



DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social PHARMACIA & UPJOHN COMPANY sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América

No de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica) JOSE ANTONIO LLOREDA

País de Domicilio Estados Unidos de América

Departamento o Estado Michigan

Dirección 301 Henrietta Street, Kalamazoo, Michigan 49001, Estados Unidos de América

Ciudad Kalamazoo Teléfono 1 616 8337746

(74) DATOS DEL REPRESENTANTE LEGAL

Nombre JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección y Domicilio Calle 72 No 5-83 Piso 6, Bogotá, Colombia

Ciudad Bogotá D C Teléfono 57 1 3264270

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Kai S. Lee, Xiao-Dong Sun, Bruce M. Taylor, Dennis E. Epps y Allen E. Buhl

Identificación

Dirección 5235 Raborn Court, Portage, Michigan 49024, 5177 Shagbark Court, Portage, Michigan 49024, 7074 West H Avenue, Kalamazoo, Michigan 49024, 240 Point 'O' Woods Drive, Portage, Michigan 49002 y 2677 Woody No11 Drive, Portage, Michigan 49002, Estados Unidos de América

Ciudad Portage y Kalamazoo Teléfono 1 616 8337746

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención "ENSAYOS Y MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE CANALES DE SODIO COMO OBJETIVOS DE AMILOIDE B O DE SUS AGREGADOS"

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☒ UNIONISTA ☐
D.486

(33) País US (32) Fecha 23-12-99 (31) No Solicitud 60/172,032

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente Solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A.61K19/00

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Entre otras cosas, se proporcionan ensayos y métodos para diagnósticos y tratamiento de enfermedades (por ejemplo, el mal de Alzheimer) basados en la sorprendente observación de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio. En particular, se proporcionan métodos para identificar compuestos que modulan dicha interacción, así como métodos para diagnóstico y tratamiento basados en esta interacción.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
El documento de representación legal debidamente otorgado, o mención de su protocolización ante la SIC 17 109	☒
Recibo de la tasa respectiva \$608 000,00	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina <u>SI</u>	
Copia de la primera solicitud US 60/172,032 de fecha 23-12-99	☒
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista	☐
Copia certificada de la primera solicitud	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los cuatro (4) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior.	
Traducción Simple No. LLC-139-2000 de fecha 20-12-00 de Gabriel Rueda Chadid	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐
Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería	☒

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSE ANTONIO LLOREDA

C C 17 159 681 de Bogotá TP No 10 784



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT 900175000 2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación : 00057116 00000000 Folios 148

Fecha (IMP): 2009-12-21 16:31:35

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA 77,021
FECHA DICIEMBRE 18 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No PAGO	Vr PAGO
JOSE LLOPCHA CANACHO & COCONSIGNACION		BANCO POPULAR	BOGOTA	050 00110 6	2537070	11,326,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01 01 SOLICITUDES	
	1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE 1ª	600,000 00
	TOTAL	600,000 00

SON SEISCIENTOS CERO MIL PESOS

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE 'J'

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
e-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D C, Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra

- a) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidas a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París —el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4—

- b) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.
- c) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud cuya prioridad ahora reivindico, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 9 de la Decisión 486 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes del País Miembro del Acuerdo de Cartagena.

9 2

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá los doctores JOSE LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA y/o AURA DUEÑAS RODRIGUEZ y/o GUSTAVO TAMAYO ARANGO y/o ANGELA MARIA RESTREPO para RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria y que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el número 17 109 En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos puedan intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida

Atentamente,



JOSE ANTONIO LLOREDA
T P No 10 784
CODIGO 231

RESUMEN OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Entre otras cosas, se proporcionan ensayos y métodos para diagnósticos y tratamiento de enfermedades (por ejemplo, el mal de Alzheimer) basados en la sorprendente observación de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio. En particular, se proporcionan métodos para identificar compuestos que modulan dicha interacción, así como métodos para diagnóstico y tratamiento basados en esta interacción.



ENSAYOS Y MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE CANALES DE SODIO COMO OBJETIVOS DE AMILOIDE β O DE SUS AGREGADOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

Esta invención proporciona, entre otras cosas, ensayos y métodos de diagnóstico y tratamiento basados en la sorprendente observación de una interacción entre el amiloide β o sus agregados con canales de sodio. En particular, proporciona métodos para identificar compuestos que modulan esta interacción y métodos de diagnóstico y tratamiento sobre la base de esta interacción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Ciertas enfermedades neurodegenerativas, tal como el mal de Alzheimer y el síndrome de Down, se caracterizan por la presencia de agregados insolubles de amiloide β (A β). Este péptido de 39-43 aminoácidos deriva por proteólisis anormal de la Proteína Precursora de Amiloide (PPA). Es sabido que los agregados o las placas de amiloide β , que se encuentran comúnmente en el cerebro y en el enredo neurofibrilar intraneuronal de los pacientes con mal de Alzheimer pueden modular el crecimiento neurítico, la sinaptogénesis, la plasticidad sináptica, o causar la muerte neuronal [Mattson et al, *Trends Neurosci*, 16, 406-415 (1993)]. Sin embargo, aún no se han determinado claramente los mecanismos por los cuales se producen estos efectos [Frazer et al, *Trends Neurosci*, 20, 67-72 (1997)].

En la actualidad, una teoría sostiene que estos efectos deletéreos pueden originarse a partir de la capacidad del amiloide β de promover la entrada crónica de calcio a las neuronas a través de la modulación de los canales iónicos neuronales de calcio [Daidson et al, *Brain Res*, 643, 324-327 (1994)], o a través de la formación de canales transmembrana permeables a cationes [Kawahara et al, *Biophysiol J*, 73, 67-75 (1997)] que permiten indiscriminadamente el ingreso de calcio, sodio y otros cationes al interior de la célula y destruir su homeostasis relacionada con el calcio. Se ha comprobado que los bloqueantes de canales de calcio que pueden atravesar la barrera hematoencefálica, tales como la nimodipina, pueden retrasar el avance del mal de Alzheimer en algunos pacientes.

7

[Tollefson, *Biol Psychiatry*, 27, 1133-1142 (1990)] De la misma forma se ha demostrado que el catión zinc, que se une a sitios específicos de amiloide β 1-40 [Bush et al, *Science* 265, 1464-1467 (1994)] puede bloquear el ingreso de calcio a través de canales de amiloide β 1-40 [Arispe et al, *Proc Natl Acad Sci*, 93, 1710-1715 (1996)]

Asimismo, se ha comprobado que los agregados de amiloide β inducen una actividad anormal de los canales de potasio. En cultivos de neuronas del hipocampo, el amiloide β abre un canal de potasio de alta conductancia sensible al calcio (es decir, BK sensible a la ibertoxina) [Furukawa et al, *Nature*, 379, 74-78 (1996)], que puede llevar a la pérdida crónica de potasio citoplasmático y destruir la habilidad de las neuronas de generar y propagar potenciales de acción críticos para las funciones de señales cerebrales. Esta actividad tan aberrante de los canales de potasio de hecho se ha observado en pacientes con mal de Alzheimer [Etcheberry et al, *Proc Natl Acad Sci*, 90, 8209-8213 (1993)]. También, en el cultivo de la línea celular colinérgica septal SN56, el amiloide β (por ejemplo, el amiloide β 1-40) produce la muerte celular por impacto sobre canales de potasio sensibles a TEA [Colom et al, *J Neurochemistry*, 70, 1925-1934 (1998)]

Estos estudios sugieren que los agregados de amiloide β ejercen sus efectos a través de múltiples objetivos (*targets*). Sin embargo, ninguno de los objetivos descriptos ha dado como resultado la inhibición rápida y completa de los impulsos eléctricos neuronales, críticos para la función cerebral, observada en estados avanzados del mal de Alzheimer. Además, los estudios de canales iónicos descriptos anteriormente se realizaron en cultivos de neuronas cuyas propiedades pueden haber sufrido cambios importantes durante la diferenciación en las condiciones de cultivo. Por lo tanto, es posible que los datos disponibles en la actualidad no representen la verdadera respuesta de las neuronas nativas.

Estudios genéticos recientes han mostrado que mutaciones en el precursor de la proteína amiloide y en los genes de presenilina afectan el procesamiento y la producción del amiloide β y, en consecuencia, están relacionados con la edad de comienzo del mal de Alzheimer y con la susceptibilidad a esta enfermedad. Otros estudios han mostrado que

8

variaciones en los genes ApoE también afectan la susceptibilidad al mal de Alzheimer y la edad del comienzo de la enfermedad. Hipotéticamente, el mal de Alzheimer espontáneo está bajo el control de otros genes y factores ambientales que aun se deben identificar.

Asimismo, se supone que la inhibición de la agregación del amiloide β y, en consecuencia, de su toxicidad es terapéuticamente beneficiosa en el tratamiento del mal de Alzheimer. Existen varios informes que dan evidencia de que pequeños agregados capaces de difundir [Lambert et al, *Proc Natl Acad Sci*, 95, 6448-6453 (1998), PCT International Application WO 98/33815] y protofibrillas [Harper et al, *Chem Biol*, 4, 119-125 (1997), Harper et al *Chem Biol*, 4, 951-959 (1997), Walsh et al, *J Biol Chem*, 272, 22364-22374 (1997)], y no el péptido fibrilar completo, podrían ser las especies del A β tóxicas para las células vivas. Las diferencias físicas en las supuestas especies tóxicas identificadas por estos grupos de investigación "soporta el concepto de que distintas estructuras del A β tienen actividades neurobiológicas particulares que se pueden manifestar de maneras diferentes mediante una lectura electrofisiológica" [Hartley et al, *J Neuroscience*, 19, 8876-8884 (1999)]. En consecuencia, la etiología del mal de Alzheimer puede ser bastante compleja y presentar una variedad de formas diferentes de diagnóstico y tratamiento.

Dentro de este contexto, la Patente 5 876 948 de los EE UU describe métodos de investigación para identificar inhibidores del efecto neurotóxico del amiloide β . En particular, la patente '948 proporciona un método de investigación de compuestos candidatos, que requiere la obtención de una célula tal como una neurona primaria, una célula neuronal o una célula derivada de tejido neuronal. La célula se pone en contacto con un compuesto candidato en presencia de una neurotoxina seleccionada del grupo constituido por amiloide β 1-38, β 1-40, β 1-43 y β 29-35, y se determina si el compuesto reduce el efecto de la neurotoxina (por ejemplo, reduce la muerte celular) o reduce la acumulación de amiloide β en la superficie de la célula. En consecuencia, esta patente no proporciona información sobre cómo averiguar cuáles son los compuestos que desencadenan los eventos celulares que preceden a la muerte de las células, excepto la

acumulación del péptido en la superficie celular. En consecuencia, se necesitan ensayos útiles para investigar los compuestos que ejercen efectos protectores en la etapa previa a la muerte celular mediada por amiloide β , y los compuestos que ejercen un efecto que no sea la interferencia en la deposición de amiloide β en la superficie celular. Además, la patente '948 aparentemente no considera ningún efecto del estado de agregación del amiloide β sobre la neurotoxicidad. La patente relacionada 5 137 873 de los EE UU presenta un método para tratar una enfermedad que se caracteriza por la acumulación del amiloide β que incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de taquicinina, como por ejemplo, la sustancia P.

La patente 5 892 018 de los EE UU hace referencia a secuencias de ADN que codifican una nueva subfamilia de canales de sodio sensibles a amilorida en el sistema nervioso central humano. La PCT International Application WO 98/54316 describe una nueva clase de canales de sodio que pueden funcionar como receptores para transmisores endógenos. Tanto la patente '018 como la solicitud '316 sugieren que los canales iónicos pueden jugar algún rol en la patogénesis o en el tratamiento del mal de Alzheimer (ver solicitud '316, páginas 1 y 15, ver patente '018, columna 1, líneas 50-54). Sin embargo, ninguno de estos documentos presenta un ensayo para el diagnóstico del mal de Alzheimer, y mucho menos métodos de tratamiento.

En consecuencia, aún es necesaria una mayor comprensión del funcionamiento del amiloide β o de sus agregados, y los medios para diagnosticar, predecir, prevenir y tratar enfermedades, trastornos y condiciones resultantes del amiloide β o de sus agregados. Estos y otros temas y ventajas de esta invención, así como recursos de invención adicionales, se harán evidentes a partir de la descripción de la invención descrita en este documento.

RESUMEN DE LA INVENCION

Esta invención está relacionada con la sorprendente observación de la interacción entre el amiloide β o sus agregados y los canales de sodio. Basándose en esta novedosa e inesperada interacción, esta invención provee un método para identificar compuestos que

modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio. Este método requiere en especial poner en contacto una célula que contiene un canal de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y en ausencia de un compuesto de ensayo, y luego determinar si existe algún impacto sobre el canal de sodio con y sin la presencia del compuesto, y con un compuesto que exhiba un impacto modulador de la interacción del amiloide β o de sus agregados con dicho canal de sodio. En condiciones ideales, el impacto sobre los canales de sodio se evalúa ya sea examinando el potencial de reposo de la membrana, el potencial de acción de la membrana o midiendo la corriente rápida de entrada de sodio. Preferentemente, como se realizó en la invención, la célula debe ser neuronal o puede ser no neuronal, como se describe en este documento.

El método de identificación de compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio también se puede llevar a cabo según la invención. Este método requiere la obtención de una primera célula que produce amiloide β o sus agregados, la obtención de una segunda célula que contiene un canal de sodio, el contacto de la segunda célula con la primera en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, y la determinación de la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del compuesto, donde un compuesto de ensayo que ejerce un impacto sobre la actividad se considera modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con dicho canal de sodio. Preferentemente, la primera célula es neuronal y la segunda no neuronal, y viceversa, o ambas son neuronales o bien no neuronales.

