre el 50-94%. En la enfermedad de Chagas, también pueden encontrarse AAB contra el β₁-AR en aproximadamente el 53% de los casos. Esta situación puede representar el mimetismo antigénico de originalmente el mismo antígeno de *T. cruzi*, con un antagonismo funcional como epifenómeno.

Con respecto a la naturaleza patogénica de los agAAB descritos, en el siguiente párrafo sólo se tendrán en cuenta los acontecimientos de señalización con evidencias de relevancia clínica. La activación del β-AR conduce a un aumento de AMPc mediante la activación de adenilato ciclasa a través de la estimulación de proteínas G_s en el trímero de proteínas G. Por otro lado, la unión de ligando agonista a receptores de acetilcolina muscarínicos y nicotínicos inhibe la adenilato ciclasa mediante la inhibición de proteínas G_i. Sin embargo, este patrón sencillo tiene que ampliarse para los receptores individuales.

Los autoanticuerpos de sueros de pacientes con miocarditis o DCM muestran un efecto cronotrópico positivo en la misma medida que la isoprenalina agonista. La isoprenalina aumenta claramente la concentración de AMPc en la célula y activa los canales de Ca²⁺ de tipo L. Se ha mostrado que AAB de pacientes con DCM activan los canales de Ca²⁺ de tipo L. Por otro lado, el efecto de AAB sobre la acumulación de AMPc fue más bien marginal. Sin embargo, se ha mostrado que la proteína cinasa A citosólica así como la unida a la membrana en cardiomiocitos se activa tras la estimulación con AAB. Un AB monoclonal anti-receptor β₁ que induce apoptosis en cardiomiocitos de rata también actúa a través de AMPc y proteína cinasa A, MAP-cinasas, especialmente cinasa p38 están activadas aguas abajo de varios GPCR, pero también en la cascada de transducción de señales de citocinas inflamatorias. Por tanto, puede sugerirse que la estimulación del β₁-AR mediante agAAB también puede tener un efecto proinflamatorio.

También hay importantes rutas de señalización independientes de AMPc. Los canales de Ca²⁺ de tipo L no sólo se activan a través de la fosforilación mediante proteína cinasa A, sino también directamente a través de subunidades de proteínas G. Por tanto, la estimulación del influjo de Ca²⁺ puede ser una ruta significativa para el papel patogénico de AAB en la miocarditis y DCM autoinmunitarias. El potencial de acción en cardiomiocitos de rata y humanos se prolonga mediante la administración de agAAB contra el β₁-AR y activa a su vez el intercambiador electrogénico de Na⁺/Ca²⁺, dando como resultado inestabilidad eléctrica del corazón. También se sabe que la sobrecarga de calcio intracelular es un acontecimiento clave de remodelado, al igual que la estimulación β₁-adrenérgica. En un modelo de rata transgénica, el β₁-AR era crucial para la reorganización de actina mediada por transcripción potenciada del factor natriurético auricular.

Tomadas en conjunto, la sobreestimulación β-adrenérgica, la sobrecarga de calcio intracelular y la ausencia parcial de regulación por disminución del β₁-AR pueden estar implicadas en la patogénesis de la miocarditis y DCM. Resultados de experimentos con animales respaldan los datos *in vitro* sobre la relevancia patogénica de agAAB obtenidos en experimentos de cultivo tisular. Jahns *et al.* pudieron inducir anticuerpos agonistas en ratas mediante inmunización con el segundo bucle extracelular del β₁-AR. Los animales desarrollaron una miocardiopatía dilatada similar a la de la miocardiopatía dilatada humana. La transferencia del anticuerpos/inmunoglobulinas inducidos a animales sanos también conduce a una DCM.

También se realizó la inducción de anticuerpos agonistas contra el β₁-AR en conejos y dio como resultado la aparición de agAAB así como DCM. Una retirada de agAAB a partir del plasma sanguíneo del animal mediante inmunoadsorción específica usando una columna de péptido conduce a una mejora de la función del músculo cardíaco, medida como fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

Más de una docena de publicaciones notifican el beneficio clínico de la aféresis terapéutica (inmunoadsorción) en pacientes que padecen DCM. En un estadio clínico de la enfermedad cardíaca en el que no es posible ninguna medicación farmacológica cardíaca satisfactoria, la aféresis terapéutica conduce a una reducción de larga duración de los agAAB, una desaparición de leucocitos inflamatorios activados del tejido de músculo cardíaco y un aumento de funciones cardíacas esenciales.

Otros ejemplos de enfermedades que están asociadas con, o provocadas por, agAAB son la preeclampsia y rechazo de riñón necrótico vascular (agAAB contra el receptor de angiotensina-1) o el glaucoma de ángulo abierto (agAAB contra el receptor β₂-adrenérgico).

El documento WO-A-02/093174 da a conocer un método y un dispositivo para tratar la EA. El método implica la retirada de autoanticuerpos en circulación de un marcador bioquímico de marcadores, específicamente proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) humana y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en líquido corporal, preferiblemente sangre o un hemoderivado. La invención incluye además un dispositivo o un procedimiento de modulación del sistema inmunitario eficaz para la retirada de autoanticuerpos.

