

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 308**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2013 PCT/EP2013/057161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150127**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2013 E 13719436 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2834644**

54 Título: **Polímeros que contienen péptidos D multivalentes que se unen a beta-amiloide y su uso**

30 Prioridad:

**05.04.2012 DE 102012102998**

**14.09.2012 DE 102012108598**

**14.09.2012 DE 102012108599**

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

**16.04.2020**

73 Titular/es:

**FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)  
52425 Jülich, DE**

72 Inventor/es:

**WILLBOLD, DIETER;  
FUNKE, SUSANNE AILEEN;  
BRENER, OLEKSANDER;  
NAGEL-STEGER, LUITGARD y  
BARTNIK, DIRK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 754 308 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

Polímeros que contienen péptidos D multivalentes que se unen a beta-amiloide y su uso

5 La presente invención se refiere a nuevas sustancias poliméricas multivalentes que se unen a beta-amiloide, que están constituidas por varias sustancias unidas entre sí, que tienen de por sí ya propiedades de unión a beta-amiloide, así como al uso de estas sustancias denominadas a continuación "polímeros" en particular en la medicina.

10 Debido al desarrollo demográfico en las siguientes décadas aumentará el número de personas que padecen enfermedades condicionadas por la edad. En este caso ha de mencionarse en particular la denominada enfermedad de Alzheimer (DA, demencia por Alzheimer, en latín = Morbus Alzheimer).

15 Hasta ahora no existe ningún principio activo o medicamento, que actúe contra las causas de DA. Los medicamentos autorizados y usados hasta ahora mitigan algunos de los síntomas que se producen en la demencia por Alzheimer. Sin embargo éstos no pueden ralentizar el avance de la enfermedad o causar una curación. Existen algunas sustancias que en el ensayo con animales han mostrado éxito en la prevención, sin embargo no (absolutamente) en el tratamiento de DA. Se conocen principios activos contra enfermedades neurodegenerativas por el documento DE 10 2006 015 140 A1.

20 Una característica de la enfermedad de Alzheimer son los depósitos extracelulares del péptido beta-amiloide (péptido beta-A,  $\beta$ A o péptido  $\beta$ A). Este depósito del péptido beta-A en placas puede detectarse normalmente en los cerebros de pacientes con DA *post mortem*. Por tanto se hacen responsables las distintas formas del péptido beta-A - tal como por ejemplo fibrillas - de la producción y el avance de las enfermedades. Adicionalmente, desde hace algunos años se consideran los oligómeros de beta-A pequeños, que pueden difundirse libremente como principales causantes de  
25 la producción y del avance de la DA.

Los monómeros de beta-A, como módulos de los oligómeros de beta-A, se producen en el cuerpo humano de manera constante y son probablemente *per se* no tóxicos. Existe incluso la posibilidad de que los monómeros tengan una función positiva. Los monómeros de beta-A pueden agruparse al azar dependiendo de su concentración. La  
30 concentración depende de su tasa de formación y degradación en el organismo. Si con el aumento de la edad tiene lugar un aumento de la concentración de monómeros de beta-A en el organismo, es cada vez más probable un agrupamiento espontáneo de los monómeros para dar oligómeros de beta-A. Los oligómeros de beta-A así producidos podrían proliferar de manera análoga a los priones y finalmente podrían conducir a la enfermedad de Alzheimer.

35 Una importante diferencia entre la prevención y el tratamiento o incluso la curación de DA se encuentra en el hecho de que una prevención pueda conseguirse posiblemente ya mediante el impedimento de la formación de los oligómeros de beta-A. Para ello son suficientes algunos, pocos ligandos de beta-A, que son poco afines y selectivos con respecto a los oligómeros de beta-A.

40 La formación de los oligómeros de beta-A a partir de muchos monómeros es una reacción de orden alto y con ello depende en alta potencia de la concentración de monómero de beta-A. Por consiguiente conduce ya una pequeña reducción de la concentración de monómeros de beta-A activos a un impedimento de la formación de los primeros oligómeros de beta-A. En este mecanismo se basan probablemente los conceptos de terapia y sustancias más bien preventivos que se encuentran hasta ahora en desarrollo.

45 En el tratamiento de DA ha de partirse, sin embargo, de una situación completamente modificada. En este caso se encuentran oligómeros de beta-A o eventualmente también polímeros más grandes o fibrillas, que proliferan mediante mecanismos similares a priones. Esta proliferación es sin embargo una reacción de orden inferior y apenas depende de la concentración de monómeros de beta-A.

50 Las sustancias conocidas por el estado de la técnica reducen la concentración de monómeros y/u oligómeros de beta-A del modo más diverso. Así se conocen por ejemplo moduladores de gamma-secretasa, que se usaron en el ensayo con animales para la prevención.

Por el documento WO 02/081505 A2 se conocen distintas secuencias de D-aminoácidos, que se unen a péptidos beta-A. Estas secuencias de D-aminoácidos se unen con una constante de disociación (valor  $K_D$ ) de 4  $\mu$ M a péptidos beta-amiloide.

55 Por el documento WO 2011/147797 A2 se conocen compuestos híbridos, que están constituidos por aminopirazoles y péptidos, que impiden la oligomerización de beta-A.

60 Los compuestos que interactúan con péptidos beta-A se conocen por los documentos DE 10 2008 037 564 A1, DE 696 21 607 T2 o DE 10 2010 019 336 A1. La unión de un polímero multivalente a dos asociados de unión se describe en el documento WO 2008/116293 A1.

Zhang G. et al. Bioconjugate Chemistry, 14(1), 2003 da a conocer que la formación de placas de  $\beta$ -amiloide en el caso de Alzheimer se desencadena por el contacto intermolecular de la secuencia de 5 aminoácidos KLVFF en péptidos  $\beta$ -amiloides con un tamaño de 40 a 43 restos.

65 Wiesehahn et al, CHEMBIOCHEM, 4(8), 2003 da a conocer un ensayo de presentación en fago, para identificar

ligandos nuevos y altamente específicos para el péptido  $\beta$ A(1-42) de Alzheimer.

Sidhartha et al. ChemBioChem, 8(15), 2007 da a conocer un dendrímero de cuatro péptidos con el motivo KLVFF.

- 5 Stains et al, CHEMMEDCHEM, 2(12) 2007 se refiere al conocimiento actual en relación a moléculas que interacciona como puede demostrarse con formas oligoméricas o fibrilares del péptido beta-amiloide.

El documento WO 2007/047967 A2 se refiere a un dispositivo, que se coloca dentro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (DA), para extraer péptidos beta-amiloides neurotóxicos (nt-bAP) de líquidos corporales.

- 10 El documento WO 02/42462 A2 se refiere a agentes terapéuticos que son adecuados para el tratamiento de un trastorno amiloidogénico.

- 15 El documento WO 2011/147797 A2 se refiere a un compuesto híbrido a base de derivados de aminopirazol y péptidos para el uso como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades.

- 20 En muchas sustancias que han mostrado resultados positivos en el ensayo con animales, no pudo comprobarse esta acción en estudios clínicos en el ser humano. En estudios clínicos de fase II y III deben tratarse solo personas que se diagnosticaron de manera unívoca con DA. En este caso ya no es suficiente una baja reducción de la concentración de monómeros de beta-A para impedir que se formen a partir de los oligómeros de beta-A ya existentes aún más, por ejemplo mediante un mecanismo similar a priones. La proliferación de los oligómeros de beta-A o aún mejor su degradación o destrucción es sin embargo absolutamente necesaria para ejercer influencia sobre el desarrollo de la enfermedad.

- 25 Hasta ahora se diagnostica la demencia por Alzheimer principalmente mediante ensayos neuro-psicológicos, mediante experimentos en personase en las que se reconocieron síntomas de demencia. Sin embargo se sabe que oligómeros de beta-A y las fibrillas y placas que siguen a esto temporalmente se producen hasta 20 años antes de la aparición de los síntomas en el cerebro de pacientes, y pueden haber originado ya daños irreversibles. Sin embargo hasta ahora no existe ninguna posibilidad de diagnosticar DA antes del brote de los síntomas.

- 30 Por consiguiente existe además una necesidad de nuevos compuestos (principios activos), que se unen de manera muy específica y con alta afinidad a oligómeros de beta-A, e impedir así su proliferación. Estos compuestos no debían mostrar efectos con acciones secundarias indeseadas, en particular no debían producir ninguna reacción inmunitaria. Los compuestos deben reconocer además oligómeros de beta-A tóxicos y con ello también los oligómeros pequeños que pueden difundirse libremente también en pequeñas concentraciones, deben destruirlos completamente y/o impedir su proliferación (similar a priones).