De igual manera, el método de identificación de compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio se debe llevar a cabo preferentemente de acuerdo con la invención, donde el método requiere los siguientes pasos: obtener una composición que contenga un canal de sodio purificado, poner en contacto el canal de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia o en ausencia del compuesto de ensayo y determinar la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del compuesto de ensayo donde un compuesto de ensayo que ejerce un impacto sobre la

actividad se considera modulador de la interacción del amiloide B o sus agregados con el canal de sodio

La invención también provee un método para diagnosticar el mal de Alzheimer (o enfermedades por prión) en un mamífero supuestamente afectado por dicho mal (o por enfermedades por prión), que requiere la medición de la actividad del canal de sodio en una célula de mamífero donde la disminución de la actividad del canal de sodio se correlaciona con la existencia de una etapa del mal de Alzheimer (o una etapa de enfermedades por prión)

La invención además brinda un método de observación de la susceptibilidad de un mamífero al mal de Alzheimer, que comprende los siguientes pasos

- (a) aislar del mamífero una célula que contenga un canal de sodio, y
- (b) medir la actividad del canal de sodio en ausencia y en presencia de la proteína amiloide B, donde la disminución de la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del amiloide B se correlaciona con la susceptibilidad a desarrollar el mal de Alzheimer

Asimismo, la invención provee un método para prevenir, tratar o revertir enfermedades tales como el mal de Alzheimer y enfermedades por prión en un mamífero, donde el método preferentemente requiere poner en contacto un canal de sodio del mamífero con un compuesto que protege a este canal contra el impacto negativo del amiloide B o sus agregados. Opcionalmente, este método se puede llevar a cabo usando compuestos que abran el canal de sodio

Además, la invención contempla el uso de un compuesto que module la interacción del amiloide B o sus agregados con canales de sodio celulares para fabricar un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico (por ejemplo, el mal de Alzheimer)

Otros recursos y variaciones de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia a partir de la totalidad de la aplicación, incluso la descripción detallada, y todos estos recursos se deberán considerar aspectos de la invención. De igual modo, los

12

recursos que se describen en este documento se pueden volver a combinar en otros contextos que también se deberán considerar aspectos de la invención, independientemente de que la combinación de recursos haya sido específicamente mencionada más arriba como un aspecto o un entorno de la invención. En este mismo sentido, las limitaciones que se describen en este documento como críticas para la invención deben considerarse como tal, las variaciones de la invención que carecen de limitaciones y que no se han descrito aquí como críticas deberán considerarse como aspectos de la invención

Además de lo antedicho, la invención incluye, como aspecto adicional, todos los entornos de menor espectro de la invención en cualquier forma diferente de las variaciones que específicamente se mencionaron más arriba. Aunque los postulantes inventaron el espectro completo de las declaraciones que se adjuntan al presente, estas declaraciones no tienen como fin incluir en dicho espectro trabajos previos realizados por otros. Por lo tanto, en el caso de que una Oficina de Patentes o cualquier otra persona física o jurídica llamara la atención a los postulantes en relación con una invención anterior regulada que entra en el espectro de una declaración, los postulantes podrán decidir ejercer o no sus derechos de modificación conforme a las leyes de patentes aplicables para volver a definir el tema de tal declaración a fin de excluir específicamente dicha invención anterior regulada, o variaciones obvias de la invención, del espectro de la declaración en cuestión. Las variaciones de la invención definidas por las declaraciones modificadas también se deberán considerar aspectos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

Las Figuras 1 A-C contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200, que muestran cambios en el potencial de acción tomados de una única neurona cortical (A) en ausencia del péptido amiloide β 1-40, (B) en presencia de una solución 11.5 μ M del péptido amiloide β 1-40, (C) después del lavado de la neurona con una solución libre de péptido.

Las Figuras 2 A-C contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran cambios en el potencial de acción tomados de una única neurona del

hipocampo (A) en ausencia del péptido amiloide β 1-40, (B) en presencia de una solución 11.5 μ M del péptido amiloide β 1-40, (C) después del lavado de la neurona con una solución libre de péptido

Las Figuras 3 A-C contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran la disminución progresiva en la corriente rápida de entrada de sodio en una neurona del hipocampo estimulada por un cambio de potencial con un incremento desde -80 mV (milivoltios) hasta -30 mV en ausencia del amiloide β 1-40 (Figura 3-A), en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (Figura 3-B), y en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (Figura 3-C). El efecto del péptido no se puede eliminar por lavado. La flecha indica la dirección de la disminución progresiva de la corriente causada por el péptido.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el cambio progresivo de la amplitud del pico de la corriente de entrada de sodio (I_{Na}) medida en picoamperios (pA) (eje Y) en función del tiempo (segundos) (eje X), en ausencia de amiloide β 1-40 (círculos en blanco), en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (círculos rellenos), y en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (cuadrados rellenos). Las lecturas se realizaron del mismo experimento al que se refieren las Figuras 3 A-C.

Las Figuras 5 A-D contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran el efecto del amiloide β 1-40 en la corriente rápida de entrada de sodio en una neurona del hipocampo en un amplio rango de potenciales de membrana que oscila desde -50 a +20 mV. Cada panel ilustra ocho trazos de corrientes rápidas de entrada de sodio superpuestas en el mismo lapso, estimuladas por un cambio de potencial con un incremento desde un potencial de reposo de -80 mV (milivoltios) hasta -50 mV, y luego

en incrementos de 10 mV hasta +20 mV en ausencia del amiloide β 1-40 (Figura 5-A), en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (Figura 5-B), y en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (Figura 5-C), luego del lavado del péptido (Figura 5-D) El efecto del amiloide β 1-40 no se puede eliminar por lavado

La Figura 6 es un gráfico que muestra la amplitud del pico de la corriente rápida de entrada de sodio en pA (eje Y) en función de un amplio rango de potenciales de membrana en mV (eje X), en ausencia de amiloide β 1-40 (círculos en blanco), en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (círculos rellenos), y en presencia de una solución 50 μ M de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (cuadrados en blanco), y luego del lavado del péptido (cuadrados rellenos) Las lecturas se realizaron del mismo experimento al que se refieren las Figuras 5 A-D

Las Figuras 7 A-C contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran trazos superpuestos de corrientes de sodio de una neurona del hipocampo estimuladas a partir de un potencial de reposo de -80 mV a -70 mV, y luego en incrementos de 10 mV hasta +10 mV, obtenidos en ausencia del bloqueante específico de canales rápidos de entrada de sodio tetrodotoxina (TTX) (Figura 7A), en presencia de una solución 1 μ M de TTX (Figura 7B), y con lavado de TTX (Figura 7C)

La Figura 8 es un gráfico que muestra la amplitud del pico de la corriente rápida de entrada de sodio en pA (eje Y) en función de un amplio rango de potenciales de membrana en mV (eje X), en ausencia de TTX (círculos en blanco), en presencia de una solución 1 μ M de TTX (círculos rellenos), y luego del lavado de TTX (cuadrados rellenos) Las lecturas se realizaron del mismo experimento al que se refieren las Figuras 7 A-C

Las Figuras 9 A-B contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran una única corriente de calcio de neuronas aisladas del hipocampo estimuladas a partir de un potencial de reposo de -40 mV hasta $+10$ mV, en ausencia del amiloide β 1-40 (Figura 9A) y en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ del péptido amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 70 minutos (Figura 9B)

La Figura 10 es un gráfico que muestra la amplitud del pico de la corriente de calcio (I_{Ca}) medida en pA (eje Y) en función del tiempo en segundos (seg) (eje X), en ausencia del amiloide β (círculos en blanco) y en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ del amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 70 minutos (círculos rellenos). Las lecturas se realizaron del mismo experimento al que se refieren las Figuras 9 A-B

Las Figuras 11 A-D contienen registros tomados de un Amplificador Axopatch 200 que muestran las corrientes de potasio con estimulación, mediante incremento del potencial desde un potencial de reposo de -40 mV hasta $+10$ mV en incrementos de 10 mV, en ausencia del amiloide β 1-40 (Figura 11-A), en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (Figura 11-B), y en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ de amiloide β 1-40 después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (Figura 11-C) y luego del lavado del péptido (Figura 11-D)

La Figura 12 es un gráfico que muestra la amplitud del pico de las corrientes de potasio en nanoamperios (nA) (eje Y) en función de un amplio rango de potenciales de membrana en mV (eje X) en ausencia del amiloide β 1-40 (línea llena), en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ del amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del amiloide β durante aproximadamente 90 minutos (línea sombreada) y en presencia de una solución $50 \mu\text{M}$ del amiloide β 1-40, después de la agregación inducida por agitación del

amiloide β durante aproximadamente 120 minutos (línea punteada) Las lecturas se realizaron del mismo experimento al que se refieren las Figuras 11 A-D

La Figura 13 es un gráfico que muestra el impacto del amiloide β sobre el canal de sodio (eje Y, % de disminución en I_{Na}) a diferentes tiempos (eje X, en minutos) de agregación El pico de impacto sobre la actividad aparece aproximadamente a los 60-80 minutos de la agregación inducida por agitación de la solución 50 μ M del amiloide β 1-40 Para cada valor graficado, se indica la cantidad de mediciones individuales sobre las neuronas independientes, y se proporcionan barras de error donde se han promediado múltiples mediciones

Se incluyen una descripción detallada y ejemplos con el fin de facilitar la comprensión de la invención, pero no tienen como finalidad limitar su alcance

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Está comprobado que en cultivos celulares o en neuronas neonatales, ciertas formas del amiloide β (AB) son neurotóxicas al interferir las funciones neuronales normales Sin embargo, aún no se han establecido los canales objetivo precisos y los cambios subsiguientes en los potenciales de acción que se reflejan en patrones de neuronas nativas en mamíferos adultos Este tema importante fue examinado utilizando una preparación neuronal bien definida y de alta sensibilidad, disociada en fresco de cerebros de ratas adultas y con la técnica de registro con pipeta de succión Sorprendentemente, se descubrió que el amiloide β disminuía o eliminaba los potenciales de acción neuronal por medio del bloqueo específico de canales rápidos de entrada de sodio y el consiguiente bloqueo de los impulsos neuronales Además, se determinó que los agregados de amiloide β de bajo peso molecular tenían mayor capacidad ejercer un impacto deletéreo sobre las funciones celulares (por ejemplo, incluyendo la actividad del canal de sodio) que los monómeros o los polímeros

Según lo explicitado en el párrafo anterior y tal como se describe más abajo en este documento, esta invención proporciona, entre otras cosas, un método para identificar compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de

sodio Estos compuestos son útiles para diagnosticar, prevenir, tratar o revertir diversos trastornos (por ejemplo, el mal de Alzheimer y enfermedades por prión) que se caracterizan por la alteración de los canales de sodio

El amiloide β o sus Agregados

De acuerdo con la invención, el "amiloide β " ($A\beta$) es cualquiera de las secuencias 1-43, 1-42, 1-41, 1-40, 1-39 y 1-38 y secuencias truncadas de cualquiera de las anteriores, como resultado del clivaje por β -secretasa y γ -secretasa de la proteína precursora de amiloide[(ver, por ejemplo, Yan et al , *Nature*, 402, 533-537 (1999), Kang et al , *Nature*, 325, 733 (1987), Selkoe, *In Annual Review of Neuroscience*, Cowan (Ed), 17, ix + 623, 489-517 (1994)] El $A\beta$ puede ser el de cualquier especie, particularmente una especie de mamíferos, y en especial de la especie humana Además, "amiloide β " comprende cualquier sustitución de aminoácidos en las secuencias anteriores que resultan en un péptido/proteína modificado con propiedades de agregación similares a las del péptido/proteína nativo En particular, el amiloide β es una proteína (o péptido) que comprende los residuos 1-38, 1-40, 1-43 ó 29-35 de la PPA, como se establece en la Patente 5 876 948 de los EE UU , y que puede ser producida por técnicas de recombinación o de síntesis

El amiloide β se puede adquirir fácilmente en el mercado, de proveedores tales como Polypeptide Laboratories (Torrence, CA, Número de Catálogo P-0036) y Bachem Biochemica (Heidelberg, Alemania) El $A\beta$ también puede ser producido naturalmente por una célula, por una célula usando técnicas de recombinación, por una célula (por ejemplo, neuronal) mientras que su impacto se evalúa en otra (por ejemplo, no neuronal), puede ser empleado en su forma polipeptídica (es decir, preagregado o no) para ponerlo en contacto con un canal de sodio, o puede utilizarse como parte de una composición (por ejemplo, incluido en micelas) para ponerlo en contacto con un canal de sodio Todas estas variantes, así como otras variantes que resultarán obvias para los expertos en la materia, están englobadas en la invención objeto de este documento

Los "agregados" del amiloide β comprenden cualquier estructura de orden superior formada por la asociación de más de un monómero de A β con la capacidad de inhibir la corriente rápida de entrada de sodio (I_{Na}), y en especial comprende un tetramero del amiloide β (*es decir*, una estructura de orden superior formada por la asociación de cuatro monómeros del amiloide β)

La agregación del amiloide β se realiza preferentemente en un buffer apropiado. Si luego el agregado de amiloide β no se va a emplear sobre células, entonces es conveniente que el buffer tenga una composición aproximada de fosfato 10 mM, NaCl 100 mM y pH 7.4, u otra similar. Si el agregado de amiloide β luego se va a emplear sobre células (por ejemplo, células completas, células aisladas u otras), entonces es conveniente que el buffer usado para la agregación consista en el mismo medio de cultivo de tejidos en el cual las células son agregadas (por ejemplo, solución salina equilibrada de Hank). Preferentemente, la agregación se deberá llevar a cabo por agitación de la mezcla del amiloide β en el buffer (*por ejemplo*, se aconseja una velocidad de aproximadamente 700 a 800 rpm). Óptimamente, la agregación se deberá llevar a cabo a varios tiempos, como se describe en los Ejemplos. Es deseable monitorear la agregación, *por ejemplo*, mediante medidas de dispersión de luz a 405 nm. Se puede obtener más información detallada sobre la agregación en los Ejemplos, así como en la referencia de Findeis et al., *Biochemistry*, 38, 6791-6800 (1999).

Además, preferentemente el amiloide β debe tratarse inicialmente de la manera adecuada para obtener monómeros formados por enrollamiento al azar, previo a la disolución en el buffer apropiado. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante un tratamiento con alcohol hexafluoroisopropílico —AHFIP— (como se describe en los Ejemplos) o mediante un tratamiento con ácido (como se describe en los Ejemplos y en Findeis et al., *supra*).

Canales de Sodio y Células que los Poseen

Los canales de sodio a utilizar en la invención incluyen, entre otros, canales de sodio nativos de todos los tejidos, especialmente del sistema nervioso, y más específicamente de células de tejido cerebral y de médula espinal. Estos canales son los objetivos del A β en varias formas y en diversos estados de agregación (*es decir*, son sensibles en algún nivel a los efectos deletéreos del A β o de sus agregados). Entonces, de acuerdo con la invención, una "célula" debe ser preferentemente una neurona primaria, una célula neuronal o una célula derivada de un tejido neuronal.