D.M. Walsh *et al.* dan a conocer en Biochemical Society Transactions (2005) vol. 33, parte 5, págs. 1087-1090, que

- los oligómeros solubles de A β se encuentran entre los efectores más tempranos de la enfermedad de Alzheimer. Notifican pruebas de compuestos dirigidos a tres dianas terapéuticas prominentes basadas en amiloide, la inhibición de las secretasas responsables de la producción de A β , la inhibición de la agregación de A β y la inmunización contra A β . En cada caso, los compuestos que pueden reducir la producción de oligómero o los anticuerpos que se unen con
- 5 avidez a oligómeros de A β también mejoran los efectos sinaptotóxicos de estos oligómeros naturales derivados de células. Norman R. Relkin *et al.* dan a conocer en *Neurobiology of Aging* (2008), 20 de febrero, publicación electrónica, que los anticuerpos que se producen de manera natural contra β A pueden reducir el nivel de β A en el organismo, y su aplicación intravenosa puede mejorar la función cerebral en pacientes con EA leve.
- Dennis J. Selkoe *et al.* notifican en *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003, 43:545-84 comentarios sobre el
- 10 entendimiento molecular que predice productos terapéuticos basados en amiloide. Desde hace mucho tiempo las enfermedades degenerativas del cerebro se consideraron entre las enfermedades de seres humanos menos conocidas y más resistentes al tratamiento. Sin embargo, recientes avances en el entendimiento de sus mecanismos han llevado al borde de agentes potenciales de modificación de la enfermedad. Esta evolución se muestra quizás como ejemplo de la mejor manera mediante el caso de la enfermedad de Alzheimer. La aplicación de genética y
- 15 patología molecular ha llevado al reconocimiento de que los cuatro genes implicados hasta la fecha en la enfermedad de Alzheimer familiar elevan, todos ellos, de manera crónica los niveles cerebrales de la proteína β -amiloide (A β). Por consiguiente, están desarrollándose activamente inhibidores de molécula pequeña de las β y γ -secretasas, las proteasas que generan A β a partir de su precursor, y algunos han mostrado eficacia *in vivo* en modelos de ratón. Un enfoque alternativo, la inmunización activa o pasiva contra A β , ha recibido una amplia validación preclínica en ratones,
- 20 pero todavía se espera una preparación eficaz libre de efectos secundarios significativos en seres humanos. En este caso también se revisan varias otras posibles terapias. Si se demuestra en última instancia que uno o más de estos diversos enfoques ralentizan o previenen la demencia, la enfermedad de Alzheimer pasará a ser un ejemplo destacado de la aplicación satisfactoria de la biología reduccionista al más complejo de los órganos, la corteza cerebral humana.
- El documento EP-A-1832600 da a conocer una invención que se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para péptidos que interaccionan con autoanticuerpos asociados con glaucoma, a los propios péptidos, a una
- 25 composición farmacéutica que comprende dichas moléculas de ácido nucleico y péptidos, y al uso de dichos péptidos (especialmente en aféresis) para el tratamiento de glaucoma. Los péptidos representan un epítipo que es una parte del bucle 2 extracelular del receptor β_2 -adrenérgico.
- El documento WO-A-02/38592 da a conocer una invención que se refiere a péptidos que tienen una alta afinidad por
- 30 inmunoglobulinas.
- Y. Magnusson *et al.* notifican en *Clin. Exp. Immunol.* (1989) 78, 42-48 un análisis antigénico del segundo bucle extracelular del receptor beta-1-adrenérgico humano que es diferente del receptor beta-2-adrenérgico.
- Yanxiang Ni *et al.* notifican la activación de la actividad γ -secretasa estimulante de receptor β_2 -adrenérgico y la
- 35 aceleración de la formación de placas de amiloide. Notifican que la activación de β_2 -AR puede estimular la actividad γ -secretasa y la formación de placas de amiloide y especulan que la activación anómala de β_2 -AR puede contribuir a la acumulación de A β en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.
- Un objeto de la invención era proporcionar un compuesto que pueda usarse en el tratamiento de la EA. Otro objeto era proporcionar un compuesto que pueda reducir la actividad γ -secretasa mediada por el receptor β_2 -adrenérgico en individuos que presentan mayores niveles de γ -secretasa debido a autoanticuerpos contra receptor adrenérgico.
- 40 La invención se basa en el hallazgo de autoanticuerpos agonistas (agAAB) dirigidos contra los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptor β_2 y α_1 -adrenérgico (AR), en el plasma sanguíneo de pacientes que padecen enfermedades provocadas por un aumento de la actividad γ -secretasa, una liberación aumentada de moléculas de β -amiloide y/o disfunción celular de células de vasos sanguíneos del cerebro, células de la glía o neuronas. En particular, la enfermedad es EA.
- 45 Se da a conocer que el objeto puede resolverse retirando inmunoglobulinas de pacientes que se sospecha que padecen, o que padecen, una enfermedad provocada por un aumento de la actividad γ -secretasa, una liberación aumentada de moléculas de β -amiloide y/o disfunción celular de células de vasos sanguíneos del cerebro, células de la glía o neuronas. La retirada de inmunoglobulinas puede realizarse mediante adsorción de las inmunoglobulinas respectivas sobre un soporte sólido. Estos métodos en sí mismos se conocen bien en la técnica.
- 50 Además, se da a conocer el uso de un dispositivo de inmunoadsorción para fabricar un dispositivo para el tratamiento de una enfermedad provocada por un aumento de la actividad γ -secretasa, una liberación aumentada de moléculas de β -amiloide y/o disfunción celular de células de vasos sanguíneos del cerebro, células de la glía o neuronas mediante la retirada de inmunoglobulinas de pacientes.