- 35 Además existe también una necesidad de nuevos compuestos, que pueden usarse como sondas para el reconocimiento y marcación de oligómeros de beta-A, en particular, cuando estos oligómeros se producen solo en pequeñas concentraciones.

- 40 Este objetivo se consigue mediante los polímeros de acuerdo con la invención, que contienen al menos dos sustancias (monómeros), que se unen a oligómeros de beta-amiloide, siendo una sustancia (monómero) de las al menos dos sustancias SEQ ID NO: 1 (RD2).

- 45 En el sentido de la presente invención designa el término oligómeros de beta-A tanto agregados de beta-A como también oligómeros de beta-A y también oligómeros de beta-A pequeños que se difunden libremente. Los polímeros en el sentido de la invención es una sustancia formada por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustancias (monómeros) que se unen de por sí ya a beta-amiloide o múltiplos de las mismas.

- 50 En una realización se trata en el caso de los polímeros de péptidos. Éstos están constituidos de manera preferente esencialmente por D-aminoácidos.

- 55 En el sentido de la presente invención significa la expresión "esencialmente por D-aminoácidos" que los monómeros que van a usarse están constituidos en al menos el 60 %, preferentemente el 75 %, 80 %, de manera especialmente preferente el 85 %, 90 %, 95 %, en particular el 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % por D-aminoácidos.

- 60 En una variante de la invención se usan monómeros, que se unen a un monómero de beta-A y/u oligómeros de beta-A y/o fibrillas del péptido beta-A con una constante de disociación (valor  $K_D$ ) de como máximo 500  $\mu$ M, preferentemente 250, 100, 50  $\mu$ M, de manera especialmente preferente 25, 10, 6  $\mu$ M, en particular 4, 2, 1  $\mu$ M.

El polímero de acuerdo con la invención contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los monómeros descritos anteriormente.

- 65 En otra realización se seleccionan los monómeros del grupo que está constituido por: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,

SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79.

En otra variante se unen los polímeros de acuerdo con la invención a partes del péptido beta-amiloide.

En otra variante no de acuerdo con la invención presentan los monómeros secuencias que se diferencian de las secuencias indicadas en hasta tres aminoácidos. Además se usan como monómeros también secuencias que contienen las secuencias mencionadas anteriormente.

En otra variante, los monómeros presentan fragmentos de las secuencias mencionadas anteriormente o presentan secuencias homólogas a las secuencias mencionadas anteriormente.

"Secuencias homólogas" o "homólogo" significa en el sentido de la invención que una secuencia de aminoácidos presenta una identidad con una de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente de los monómeros de al menos el 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 %. En lugar del término "identidad" se usan en la presente descripción los términos "homólogo" o "homología" de manera sinónima. La identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos se calcula mediante comparación con ayuda del programa BESTFIT que se basa en el algoritmo de Smith, T.F. y Waterman, M.S (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)) con ajuste de los siguientes parámetros para aminoácidos: penalización por creación de huecos: 8 y penalización por extensión de huecos: 2; y los siguientes parámetros para ácidos nucleicos: penalización por creación de huecos: 50 y penalización por extensión de huecos: 3. Preferentemente se define la identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos mediante la identidad de la secuencia de ácido nucleico/secuencia de polipéptidos por medio de la longitud de secuencia total en cada caso, tal como se calcula mediante comparación con ayuda del programa GAP que se basa en el algoritmo de Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48: 443-453) con ajuste de los siguientes parámetros para aminoácidos: penalización por creación de huecos: 8 y penalización por extensión de huecos: 2; y los siguientes parámetros para ácidos nucleicos: penalización por creación de huecos: 50 y penalización por extensión de huecos: 3. Dos secuencias de aminoácidos son idénticas en el sentido de la presente invención cuando tienen la misma secuencia de aminoácidos.

Por homólogos ha de entenderse en una variante las correspondientes secuencias retro-inversas de los monómeros mencionados anteriormente. Con el término "secuencia retro-inversa" se designa de acuerdo con la invención una secuencia de aminoácidos, que se compone de aminoácidos en la forma enantiomérica (inversa: quiralidad del átomo de C alfa invertida) y en la que adicionalmente se invirtió el orden de secuencias con respecto a la secuencia de aminoácidos original (retro = hacia atrás).

El polímero de acuerdo con la invención está constituido por monómeros idénticos, o contiene distintos monómeros.

En una alternativa, el polímero de acuerdo con la invención está constituido por cualquier combinación discrecional de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de los monómeros descritos anteriormente.

En una realización, el polímero es un dímero de dos monómeros D3 (SEQ ID NO:13). En otra realización, el polímero de acuerdo con la invención es un dímero de dos monómeros RD2 (SEQ ID NO:76).

Los dímeros pueden prepararse por ejemplo a través de síntesis química o bien síntesis de péptidos.

En una realización de la invención, los monómeros están enlazados de manera covalente entre sí. En otra realización, los monómeros están unidos de manera no covalente entre sí.

Una unión o bien enlace covalente de las unidades de monómero se encuentra en el sentido de la invención, en el caso de que los péptidos se enlacen de cabeza a cabeza, de cola a cola o de cabeza a cabeza de manera lineal entre sí, sin que entre esto se usen ligadores o grupos de ligadores.

Un enlace no covalente en el sentido de la invención se encuentra en el caso de que los monómeros estén enlazados a través de biotina y estreptavidina, en particular tetrámero de estreptavidina entre sí.

En una variante de la presente invención pueden estar enlazados los monómeros de manera lineal entre sí, en particular tal como se ha descrito anteriormente. En otra variante están enlazados los monómeros de manera ramificada entre sí para dar el polímero de acuerdo con la invención.

En el caso de un polímero ramificado puede tratarse de acuerdo con la invención de un dendrímero, en el que los monómeros están enlazados de manera covalente o no covalente entre sí.

5 Como alternativa pueden estar enlazados los monómeros también con una molécula de plataforma (tal como por ejemplo PEG o azúcar) y así pueden formar un polímero ramificado.

Como alternativa son posibles también combinaciones de estas opciones.

10 El polímero está caracterizado por que se une a oligómeros de beta-amiloide con una constante de disociación de como máximo 1  $\mu\text{M}$ , preferentemente 800, 600, 400, 200, 100, 10 nM, de manera especialmente preferente 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 pM, en particular como máximo 20 pM.

15 En otra forma de realización, el polímero de acuerdo con la invención está caracterizado por que se une a oligómeros de beta-amiloide con una constante de disociación de como máximo 500, 5 pM.

El polímero de acuerdo con la invención es adecuado para su uso en la medicina.

20 En una realización se trata de un polímero para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. En otra realización se trata de un polímero que puede usarse para el tratamiento de Parkinson, CJD (*Creutzfeldt Jakob Disease*), o diabetes.

25 Los polímeros de monómeros estructurados de acuerdo con la invención, que por su parte se unen a oligómeros de beta-A, muestran claramente efectos sinérgicos en relación a su selectividad y afinidad con respecto a los oligómeros de beta-A en comparación con los monómeros. Con otras palabras: Los polímeros de acuerdo con la invención son superiores a los monómeros. Los efectos sinérgicos en el sentido de la presente invención son efectos que muestran una selectividad y afinidad más altas con respecto a los oligómeros de beta-A, en particular el valor  $K_D$  que se refiere a la unión a oligómeros de beta-A, que los monómeros de manera individual o en su suma.

Por un ligador ha de entenderse una o varias moléculas que están unidas a través de enlaces covalentes a los monómeros, pudiendo estar enlazados estos ligadores entre sí también mediante enlaces covalentes.

30 En una alternativa de la presente invención, mediante los ligadores no se modifican las propiedades del polímero predeterminadas por los monómeros, concretamente la unión a oligómeros de beta-A.

35 En otra alternativa, los ligadores provocan una modificación de las propiedades del polímero, que están predeterminadas por los monómeros. En una realización de este tipo se refuerza la selectividad y/o afinidad de los polímeros de acuerdo con la invención con respecto a los oligómeros de beta-A y/o se reduce la constante de disociación. En otra realización se seleccionan los ligadores o pueden estar dispuestos de modo que modifiquen la acción estérica de los polímeros de acuerdo con la invención de manera que éstos se unan selectivamente solo a oligómeros de beta-A de un determinado tamaño.

40 Un ejemplo no limitativo de un ligador es la secuencia de aminoácidos "nwn".

45 Una modificación de este tipo de la acción estérica de los polímeros de acuerdo con la invención puede conseguirse también mediante la estructura de polímeros de acuerdo con la invención ramificados, mediante dendrímeros de una estructura especial o la correspondiente estructura del polímero por medio de monómeros y una molécula de plataforma o combinaciones de estas opciones.