La invención también puede realizarse utilizando canales de sodio de células de tejidos no neuronales (*es decir*, células no neuronales). Una "célula no neuronal" es una célula que no es una neurona primaria ni una célula neuronal ni una célula derivada de un tejido neuronal. Las células no neuronales preferidas para uso en la invención incluyen, entre otros, células primarias con una geometría, una cantidad y un grado de homogeneidad que permitan un cultivo relativamente sencillo de las células para los ensayos electrofisiológicos sobre células únicas. En especial, las células no neuronales que se prefieren son células musculares, particularmente aquellas en las que se ha confirmado la presencia de canales de sodio funcionalmente similares a los de las células neuronales (*por ejemplo*, células musculares esqueléticas y células musculares cardíacas, tales como células marcapasos, células auriculares, células del nodo aurículo-ventricular, células del ventrículo izquierdo, células del ventrículo derecho, células musculares papilares y células de las fibras de Purkinje), aunque pueden emplearse otras células musculares que no han sido tan caracterizadas (*por ejemplo*, células del músculo liso, en particular, células del músculo liso cardíaco). Las células que no son ideales para los estudios electrofisiológicos (*por ejemplo*, las que tienen un tamaño pequeño, las que tienen una morfología plana, las que se encuentran en poca cantidad y/o las que pertenecen a tejidos no homogéneos) también se pueden emplear con la apropiada optimización de los ensayos para la invención. Estas células abarcan las células sanguíneas, renales y epiteliales (*es decir*, las que revisten los intestinos). Ninguna de estas células derivan de células neuronales.

Además, pueden emplearse opcionalmente células de cultivo, incluso líneas celulares cancerosas no neuronales, en la medida en que las células puedan mantenerse en condiciones en las cuales la dediferenciación sea improbable y poco frecuente. Estas líneas celulares difieren de las células primarias en cuanto a que las líneas celulares han sufrido un cambio genético que las transforman en inmortales.

Es aconsejable que la célula sea una célula aviar o una célula de mamífero, como por ejemplo roedores, primates (monos, simios, gorilas, chimpancés, gibones, orangutanes —y otros de similar naturaleza— felinos, caninos, ungulados —*por ejemplo*, rumiantes o cerdos) y en particular, de humanos. Es conveniente que la célula sea de especies de mamíferos (en particular, de humanos). Se puede trabajar con la célula una entidad única o formando parte de un conjunto mayor de células, como por ejemplo un cultivo celular, un tejido (*tal como* el tejido neuronal), un órgano (*tal como* el cerebro o la médula espinal), un sistema de órganos (*por ejemplo*, el sistema nervioso central) o un organismo (*por ejemplo*, un mamífero).

Es preferible que el "canal de sodio" sea un canal rápido de entrada de sodio. Un "canal rápido de entrada de sodio" es una proteína grande, transmembrana y voltaje dependiente que se abre (*es decir*, permite el pasaje a través de la membrana celular, desde el exterior de la célula hacia su interior) como respuesta a la despolarización de la membrana. Una vez abierto, el canal permite el flujo masivo de iones sodio hacia el interior de la célula sólo durante unos pocos milisegundos, y en una célula neuronal permite la generación del potencial de acción que es crítico para la conducción de los impulsos nerviosos. Sin la apertura de los canales rápidos de entrada de sodio, una red neuronal permanece "silenciosa" y se vuelve no funcional. Los canales de sodio que se consideran para uso en la invención incluyen a los que se conoce como "con puerta de voltaje", "sin puerta de voltaje" e "intercambiadores". La corriente medida en un canal rápido de entrada de sodio es la corriente rápida de entrada de sodio.

Todos los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina (TTX) e insensibles a TTX provenientes de las fuentes tisulares/celulares mencionadas anteriormente son los objetivos

clave para el amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. Sin embargo, en condiciones ideales, la invención se realiza utilizando canales de sodio sensibles a TTX.

Los canales de sodio útiles para la realización de la invención incluyen canales de sodio no nativos (*por ejemplo*, los obtenidos por recombinación, tales como canales de sodio molecularmente clonados, como *por ejemplo* los clonados a partir de células de cualquier tejido, en particular del sistema nervioso central, y especialmente del cerebro) como objetivos del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. Los canales de sodio no nativos útiles para la realización de los ensayos de la invención son sensibles en algún nivel a los efectos deletéreos del amiloide β o de sus agregados. Sin embargo, los canales de sodio no nativos insensibles a los efectos deletéreos del amiloide β o de sus agregados son útiles para la determinación de las regiones en las cuales el amiloide β interactúa con el canal (*por ejemplo*, por comparación de la estructura del canal no nativo con la del canal nativo). Estos canales de sodio no nativos incluyen, entre otros, los descritos en la Patente 5 892 018 de los EE UU y en la PCT International Application WO 98/54316.

De ahí que la actividad deletérea del amiloide β o sus agregados se puede estudiar y modular mediante la introducción en las células de vectores de expresión que conduce a la producción de altos niveles de canales de sodio. En este sentido, la invención además proporciona métodos de empleo de canales de sodio purificados (o porciones de ellos) y de células huésped tratadas por ingeniería genética que expresan canales de sodio recombinantes para evaluar e investigar los moduladores de la interacción entre el péptido amiloide β y el canal de sodio.

Ensayos para Moduladores de la Interacción del Amiloide β o sus Agregados con los Canales de Sodio

Esta invención aporta métodos de investigación para moduladores putativos utilizando alguna de las tantas técnicas de investigación de drogas. Estos moduladores

proporcionarán la base para preparaciones farmacéuticas para el tratamiento y el mejoramiento de los síntomas asociados con la actividad del amiloide β o sus agregados

Los moduladores de la interacción del amiloide β o sus agregados con los canales de sodio incluyen los moduladores que facilitan (*es decir*, aumentan la efectividad o la posibilidad) de interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio, y compuestos que dificultan (*es decir*, disminuyen la efectividad o la posibilidad) de interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio. En el contexto de la presente invención, los compuestos que dificultan la interacción del amiloide β o sus agregados con los canales de sodio se podrían utilizar particularmente en la prevención y/o el tratamiento del mal de Alzheimer, y de enfermedades por prión, así como de otros trastornos, lo cual se describe más adelante en este documento.

De acuerdo con la invención, los moduladores que dificultan la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio permiten la reducción de un máximo de 0% a aproximadamente 20% en la corriente rápida de entrada de sodio cuando un canal de sodio entra en contacto con el amiloide β o sus agregados y el modulador (*es decir*, comparado con un canal de sodio que entra en contacto con el amiloide β o sus agregados en ausencia del modulador), o hacen que la reducción que se produce luego de este contacto tenga un inicio demorado y/o una duración menos prolongada (*es decir*, comparado con un canal de sodio que entra en contacto con el amiloide β o sus agregados en ausencia del modulador).

Por comparación, los moduladores que facilitan la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio aumentan la reducción en la corriente rápida de entrada de sodio cuando el canal de sodio se expone al amiloide β o sus agregados en aproximadamente 10% a 20%, como mínimo (*es decir*, comparado con un canal de sodio que entra en contacto con el amiloide β o sus agregados en ausencia del modulador), o hacen que la reducción que se produce luego de dicha exposición tenga un inicio más rápido y/o una duración más prolongada (*es decir*, comparado con un canal de sodio que entra en contacto con el amiloide β o sus agregados en ausencia del modulador).

Bajo ciertas condiciones, la invención proporciona un método de identificación de compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio que, idealmente, incluya los siguientes pasos

- (a) obtener una célula que contenga canales de sodio
- (b) poner en contacto los canales de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, y
- (c) determinar la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del compuesto de ensayo, donde un compuesto de ensayo que ejerce un impacto sobre la actividad se considera modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio

Los canales de sodio empleados en los métodos de ensayo de la invención pueden estar libres en solución, fijados sobre un soporte sólido, presentes en la superficie celular o ubicados en micelas u otras estructuras. Asimismo, como se explicó anteriormente, el canal de sodio (y/o el amiloide β o sus agregados) puede proporcionarse a la célula por técnicas de recombinación (*por ejemplo*, producido dentro de la célula como resultado de modificaciones en la célula por ADN recombinante, o producido por una célula vecina — tal como una célula neuronal— y empleado para causar un impacto en una célula no neuronal sometida a estudio). El amiloide β tal como se aplica para contacto con el canal de sodio puede presentarse en forma polipeptídica y, tal como se suministra, puede presentarse como preagregado durante diversos períodos (*por ejemplo*, como se describió previamente y como se indica en los Ejemplos que se incluyen más adelante en este documento) o puede emplearse para contacto en su forma monomérica.

En una de las versiones, es preferible aplicar el método

- (a) obteniendo una primera célula que produzca amiloide β o sus agregados
- (b) obteniendo una segunda célula que posea canales de sodio
- (c) poniendo en contacto la segunda célula con la primera en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, y

(d) determinando la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del compuesto de ensayo, donde un compuesto de ensayo que ejerce un impacto sobre la actividad se considera modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio. El método preferentemente debe aplicarse de forma tal que la primera y la segunda célula sean del mismo tipo, en consecuencia, ambas células serán neuronales o no neuronales (*por ejemplo*, ambas células son neuronales o no neuronales, o ambas son del mismo tipo de células neuronales o no neuronales). Asimismo, el método preferentemente debe aplicarse de forma tal que la primera y la segunda célula sean de tipos diferentes, por ejemplo una de la primera y segunda célula es neuronal y la otra es una célula no neuronal, o una es de un tipo de célula neuronal o no neuronal y la otra es de otro tipo de célula neuronal o no neuronal.

El método también se puede aplicar

- (a) obteniendo un preparado que contenga canales de sodio purificados
- (b) poniendo en contacto los canales de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo, y
- (c) determinando la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del compuesto de ensayo, donde un compuesto de ensayo que ejerce un impacto sobre la actividad se considera modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio.

Es conveniente que los métodos de ensayo aquí descriptos se apliquen de forma tal que la actividad del canal de sodio (y el impacto sobre dicho canal) con y sin la presencia del compuesto de ensayo se determine o evalúe por medio de un método seleccionado del grupo que consiste en examinar potenciales de reposo de membrana, examinar potenciales de acción o medir la corriente rápida de entrada de sodio. En comparación con las corrientes rápidas de entrada de sodio, existen corrientes lentas de entrada de sodio pero éstas tienen una participación mínima en la generación de los potenciales de acción. En particular, se debe evaluar la reducción y/o anulación del potencial de acción, así como la liberación de dicha reducción o bloqueo (*por ejemplo*, mediante los denominados

“abridores de canales de sodio”, como se describe más adelante) De la misma forma, se debe evaluar la reducción o el bloqueo de la corriente rápida de entrada de sodio, así como la liberación de dicha reducción o bloqueo (*por ejemplo*, mediante los denominados ‘abridores de canales de sodio’) Estas mediciones deben realizarse utilizando métodos conocidos en el área, que se describen en los Ejemplos

La modulación de los efectos de amiloide β o sus agregados sobre un canal de sodio por un agente sometido a estudio (*es decir*, un “compuesto de ensayo”) se puede medir con las técnicas aquí descritas, u otras técnicas conocidas en el área, aptas para ensayos bioquímicos o basados en células para evaluación de alto rendimiento (High Throughput Screening – HTS), (*por ejemplo*, sistemas de ensayos en melanocitos para investigar las interacciones ligando-receptor, sistemas de ensayos basados en levaduras, y sistemas de expresión potencial en células de mamíferos y otros sistemas de similar naturaleza) Se puede encontrar una revisión del tema en Jayawickreme and Kost, *Curr Opin Biotechnol*, 8, 629-634 (1997) También se incluyen los ensayos HTS automatizados y en miniatura, como se describe por ejemplo en Houston and Banks, *Curr Opin Biotechnol*, 8, 734-740 (1997)

Estos ensayos HTS se utilizan para investigar bibliotecas de compuestos con el fin de identificar compuestos particulares que exhiben la capacidad buscada de modular la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio Se puede utilizar cualquier biblioteca de compuestos, incluso bibliotecas químicas, bibliotecas de productos naturales, bibliotecas combinatorias que abarcan oligopéptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos designados o al azar

Las bibliotecas químicas pueden contener compuestos conocidos, análogos estructurales patentados de compuestos conocidos o compuestos identificados mediante la investigación de productos naturales

Las bibliotecas de productos naturales son conjuntos de sustancias aisladas de fuentes naturales, típicamente microorganismos, animales, plantas u organismos marinos Los productos naturales se aíslan de sus fuentes mediante fermentación por

microorganismos seguida de aislamiento y extracción de los caldos de fermentación, o por extracción directa de los microorganismos o de los tejidos (de plantas o animales) mismos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen polipéptidos, péptidos no ribosomales y variantes (incluso variantes de origen no natural) de éstos. Se puede encontrar una revisión del tema en Cane et al, *Science*, 282, 63-68 (1998).

Las bibliotecas combinatorias contienen una gran cantidad de compuestos relacionados, tales como péptidos, oligonucleótidos o una combinación de otros compuestos orgánicos. Estos compuestos son relativamente sencillos de diseñar y preparar mediante protocolos tradicionales de síntesis automatizada, PCR, clonado o métodos de síntesis patentados. Las bibliotecas combinatorias de péptidos y oligonucleótidos son de particular interés.

A su vez, otras bibliotecas de interés son las de péptidos, proteínas, peptidomiméticos, conjuntos de síntesis en multiparalelo, recombinatorias y de polipéptidos. Se puede encontrar una revisión de química combinatoria y de las bibliotecas relacionadas en Myers, *Curr Opin Biotechnol*, 8, 701-707 (1997).

Una vez que se ha identificado que los compuestos muestran actividad como moduladores de la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio, se puede emprender un programa de optimización para mejorar la potencia y/o la selectividad de la actividad. Este análisis de la relación estructura-actividad (REA) típicamente involucra una serie iterativa de modificaciones selectivas de estructuras de compuestos y su correlación con la actividad bioquímica o biológica. Se pueden diseñar familias de compuestos relacionados de forma tal que todos exhiban la actividad buscada, con algunos miembros de la familia que potencialmente sean aptos como candidatos terapéuticos.

Asimismo, la invención contempla el uso de un compuesto que modula la interacción del amiloide β o sus agregados con los canales de sodio para fabricar un medicamento para el tratamiento de trastornos neurológicos (por ejemplo, el mal de Alzheimer). En particular, esta invención contempla compuestos que protegen los canales

de sodio de la acción inhibitoria del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación

Esta invención además contempla compuestos que abren canales de sodio en presencia del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. Estos compuestos ("abridores de canales de sodio") se pueden emplear para causar un impacto sobre todos los potenciales de acción generados por canales de sodio, como objetivos viables del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. Es deseable, de acuerdo con la invención, que un abridor de canales de sodio también pueda ser un compuesto que abra estos canales en ausencia del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. Algunos ejemplos de abridores de canales de sodio incluyen la veratridina y el DP1201. Sin embargo, la veratridina y el DP1201 modifican el mecanismo de apertura del canal y permiten la entrada de una cantidad excesiva de sodio en la célula y, si bien son útiles en un contexto de investigación, pueden no serlo para el tratamiento de enfermedades.