ES 2 639 573 T3

En una realización de la invención, el objeto se resuelve mediante un péptido que tiene una DE_{50} de menos de 500 nM, en particular 10 nM contra un anticuerpo que reconoce un epítipo en un bucle 2 de α_1 y bucle 1 de β_2 de un receptor adrenérgico humano en el que la unión del anticuerpo al epítipo da como resultado el aumento de la actividad γ -secretasa y/o liberación de β -amiloide patológica aumentada y/o disfunción celular de células de vasos sanguíneos del cerebro, células de la glía o neuronas, en el que el valor de DE_{50} se mide mediante un bioensayo, en particular

5 que se usa para identificar los agAAB, y en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9

en la que

a)

10 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,

X2 = A, G, α -Abu, F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, S, V, W, Y o delección,

X3 = Hyp, P, Pip, S, T, Y o delección,

X4 = Aad, Asu, D, E, Har, K, N, Orn, Q, R,

X5 = Aad, Asu, D, E, N, Q,

15 X6 = Aad, Asu, D, E, Har, K, N, Orn, Q, R,

X7 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y o delección,

X8 = A, α -Abu, β -A, G, S, T, V, Y o delección,

X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o

b)

20 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,

X2 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y,

X3 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R, S, V,

X4 = Aad, Asu, D, E, Hyp, N, P, Pip, Q,

X5 = Aad, Asu, D, E, Hyp, N, P, Pip, Q,

25 X6 = A, α -Abu, G, Hyl, K, Orn, R, S, V

X7 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y,

X8 = γ -Abu, Ahx, β -A, G o delección,

X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o

c)

30 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,

X2 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R o delección,

X3 = A, C, F, Hph, M, Nal, S, W, Y,

X4 = F, S, T, W, Y,

X5 = F, S, T, W, Y,

X6 = A, C, F, Hph, M, Nal, S, W, Y,

X7 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R,

X8 = Abu, Ahx, β -A, G o delección,

5 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o d)

X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,

X2 = Aad, Asu, D, E, F, Hph, N, Nal, Q, W, Y,

X3 = A, C, G, Hcy, S, Sec,

10 X4 = D, E, F, N, Nal, Q, W, Y,

X5 = F, Hph, Nal, W, Y,

X6 = D, E, F, N, Nal, Q, W, Y,

X7 = A, C, G, Hcy, S, Sec,

X8 = Aad, Asu, D, E, F, Hph, N, Nal, Q, W, Y,

15 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección

en el que Aad es ácido α -aminoadípico; α -Abu es ácido α -aminobutírico; Ahx es ácido ϵ -aminohexanoico; Asu es ácido o-aminosubérico; β -A es β -alanina; Dab es ácido α,γ -diaminobutírico; γ -Abu es ácido γ -aminobutírico; Har es homoarginina; Hcy es homocisteína; Hph es homofenilalanina; Hyl es δ -hidroxilisina; Hyp es hidroxiprolina; Nal es β -(1 ó 2-naftil)-alanina; Orn es ornitina; Pip es ácido piperídico; Sec es selenocisteína y el código de una letra de aminoácidos representa los L-aminoácidos comunes según la nomenclatura de la IUPAC así como los D-aminoácidos correspondientes.

20

En particular, el péptido de la invención reconoce los epítomos de bucle de α_1 humano de los subtipos de receptor α -adrenérgico A, B o C o combinaciones de los mismos.

25 En una realización adicional de la invención, el péptido según la invención se caracteriza porque el ligador y/o un espaciador se seleccionan del grupo que consiste en ácidos α -aminocarboxílicos así como homo y heterooligómeros de los mismos, ácidos α,ω -aminocarboxílicos y oligómeros ramificados o heterooligómeros de los mismos, otros aminoácidos alifáticos y/o aromáticos así como homo o heterooligómeros lineales y ramificados; amino-oligoalcoxilalquilaminas; derivados de ácido maleinimidocarboxílico; oligómeros de alquilaminas; derivados de 4-alquilfenilo; derivados de 4-oligoalcoxilfenilo o 4-oligoalcoxilfenoxilo; derivados de 4-oligoalquil-mercaptofenilo o 4-oligoalquilmercaptofenoxilo; derivados de 4-oligo-alquilaminofenilo o 4-oligoalquilaminofenoxilo; derivados de (oligoalquilbencil)-fenilo o 4-(oligoalquilbencil)fenoxilo, así como derivados de 4-(oligo-alcoxilbencil)fenilo o 4-(oligoalcoxi-bencil)fenoxilo; derivados de tritilo; derivados de benciloxiarilo o benciloxialquilo; derivados de xanten-3-iloxialquilo; derivados de ácido (4-alquilfenil) o ω -(4-alquilfenoxi)alcanoico; derivados de oligoalquilfenoxialquilo u oligoalcoxilfenoxialquilo; derivados de carbamato; aminas; derivados de trialkilsililo o dialquilalcoxisililo; derivados de alquilo o arilo y/o combinaciones de los mismos.

30

En aún otra realización, el péptido según la invención se caracteriza porque se selecciona del grupo que consiste en:

a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9

en la que X1 a X9 tienen el mismo significado que el mencionado anteriormente en el presente documento;

40 b) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene homología suficiente como para ser

funcionalmente análogo a una secuencia de aminoácidos según a).