Es objeto de la presente invención también una composición que contiene el polímero de acuerdo con la invención, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

50 Se divulga además una composición que contiene el polímero de acuerdo con la invención, en particular para el impedimento de oligómeros de beta-A tóxicos o para la destrucción de polímeros o fibrillas formados a partir de éstos. La "composición" de acuerdo con la invención puede ser por ejemplo una vacuna, un medicamento (por ejemplo en forma de comprimido), una solución de inyección, un producto alimenticio o complemento alimenticio que contiene el polímero de acuerdo con la invención en una formulación que va a prepararse debido al conocimiento técnico.

55 Los polímeros de acuerdo con la invención desintoxican los oligómeros de beta-A o polímeros así como fibrillas formados a partir de éstos, uniéndose a ellos y transformándolos así en compuestos no tóxicos. Las sustancias que son capaces de inhibir la formación de fibrillas, no deben necesariamente también poder destruir las fibrillas formadas previamente, dado que las fibrillas de beta-A formadas previamente son muy estables y pueden destruirse de nuevo solo con mucha dificultad y lentamente.

60 Además se da a conocer también un procedimiento para la desintoxicación de los oligómeros de beta-A, polímeros o fibrillas formados a partir de éstos.

65 Debido a su propiedad de unirse a tanto los oligómeros de beta-A pequeños que pueden difundirse libremente, oligómeros de beta-A más grandes hasta a fibrillas, los polímeros de acuerdo con la invención pueden usarse en todos los estadios de DA. Basándose en la enseñanza de la presente invención pueden prepararse polímeros que se unen también de manera selectiva a distintas formas de los oligómeros de beta-A.

Además se da a conocer también un procedimiento para la preparación del polímero de acuerdo con la invención. Los procedimientos preferentes son por ejemplo procedimientos de síntesis de péptidos (péptidos), la preparación recombinante de proteínas y los procedimientos de síntesis orgánica reconocidos para cualquiera de los denominados

5 *low-molecular-weight compounds*.

La presente invención se refiere también al uso del polímero como sonda para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de oligómeros de beta-amiloide. Además se da a conocer también una sonda que contiene el polímero de acuerdo con la invención para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de oligómeros

10 de beta-amiloide.

Tales sondas son de gran importancia, dado que con ello se posibilita un diagnóstico temprano de la demencia por Alzheimer. Con ello puede impedirse la enfermedad ya en un estadio más temprano.

15 Tales sondas moleculares contienen el polímero de acuerdo con la invención y pueden inyectarse a los pacientes por ejemplo por vía intravenosa. Otras partes constituyentes de las sondas pueden ser: colorantes, colorantes fluorescentes, isótopos radiactivos (por ejemplo PET), gadolinio (MRI) y/o partes constituyentes, que se usan para sondas en la obtención de imágenes. Tras el paso por la barrera hematoencefálica pueden unirse las sondas a oligómeros de beta-A y/o placas. Los oligómeros de beta-A y/o placas así marcados pueden hacerse visibles por

20 RM de protones etc.

Otro objetivo de la presente invención es el uso del polímero para el impedimento de la proliferación de oligómeros de beta-amiloide tóxicos.

25 Los polímeros de acuerdo con la invención se usan además también para la formación de complejos de polímero-oligómero de beta-amiloide no tóxicos.

Además se da a conocer un kit que contiene el polímero de acuerdo con la invención. En un kit de este tipo pueden estar envasados los polímeros de acuerdo con la invención en recipientes eventualmente con/en tampones o

30 soluciones. Todos los componentes del kit pueden estar envasados en el mismo recipiente o separados uno de otro. Además, el kit puede contener instrucciones para su uso. Un kit de este tipo puede contener por ejemplo los polímeros de acuerdo con la invención en un frasco de inyección con tapón y/o septo. Además puede estar contenido en éste por ejemplo también una jeringuilla de un solo uso.

35 Las secuencias que pueden usarse de acuerdo con la invención están representadas a continuación:

RD 2: ptlhthnrrrr (SEQ ID NO: 1)

D3D3: rprtrlhthnrrprtrlhthnr (SEQ ID NO:13)

D3nwnD3: rprtrlhthnwnrprtrlhthnr (SEQ ID NO:14)

40 extremos N-terminales libres de D3 doble: (rprtrlhthnr)<sub>2</sub>-PEG3 (SEQ ID NO: 15)

extremos C-terminales libres de D3 doble: PEG5-(rprtrlhthnr)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:16)

kqhvhveysdhrfead (SEQ ID NO:2)

shyrhisp (SEQ ID NO:3)

giswqqshhlva (SEQ ID NO:4)

45 prtrlhth (SEQ ID NO:5)

qshyrhispaqv (SEQ ID NO:6)

qshyrhispdqv (SEQ ID NO:7)

qshyrhispar (SEQ ID NO:8)

kshyrhispakv (SEQ ID NO:9)

50 rprtrlhthnr (SEQ ID NO:10)

rprtrlhthrte (SEQ ID NO:11)

kprtrlhthnr (SEQ ID NO:12)

daefrhdsgye (SEQ ID NO:17)

hhghspnvsqvr (SEQ ID NO:18)

55 gsfstqvgslhr (SEQ ID NO:19)

htgtqsyvprl (SEQ ID NO:20)

tlayaraymvap (SEQ ID NO:21)

tlayaraymvap (SEQ ID NO:22)

atpqndllktfph (SEQ ID NO:23)

60 tqpetdllrvqf (SEQ ID NO:24)

citwppgtlty (SEQ ID NO:25)

fletgpiyadg (SEQ ID NO:26)

lvppthrhwpvt (SEQ ID NO:27)

appgnwrnylmp (SEQ ID NO:28)

65 dnysnyvpgtkp (SEQ ID NO:29)

svsvgmkprrp (SEQ ID NO:30)

slpnpfsvssfg (SEQ ID NO:31)  
 yvhnpyhlpnpp (SEQ ID NO:32)  
 crrlhtyigpvt (SEQ ID NO:33)  
 5 gatmkkmdhvt (SEQ ID NO:34)  
 lgktqklsdahs (SEQ ID NO:35)  
 ddqarpymaygp (SEQ ID NO:36)  
 gdtwvnmvsmvh (SEQ ID NO:37)  
 gytwvnmvsmvh (SEQ ID NO:38)  
 10 wtnvarlatpy (SEQ ID NO:39)  
 qtqalyhsrqvh (SEQ ID NO:40)  
 nsqtqtlhlfph (SEQ ID NO:41)  
 hntsanilhssh (SEQ ID NO:42)  
 shinptsfwpap (SEQ ID NO:43)  
 ffsnplymwprp (SEQ ID NO:44)  
 15 gpspfnpqptpv (SEQ ID NO:45)  
 fsdhksptppr (SEQ ID NO:46)  
 stsvypppsaw (SEQ ID NO:47)  
 yglptqansmql (SEQ ID NO:48)  
 hnrtndntyirpt (SEQ ID NO:49)  
 20 lqqplgnnrpns (SEQ ID NO:50)  
 kpedsaaypqr (SEQ ID NO:51)  
 rpedsvitktqnt (SEQ ID NO:52)  
 raadsgctptkh (SEQ ID NO:53)  
 rprtrlhtrnt (SEQ ID NO:54)  
 25 rprtrlhthtnv (SEQ ID NO:55)  
 rprtrlhthtnr (SEQ ID NO:56)  
 rprtrlhthrkq (SEQ ID NO:57)  
 rprtrlhtrnr (SEQ ID NO:58)  
 rrsplhtrnr (SEQ ID NO:59)  
 30 lrsprqripri (SEQ ID NO:60)  
 rkrqlrmttprp (SEQ ID NO:61)  
 shyrhispak (SEQ ID NO:62)  
 extremos N-terminales libres de D3 doble: (rprtrlhtrnr)2- (SEQ ID NO:63)  
 extremos C-terminales libres de D3 doble: (rprtrlhtrnr)2 (SEQ ID NO:64)  
 35 DB 3: rpitrlrthqnr (SEQ ID NO: 65),  
 D3: rprtrlhtrnr (SEQ ID NO:66)  
 RD 1: pnhhrrrrrtl (SEQ ID NO: 67)  
 RD 3: rrpitrhthnrr (SEQ ID NO: 68)  
 D3-delta-hth: rprtrlnr (SEQ ID NO:69)  
 40 NT-D3: rprtrl (SEQ ID NO: 70)  
 DB 1: rpitrlhtrnr (SEQ ID NO: 71),  
 DB 2:rpitrlqthqnr (SEQ ID NO: 72),  
 DB 4: rprtrlrthqnr (SEQ ID NO: 73 ())  
 DB 5: rpitrlqtheqr (SEQ ID NO. 74)  
 45 D3-delta-hth D3-delta-hth: rprtrlnrrprtrlnr (SEQ ID NO:75)  
 RD 2- RD 2: ptlthnrrrrrptlthnrrrrr (SEQ ID NO: 76)  
 DO 3: sgwhynwqywwk (SEQ ID NO:77)  
 rprtrsgwhynwqywwkrr (SEQ ID NO:78)  
 50 ptlsgwhynwqywwkrrrrr (SEQ ID NO:79)

Los anticuerpos que se unen a beta-A están representados a continuación:  
 Los anticuerpos que

- 55 a) se unen a una secuencia retro-inversa del péptido beta-amiloide o fragmentos parciales de péptido beta-amiloide y/o  
 b) se unen a los dominios de multimerización del péptido beta-amiloide y también a péptido beta-amiloide y/o  
 c) se unen a una de las secuencias de acuerdo con la invención mencionadas anteriormente seleccionadas del grupo:
- 60 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID
- 65

NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79 o secuencias homólogas de las mismas.