Además, de acuerdo con la invención, éstos y otros compuestos se pueden emplear para causar un impacto sobre todos los canales de calcio y/o potasio, como objetivos viables del amiloide β en varias formas y en diversos estados de agregación. En particular, se puede emplear un modulador identificado según los métodos aquí descriptos para el tratamiento del mal de Alzheimer (o enfermedades por prión) como parte de una preparación que lo contenga. Esta invención contempla un compuesto identificado como modulador de acuerdo con los métodos de investigación aquí descriptos. La invención también contempla una preparación de un compuesto identificado de esta forma en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Asimismo, esta invención contempla un método que consiste en usar un compuesto identificado de esta forma en la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o revertir el mal de Alzheimer (o enfermedades por prión) en mamíferos.

Sistemas de Expresión de la Célula Huésped

Como se indicó anteriormente, tanto el canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β pueden proporcionarse a las células en forma de sus ácidos nucleicos codificantes y, en consecuencia, serán producidos por la célula neuronal, o se pueden introducir en la célula huésped en su forma polipeptídica. El término "polipéptido" como se usa en este documento incluye todos los péptidos (*por ejemplo*, porciones de proteínas) y las proteínas (*es decir*, que tienen grupos amino y carboxilo terminales) ya sean recombinantes, sintéticos o purificados a partir de fuentes naturales

Es así como se proporcionan células huésped, tanto células procariontes como eucariontes, modificadas en forma estable o transitoria por introducción de un polinucleótido que permite la expresión del canal de sodio codificado (o sus componentes) y/o el amiloide β , o modificadas en forma estable o transitoria por introducción del propio canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β . Si bien las células eucariontes, tales como las células neuronales, se pueden aplicar directamente a los ensayos de la invención, existen otras células eucariontes o procariontes que pueden resultar útiles en otros aspectos (*por ejemplo*, para la producción proteica *in vitro* o para la construcción de otros vectores de expresión apropiados para uso en células neuronales)

La forma en que los polinucleótidos que codifican los canales de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β y los propios canales de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β se introducen en las células se puede describir también como una "construcción". Una "construcción" es cualquier forma de molécula en la cual una secuencia polipeptídica (*por ejemplo*, canal de sodio o sus componentes y/o el amiloide β) o su secuencia polinucleótida codificante se une a una molécula mayor o forma parte de ésta. La conexión entre el polinucleótido y/o la secuencia polipeptídica, y su sitio de acoplamiento en la molécula preferentemente debe ser mediante un enlace no covalente (*por ejemplo*, como en el caso de una unión antígeno/anticuerpo), o mediante un enlace covalente

En este sentido, una "construcción" incluye, entre otros, un vector (por ejemplo, la incorporación genética de una secuencia codificante polipeptídica en un vector polinucleótido) o un vector de tipo conjugado (*por ejemplo*, el caso de una secuencia codificante, una secuencia polipeptídica u otra fracción que está asociada en forma no covalente con el vector) u otra fracción apropiada que se puede utilizarse para causar la entrada a la célula. Dentro del contexto de este documento, un "vector" es un vehículo capaz de causar la entrada a la célula —*por ejemplo*, para transferencia de genes— y también conserva el significado general conocido por los expertos en la materia.

La invención contempla construcciones de expresión que contienen polinucleótidos que codifican el canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β , operativamente ligadas a una secuencia de ADN de control de expresión endógena u exógena y a un terminador de la transcripción. Las secuencias de ADN de control de expresión incluyen promotores, potenciadores y operadores, y generalmente son seleccionadas sobre la base de los sistemas de expresión en los cuales será usada la construcción de expresión. Las secuencias promotoras y potenciadoras preferidas generalmente se seleccionan según la capacidad de aumentar la expresión de genes, mientras que las secuencias operadoras generalmente se seleccionan según la capacidad de regular la expresión de genes. Las construcciones de la invención que se prefieren también incluyen las secuencias necesarias para replicación en la célula huésped. Las construcciones de expresión son utilizadas preferentemente para producir un canal de sodio codificado (o sus componentes) y/o el amiloide β .

Así es que los polinucleótidos de la invención se pueden introducir en la célula huésped idealmente como parte de un plásmido circular o como ADN lineal que contengan una región aislada codificante de proteínas dentro de un vector viral, o por otros medios apropiados. Los métodos para introducir el ADN en la célula huésped incluyen transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear o fusión con vehículos tales como liposoma, micelas, células fantasma, y protoplastos, entre otros.

Cualquier vector de expresión apropiado [*por ejemplo*, como se describe en Pouwels et al , *Cloning Vectors A Laboratory Manual* (Elsevier, N Y , 1985)] y el huésped adecuado correspondiente pueden emplearse para la producción de polipéptidos/proteínas para llevar a cabo los procedimientos de la invención. Los huéspedes de expresión incluyen, entre otros, bacterias, levaduras, hongos, mamíferos, plantas, y sistemas de células huésped de insectos, incluso sistemas de baculovirus [*por ejemplo*, como se describe en Luckow et al , *Bio/Technology*, 6, 47, (1988)], entre otros, y líneas celulares establecidas tales como la línea celular COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa, BHK, entre otras.

Para la introducción en las células se prefiere el uso de una construcción que sea capaz de entrar al tipo de célula en particular (*por ejemplo*, un vector de herpes virus para entrar en una célula neuronal). Algunos ejemplos de vectores virales incluyen vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus o virus vaccinia. Como alternativa, las proteínas se pueden entregar a las células objetivo en liposomas.

De igual forma, en los diferentes huéspedes, la naturaleza del *upstream* del ADN no codificante de la región codificante del canal de sodio (o de sus componentes) y/o de las secuencias polinucleótidas del amiloide β deberían estar compuestas por señales de transcripción/traducción apropiadas para el huésped.

Las células huésped de la invención son útiles en métodos para producción a gran escala o para uso de canales de sodio (o sus componentes) y/o de polipéptidos del amiloide β . Por ejemplo los canales de sodio recombinantes (o sus componentes) y/o los productos del amiloide β se pueden producir y aislar a partir de células huésped para uso en ensayos *in vitro* tales como ensayos de investigación de drogas. En estos métodos las células huésped se cultivan en un medio apropiado y el producto polipeptídico deseado se aísla de las células o del medio en el cual éstas se cultivan.

El producto polipeptídico (*por ejemplo*, canal de sodio o AB) opcionalmente se puede aislar por métodos de purificación conocidos dentro de esta área, tales como métodos cromatográficos convencionales que incluyen cromatografía de inmunoafinidad,

cromatografía de afinidad por receptor, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad por lectina, filtración de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography – HPLC), HPLC en fase reversa, y otros métodos de similar naturaleza

También existen otros métodos de purificación que incluyen aquéllos en los cuales la proteína deseada se expresa y purifica como una proteína de fusión en la cual el canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β están ligados a secuencias heterólogas de aminoácidos. Las secuencias heterólogas apropiadas pueden incluir una fracción específica que actúe como etiqueta, rótulo o fracción quelante reconocida por un agente o "socio" específico de unión. Por ejemplo, para buscar moduladores de la interacción entre el canal de sodio y el amiloide β en bibliotecas de péptidos, se puede producir cualquiera de los compuestos fusionados a una proteína heteróloga en particular que se selecciona para que sea específicamente identificable, por ejemplo, usando una sonda de anticuerpos. También se puede diseñar una proteína de fusión para que contenga un sitio de clivaje (*por ejemplo*, factor XA o secuencia sensible a enteroquinasa) localizado entre la secuencia de canal de sodio (o sus componentes) y/o de amiloide β y la secuencia heteróloga proteica, a fin de permitir que el canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β sean clivados de la proteína heteróloga y posteriormente purificados. El clivaje del compuesto de fusión puede producir una forma de la proteína deseada que posea residuos de aminoácidos adicionales como resultado del proceso de clivaje.

En condiciones ideales conforme a las características de esta invención, se puede utilizar un canal de sodio (o sus componentes) y/o el amiloide β , o una célula huésped que exprese las secuencias de codificación para el canal de sodio (o sus componentes) y/o para el amiloide β , para investigar péptidos u otras moléculas, tales como moléculas orgánicas o inorgánicas que actúan como moduladores de la interacción entre el canal de sodio (o sus componentes) y el amiloide β . Por ejemplo, la investigación de bibliotecas de péptidos u orgánicas mediante química combinatoria con los polipéptidos o las líneas celulares

anteriormente mencionados puede ser útil para identificar moléculas terapéuticas que funcionen modulando la interacción entre el canal de sodio y el amiloide β . Se pueden investigar compuestos sintéticos, productos naturales y otras fuentes de sustancias potencialmente activas desde el punto de vista biológico en una cantidad de formas consideradas de rutina por los expertos en la materia.

Contacto

El "contacto" descrito anteriormente entre el amiloide β o sus agregados con el canal de sodio y, opcionalmente, con un modulador según esta invención, se puede realizar mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia, y que se describen en este documento, mediante el cual se puede efectuar el contacto aparente —o tangencialidad mutua— del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio y, opcionalmente, con un modulador conforme a esta invención. Por ejemplo, el contacto se puede realizar mezclando estos compuestos en un pequeño volumen de la misma solución. Sin embargo, los compuestos no deben necesariamente ponerse en contacto en un pequeño volumen como, por ejemplo, en casos en donde uno o más de los compuestos está presente o se le administra a un huésped, y viaja dentro del huésped en el torrente sanguíneo, en el líquido cefalorraquídeo o en otro fluido corporal. Asimismo, no siempre es necesario adicionar todos los compuestos al mismo tiempo, es suficiente con que todos los compuestos necesarios para el ensayo estén presentes juntos en *algun* momento durante el ensayo (o durante el tratamiento, como se describe más adelante).

El método de esta invención se puede utilizar para medios de contacto tanto *in vitro* como *in vivo* por ejemplo para investigación, diagnóstico o acción terapéutica. Según la invención, el "contacto" comprende cualquier medio de contacto, el método no depende de algún medio en particular y no debe interpretarse de esta manera. Estos medios son conocidos por los expertos en la materia, y también se ejemplifican en este documento.

Sin embargo, para los compuestos que se proporcionan en forma de construcción (por ejemplo, formas polinucleótidas de las proteínas de canal de sodio y de amiloide β), el

contacto puede ser realizado *in vitro* (como en el caso de estudios de cultivos tisulares) o *in vivo*, por ejemplo, por electroporación, transformación, transducción, conjugación o apareamiento triparental, (co)transfección, (co)infección, fusión de membrana con lípidos catiónico, bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN, incubación con un precipitado de DNA con fosfato de calcio, microinyección directa en células individuales, y por otros métodos similares. Asimismo, la construcción se puede introducir por medio de lípidos catiónicos, por ejemplo, por liposomas. Estos liposomas se pueden adquirir en el mercado (por ejemplo, Lipofectin®, Lipofectamine™ y otras marcas, provistos por Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, Md, y otros proveedores). También se pueden adquirir otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Métodos de Diagnóstico y Acción Terapéutica

Los compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con los canales de sodio no contemplados en esta invención se pueden emplear potencialmente para diagnosticar, prevenir, tratar o revertir los trastornos debidos a los efectos deletéreos del amiloide β en el sistema nervioso central, es decir, mediados por el efecto del A β sobre el canal de sodio.

Dentro de este contexto, "prevención" se refiere a la acción de evitar que ocurra un trastorno en un mamífero (especialmente, en el humano) que puede estar predispuesto a dicho trastorno pero que aun no se le ha diagnosticado. Por "tratamiento" se entenderá inhibir el trastorno, es decir, detener su desarrollo, mitigar el trastorno, es decir, causar su regresión, o mejorar el trastorno, es decir, reducir la gravedad de los síntomas asociados con el trastorno. "Trastorno" engloba trastornos médicos, enfermedades, condiciones, síndromes, entre otros.

En particular, el método de la invención se puede emplear para tratar terapéuticamente o profilácticamente mamíferos (en especial, humanos), por ejemplo, mamíferos que están o pueden estar sujetos a trastornos tales como el mal de Alzheimer, Síndrome de Down en adultos (es decir, mayores de 40 años), hemorragia cerebral

hereditaria con amiloidosis, angiopatía congoflica no hereditaria con hemorragia cerebral, y demencia senil. Todos éstos son trastornos que se caracterizan por la presencia de A β , por ejemplo, depositado en forma de agregados/placas. Por primera vez, se demuestra en este documento que A β produce un impacto deletéreo sobre el funcionamiento del canal de sodio. Tal impacto podría producir los defectos neurales y cognitivos, y otros síntomas que se observan en estos trastornos. En consecuencia, es razonable esperar que los moduladores que dificultan la capacidad del A β de causar un impacto deletéreo sobre el funcionamiento del canal de sodio se puedan utilizar para reducir —o prevenir completamente— los defectos neurales y cognitivos, y otros síntomas que se observan en dichos trastornos.

Asimismo, esta invención proporciona un método para diagnosticar el mal de Alzheimer en mamíferos (por ejemplo, en humanos) cuando se sospecha que padecen dicha enfermedad. En dicho método se mide la actividad del canal de sodio en una célula neuronal del mamífero, y la actividad reducida del canal de sodio se correlaciona con la existencia de una etapa del mal de Alzheimer. Es conveniente que la actividad se determine mediante un método seleccionado del grupo que consiste en examinar potenciales de reposo de membrana, examinar potenciales de acción y medir la corriente rápida de entrada de sodio. Se espera que los métodos de la invención demuestren ser útiles en dichos diagnósticos o predicciones, debido a que se sabe que el impacto sobre el canal de sodio puede producirse antes de que se manifiesten todos los síntomas del trastorno (por ejemplo, antes de que se manifiesten todos los síntomas del mal de Alzheimer). Si la funcionalidad de los canales de sodio es aparentemente menor, se pueden realizar opcionalmente más ensayos para confirmar que el menor funcionamiento se debe al impacto del amiloide β o sus agregados sobre el canal de sodio. Por ejemplo, el método además puede opcionalmente incluir la medición de la cantidad de amiloide β o sus agregados en la célula (por ejemplo, cuando la célula es una célula neuronal aislada de un mamífero), en la superficie de la célula o en el fluido extracelular que está en contacto con la célula del mamífero, donde la presencia del amiloide β , o sus agregados, en la célula o el

fluido (por ejemplo, junto con la presencia de actividad reducida del canal de sodio) se correlaciona con la existencia de una etapa del mal de Alzheimer. Preferentemente, según esta invención, el fluido de ensayo es líquido cefalorraquídeo.