Además, se da a conocer que el péptido se selecciona del grupo que consiste en a); b);

5 c) un péptido según una secuencia de aminoácidos a) o b) que se modifica mediante deleciones, adiciones, sustituciones, translocaciones, inversiones y/o inserciones y funcionalmente análogo a una secuencia de aminoácidos según a) o b);

d) un péptido según una secuencia de aminoácidos a), b) o c) que se modifica mediante ramificación o extensión con el mismo o con otro péptido según la secuencia de aminoácidos a), b) o c) para formar un péptido homooligomérico o heterooligomérico.

10 Además, se da a conocer un péptido caracterizado porque la secuencia de aminoácidos especificada en b) tiene una homología de al menos el 40% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificada en a). Además, el péptido de la invención se caracteriza porque la secuencia de aminoácidos especificada en b) tiene una homología de al menos el 60%, preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 80%, de manera especialmente preferible el 90% con cualquiera de las secuencias de aminoácidos especificada en a).

15 En aún otra realización de la invención el péptido de la invención se caracteriza porque consiste en la secuencia de aminoácidos APEDET; WKEPAP; PDERF; KMWTFG o FGNFWCE.

Se da a conocer que el péptido de la invención puede usarse como principio activo médico. El péptido según la invención puede unirse a anticuerpos de pacientes que padecen enfermedad de Alzheimer.

El péptido de la invención se caracteriza además porque puede inmovilizarse y/o fijarse a nanopartículas magnéticas, paramagnéticas y/o no magnéticas.

20 De manera todavía adicional, se da a conocer que el péptido según la invención puede unirse a una fase sólida. El péptido de la invención puede estar presente en una forma lineal y ramificada así como cíclica. El cierre del anillo peptídico se realiza, por ejemplo, mediante formación de puentes disulfuro cuando hay dos cisteínas presentes, o mediante ciclación de amida, que se realiza opcionalmente mediante cadenas laterales, mediante los extremos C-terminal con N-terminal o mediante una combinación de estos últimos.

25 El péptido según la invención puede caracterizarse además porque las inmunoglobulinas a las que se une son agAAB que interactúan con el β_2 -AR y α -AR humanos.

El péptido según una cualquiera de las realizaciones anteriores, caracterizado porque comprende adicionalmente grupos amino, amidas, hidrazidas, azidas, carbamatos, grupos acetilo, grupos biotina, marcadores, espaciadores y/o ligadores también es una realización de la invención.

30 Además, también se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para al menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos según la invención;

b) una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos según a);

35 c) una molécula de ácido nucleico que experimenta hibridación con una secuencia de nucleótidos según a) o b) en condiciones rigurosas;

d) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene homología suficiente como para ser funcionalmente análogo a una secuencia de nucleótidos según a), b) o c);

e) una molécula de ácido nucleico que, como consecuencia del código genético, está degenerada para dar una secuencia de nucleótidos según a) a d); y

40 f) una molécula de ácido nucleico según una secuencia de nucleótidos de a) a e) que está modificada mediante deleciones, adiciones, sustituciones, translocaciones, inversiones y/o inserciones y es funcionalmente análogo a una secuencia de nucleótidos según a) a e).

45 Se da a conocer que la molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos especificada en d) comprende una homología de al menos el 40%, en particular al menos el 60%, preferiblemente el 70%, más preferiblemente el 80%, de manera especialmente preferible el 90% con cualquiera de las secuencias de nucleótidos especificadas en

a) a c).

Se da a conocer que la molécula de ácido nucleico es ADN genómico, ADNc y/o ARN.

También se da a conocer un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según la invención.

También se da a conocer una célula huésped que comprende el vector según la invención.

- 5 También son objeto de la invención fases sólidas para cromatografía de afinidad o extracción en fase sólida, que comprenden polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos o polímeros mixtos, preferiblemente agarosa reticulada, celulosa, gel de sílice, poliamida y poli(alcoholes vinílicos), que opcionalmente están activados químicamente, con péptidos según la invención, inmovilizados sobre la superficie de la fase sólida, por ejemplo, mediante unión covalente o mediante adsorción. En particular, los péptidos pueden unirse de manera covalente a la fase sólida en la posición
10 X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y/o X9. Puede resultar ventajoso que los péptidos estén separados de la superficie de soporte mediante ligadores o espaciadores.

También se da a conocer un dispositivo para retirar inmunoglobulinas de muestras que contienen inmunoglobulina sobre fases sólidas, en el que el dispositivo contiene la fase sólida de la invención. También pueden proporcionarse medios para la introducción de muestras que contienen inmunoglobulina.

- 15 Además, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico según la invención, el vector según la invención, la célula huésped según la invención, el péptido según la invención y/o la fase sólida según la invención, opcionalmente junto con una sustancia portadora farmacéuticamente tolerable.

- Además, se da a conocer un kit que comprende una molécula de ácido nucleico tal como se da a conocer, un vector tal como se da a conocer, una célula huésped tal como se da a conocer, un péptido según la invención, una fase sólida según la invención y/o una composición farmacéutica tal como se da a conocer, opcionalmente junto con instrucciones para combinar el contenido del kit y/o proporcionar una formulación.
20

También se da a conocer un aparato para cromatografía, que comprende péptidos según la invención. En particular, el aparato se caracteriza porque los péptidos están unidos a la fase sólida de la invención.