5

### Ejemplos:

#### Ejemplo 1:

10 Se prepararon los siguientes cuatro dímeros de D3:

D3D3: rprtrlhthrrrrprtrlhthrrr (SEQ ID NO:13)

D3nwnD3: rprtrlhthrrnmwnrprtrlhthrrr (SEQ ID NO:14)

15 extremos N-terminales libres de D3 doble: (rprtrlhthrrr)<sub>2</sub>-PEG3 (SEQ ID NO:15)

extremos C-terminales libres de D3 doble: PEG5-(rprtrlhthrrr)<sub>2</sub> (SEQ ID NO:16)

Además se prepararon dímeros (a través de síntesis química o bien síntesis de péptidos) que están constituidos por D3 y D1 (secuencia qshyrhispaqv, SEQ ID NO:6) o D3 y V1, siendo V1 una variante de D1 con delección del primer aminoácido en el extremo N-terminal (secuencia shyrhispaqk, SEQ ID NO:62)

20 D3D1  
D3V1  
V1D3

#### Ejemplo 2:

25

Ensayo de tioflavina T

Los dímeros de D3 preparados en el ejemplo 1 así como un monómero de D3 se compararon en un ensayo de tioflavina-T (ThT) habitual, conocido por el experto. ThT es un colorante que tienen en la unión a fibrillas regular una fluorescencia más alta y por consiguiente sirve como medida de la fibrilación. Los dímeros de D3 redujeron la fibrilación de beta-A de manera mucho más eficaz que el monómero de D3.

30

La figura 1 muestra los resultados del ensayo ThT para el análisis del comportamiento de agregación de beta-A 1-42 en presencia de D3 o bien multímeros de D3. El sedimento de beta-A se preparó mediante incubación previa con HFIP durante la noche y posterior evaporación por medio de centrifugación a vacío (222  $\mu$ M de  $\beta$ A en HFIP). Los sedimentos de beta-A se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS pH 7,4 (incl. 10  $\mu$ M de ThT y 10  $\mu$ M de D3 o bien multímero de D3) y se alicuotaron para una determinación de 4 veces. La fluorescencia de ThT se midió con  $\lambda_{ex}$  440 nm y  $\lambda_{em}$  = 490 nm en el espectrómetro de fluorescencia.

35

#### Ejemplo 3:

40

Los dímeros de D3D1 preparados en el ejemplo 1 así como los monómeros de D1 y D3 se compararon en un ensayo de ThT habitual, conocido por el experto, ensayo ChTThT.

45

Los dímeros de D3D1 habían reducido la fibrilación de beta-A de manera mucho más eficaz que el monómero de D3.

La figura 2 muestra los resultados del ensayo ThT para el análisis del comportamiento de agregación de beta-A 1-42 en presencia de D3 y D1 o bien multímeros de D3D1. Se incubó previamente beta-A en HFIP durante la noche (222  $\mu$ M de beta-A en HFIP). A continuación se prepararon alícuotas de 13,5  $\mu$ g y se separó por evaporación HFIP durante la noche. Los sedimentos de beta-A se resuspendieron en 270  $\mu$ l de PBS pH 7,4 (incl. 10  $\mu$ M de ThT) y a continuación se añadió la correspondiente concentración de D3 o bien multímero de D3D1 (5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M o bien 100  $\mu$ M), después se alicuotó para una determinación de 5 veces. La fluorescencia de ThT se midió con  $\lambda_{ex}$  440 nm y  $\lambda_{em}$  = 490 nm en el espectrómetro de fluorescencia.

50

#### Ejemplo 4:

55

Los dímeros de D3 preparados en el ejemplo 1 así como el monómero de D3 se mezclaron con beta-A1-42 y se sometieron a una centrifugación con gradiente de densidad. Las distribuciones de tamaño de beta-A en solución y mezclas de péptidos de beta-A se sometieron a estudio a este respecto mediante análisis de sedimentación para determinar un gradiente de iodixanol (5-50 %). Las mezclas contenían 80  $\mu$ M de beta-A y 20 (D3) o 10 (D3D3)  $\mu$ M de péptido. Tras la centrifugación se obtuvieron 15 fracciones de en cada caso 140  $\mu$ l mediante pipeteado secuencial de la superficie y se analizaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) y posterior coloración con plata. Los resultados (figura 3) muestran que los péptidos reducen significativamente el contenido de oligómeros de beta-A (fracciones 4-10), D3D3 en el momento sometido a ensayo en una medida bastante más alta que D3. Se producen grandes agregados, que pueden detectarse en las fracciones 12-15. En otros estudios resulta que precipita D3-oligómero beta-A y se convierte en agregados grandes, amorfos y no tóxicos (Funke et al.,

60

65



ACS Chem. Neurosci. 2010).

### **Ejemplo 5:**

5 Las sustancias de acuerdo con la invención son capaces de inhibir la formación de fibrillas y destruir las fibrillas formadas previamente. Se sometió a estudio cómo de eficaces son los dímeros inhibidores (D3D3 SEQ ID NO: 13, RD2RD2 SEQ ID NO: 76, D3( $\Delta$ )delta-hthD3( $\Delta$ )delta-hth SEQ ID NO: 75) en comparación con los correspondientes monómeros inhibidores (D3 SEQ ID NO: 66, RD2 SEQ ID NO: 1, D3( $\Delta$ )delta-hth SEQ ID NO: 69) en un ensayo de desfibrilación de tioflavina T (ThT).

10 A este respecto se sometió a estudio qué proporción de fibrillas formadas previamente positivas para ThT se reducía tras un determinado tiempo de incubación. La tioflavina T (ThT) modifica durante la interacción con fibrillas amiloides, positivas para ThT sus propiedades espectroscópicas de manera medible. La disminución de la fluorescencia de ThT medida ( $\lambda_{em}$ : 450 nm,  $\lambda_{ex}$ : 490 nm) reproduce una disminución de estructuras de hoja plegada  $\beta$ , que son características para fibrillas de beta-A.

15 Para la preparación de fibrillas de beta-A formadas previamente se incubó beta-A(1-42) sintético 33  $\mu$ M durante 6 días en fosfato de sodio 10 mM pH 7,4 y 8,5 % de DMSO a 37 °C. Las fibrillas de beta-A producidas mediante esto se mezclan para dar 20  $\mu$ M con 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l de la respectiva sustancia (D3D3, RD2RD2, D3delta-hthD3delta-hth, D3, RD2, D3 $\Delta$ hth) y 10  $\mu$ M de ThT. Se introdujeron 50  $\mu$ l de cada mezcla de reacción en un pocillo de una placa de microtitulación negra con 384 pocillos (Nunc, Langensfeld). La fluorescencia de ThT se siguió durante 17,5 h. A este respecto se agitó la placa de microtitulación antes de cada medición durante 30 s. Todas las muestras se midieron cinco veces.

25 En la evaluación se determinaron valor medio, desviación estándar y significancia (entre efectores monoméricos y diméricos). La fluorescencia de ThT de los efectores se normalizó con respecto a la fluorescencia de ThT de fibrillas de beta-A en presencia de sustancias inhibidoras.