La invención además provee un método para investigar la susceptibilidad de un mamífero al mal de Alzheimer, que incluye los siguientes pasos:

- (a) aislar del mamífero una célula que contenga un canal de sodio, y
- (b) medir la actividad del canal de sodio en ausencia y en presencia de la proteína amiloide β donde la disminución de la actividad del canal de sodio con y sin la presencia del amiloide β se correlaciona con la susceptibilidad a desarrollar el mal de Alzheimer.

Asimismo, la invención provee un método para prevenir, tratar o revertir enfermedades tales como el mal de Alzheimer en un mamífero, donde el método preferentemente requiere poner en contacto un canal de sodio del mamífero con un compuesto que proteja a este canal contra la reducción de su actividad debida al amiloide β o sus agregados. Explícitamente se contempla el tratamiento con compuestos identificados de acuerdo con los métodos de investigación previstos en la invención.

Al igual que en el mal de Alzheimer, las enfermedades por prión son enfermedades neurodegenerativas, en las que la proteína prión causa la neurotoxicidad. Los expertos en la materia entienden que la proteína prión, al igual que el amiloide β o sus agregados, puede afectar la función neural del canal de sodio como parte de la patología de las enfermedades por prión. De la misma forma, el impacto sobre los canales de sodio que provocan las proteínas prión puede ser útil para encontrar nuevas terapias para dichas enfermedades. Por ejemplo, se puede esperar que algunos de los moduladores cuya utilidad para el mal de Alzheimer se ha identificado tengan efectos beneficiosos para enfermedades por prión, debido a su capacidad de disminuir o revertir el bloqueo del funcionamiento de canal de sodio. Los análisis de las proteínas del canal de sodio y de las proteínas reguladoras del canal de sodio proporcionarán la base para los ensayos de diagnóstico del

mal de Alzheimer, como también los indicadores clínicos para hacer un seguimiento de la evolución y de la eficacia de la terapia para enfermedades por prión

Esta invención además proporciona un método para diagnosticar las enfermedades por prión en mamíferos cuando se sospecha que padecen este tipo de enfermedades. Este método incluye la medición de la actividad de un canal de sodio en una célula de mamífero, donde la actividad disminuida del canal de sodio se correlaciona con la existencia de una etapa de las enfermedades por prión.

Asimismo, esta invención proporciona un método para prevenir, tratar o revertir las enfermedades por prión en mamíferos. Es deseable que en este método se ponga en contacto un canal de sodio de mamífero con un compuesto que proteja a este canal contra la reducción de su actividad debida al amiloide β o sus agregados.

En condiciones ideales, esta invención proporciona compuestos capaces de abrir los canales de sodio, *es decir*, "abridores de canales de sodio". En consecuencia, esta invención provee un método para prevenir, tratar o revertir el mal de Alzheimer en mamíferos, en el cual es conveniente poner en contacto un canal de sodio del mamífero con un compuesto que abra dicho canal.

Además, esta invención proporciona un método para prevenir, tratar o revertir enfermedades por prión en mamíferos, en el cual es conveniente poner en contacto un canal de sodio del mamífero con un compuesto que abra dicho canal.

En términos de uso terapéutico, se utilizarán diversos ensayos para evaluar la eficacia de un régimen terapéutico para tratamiento, y para determinar un perfil estándar o normal. Estos ensayos incluyen los estudios específicos del canal de sodio que se ilustran en los Ejemplos de este documento. Los ensayos se pueden adaptar a una aplicación en particular y se pueden utilizar en estudios en animales, en estudios clínicos o para monitorear el tratamiento de un paciente.

Para establecer una base para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, es preciso definir un perfil estándar o normal. Esto se logra mediante la combinación de una muestra biológica tomada de un sujeto normal. Los valores estándar obtenidos de las

muestras normales se pueden comparar con los valores obtenidos de las muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o una enfermedad relacionada con los efectos deletéreos del A β o sus agregados. La diferencia entre los valores estándar y los de los sujetos establece la presencia de la enfermedad. Si se establece la presencia de la enfermedad, se administra un agente terapéutico y se genera un perfil o valores para su tratamiento. El ensayo se puede repetir en forma regular a fin de analizar si los valores evolucionan hacia el patrón estándar o normal, o en sentido inverso. Se pueden emplear perfiles de tratamiento sucesivos para observar la eficacia del tratamiento durante un período de varios días o meses.

Otros Usos

Además del uso terapéutico y de diagnóstico anteriormente descritos, existen muchos usos y descubrimientos adicionales que se desprenden de la presente invención.

Por ejemplo, el descubrimiento aquí descrito del mecanismo del impacto negativo del A β sobre los canales de sodio indica que dichos canales constituyen uno de los elementos, hasta el momento desconocidos, relacionados con la susceptibilidad al mal de Alzheimer. En consecuencia, los genes que codifican canales de sodio y los genes de los reguladores de los canales de sodio que reciben el impacto de la actividad del A β se pueden asociar con la susceptibilidad al mal de Alzheimer. Se puede utilizar el análisis de las variantes genéticas tanto de los genes estructurales de canales de sodio como de las proteínas reguladoras de canales de sodio para vincular mutantes específicos o variantes de estos genes con la susceptibilidad al mal de Alzheimer. Los ensayos para detectar genes mutantes o variantes servirán como diagnóstico del mal de Alzheimer o de la susceptibilidad a esta enfermedad. En consecuencia, el descubrimiento aquí descrito, consistente en la vinculación entre los canales de sodio y las acciones deletéreas del A β o sus agregados, proveerá la base para ensayos de diagnóstico del mal de Alzheimer y para indicadores clínicos a fin de realizar un seguimiento del progreso y la eficacia del tratamiento de esta enfermedad.

Asimismo, esta invención contempla el uso de mediciones cinéticas de los efectos del péptido A β (que se describen en el Ejemplo 5), y mediciones de la corriente rápida de sodio. Este enfoque cinético también se puede utilizar para descubrir drogas para tratar el mal de Alzheimer.

Preparaciones Farmacéuticas

Esta invención además contempla las preparaciones farmacéuticas. Opcionalmente, estas preparaciones están compuestas por moduladores (como se describió anteriormente) o polinucleótidos que codifican el canal de sodio (o un péptido de este) y/o el amiloide β como principio activo, y vehículos farmacéuticos biocompatibles o adyuvantes. Preferentemente el principio activo actúa en el tratamiento de una condición médica debida a los efectos negativos del amiloide o sus agregados. La preparación puede incluir el agente como la única fracción activa o en combinación con otros principios activos, opcionalmente mezclados con excipientes u otros vehículos farmacéuticamente apropiados.

Los excipientes farmacéuticamente apropiados que se agregarán a las preparaciones farmacéuticas son conocidas por los expertos en la materia y se pueden obtener fácilmente. La elección de los excipientes dependerá en parte del método que se emplee para administrar la preparación de acuerdo con la invención. En consecuencia, existe una gran variedad de formulaciones aptas para uso dentro del contexto de esta invención. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente ejemplos y de ninguna forma se deberán considerar como restrictivos.

En *Remington's Pharmaceutical Sciences*, decimotercera edición, Mack Publishing Co., Easton PA, 1990, se pueden encontrar las técnicas para la formulación y administración de las preparaciones farmacéuticas, que son conocidas para los expertos en la materia. Las preparaciones farmacéuticas de esta invención se pueden realizar utilizando cualquier método convencional, tales como los procesos de mezclado, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsionado, encapsulado, atrapamiento, fusión por

centrifugado, secado por rocío (*spray-drying*) o liofilizado. Sin embargo, la formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la materia según la vía de administración y la dosis deseada. Estas formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento (*clearance*) *in vivo* del agente administrado. Según la condición a causa de la cual se aplique el tratamiento, estas preparaciones farmacéuticas se pueden formular y administrar en forma sistémica o local.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto utilizando cualquier método convencional, tal como técnicas parenterales y enterales. Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las cuales la preparación se administra por una vía que no sea a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramedular, intramuscular, intraarticular, intratecal, e intraventricular. Las modalidades de administración enteral incluyen, por ejemplo, administración oral (bucal y sublingual) y rectal. Las modalidades de administración transcutánea incluyen, por ejemplo, administración transdermal y a través de mucosas. Esta última incluye, por ejemplo, la administración enteral, así como la administración nasal, por vía inhalatoria, profunda pulmonar, la administración vaginal y la administración rectal. La administración transdermal incluye modalidades transdermales o transcutáneas pasivas o activas, por ejemplo, parches y dispositivos para iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, bálsamos o ungüentos. Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de preparaciones de depósito (*depot*) —o reservorio— bombas osmóticas, y otras preparaciones de similar naturaleza.

Las preparaciones farmacéuticas se formulan para que contengan vehículos farmacéuticamente apropiados, y opcionalmente pueden contener excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos para obtener preparaciones que se puedan utilizar con fines farmacéuticos. La modalidad de administración generalmente determinará la naturaleza del vehículo. Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden contener soluciones acuosas de los compuestos activos en su formas

solubles en agua. Los vehículos apropiados para administración parenteral se pueden seleccionar entre una variedad de soluciones tales como solución salina, buffer salino, solución de dextrosa, agua, y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los vehículos preferidos para la administración parenteral son buffers fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, soluciones Ringer o buffers salinos fisiológicos. Para la administración tisular o celular, se utilizan en la formulación penetrantes aptos para atravesar la barrera en cuestión. Estos penetrantes son generalmente conocidos en el área. Para preparaciones que poseen proteínas, la formulación puede incluir sustancias estabilizantes tales como polioles (*por ejemplo*, sacarosa) y/o surfactantes (*por ejemplo*, surfactantes no iónicos), entre otros.

Alternativamente, las formulaciones para uso parenteral pueden incluir suspensiones de los compuestos activos, preparados como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los solventes o vehículos lipofílicos apropiados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, y ésteres sintéticos de ácidos grasos, tales como etil oleato o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas inyectables pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes apropiados que aumenten la solubilidad del compuesto para permitir la preparación de soluciones de alta concentración. También se pueden utilizar emulsiones, por ejemplo, dispersiones de aceite en agua o de agua en aceite, opcionalmente estabilizadas por un agente emulsificante o dispersante (sustancias tensioactivas o surfactantes). Además, se pueden usar para la administración parenteral liposomas que contengan el principio activo.

Otra opción es que la preparación farmacéutica que contiene el agente en dosis apropiadas para la administración oral, se pueda formular empleando vehículos farmacéuticamente apropiados, que son bien conocidos en el área. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden ser tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, grageas, pastillas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones o polvos. A modo ilustrativo, las

preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener por combinación de compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo el resultado de la mezcla y procesando la mezcla de gránulos después de agregar auxiliares apropiados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Obsérvese que las formulaciones orales pueden emplear vehículos líquidos del mismo tipo descripto para el uso parenteral, por ejemplo, buffers acuosos, suspensiones, etc

Las formulaciones orales preferidas incluyen tabletas, grageas y cápsulas de gelatina. Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes. Algunos ejemplos de estos excipientes son

- (a) diluyentes, tales como azúcares (lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol)
- (b) aglutinantes, tales como silicato de aluminio y magnesio, almidón de maíz, de trigo, de arroz, de papa, etc
- (c) derivados de la celulosa, tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, gomas, tales como goma arábiga y goma tragacanto, y proteínas, tales como gelatina y colágeno
- (d) agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, almidones, ágar, ácido algínico o alguna de sus sales, como por ejemplo, alginato de sodio, o formulaciones efervescentes
- (e) lubricantes, tales como sílica, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o calcio, y polietilenglicol
- (f) saborizantes y edulcorantes
- (g) colorantes o pigmentos, por ejemplo, para identificar el producto o para caracterizar la cantidad (dosis) de principio activo, y
- (h) otros componentes, tales como conservantes, estabilizantes, agentes de hinchamiento, emulsificantes, agentes solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y buffers

Las capsulas de gelatina incluyen cápsulas *push-fit* (de encastre) y cápsulas blandas selladas, y un recubrimiento de glicerol o sorbitol. Las cápsulas *push-fit* pueden contener los ingredientes activos mezclados con sustancias de relleno, aglutinantes, lubricantes, estabilizantes, etc. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden ser disueltos o suspendidos en fluidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizadores.

Los nucleos de las grageas pueden tener recubrimientos apropiados, tales como soluciones concentradas de azucar que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos apropiados o mezclas de solventes.

Las preparaciones farmacéuticas se pueden presentar como una sal del principio activo, que se puede formar con muchos ácidos, tales como ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos, porque en estos solventes las sales se encuentran como bases libres.

Como se mencionó anteriormente, las características del agente mismo y de su formulación pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* del agente administrado. Esta información farmacocinética y farmacodinámica se puede obtener mediante estudios pre-clínicos *in vitro* e *in vivo*, que luego se confirman en humanos durante los estudios clínicos. En consecuencia, para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, se puede estimar inicialmente una dosis terapéuticamente efectiva en mamíferos, particularmente en humanos, a partir de ensayos bioquímicos y/o celulares. Luego, la dosis se puede formular en modelos animales para alcanzar un rango deseable de concentraciones circulantes (por ejemplo, del modulador). Cuando se realicen estudios en humanos, se obtendrá más información sobre los niveles de dosificación apropiados y sobre la duración del tratamiento de diversos trastornos y condiciones.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de estos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). El cociente de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el "índice terapéutico" que típicamente se expresa como el cociente DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que poseen índices terapéuticos altos. La información obtenida de estos ensayos de cultivos celulares y de otros estudios en animales se puede emplear para formular el rango de dosis para uso en humanos. La dosis de estos compuestos preferentemente está dentro del rango de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad.

Para el método de la invención se puede utilizar cualquier régimen efectivo de administración que regule el intervalo y la secuencia de dosis. Es conveniente que las dosis del agente contengan dosis farmacéuticas que posean una cantidad efectiva del agente. Dentro del contexto de este documento, por "cantidad efectiva" se entiende una cantidad suficiente para modular la interacción del amiloide β o sus agregados con el canal de sodio mediante la administración de una o más dosis farmacéuticas.