- 25 La invención también se refiere al uso de la molécula de ácido nucleico tal como se da a conocer, el vector tal como se da a conocer, la célula huésped tal como se da a conocer, el péptido según la invención, la fase sólida según la invención, la composición farmacéutica tal como se da a conocer, el kit tal como se da a conocer, el aparato tal como se da a conocer en la profilaxis, el diagnóstico, la terapia de EA así como en la producción o el examen de un fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como EA. La invención también da a conocer un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer mediante unión y/o retirada de autoanticuerpos por medio de péptidos según la invención unidos a una fase sólida. La invención también se refiere al péptido o a la fase sólida de la invención para su uso en la profilaxis, el diagnóstico, la terapia, el seguimiento y/o cuidado posterior de la enfermedad de Alzheimer, para su uso en la producción o el examen de un fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como EA; y a un péptido de la invención que puede unirse a autoanticuerpos agonistas (agAAB) dirigidos contra la actividad γ -secretasa mediada por receptor β_2 y α_1 -adrenérgico en individuos que presentan mayores niveles de γ -secretasa, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de EA.
30
35

Ejemplos, materiales y métodos

- Se realizaron el aislamiento y el cultivo de células cardíacas neonatales tal como se describió anteriormente (Wallukat, G. y Wollenberger, A. 1987. Effects of the serum gammaglobulin fraction of patients with allergic asthma and dilated myocardiopathy on chronotropic β -adrenoceptor function in cultured rat heart myocytes. Biomed. Biochim. Acta. 78:634-639).
40

- Cultivo celular. En resumen, se disociaron células individuales a partir de los ventrículos cortados de ratas Wistar (1-2 días de edad) con una disolución al 0,25% de tripsina en bruto y se cultivaron como monocapas con una densidad de 800 células/mm² en medio Halle SM 20-I equilibrado con aire humidificado. El medio contenía FCS inactivado por calor al 10% y fluorodesoxiuridina 2 μ mol/l (Serva, Heidelberg, Alemania), esta última para prevenir la proliferación de células no musculares.
45

- En el tercer o cuarto día, se incubaron las células durante 2 h en 2 ml de medio que contenía suero reciente. Se contaron durante 15 s de siete a 10 células seleccionadas o agrupaciones de células que se contraían de manera sincrónica por matraz. El cambio en la frecuencia de pulsaciones se expresó como latidos por minuto. Se repitió este procedimiento dos veces en diferentes cultivos para proporcionar resultados que representaban un total de hasta
50 30 células para cada muestra. Se añadieron fracciones de inmunoglobulina, fármacos agonistas y antagonistas,

péptidos, etc. de manera individual o acumulativa según se indica. La frecuencia de contracción basal de los cardiomiocitos que latían de manera espontánea era de 162 ± 4 min.

5 Preparación de la fracción de inmunoglobulina. Se aisló la fracción de inmunoglobulina a partir de muestras de suero de 1 a 2 ml mediante precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 40%. Se lavaron los precipitados y se disolvieron en tampón de diálisis (NaCl 154 mmol/l, fosfato de sodio 10 mmol/l; pH 7,2). Se repitió dos veces el procedimiento de precipitación, lavado y disolución.

Finalmente, se llevaron las inmunoglobulinas a 1 ml de PBS (pH 7,2) y se sometieron a diálisis a 4°C durante 30 horas frente a 1 l de tampón de diálisis. Se cambió el tampón cinco veces durante la diálisis. Para la detección de autoanticuerpos, se añadieron las fracciones de inmunoglobulina a una dilución de 1:20 ó 1:40 a los matraces.

10 Tras la diálisis, las fracciones de IgG presentaban una concentración de 10-15 mg/ml, un máximo de 10 µg/ml de las cuales son anticuerpos de receptor específicos. Se incuban previamente 50 µl de esta disolución de IgG con los péptidos con la siguiente concentración de péptidos: 5 µl de una disolución tamponada de 100 µg/ml por 50 µl de disolución de IgG. Se incubaba previamente esta mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se llena en los viales de cultivo celular, tras haberse retirado mediante pipeta la disolución de nutrientes anterior. La cantidad del medio es de 2 ml. Por tanto, la concentración final es de 0,5-0,75 mg/ml para la IgG y de 0,5 µg para los péptidos. Si se establece el peso molecular del péptido (10 meros) a 1 KD y se establece el de la IgG a 150 KD, hay un exceso de agAAB.

20 Para los experimentos de neutralización, se añadieron en exceso (0,5 µg en 50 µl) péptidos sintéticos correspondientes a la secuencia de los tres bucles extracelulares del β_2 -AR o α_{1A} -AR humanos a 50 µl de la fracción de inmunoglobulina. Se agitaron las mezclas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después se añadieron las muestras de 100 µl a células de músculo cardiaco de rata neonatal cultivadas en 2 ml de medio hasta una dilución final de 1:40. Se contó la frecuencia de latido durante 15 s, aproximadamente 60 min tras la adición de la mezcla de péptido/inmunoglobulina.

25 Para identificar los epítomos neutralizantes de autoanticuerpo, se añadieron péptidos solapantes sintéticos correspondientes a la secuencia del primer bucle extracelular del β_2 -AR humano o del segundo bucle extracelular de α_{1A} -AR a las inmunoglobulinas. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente se usaron las muestras tal como se describió anteriormente.