30 Todas las sustancias inhibidoras sometidas a ensayo mostraron una disminución de la fluorescencia de ThT (figura 4). Esto muestra que todas éstas podían transformar fibrillas de beta-A formadas previamente en especies de beta-A no fibrilares. Las sustancias diméricas D3D3, RD2RD2 y D3delta-hthD3delta-hth mostraron a este respecto un efecto significativamente más fuerte en comparación con los péptidos de D3 monoméricos, RD2 y D3delta- $\Delta$ hth. La significancia se determinó por medio del ensayo de Mann-Whitney y está indicada en la figura con asterisco: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

35

### **Ejemplo 6:**

40 Para obtener datos de afinidad cuantitativos de comparación para D3 y D3D3, se prepararon fibrillas de beta-A-1-42, tal como se describe en el ejemplo 6. A diferencia de esto se usó una mezcla del 90 % de beta-A-1-42 y del 10 % de beta-A-1-42, que estaba biotinilado en el extremo aminoterminal, para el ensayo de fibrilación. Para separar estas fibrillas de posibles proporciones de otros conformeros de beta-A, por ejemplo monómeros y oligómeros amorfos, se sometieron las preparaciones de fibrillas a un ciclo de centrifugación con gradiente de densidad, tal como se describe en el ejemplo 4. Solo las fibrillas obtenidas en las fracciones 11 y 12 se usaron a continuación como ligando en un análisis de resonancia por plasmones superficiales. A este respecto se inmovilizaron éstas sobre un chip revestido con estreptavidina (Sensor Chip SA). A continuación se determinaron las afinidades de los analitos D3 y D3D3 por medio de análisis "single cycle kinetic". Las concentraciones de analito usadas, los sensorgramas obtenidos (líneas gruesas), las curvas de ajuste obtenidas (líneas discontinuas delgadas) y las constantes de disociación obtenidas están contenidas en las figuras 5 y 6.

50 A partir de los resultados se vuelve claro que el monómero de D3 se une a dos sitios de unión ligeramente distintos con constantes de disociación de 1,1  $\mu$ M y 0,12  $\mu$ M. También el dímero de D3 se une a dos sitios de unión distintos, uno de ellos con una constante de disociación similar al monómero de D3 de 0,17  $\mu$ M, sin embargo el otro con una constante de disociación más baja en varios órdenes de magnitud de 8,8 pM. Esto muestra que las sustancias polivalentes (en este caso D3D3) se une de manera casi 10000 veces más fuerte a su diana que la correspondiente sustancia monovalente (en este caso D3).

55

### **Listado de secuencias**

60 <110> Forschungszentrum Juelich GmbH

<120> Polímeros que contienen péptidos D multivalentes que se unen a beta-amiloide y su uso

<130> FZJ1201DE

65 <160> 79

ES 2 754 308 T3

<170> patentin version 3.5

<210> 1  
<211> 12  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> péptido D

<400> 1

Pro Thr Leu His Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

15 <210> 2  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> péptido D

<400> 2

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

25

<210> 3  
<211> 8  
<212> PRT  
30 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

35 <400> 3

Ser His Tyr Arg His Ile Ser Pro  
1 5

40 <210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
45 <223> péptido D

<400> 4

Gly Ile Ser Trp Gln Gln Ser His His Leu Val Ala  
1 5 10

50

<210> 5  
<211> 8  
<212> PRT  
55 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

<400> 5  
60

ES 2 754 308 T3

Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His  
1 5

5 <210> 6  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido D  
<400> 6

Gln Ser His Tyr Arg His Ile Ser Pro Ala Gln Val  
1 5 10

15 <210> 7  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> péptido D  
<400> 7

25 Gln Ser His Tyr Arg His Ile Ser Pro Asp Gln Val  
1 5 10

30 <210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

35 <220>  
<223> péptido D  
<400> 8

Gln Ser His Tyr Arg His Ile Ser Pro Ala Arg  
1 5 10

40 <210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

45 <220>  
<223> péptido D  
<400> 9

Lys Ser His Tyr Arg His Ile Ser Pro Ala Lys Val  
1 5 10

50 <210> 10  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

55 <220>  
<223> péptido D  
<400> 10

ES 2 754 308 T3

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 1 5 10

5 <210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 10 <223> péptido D

<400> 11

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Thr Glu  
 1 5 10

15 <210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> péptido D

<400> 12

25 Lys Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 24  
 30 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido D

35 <400> 13

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
 1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 20

40 <210> 14  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> péptido D

<400> 14

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Asn Trp Asn Arg  
 1 5 10 15

Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 20 25

50

ES 2 754 308 T3

<210> 15  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> péptido D  
 <220>  
 10 <223> extremos N-terminales libres de D3 doble (rprrlhthrrr)2-PEG3  
 <400> 15  
 Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
 1 5 10 15  
 Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 20  
 15  
 <210> 16  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> péptido D  
 <220>  
 25 <223> extremos C-terminales libres de D3 doble: PEG5-(rprrlhthrrr)2  
 <400> 16  
 Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
 1 5 10 15  
 Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
 20  
 30  
 <210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> péptido D  
 <400> 17  
 40  
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu  
 1 5 10  
 <210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> péptido D  
 50  
 <400> 18

ES 2 754 308 T3

His His Gly His Ser Pro Asn Val Ser Gln Val Arg  
1 5 10

5 <210> 19  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido D  
<400> 19

Gly Ser Phe Ser Thr Gln Val Gly Ser Leu His Arg  
1 5 10

15 <210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> péptido D  
<400> 20

His Thr Gly Thr Gln Ser Tyr Val Pro Arg Leu  
1 5 10

25 <210> 21  
<211> 12  
<212> PRT  
30 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D  
35 <400> 21

Thr Leu Ala Tyr Ala Arg Ala Tyr Met Val Ala Pro  
1 5 10

40 <210> 22  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

45 <220>  
<223> péptido D  
<400> 22

Thr Leu Ala Tyr Ala Arg Ala Tyr Met Val Ala Pro  
1 5 10

50 <210> 23  
<211> 12  
<212> PRT  
55 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D  
<400> 23



ES 2 754 308 T3

<400> 28

Ala Pro Pro Gly Asn Trp Arg Asn Tyr Leu Met Pro  
1 5 10

5 <210> 29  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10 <220>  
<223> péptido D

<400> 29

Asp Asn Tyr Ser Asn Tyr Val Pro Gly Thr Lys Pro  
1 5 10

15 <210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

20 <220>  
<223> péptido D

25 <400> 30

Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro  
1 5 10

30 <210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

35 <220>  
<223> péptido D

<400> 31

Ser Leu Pro Asn Pro Phe Ser Val Ser Ser Phe Gly  
1 5 10

40 <210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

45 <220>  
<223> péptido D

50 <400> 32

Tyr Val His Asn Pro Tyr His Leu Pro Asn Pro Pro  
1 5 10

55 <210> 33  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D



ES 2 754 308 T3

<400> 33

cys Arg Arg Leu His Thr Tyr Ile Gly Pro Val Thr  
1 5 10

5

<210> 34  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

10

<220>  
<223> péptido D

<400> 34

15

Gly Ala Thr Met Lys Lys Met Asp Asp His Thr Val  
1 5 10

20

<210> 35  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

25

<220>  
<223> péptido D

<400> 35

Leu Gly Lys Thr Gln Lys Leu Ser Asp Ala His Ser  
1 5 10

30

<210> 36  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

35

<220>  
<223> péptido D

<400> 36

Asp Asp Gln Ala Arg Pro Tyr Met Ala Tyr Gly Pro  
1 5 10

40

<210> 37  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

45

<220>  
<223> péptido D

<400> 37

50

Gly Asp Thr Trp Val Asn Met Val Ser Met Val His  
1 5 10

55

<210> 38  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>

ES 2 754 308 T3

<223> péptido D  
 <400> 38

5 Gly Tyr Thr Trp Val Asn Met Val Ser Met Val His  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 10 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido D  
 15 <400> 39

Trp Thr Asn Thr Val Ala Arg Leu Ala Thr Pro Tyr  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 20 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido D  
 25 <400> 40

Gln Thr Gln Ala Leu Tyr His Ser Arg Gln Val His  
 1 5 10

30 <210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> péptido D

40 <400> 41

Asn Ser Gln Thr Gln Thr Leu His Leu Phe Pro His  
 1 5 10

<210> 42  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 45 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> péptido D  
 50 <400> 42