Ejemplos de niveles de dosis para humanos están en el orden de 0,001 miligramo de principio activo por kilogramo de peso corporal (mg/kg) hasta aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, las dosis del principio activo están en el orden de 0,01 mg hasta aproximadamente 10 000 mg, preferentemente desde 0,1 mg hasta 1 000 mg, según la indicación, la vía de administración, etc. Según la vía de administración, una dosis apropiada se puede calcular de acuerdo con el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. El régimen definitivo de dosificación será determinado por el médico clínico a cargo del tratamiento, según las buenas prácticas médicas, considerando varios factores que modifican la acción de drogas, por ejemplo, la acción específica del agente, gravedad de la etapa de la enfermedad, capacidad de respuesta del paciente, edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección que pueda tener, y otros factores de similar naturaleza. Otros factores

que se deben tomar en cuenta incluyen momento y secuencia de administración, combinaciones de drogas, sensibilidad de reacción, y tolerancia/respuesta a la terapia. Un refinamiento posterior de la dosis apropiada para el tratamiento que incluya cualquiera de las formulaciones aquí consideradas es una práctica de rutina a cargo de practicantes idóneos, sin llegar a la experimentación indebida, especialmente teniendo en cuenta ensayos e información de dosis conocidos, así como la información farmacocinética observada en estudios clínicos con suplementos de levadura. Las dosis apropiadas se pueden determinar mediante el uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con la información de respuesta a la dosis.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y de la vía de administración. La dosis y la administración se pueden regular para lograr niveles suficientes de la fracción activa o mantener el efecto deseado. En consecuencia, las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar en dosis únicas, dosis múltiples, infusión continua, depósitos de liberación sostenida, o combinaciones de los anteriores, requeridas para mantener el nivel mínimo deseado del agente. Las preparaciones farmacéuticas de acción corta (es decir, de vida media corta), se pueden administrar una o más veces al día (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día). Las preparaciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrarse cada tres o cuatro días todas las semanas o cada dos semanas. Para la infusión continua, se prefieren las bombas, como por ejemplo la bomba subcutánea, intraperitoneal o subdural.

Las preparaciones que contienen un principio activo de esta invención formulado en un vehículo farmacéuticamente apropiado se pueden realizar, colocar en un recipiente apropiado y rotulado para tratamiento de una condición indicada. Las condiciones que se indican en el rótulo pueden incluir, entre otras, tratamiento y diagnóstico del mal de Alzheimer y de las enfermedades por priones. También se contempla el uso de kits que contengan la dosis de la preparación farmacéutica y un prospecto con instrucciones para el uso de la preparación en el tratamiento de una condición médica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sólo sirven como ilustración de esta invención, pero no restringen de forma alguna su alcance

Los ejemplos presuponen el conocimiento de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia pertinente, por ejemplo, las técnicas para aislamiento y evaluación electrofisiológicas de las células (tales como células neuronales). Estos métodos se describen detalladamente en numerosas publicaciones, como en Hille, *In Ionic Channels of Excitable Membranes*, Sinauer Associates, Inc (1992). El contenido de esta publicación y de otras publicaciones citadas en los ejemplos se incorpora en su totalidad por medio de referencias.

Para todos los estudios aquí descritos, se examinaron neuronas únicas disociadas en fresco de ratas adultas [Chad et al, *In, Cellular Neurobiology*, Ed J Chad and H Wheal, Oxford University Press (1991)] utilizando el método de pipeta de succión [Lee et al, *J Neurosci Methods*, 2, 51-78 (1980)] con pinza de corriente o voltaje y un amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Foster City, CA). El amiloide β 1-40 fue provisto por Polypeptide Laboratories, Torrance, CA, o por Bachem Biochemica, Heidelberg, Alemania.

Los ensayos de agregación por agitación (como los que se describen en los Ejemplos 1-4) se realizaron en la forma indicada anteriormente [Findeis et al, *Biochemistry*, 38, 6791-6800 (1999)]. Esta agregación hecha antes de usar el amiloide en estado agregado para que entre en contacto con células se realizó en el mismo medio donde estaban las células, es decir, en solución salina equilibrada de Hank. La agregación del amiloide para estudios de cinética (como los que se describen en el Ejemplo 5) se realizó en un buffer fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. En cada caso, la agregación se llevó a cabo en placas de 96 pocillos que contienen al amiloide β 1-40 en una concentración 25-50 μ M en un volumen final de 250 μ L. Las placas fueron agitadas en un agitador giratorio de

placa de titulación (Lab-Line Modelo 4623, Lab-Line Inst., Melrose Park, IL) a una velocidad de aproximadamente 700-800 rpm (monitoreada por un tacómetro) para inducir la agregación. A determinados tiempos, se leyeron los distintos grados de turbidez de la mezcla de reacción midiendo la dispersión de luz a 405 nm en un lector Vmax Microplate Reader de Molecular Devices (Menlo Park, CA). En todos los Ejemplos, el material agregado se extrajo a intervalos periódicos y se adicionó a neuronas aisladas para examinar su efecto.

Previo a la agregación y con el fin de preparar el amiloide β en su forma monomérica, el amiloide β 1-40 (por ejemplo, para usarse como estándar para HPLC) fue tratado con alcohol hexafluoroisopropílico (AHFIP), secado con anterioridad sobre un tamiz molecular tipo 4A a 4° C y centrifugado a 15 000 X g durante 10 minutos para remover residuos del tamiz. Para los ensayos de agregación, el péptido fue disuelto en el AHFIP para obtener una solución de concentración 8 mg/mL, y mantenido en el solvente durante 18-24 horas, con el fin de desagregar partículas preformadas. Luego de este paso de monomerización, alícuotas de 20 μ L de esta solución se sometieron a congelamiento rápido en nitrógeno líquido y se almacenaron a -195° C hasta su uso. Sin descongelar, se extrajo el AHFIP del péptido por liofilización en hielo seco. La extracción completa del AHFIP sin descongelar fue esencial para obtener un material inicial no agregado, por ejemplo, si los *pellets* (bolitas) congelados se funden antes de completar el proceso de liofilización, existe una alta probabilidad de que se vuelvan a formarse los polímeros. El A β 1-40 liofilizado se disolvió en DMSO anhidro (usualmente en 20 μ L) y se sometió a un baño de ultrasonido durante 15 minutos. Debido a que el procedimiento anteriormente descrito es demasiado largo y engorroso, para algunos experimentos se empleó el procedimiento de tratamiento con ácido, que consiste en la disolución del A β 1-40 en ácido acético al 0.1% previo a la agregación (Findeis et al., *supra*), descubriéndose que era aceptable para la randomización del péptido.

Ejemplo 1

En este experimento, se examinaron los patrones de desencadenamiento de neuronas aisladas de hipocampo y de corteza de ratas adultas por medio de un amplificador Axopatch 200 en presencia y en ausencia del péptido amiloide β 1-40

Se monitoreó con pinza de corriente el potencial de reposo de membrana y los potenciales de acción de neuronas individuales en forma continua durante 10-20 minutos como mínimo, hasta que la actividad neuronal se estabilizó. Luego se adicionó lentamente a la neurona el amiloide β 1-40 preagregado en una concentración 10-50 μ M a diferentes tiempos, sin causar artefactos de flujo. A los 5-10 minutos, los potenciales de reposo comenzaron a moverse en dirección de despolarización o hiperpolarización según el tipo neuronal examinado. Sin embargo, el efecto común fue la desaparición lenta de los potenciales de acción espontáneos o evocados. Después de aproximadamente 30 minutos de la exposición al péptido, desaparecieron todos los potenciales de acción en la mayoría de las neuronas examinadas. Estas neuronas tratadas con el amiloide β se volvieron "silenciosas" y no funcionales, y pasaron a un estado vegetativo tras la exposición prolongada (es decir, aproximadamente 30-60 minutos) al amiloide β .

Estos resultados se describen en las Figuras 1 A-C para neuronas corticales, y en las Figuras 2 A-C para neuronas de hipocampo. Estos resultados confirman que, agregando a la neurona el amiloide β 1-40 en una concentración 1-5 μ M, se anulan los potenciales de acción en neuronas corticales y de hipocampo.

Además, estos resultados confirman que el péptido amiloide β 1-40 altera los patrones de desencadenamiento de las neuronas corticales y de hipocampo de ratas adultas.

Ejemplo 2

En este experimento, se estudió el efecto del amiloide β 1-40 sobre la corriente rápida de entrada de sodio (I_{Na}) en neuronas aisladas de hipocampo de rata con un amplificador Axopatch 200.

Estos estudios se realizaron aplicando la pinza de voltaje a neuronas con un potencial de reposo de -50 a -80 mV y los canales de sodio se activaron totalmente. Una vez más se obtuvo un control estable. Luego, se aplicó a las neuronas el agregado del amiloide β 1-40, a una concentración 10 - 50 μ M, a diferentes tiempos y a temperatura ambiente (23° C) en buffer fosfato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4 . A los 5 - 30 minutos, aproximadamente el mismo tiempo para que los potenciales de acción desaparezcan, el amiloide β 1-40 bloqueó la corriente rápida de entrada de sodio en un 90% como se puede ver comparando los resultados de la Figura 3 A (control) con los de la Figura 3 B (agregado del amiloide β a 90 minutos) y con los de la Figura 3 C (agregado del amiloide β a 120 minutos). El cambio progresivo de la amplitud del pico de la corriente de entrada de sodio para los mismos experimentos con neuronas de hipocampo se muestra en la Figura 4 para agregado del amiloide β a 90 minutos (círculos rellenos) y para agregado del amiloide β a 120 minutos (cuadrados rellenos).

Además, en este momento, cuando se inactivó la pinza de corriente, la neurona no desencadenó potenciales de acción (como se puede ver en las Figuras 1 B y 2 B), confirmando de esta manera que el mecanismo del amiloide β 1-40 de eliminación del potencial de acción es el bloqueo de los canales rápidos de entrada de sodio.

Esto también se puede ver en las neuronas de hipocampo de ratas comparando las lecturas de potenciales de reposo que se muestran en la Figura 5 A (control) y en la Figura 5 D (lavado), con las lecturas que se muestran en la Figura 5 B (agregado de amiloide β a 90 minutos) y las de la Figura 5 C (agregado de amiloide β a 120 minutos). Para el mismo experimento, cuando se inactivó la pinza de corriente, la neurona no desencadenó potenciales de acción, como se puede ver en la Figura 6, para agregado de amiloide β a 90 minutos (círculos rellenos) y a 120 minutos (cuadrados en blanco).

Asimismo, se pudo observar que esta corriente rápida de entrada de sodio es sensible a tetrodotoxina (TTX). Esto se puede ver comparando trazos de corrientes de sodio obtenidos de neuronas de hipocampo, en la Figura 7 A (control, sin exposición a

TTX) y en la Figura 7 C (lavado) con los trazos que se muestran en la Figura 7 B (10^{-6} M de TTX) Para el mismo experimento, los cambios en la amplitud del pico de corriente de entrada de sodio en un rango amplio de potenciales de -80 mV a $+10$ mV se muestran en la Figura 8 para control (círculos en blanco) y lavado (cuadrados rellenos), en comparación con las neuronas expuestas a TTX (círculos rellenos)

Estos resultados confirman que el amiloide β 1-40 inhibe la corriente rápida de entrada de sodio (I_{Na}) Éste es un hallazgo nuevo e inesperado debido a que datos anteriores ponían énfasis en el impacto del amiloide β sobre canales de calcio y/o potasio Además, los resultados confirman que el objetivo del amiloide β 1-40 son los canales rápidos de entrada de sodio y que es sensible a tetrodotoxina Sin embargo, también otros tipos de canales de sodio pueden estar involucrados y/o ser sensibles a los efectos negativos del amiloide β

9

Ejemplo 3

En este experimento, se estudió el efecto del amiloide β 1-40 sobre los canales de calcio utilizando los métodos descritos en el Experimento 2 para canales de sodio

También se observó que el péptido amiloide β 1-40 deprime las corrientes neuronales de entrada de calcio (ver Figuras 9 A-B y Figura 10) Sin embargo, el canal de calcio puede ser más resistente a la acción inhibidora del amiloide β 1-40

Estos resultados confirman que el amiloide β 1-40 afecta las corrientes neuronales de calcio

Ejemplo 4

En este experimento, se estudió el efecto del amiloide β 1-40 sobre los canales de potasio utilizando los métodos descritos en el Experimento 2 para canales de sodio

Con la pinza de voltaje, en los primeros 2-5 minutos, el péptido indujo en algunas células una corriente de reposo de salida que medía aproximadamente 10-50 pA, pero esta

pequeña corriente fue suficiente para hiperpolarizar el potencial de reposo de membrana de -50 mV a -90 mV. En otras células, el péptido en cambio causó una despolarización gradual a aproximadamente -40 mV debido a una leve inhibición de la corriente de reposo de salida. En todas las células, el amiloide β 1-40 bloqueó la corriente retrasada de salida de potasio en aproximadamente 30-40% en todos los niveles de potenciales. La medición correspondiente del potencial de acción indicó que este efecto produjo la prolongación de la duración normal del potencial de acción (ver Figura 1 B). Estos resultados se muestran en las Figuras 11 A-B y en la Figura 12.

En consecuencia, estos resultados confirman que el amiloide β 1-40 afecta las principales corrientes neuronales de potasio.

Ejemplo 5

En este experimento, se estudió la relación entre el agregado del amiloide β 1-40 y su capacidad de causar un impacto sobre una variedad de parámetros, que se describen en este documento, como por ejemplo, la actividad del canal de sodio.

Según los antecedentes, la cinética de la agregación espontánea del péptido del amiloide β se caracteriza por una larga fase de latencia en la cual se puede detectar una pequeña cantidad del agregado, como mínimo, mediante fluorescencia por tioflavina T. Después de la fase de latencia se observa una fase logarítmica rápida que provoca la deposición del péptido hasta que la solución es completamente depletada de los monómeros del amiloide β . La rápida aceleración (propagación) del crecimiento fibrilar se produce a partir de núcleos preformados. El paso más importante de todo el proceso es la nucleación desde la cual la formación fibrilar avanza rápidamente. La inhibición de la nucleación detiene la totalidad del proceso, y sería altamente deseable contar con un ensayo con el cual se pueda medir este evento temprano. El aumento abrupto (exponencial) durante la fase de propagación indica la presencia de una agregación de orden superior y el crecimiento del agregado. La cinética de la agregación espontánea se estudió en

experimentos que se incluyen en este documento, así como utilizando información publicada [por ejemplo, Lansbury et al, *Arzn For Drug Research*, 45, 432-434 (1995) Pillot et al, *Eur J Biochem*, 243, 650-659 (1997)]

Para estos estudios, primero se realizaron experimentos de cinética para establecer el curso temporal de la formación de la forma β del A β 1-40 (monomero activado), y del tetramero, con el fin de obtener más conocimiento sobre la forma del péptido amiloide β que tiene la mayor capacidad de causar un impacto deletéreo sobre diversos parámetros celulares. Luego, se tomaron a tiempos determinados alícuotas del péptido de la solución de agregación activa del A β 1-40 y se agregaron a neuronas aisladas de hipocampo de rata. Se estudió el impacto de diversas formas agregadas del A β utilizando una serie de ensayos, tales como (1) potenciales de reposo de membrana, (2) potenciales de acción, (3) canales rápidos de entrada de sodio (sensibles a TTX), (4) canales de calcio, y (5) canales de salida de potasio.