30 Cálculo de DE₅₀. Para la estimación de la dosis eficaz al 50% de agAAB para estimular cardiomiocitos de rata neonatal, se administraron los anticuerpos purificados mediante cromatografía de afinidad que se unen a los epítomos en el bucle 1 del receptor β_2 -adrenérgico humano o en el bucle 2 del receptor α_1 -adrenérgico humano (subtipo A) al cultivo tisular que contenía cardiomiocitos de rata neonatal de manera secuencial con el aumento de la concentración de anticuerpo hasta que se observó el máximo del aumento de la frecuencia de latido. Se calculó la DE₅₀ mediante un programa informático.

35 Pacientes. Se obtuvieron sueros de 14 pacientes con demencia de tipo Alzheimer a partir de la Clínica de Psiquiatría del Hospital de Luedenscheid. Los controles son la fracción de inmunoglobulina de suero sanguíneo de donantes sanos del Centro Max Delbrück de Medicina Molecular, Berlín.

Para la preparación de inmunoglobulina, se centrifugaron las muestras a 4.000 g durante 30 min y se almacenaron a -20°C. Se adquirieron los reactivos de Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Alemania). Todos los demás productos químicos eran de calidad analítica.

40 Resultados

Las figuras muestran lo siguiente:

45 Figura 1: Los anticuerpos de pacientes (n = 11 - 14) con enfermedad de Alzheimer estimulan cardiomiocitos de rata mediante el receptor β_2 -adrenérgico y el receptor α_1 -adrenérgico. El antagonista β_2 -adrenérgico, ICI 118.551, bloquea específicamente, pero de manera parcial, los efectos estimulantes de los anticuerpos agonistas. Se observa una inhibición más eficaz de la actividad celular de contracción si se administra adicionalmente el antagonista α -adrenérgico, prazosina, al cultivo celular. 11 de 14 muestras de suero o inmunoglobulinas activan los miocitos cardiacos.

50 Figura 2: Los anticuerpos de pacientes (n=6) con enfermedad de Alzheimer se unen al primer bucle extracelular del receptor β_2 -adrenérgico. Tras la incubación conjunta de los péptidos de bucle extracelular 1, 2 ó 3 con las inmunoglobulinas de los pacientes, sólo el bucle 1 neutraliza el aumento mediado por anticuerpos de la frecuencia de latido celular.

Figura 3: Los anticuerpos de pacientes (n = 6) con enfermedad de Alzheimer se unen a un epítipo peptídico incorporado en el primer bucle extracelular del β_2 -AR. Tras la incubación conjunta de las inmunoglobulinas con epítopos solapantes (2 aminoácidos) de los péptidos de bucle 1, se observó una neutralización del aumento mediado por anticuerpo de la frecuencia de latido con el epítipo FGNFWCE.

5 Figura 4: Los anticuerpos de pacientes (n = 6) con enfermedad de Alzheimer y dirigidos contra el receptor β_2 -adrenérgico pertenecen a la subclase 1 de inmunoglobulina G. Tras la incubación conjunta de las inmunoglobulinas con anticuerpos monoclonales específicos para las subclases 1 – 4, la actividad mediada por anticuerpos sólo desapareció con el precipitado realizado con el anticuerpo monoclonal contra IgG1.

10 Figura 5: Los anticuerpos de pacientes (n=6) con enfermedad de Alzheimer se unen al segundo bucle extracelular del receptor α_1 -adrenérgico. Tras la incubación conjunta de los bucles 1, 2 ó 3 con las inmunoglobulinas de los pacientes, sólo el bucle 2 neutraliza el aumento mediado por anticuerpo de la frecuencia de latido celular.

15 Figura 6: Los anticuerpos de pacientes (n = 5) con enfermedad de Alzheimer se neutralizan mediante un péptido incorporado en el segundo bucle extracelular del receptor α_{1A} -adrenérgico. Se incubaron conjuntamente péptidos solapantes (uno o dos aminoácidos) con las inmunoglobulinas. El péptido con la secuencia de aminoácidos APEDET neutraliza la actividad celular de las inmunoglobulinas.

Figura 7: Los anticuerpos de pacientes (n = 5) con enfermedad de Alzheimer y dirigidos contra el receptor α_{1A} -adrenérgico pertenecen a la subclase 1 de inmunoglobulina G. Tras la incubación conjunta de las inmunoglobulinas con anticuerpos monoclonales específicos para las subclases 1 – 4, la actividad mediada por anticuerpos sólo desapareció con el precipitado realizado con el anticuerpo monoclonal contra IgG1.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido que tiene una DE_{50} de menos de 500 nM, en particular 10 nM contra un anticuerpo que reconoce un epítipo en un bucle 2 de α_1 o bucle 1 de β_2 extracelular de un receptor adrenérgico (AR) humano en el que la unión del anticuerpo al epítipo da como resultado un aumento de la actividad γ -secretasa, una liberación aumentada de moléculas de β -amiloide, en el que el valor de DE_{50} se mide mediante un bioensayo; y en el que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9

en la que

a)

- 10 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,
 X2 = A, G, α -Abu, F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, S, V, W, Y o delección,
 X3 = Hyp, P, Pip, S, T, Y o delección,
 X4 = Aad, Asu, D, E, Har, K, N, Orn, Q, R,
 X5 = Aad, Asu, D, E, N, Q,
 15 X6 = Aad, Asu, D, E, Har, K, N, Orn, Q, R,
 X7 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y o delección,
 X8 = A, α -Abu, β -A, G, S, T, V, Y o delección,
 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o

b)