His Asn Thr Ser Ala Asn Ile Leu His Ser Ser His  
 1 5 10

55 <210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

ES 2 754 308 T3

<220>  
 <223> péptido D

5 <400> 43

Ser His Ile Asn Pro Thr Ser Phe Trp Pro Ala Pro  
 1 5 10

10 <210> 44  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

15 <220>  
 <223> péptido D

<400> 44

Thr Phe Ser Asn Pro Leu Tyr Met Trp Pro Arg Pro  
 1 5 10

20 <210> 45  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

25 <220>  
 <223> péptido D

<400> 45

Gly Pro Ser Pro Phe Asn Pro Gln Pro Thr Pro Val  
 1 5 10

30 <210> 46  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

35 <220>  
 <223> péptido D

40 <400> 46

Phe Ser Asp His Lys Ser Pro Thr Pro Pro Pro Arg  
 1 5 10

45 <210> 47  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

50 <220>  
 <223> péptido D

<400> 47

Ser Thr Ser Val Tyr Pro Pro Pro Pro Ser Ala Trp  
 1 5 10

55 <210> 48  
 <211> 12  
 <212> PRT

ES 2 754 308 T3

<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

5 <400> 48

Tyr Gly Leu Pro Thr Gln Ala Asn Ser Met Gln Leu  
1 5 10

10 <210> 49  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

15 <220>  
<223> péptido D

<400> 49

His Asn Arg Thr Asp Asn Thr Tyr Ile Arg Pro Thr  
1 5 10

20

25 <210> 50  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

30 <400> 50

Leu Gln Gln Pro Leu Gly Asn Asn Arg Pro Asn Ser  
1 5 10

35 <210> 51  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

40 <400> 51

Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Pro Gln Asn Arg  
1 5 10

45 <210> 52  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

50 <220>  
<223> péptido D

<400> 52

55

Arg Pro Glu Asp Ser Val Ile Thr Lys Thr Gln Asn Thr  
1 5 10

60 <210> 53  
<211> 12  
<212> PRT

ES 2 754 308 T3

<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

5 <400> 53

Arg Ala Ala Asp Ser Gly cys Thr Pro Thr Lys His  
1 5 10

10 <210> 54  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

15 <220>  
<223> péptido D

<400> 54

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Thr  
1 5 10

20

25 <210> 55  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

30 <400> 55

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Thr Asn Val  
1 5 10

35 <210> 56  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

40 <400> 56

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Thr Asn Arg  
1 5 10

45 <210> 57  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

50 <220>  
<223> péptido D

<400> 57

55

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Lys Gln  
1 5 10

60 <210> 58  
<211> 12  
<212> PRT

ES 2 754 308 T3

<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

5 <400> 58

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr Leu Arg Asn Arg  
1 5 10

10 <210> 59  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

15 <220>  
<223> péptido D

<400> 59

Arg Arg Arg Ser Pro Leu His Thr His Arg Asn Arg  
1 5 10

20 <210> 60  
<211> 12  
<212> PRT

25 <213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

30 <400> 60

Leu Arg Ser Pro Arg Gln Arg Arg Ile Pro Arg Ile  
1 5 10

35 <210> 61  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

40 <400> 61

Arg Lys Arg Gln Leu Arg Met Thr Thr Pro Arg Pro  
1 5 10

45 <210> 62  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

50 <220>  
<223> péptido D

<400> 62

55 <210> 63  
<211> 24  
<212> PRT

60

ES 2 754 308 T3

<213> secuencia artificial

<220>  
<223> péptido D

5

<220>  
<223> extremos N-terminales libres de D3 doble (rprtrlhthnr)2

<400> 63

10

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
20

<210> 64  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

15

<220>  
<223> péptido D

20

<220>  
<223> extremos C-terminales libres de D3 doble: (rprtrlhthnr)2

<400> 64

25

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
20

<210> 65  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30

<220>  
<223> péptido D

35

<400> 65

Arg Pro Ile Thr Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg  
1 5 10

40

<210> 66  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

45

<220>  
<223> péptido D

<400> 66

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
1 5 10

50

<210> 67

ES 2 754 308 T3

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> péptido D

<400> 67

10

Pro Asn His His Arg Arg Arg Arg Arg Thr Thr Leu  
 1 5 10

<210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>  
 <223> péptido D

20

<400> 68

Arg Arg Pro Thr Leu Arg His Thr His Asn Arg Arg  
 1 5 10

<210> 69  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>  
 <223> péptido D

30

<400> 69

Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Asn Arg  
 1 5

35

<210> 70  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>  
 <223> péptido D

<400> 70

45

Arg Pro Arg Thr Arg Leu  
 1 5

<210> 71  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50

<220>  
 <223> péptido D

55

<400> 71

Arg Pro Ile Thr Arg Leu His Thr Asp Arg Asn Arg  
 1 5 10

60

<210> 72  
 <211> 12



ES 2 754 308 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> péptido D

<400> 72

Arg Pro Ile Thr Thr Leu Gln Thr His Gln Asn Arg  
 1 5 10

10 <210> 73  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> péptido D

<400> 73

20 Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg  
 1 5 10

<210> 740  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> péptido D

30 <400> 74

Arg Pro Ile Thr Arg Leu Gln Thr His Glu Gln Arg  
 1 5 10

35 <210> 75  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> péptido D

<400> 75

Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Asn Arg  
 1 5 10 15

45 <210> 76  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> péptido D

55 <400> 76

ES 2 754 308 T3

Pro Thr Leu His Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Leu His Thr His Asn  
Arg

1 5 10 15  
20

Arg Arg Arg Arg  
1 5

5 <210> 77  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> péptido D  
<400> 77

Ser Gly Trp His Tyr Asn Trp Gln Tyr Trp Trp Lys  
1 5 10

15 <210> 78  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> péptido D  
<400> 78

Arg Pro Arg Thr Arg Ser Gly Trp His Tyr Asn Trp Gln Tyr Trp Trp  
1 5 10 15

25 Lys Arg Asn Arg  
20

30 <210> 79  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> péptido D  
<400> 79

Pro Thr Leu Ser Gly Trp His Tyr Asn Trp Gln Tyr Trp Trp Lys Arg  
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg  
20

## REIVINDICACIONES

1. Polímero que contiene al menos dos sustancias (monómeros), que se unen a un oligómero de beta-amiloide, siendo una sustancia (monómero) de las al menos dos sustancias SEQ ID NO: 1 (RD2).
- 5 2. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** cada monómero, de los que está constituido el polímero, se une a un monómero y/u un oligómero y/o fibrillas de péptido beta-amiloide con una constante de disociación (valor KD) de como máximo 500 pM.
- 10 3. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** contiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más monómeros.
4. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** otros monómeros se seleccionan del grupo que está constituido por:
- 15 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ
- 20 ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78 y SEQ ID NO:79
- 25 o cualquier combinación discrecional de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de estos monómeros.
5. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los monómeros están enlazados sin ligadores, o sea directamente entre sí, o están enlazados con un grupo de ligadores entre sí.
- 30 6. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** los monómeros están enlazados de manera lineal o ramificada entre sí.
7. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se trata de un dendrímero o por que los monómeros están enlazados con una molécula de plataforma o están enlazados en una combinación de estas opciones.
- 35 8. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** se une a oligómeros de beta-amiloide con una constante de disociación de como máximo 5 pM.
- 40 9. Polímero según una de las reivindicaciones anteriores para su uso en la medicina.
10. Kit que contiene un polímero según una de las reivindicaciones 1 - 8.
- 45 11. Sonda que contiene un polímero según una de las reivindicaciones 1 - 8.
12. Composición que contiene un polímero según una de las reivindicaciones 1 - 8.
13. Uso *in vitro* del polímero según una de las reivindicaciones 1-8 como sonda para la identificación, la determinación cualitativa y/o la identificación cuantitativa de oligómeros de beta-amiloide.
- 50 14. Polímero según una de las reivindicaciones 1 - 8 para su uso *in vivo* para el impedimento de oligómeros de beta-amiloide.
- 55 15. Polímeros según una de las reivindicaciones 1 - 8 para su uso *in vivo* para la formación de complejos de polímero-oligómero de beta-amiloide no tóxicos.