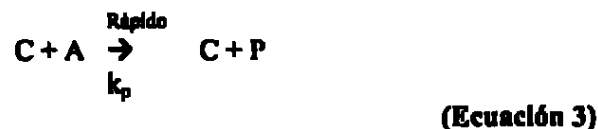
Se evaluaron los datos obtenidos de los estudios de la cinética de la agregación espontánea por medio de varios modelos cinéticos de orden múltiple. Se observó que el esquema más simple (que se indica en las Ecuaciones 1-3) para estos datos es un esquema en el cual el péptido monomérico no nucleado de estructura por enrollamiento al azar (A inactivo) se convierte en una forma activa, nucleada (B) según la siguiente ecuación



B luego se oligomeriza formando un intermediario tetramérico (C)



que une rápidamente especies de A para formar una estructura fibrilar insoluble (P)



El sistema de ecuaciones diferenciales que describe este modelo es

$$\frac{dA}{dt} = -k_1A - k_pC * A$$

(Ecuación 4)

$$\frac{dB}{dt} = k_1A - k_2B^4$$

(Ecuación 5)

$$\frac{dC}{dt} = k_2B^4 - k_pC * A$$

(Ecuación 6)

$$\frac{dP}{dt} = k_pC * A$$

(Ecuación 7)

Debido a que las ecuaciones diferenciales 4-7 no son integrables, los datos se debe adaptar utilizando un algoritmo no lineal por cuadrados mínimos apropiado concatenado con el algoritmo de integración numérica de orden cinco de Runge-Kutta. El programa no lineal de cuadrados mínimos que se utilizó en este caso fue escrito por el Dr. Ferenc Kézdy (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan).

Los datos guardan coherencia con un modelo de cambio lento del péptido en solución de una forma no nucleada inactiva a una forma activa que puede iniciar la agregación del amiloide β . El análisis demostró que la forma tetramérica del péptido es responsable de la nucleación. Después de la nucleación, el factor determinante de la parte abrupta de la cinética es la propagación, momento en el cual el compuesto que forma el tetramero alcanza el estado estacionario. La cinética de todos los experimentos de agregación espontánea realizados en esta invención y por otros [Lansbury et al., *Arzn For Drug Res*, 45, 432-434 (1991), Pillot et al., *Eur J Biochem*, 243, 650-659 (1997)] guardó coherencia sólo con este modelo. Los resultados pueden sugerir que el impacto deletéreo (por ejemplo, muerte celular) del péptido amiloide se debe al tetramero del amiloide que forma un poro en las membranas biológicas, similar a la forma tetramérica tóxica de la melitina.

A continuación de los estudios cinéticos, se tomaron alícuotas del amiloide β a tiempos determinados de la solución de agregación activa del $A\beta$ 1-40, y se agregaron a neuronas corticales y de hipocampo de rata. Luego, se midió la corriente de entrada de sodio. La disminución porcentual de esta corriente en cada punto del ensayo se determinó para cada punto de prueba como la velocidad en la que se generaba la corriente de sodio. Asimismo, se evaluaron los impactos de las diversas formas de agregados de $A\beta$ sobre el potencial de reposo de membrana, el potencial de acción, los canales de calcio y los canales de salida de potasio.

No se observó un impacto significativo causado por los monómeros del amiloide β 1-40 sobre los parámetros evaluados. Pero en la medida en que los monómeros se agregan para formar dímeros, tetrameros y finalmente polímeros, la capacidad del amiloide β 1-40 de causar un impacto negativo sobre la actividad de los canales apareció y luego aumentó en forma exponencial, siguiendo aproximadamente el curso temporal de la agregación del péptido. La fracción que produce el mayor impacto negativo sobre la actividad de los canales apareció justo antes de la desaparición total del monómero y de la saturación de la agregación del péptido. Después de alcanzar la saturación, el impacto pico disminuyó pero aun estaba por encima del nivel de 50% de inhibición de los canales rápidos de entrada de sodio (mostrado en la Figura 13, que es el valor medio de cuatro experimentos con 29 células cada uno).

El impacto negativo del amiloide β se observó en cinco niveles de actividades neuronales: (1) potenciales de reposo de membrana, (2) potenciales de acción, (3) canales rápidos de entrada de sodio (sensibles a TTX), (4) canales de calcio, y (5) canales de salida de potasio. Sin embargo, el principal canal iónico objetivo del amiloide β 1-40 es el canal rápido de entrada de sodio sensible a TTX. Esto confirma que un agregado del amiloide β ejerce efectos deletéreos sobre el canal rápido de entrada de sodio, lo no permite que las neuronas generen los impulsos eléctricos, críticos para las funciones cerebrales y nerviosas.

54

Estos resultados también confirman que los agregados peptídicos de bajo peso molecular del monómero del amiloide β tienen mayor potencia de inhibición de los canales rápidos de entrada de sodio

Todas las referencias que se citan en este documento se incorporan en su totalidad por referencia

Si bien esta invención se ha descripto poniendo énfasis en un entorno ideal, resultará obvio para los individuos con un conocimiento normal de la materia que se pueden utilizar variaciones del método y las preparaciones preferidas, y que se pretende que en la práctica de la invención se emplee cualquier otra forma diferente a la que específicamente se describe en este documento. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones contenidas dentro de su espíritu y alcance, que se definen en las siguientes propuestas

LO QUE SE PROPONE ES

54
55

1 Un método para identificar compuestos que modulen la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio, que consista en los siguientes pasos

- (a) obtener una célula que incluya un canal de sodio,
- (b) poner en contacto el canal de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y en ausencia del compuesto de ensaye,
- (c) determinar la acción del canal de sodio con y sin la presencia de dicho compuesto, considerando al compuesto de ensaye que ejerce un impacto sobre la actividad como un modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con dicho canal

2 Un método para identificar compuestos que modulen la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio, que consista en los siguientes pasos

- (a) obtener un preparado que incluya un canal de sodio purificado,
- (b) poner en contacto el canal de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y en ausencia del compuesto de ensaye,
- (c) determinar la actividad del canal de sodio con y sin la presencia de dicho compuesto, considerando al compuesto de ensaye que ejerce un impacto sobre la actividad como un modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con dicho canal

3 El método referido en los puntos 1 y 2 además incluira la fabricación de una preparación que consista en un modulador identificado en la forma descrita en el paso
(c) en un vehículo farmacéuticamente apropiado

u
w
r

4 El método referido en los puntos 1 y 2 también incluira el tratamiento del mal de Alzheimer con una preparación que consista en un modulador identificado en la forma descrita en el paso (c)

Tratamiento

5 Un método para investigación de compuestos que modulen la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio, que consista en los siguientes pasos

- (a) obtener una primera célula que produzca el amiloide β o sus agregados,

55
56

- (b) obtener una segunda célula que contenga un canal de sodio,
- (c) poner en contacto la segunda célula con la primera en presencia y en ausencia del compuesto de ensaye, y
- (d) determinar la actividad del canal de sodio con y sin la presencia de dicho compuesto, considerando al compuesto de ensaye que ejerce un impacto sobre la actividad como un modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con dicho canal

6 El método descrito en la propuesta 5, donde la primera o segunda célula sea una célula neuronal y la otra una célula no neuronal

7 El método descrito en la propuesta 5, donde tanto la primera como segunda célula sean neuronales o no neuronales

8 El método descrito en las propuestas 5 a 7, donde se incluya la fabricación de una preparación que contenga un modulador identificado en la forma descrita en el paso (d) en un vehículo farmacéuticamente apropiado

claro
esto
se define
no método

9 El método descrito en las propuestas 5 a 7, donde se incluya el tratamiento del mal de Alzheimer con una preparación que consista en un modulador identificado en la forma descrita en el paso (c)

esto claro

10 Un compuesto identificado como modulador de acuerdo con cualquiera de las propuestas anteriores

definir estructura

11 Una preparación que contenga un compuesto conforme a lo indicado en la propuesta 10 en un vehículo farmacéuticamente apropiado

definir compo

12 Un método para usar un compuesto conforme a lo indicado en la propuesta 10 en la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o revertir el mal de Alzheimer en mamíferos

tratar

13 Un método para diagnosticar el mal de Alzheimer en mamíferos cuando se sospecha que padecen el mal de Alzheimer, que contemple la medición de la actividad de un canal de sodio en células de mamíferos correlacionando la reducción de actividad de dicho canal con la existencia del mal de Alzheimer en cualquiera de sus etapas

14 El metodo indicado en la propuesta 13, que además contemple la medición de la cantidad del amiloide β o sus agregados en dichas células o en el fluido extracelular de los mamíferos que esta en contacto con la célula, y donde se correlacione la presencia del amiloide β o sus agregados en las células o el fluido con la existencia del mal de Alzheimer en cualquiera de sus etapas

15 Un método para investigar la susceptibilidad de un mamifero al mal de Alzheimer, que conste de los siguientes pasos

- (a) aislar una celula del mamifero que contenga un canal de sodio,
- (b) medir la actividad del canal de sodio en presencia y en ausencia del amiloide β o sus agregados,

donde la reducción de la actividad de dicho canal se compare con y sin la presencia del amiloide β o sus agregados, y se correlacione con la susceptibilidad al desarrollo del mal de Alzheimer

16 Un método para diagnosticar enfermedades por priones en mamíferos cuando se sospecha que padecen este tipo de enfermedad, que contemple la medición de la actividad de un canal de sodio en las células de dichos mamíferos, donde la reducción de la actividad de dicho canal de sodio se correlacione con la existencia de una etapa de la enfermedad por priones

17 El uso de un compuesto que proteja el canal de sodio contra la reduccion de su actividad provocada por el amiloide β o sus agregados a fin de fabricar un medicamento para prevenir, tratar o revertir el mal de Alzheimer en mamíferos

18 El uso de un compuesto que proteja el canal de sodio contra la reducción de su actividad provocada por el amiloide β o sus agregados a fin de fabricar un medicamento para prevenir, tratar o revertir las enfermedades por priones en mamíferos

19 El uso de un compuesto que abra el canal de sodio a fin de fabricar un medicamento para prevenir, tratar o revertir el mal de Alzheimer en mamíferos

x
~~57~~
58

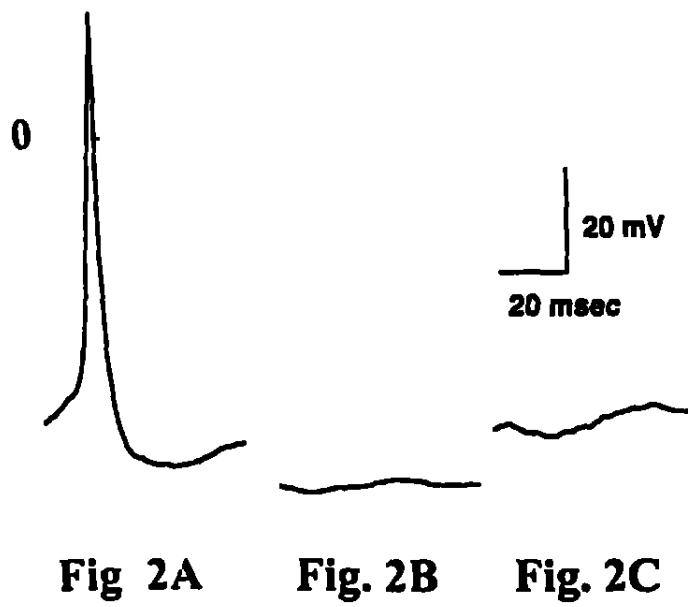
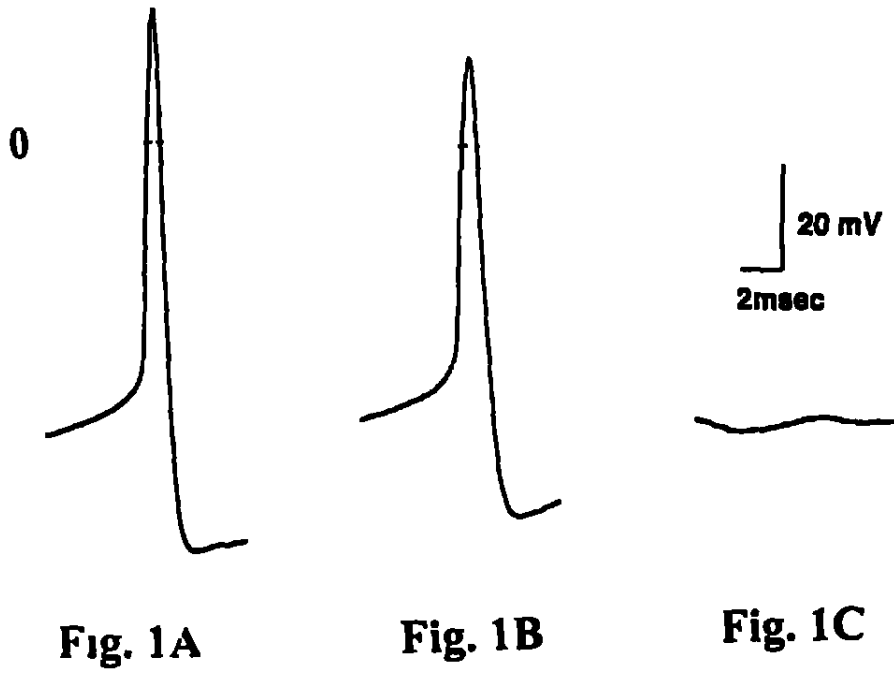
~~20~~ El uso de un compuesto que abra el canal de sodio a fin de fabricar un medicamento para prevenir, tratar o revertir las enfermedades por priones en mamíferos

~~21~~ El método indicado en cualquiera de las propuestas 1 a 4, y 13 a 16, donde la célula sea neuronal

~~22~~ El método indicado en cualquiera de las propuestas 1 a 4, y 13 a 16, donde la célula sea no neuronal

~~23~~ El método de cualquiera de las propuestas anteriores, donde la actividad se determine por un método seleccionado del grupo que consiste en examinar potenciales de reposo de membrana, examinar potenciales de acción y medir la corriente rápida de entrada de sodio