- 20 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,
 X2 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y,
 X3 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R, S, V,
 X4 = Aad, Asu, D, E, Hyp, N, P, Pip, Q,
 X5 = Aad, Asu, D, E, Hyp, N, P, Pip, Q,
 25 X6 = A, α -Abu, G, Hyl, K, Orn, R, S, V
 X7 = F, Hph, Hyp, Nal, P, Pip, W, Y,
 X8 = γ -Abu, Ahx, β -A, G o delección,
 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o

c)

- 30 X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,
 X2 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R o delección,
 X3 = A, C, F, Hph, M, Nal, S, W, Y,
 X4 = F, S, T, W, Y,

X5 = F, S, T, W, Y,

X6 = A, C, F, Hph, M, Nal, S, W, Y,

X7 = A, α -Abu, Dab, G, Hyl, K, Orn, R,

X8 = Abu, Ahx, β -A, G o delección,

5 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección, o

d)

X1 = grupo amino, amida, grupo acetilo, grupo biotina, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección,

X2 = Aad, Asu, D, E, F, Hph, N, Nal, Q, W, Y,

X3 = A, C, G, Hcy, S, Sec,

10 X4 = D, E, F, N, Nal, Q, W, Y,

X5 = F, Hph, Nal, W, Y,

X6 = D, E, F, N, Nal, Q, W, Y,

X7 = A, C, G, Hcy, S, Sec,

X8 = Aad, Asu, D, E, F, Hph, N, Nal, Q, W, Y,

15 X9 = amida, hidrazida, azida, carbamato, marcador, espaciador, ligador, C, GKK, SGKK o delección

en el que Aad es ácido α -aminoadípico; α -Abu es ácido α -aminobutírico; Ahx es ácido ϵ -aminohexanoico; Asu es ácido α -aminosubérico; β -A es β -alanina; Dab es ácido α,γ -diaminobutírico; γ -Abu es ácido γ -aminobutírico; Har es homoarginina; Hcy es homocisteína; Hph es homofenilalanina; Hyl es δ -hidroxilisina; Hyp es hidroxiprolina; Nal es β -(1 ó 2-naftil)-alanina; Orn es ornitina; Pip es ácido piperídico; Sec es selenocisteína y el código de una letra de aminoácidos representa los L-aminoácidos comunes según la nomenclatura de la IUPAC así como los D-aminoácidos correspondientes.

20

2. Péptido según la reivindicación 1, en el que el péptido reconoce los epítomos de bucle 1 extracelular de α_1 de los subtipos de α -AR humano A, B o C o combinaciones de los mismos, y el bucle 1 extracelular de un β_2 -AR, en el que las combinaciones son A y B; A y C; B y C; A y B y C.

25

3. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el ligador y/o un espaciador se seleccionan del grupo que comprende: ácidos α -aminocarboxílicos así como homo y heterooligómeros de los mismos, ácidos α,ω -aminocarboxílicos y oligómeros ramificados o heterooligómeros de los mismos, otros aminoácidos alifáticos y/o aromáticos así como homo o heterooligómeros lineales y ramificados; amino-oligoalcoxilquilaminas; derivados de ácido maleinimidocarboxílico; oligómeros de alquilaminas; derivados de 4-alquilfenilo; derivados de 4-oligoalcoxilfenilo o 4-oligoalcoxilfenoxilo; derivados de 4-oligoalquilmercaptofenilo o 4-oligoalquilmercaptofenoxilo; derivados de 4-oligo-alquilaminofenilo o 4-oligoalquilaminofenoxilo; derivados de (oligoalquilbencil)fenilo o 4-(oligoalquilbencil)fenoxilo, así como derivados de 4-(oligo-alcoxilbencil)fenilo o 4-(oligoalcoxi-bencil)fenoxilo; derivados de tritilo; derivados de benciloxiarilo o benciloxialquilo; derivados de xanten-3-iloxialquilo; derivados de ácido (4-alquilfenil) o ω -(4-alquilfenoxi)alcanoico; derivados de oligoalquilfenoxialquilo u oligoalcoxilfenoxialquilo; derivados de carbamato; aminas; derivados de trialquilsililo o dialquialcoxisililo; derivados de alquilo o arilo y/o combinaciones de los mismos.

35

4. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se selecciona del grupo que consiste en:

a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos

40

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9

según la reivindicación 1;