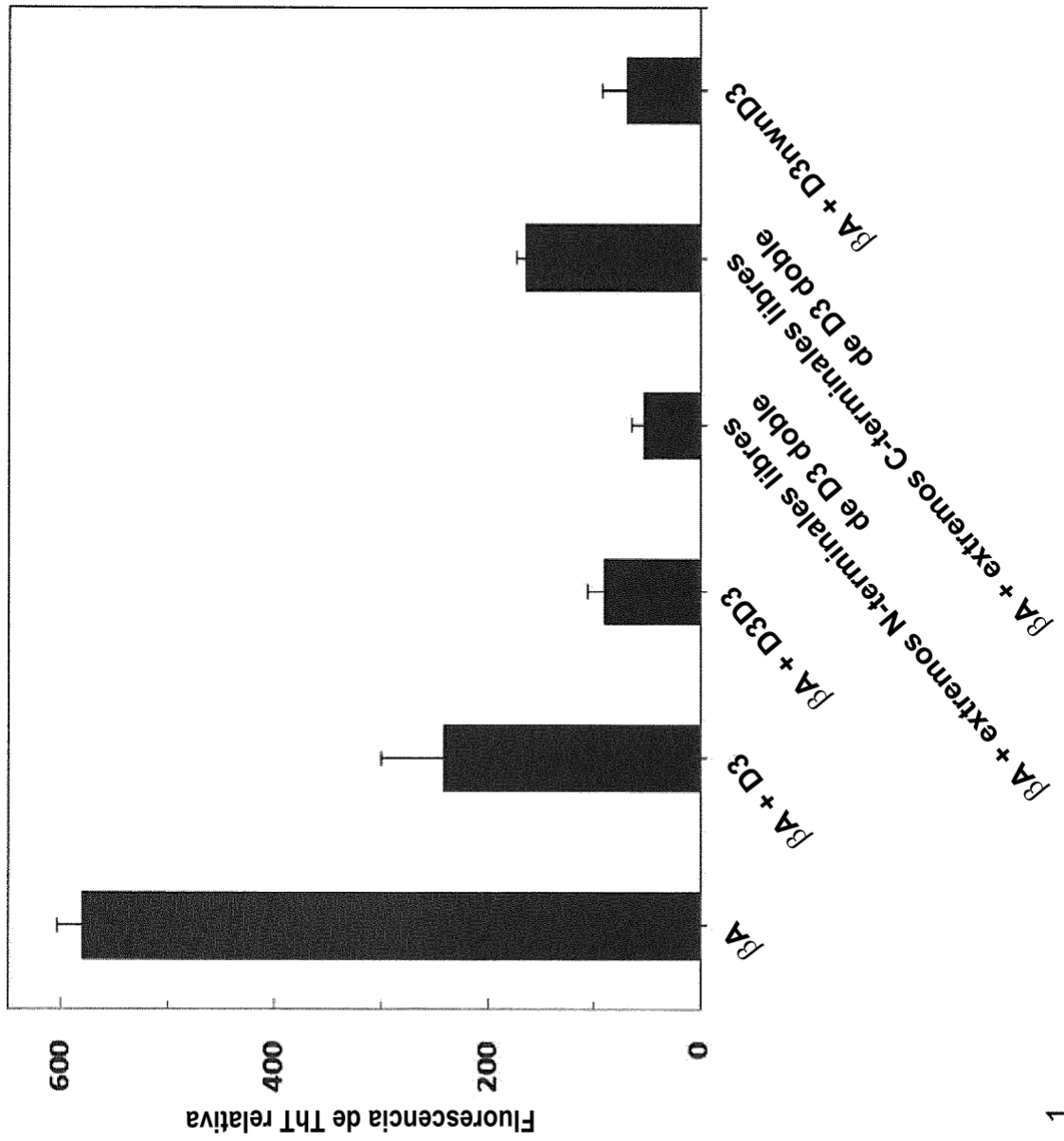


Fig. 1

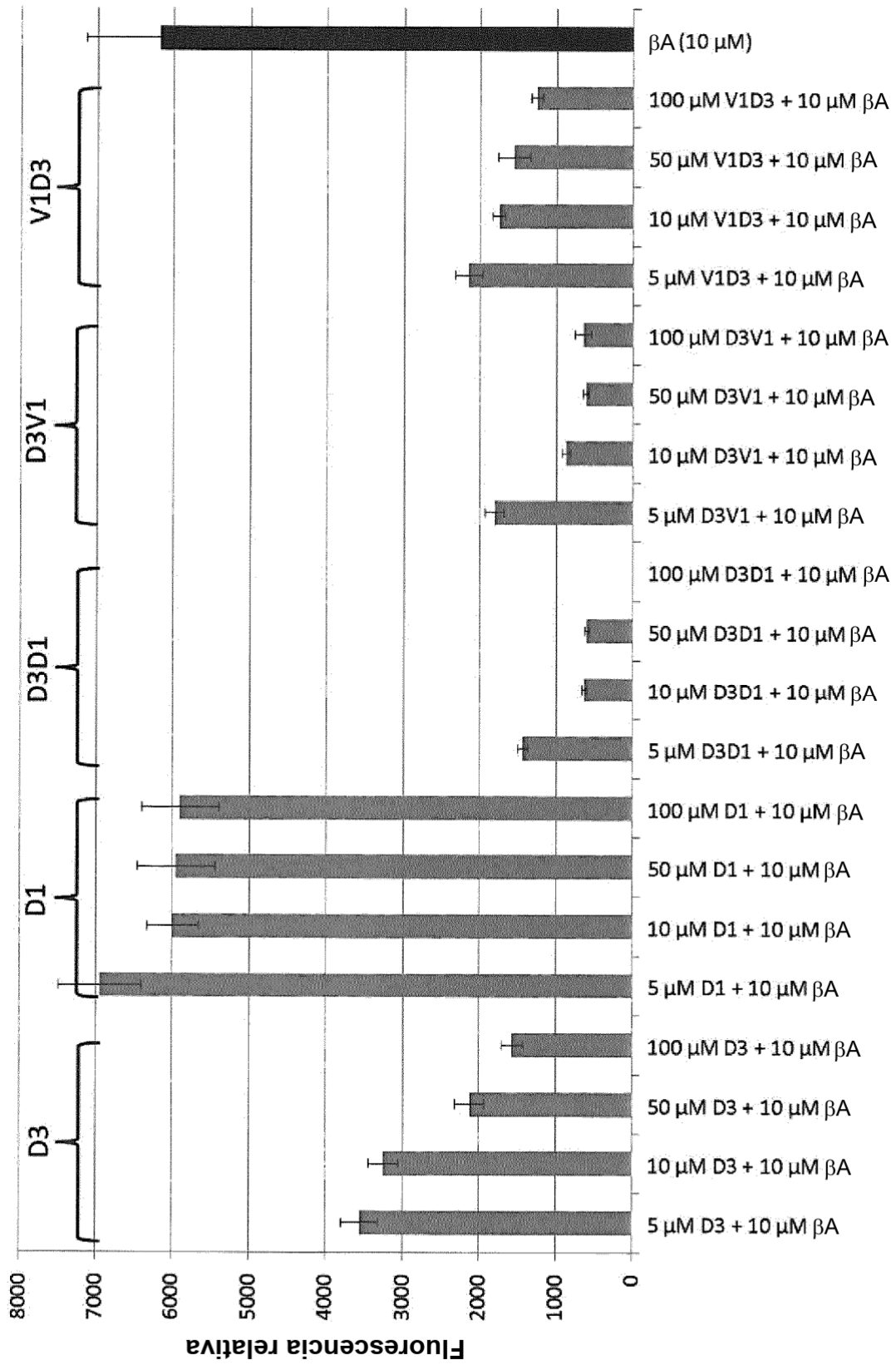


Fig. 2

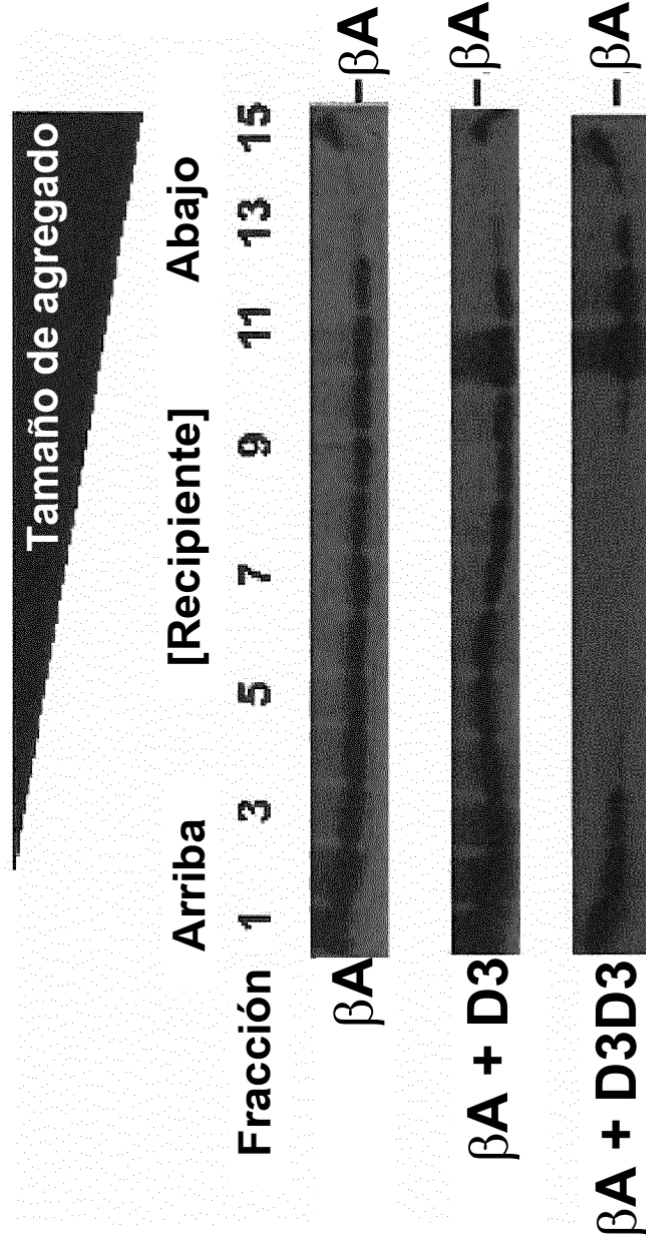


Fig. 3

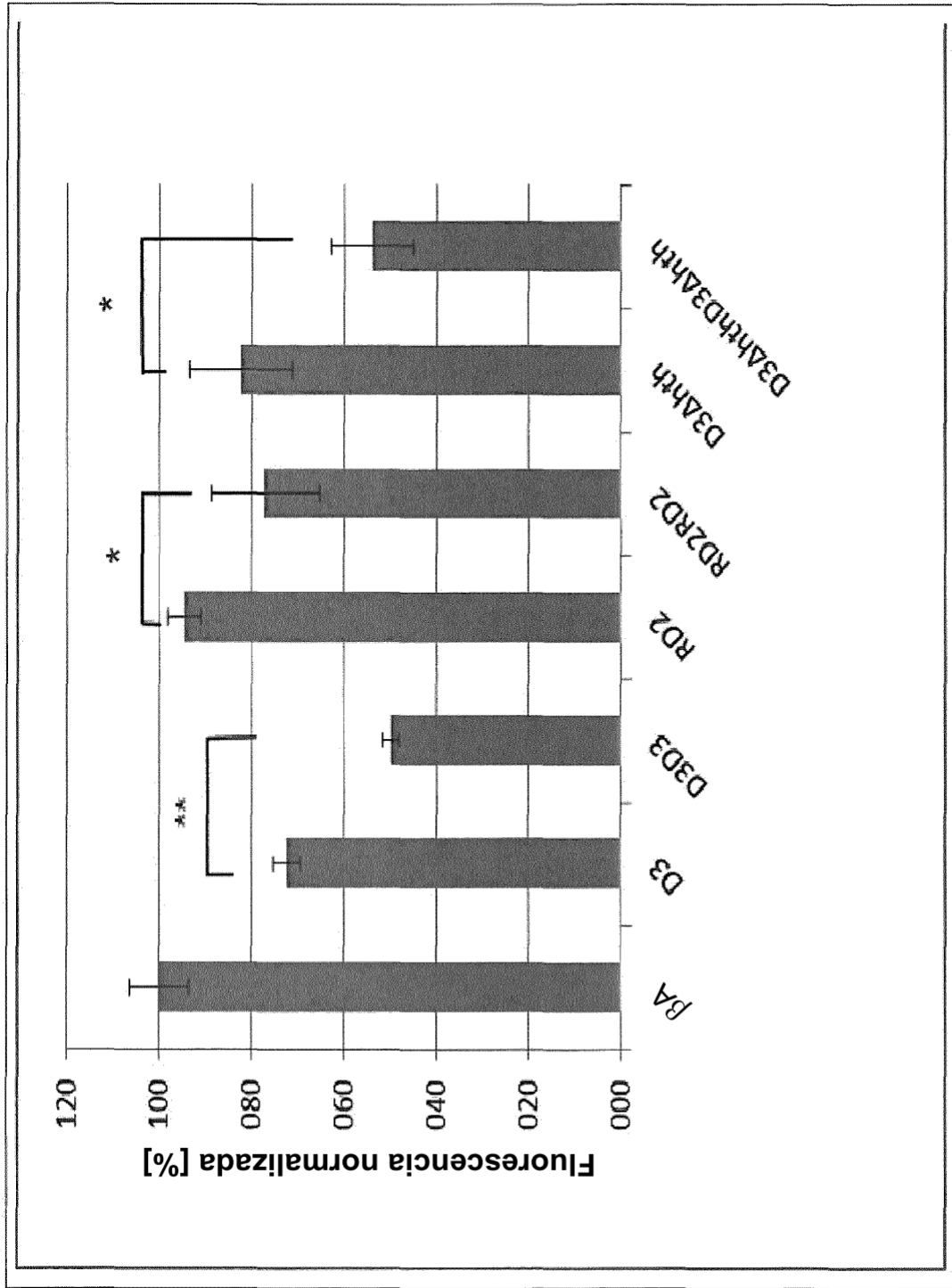
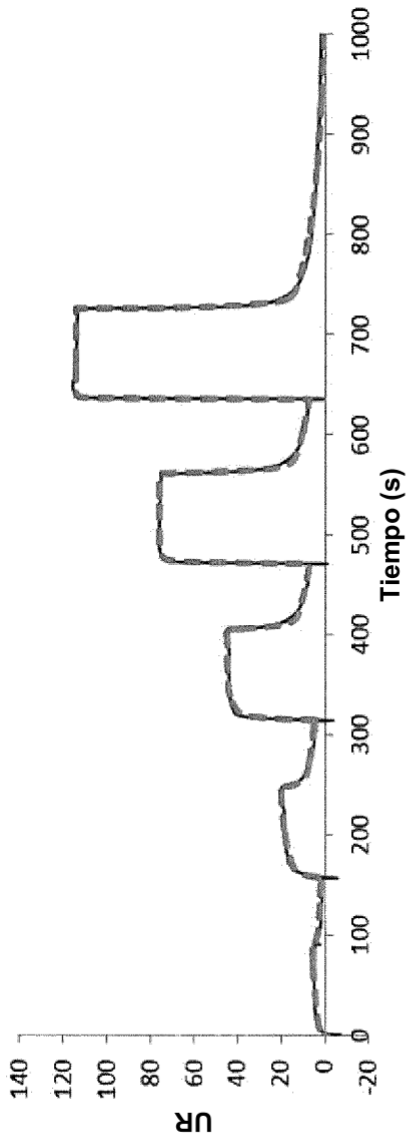


Fig. 4

Unión de D3 a fibrillas de beta-A(1-42)



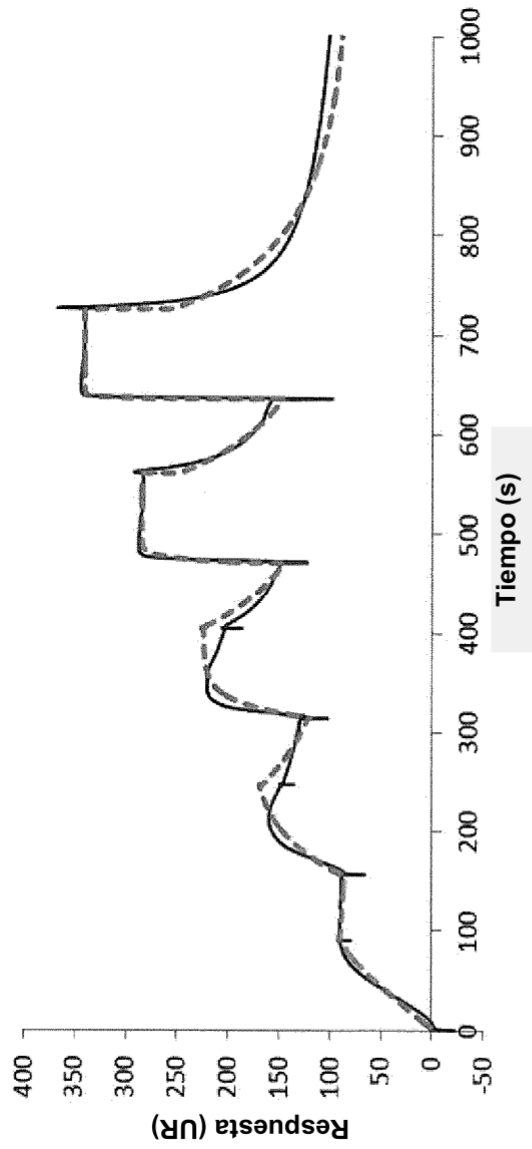
— Medición  
- - - Ajuste

ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (M)	Rmáx1 (UR)	RI (UR)	Chi² (UR²)	Conc (M)
3,06E+05	0,3398	1,11E-06	78,6	-1,048	0,678	4,88E-08
ka2 (1/Ms)	kd2 (1/s)	KD2 (M)	Rmáx2 (UR)	RI (UR)	Chi² (UR²)	Conc (M)
8,54E+04	0,01065	1,25E-07	16,47	-1,079	-1,769	1,95E-07
				1,954	7,81E-07	3,13E-06
				25,58	1,25E-05	

Fig. 5



Unión de D3D3 a fibrillas de beta-A(1-42)



ka1 (1/Ms)	kd1 (1/s)	KD1 (M)	Rmáx1 (UR)	Conc (M)	RI (UR)	Chi² (UR²)
4,00E+06	3,51E-05	8,77E-12	81,73	4,88E-08	-1,455	80,7
ka2 (1/Ms)	kd2 (1/s)	KD2 (M)	Rmáx2 (UR)	Conc (M)	RI (UR)	Chi² (UR²)
9,50E+04	0,01566	1,65E-07	175,6	1,95E-07	3,096	
				7,81E-07	-2,225	
				3,13E-06	36,46	
				1,25E-05	85,86	

Fig. 6