- b) un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una homología suficiente como para ser funcionalmente análogo a una secuencia de aminoácidos según a).
5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende la secuencia de aminoácidos APEDET; WKEPAP; PPDERF; KMWTFG o FGNFWCE.
- 5 6. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en una forma lineal y ramificada, así como cíclica, en el que el cierre del anillo peptídico se realiza mediante formación de puentes disulfuro cuando hay dos cisteínas presentes, o mediante ciclación de amida, que se realiza opcionalmente mediante cadenas laterales, mediante los extremos C-terminal con N-terminal o mediante una combinación de estas dos últimas posibilidades.
- 10 7. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las inmunoglobulinas, es decir los anticuerpos según la reivindicación 1, son autoanticuerpos agonistas que interactúan con el receptor α -adrenérgico.
8. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende adicionalmente grupos amino, amidas, hidrazidas, azidas, carbamatos, grupos acetilo, grupos biotina, marcadores, espaciadores y/o ligadores.
- 15 9. Fases sólidas para cromatografía de afinidad o extracción en fase sólida que consisten en polímeros orgánicos, inorgánicos, sintéticos o en polímeros mixtos, preferiblemente agarosa reticulada, celulosa, gel de sílice, poliamida y poli(alcoholes vinílicos), que opcionalmente están activados químicamente, con péptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, inmovilizados sobre la superficie de la fase sólida.
- 20 10. Fases sólidas según la reivindicación 9, en las que los péptidos están unidos a la fase de soporte sólido de manera covalente o mediante adsorción.
11. Fases sólidas según la reivindicación 9 y/o 10, en las que los péptidos están unidos de manera covalente a la fase sólida en la posición X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y/o X9.
12. Fases sólidas según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en las que los péptidos están separados de la superficie de soporte mediante ligadores/espaciadores.
- 25 13. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o fase sólida según las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en la profilaxis, el diagnóstico, la terapia, el seguimiento y/o cuidado posterior de la enfermedad de Alzheimer.
14. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o fase sólida según las reivindicaciones 9 a 12, para su uso en la producción o el examen de un fármaco para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como EA.
- 30 15. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que puede unirse a autoanticuerpos agonistas (agAAB) dirigidos contra la actividad γ -secretasa mediada por receptor β_2 y α_1 -adrenérgico en individuos que presentan mayores niveles de γ -secretasa, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de EA.

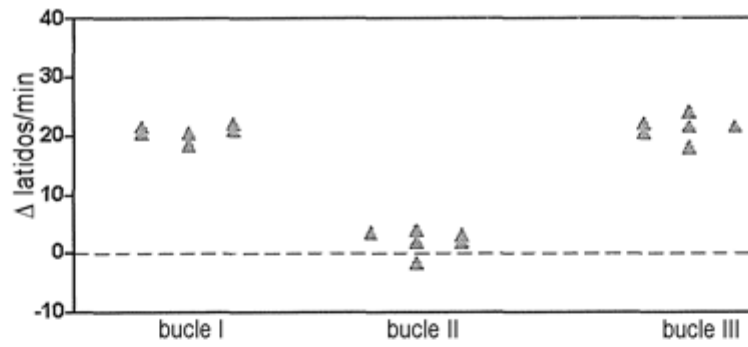


Fig. 5

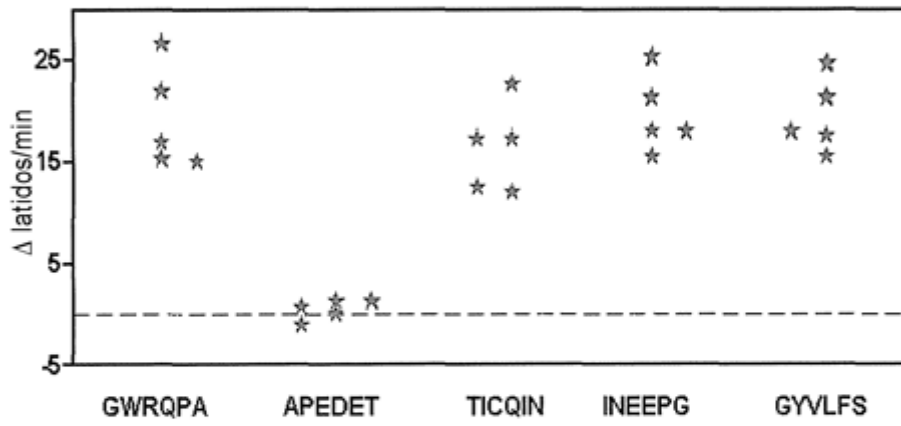


Fig. 6

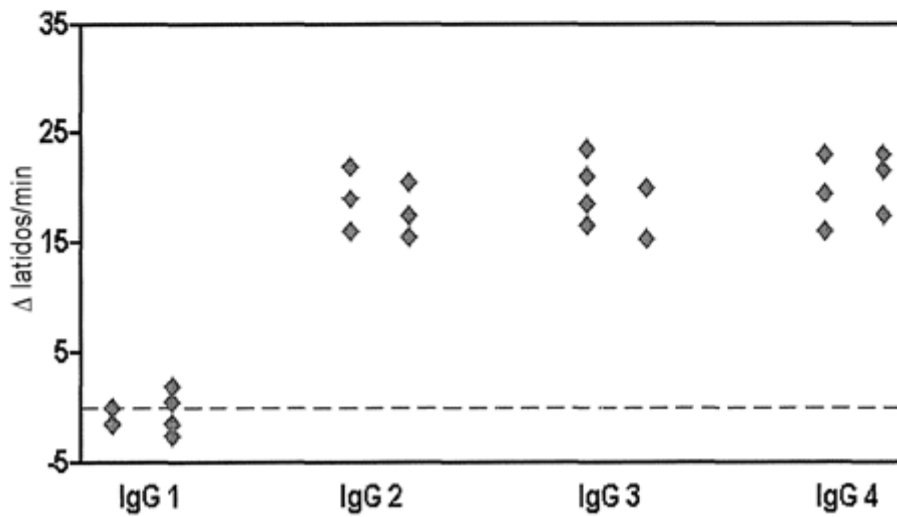


Fig. 7