1/11



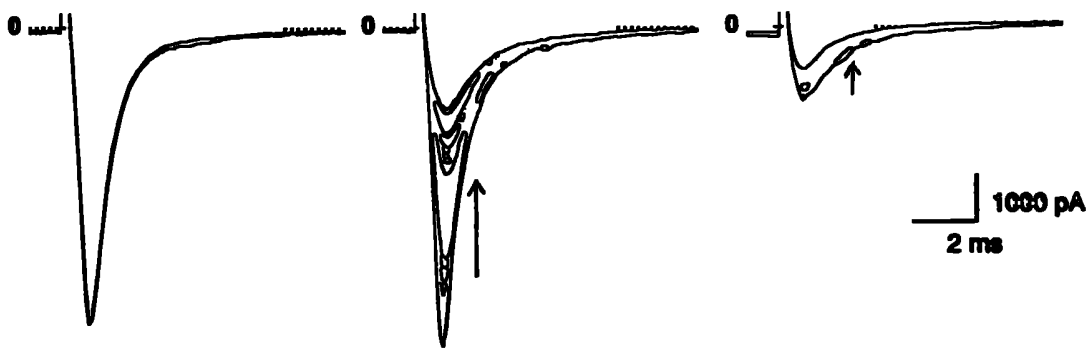


Fig. 3A

Fig. 3B

Fig. 3C

50

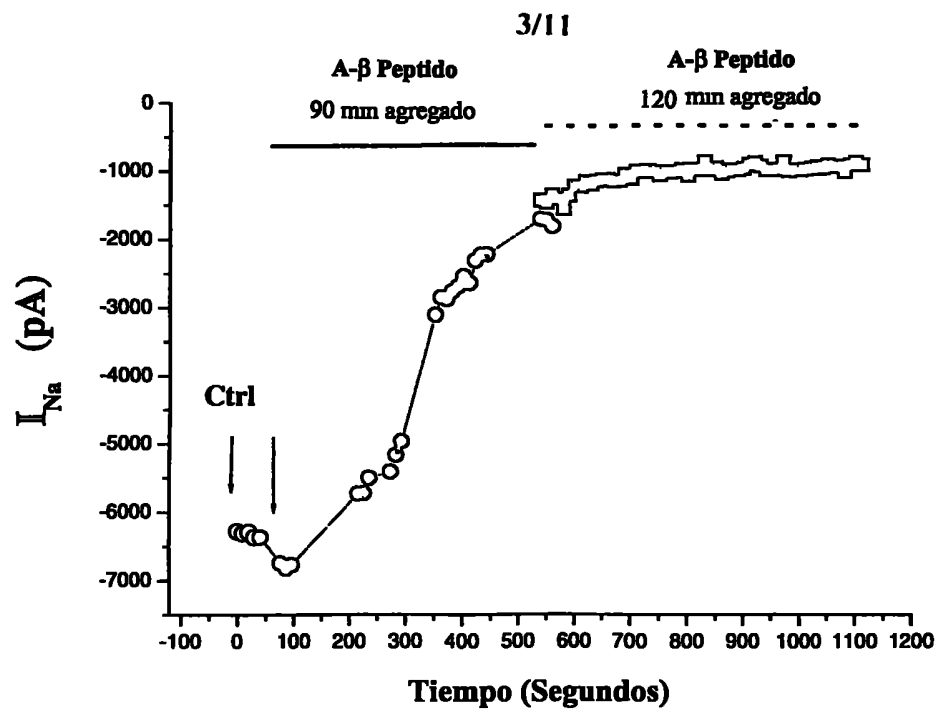


Fig. 4

Q

4/11

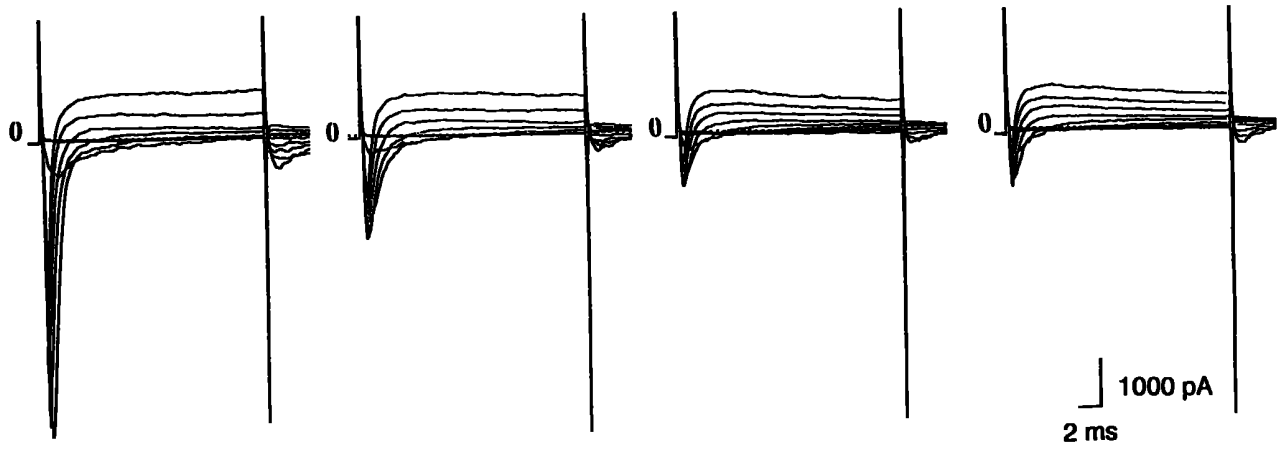


Fig. 5A

Fig. 5B

Fig. 5C

Fig. 5D

64

5/11

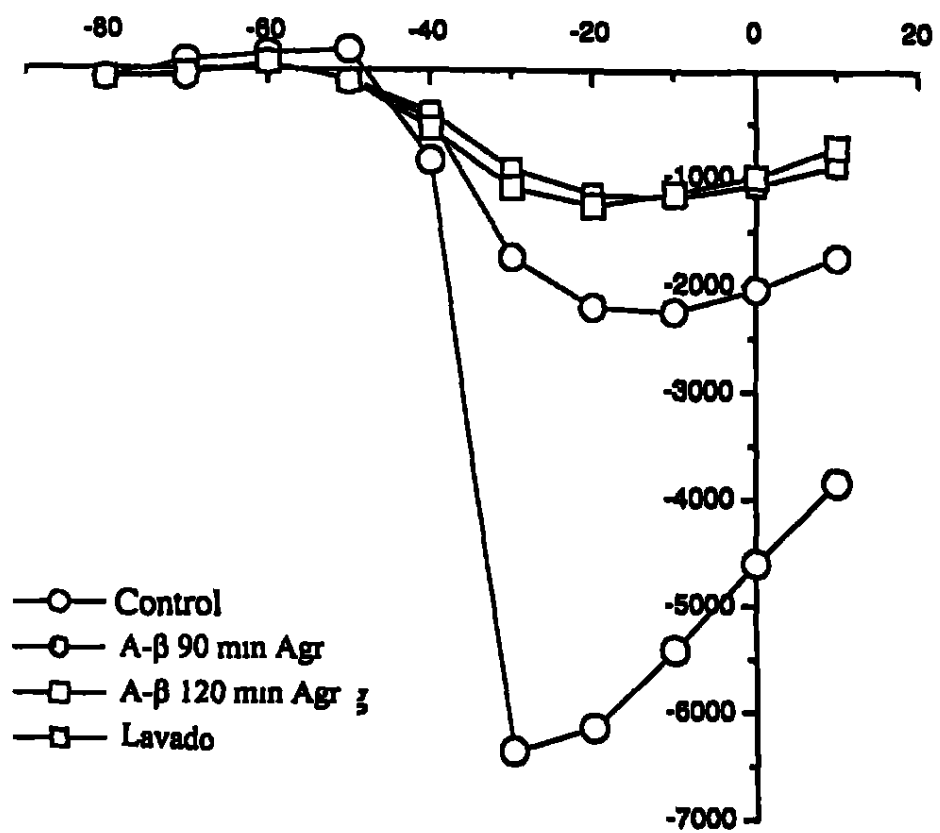


Fig. 6

69

6/11

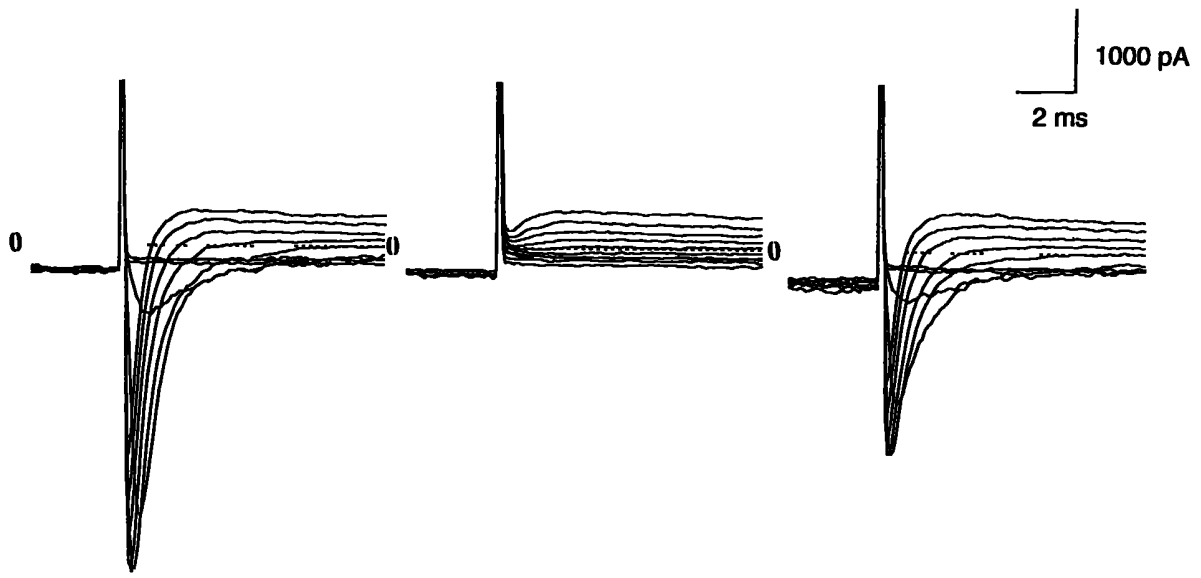


Fig. 7A

Fig. 7B

Fig. 7C

[Handwritten signature]

64
65

7/11

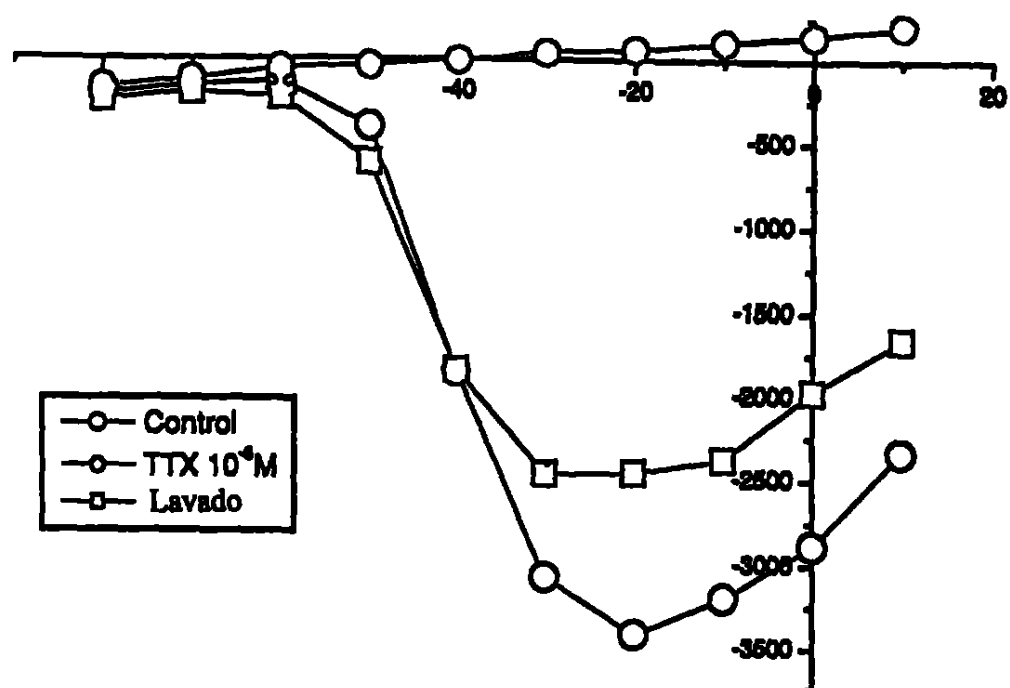


Fig. 8

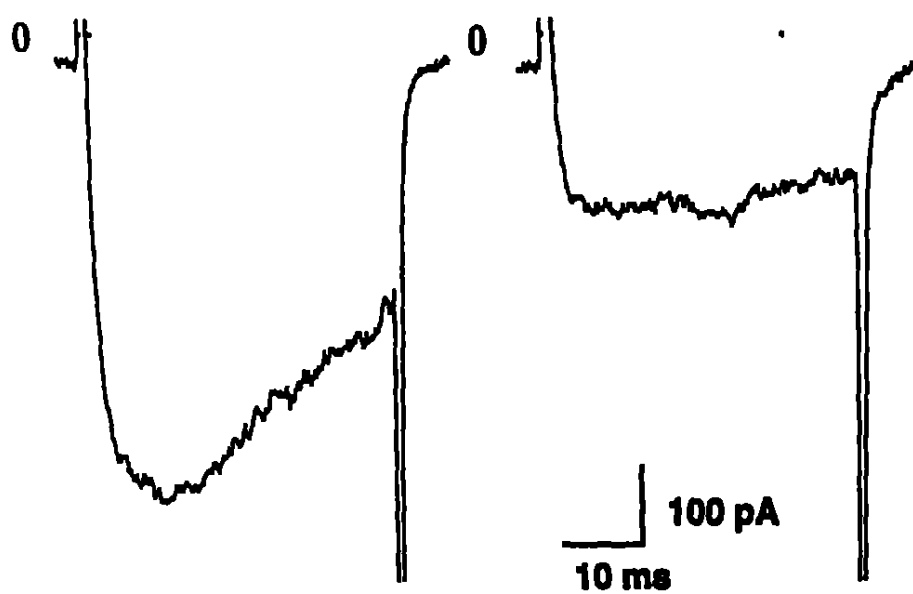


Fig. 9A

Fig. 9B

65
66

8/11

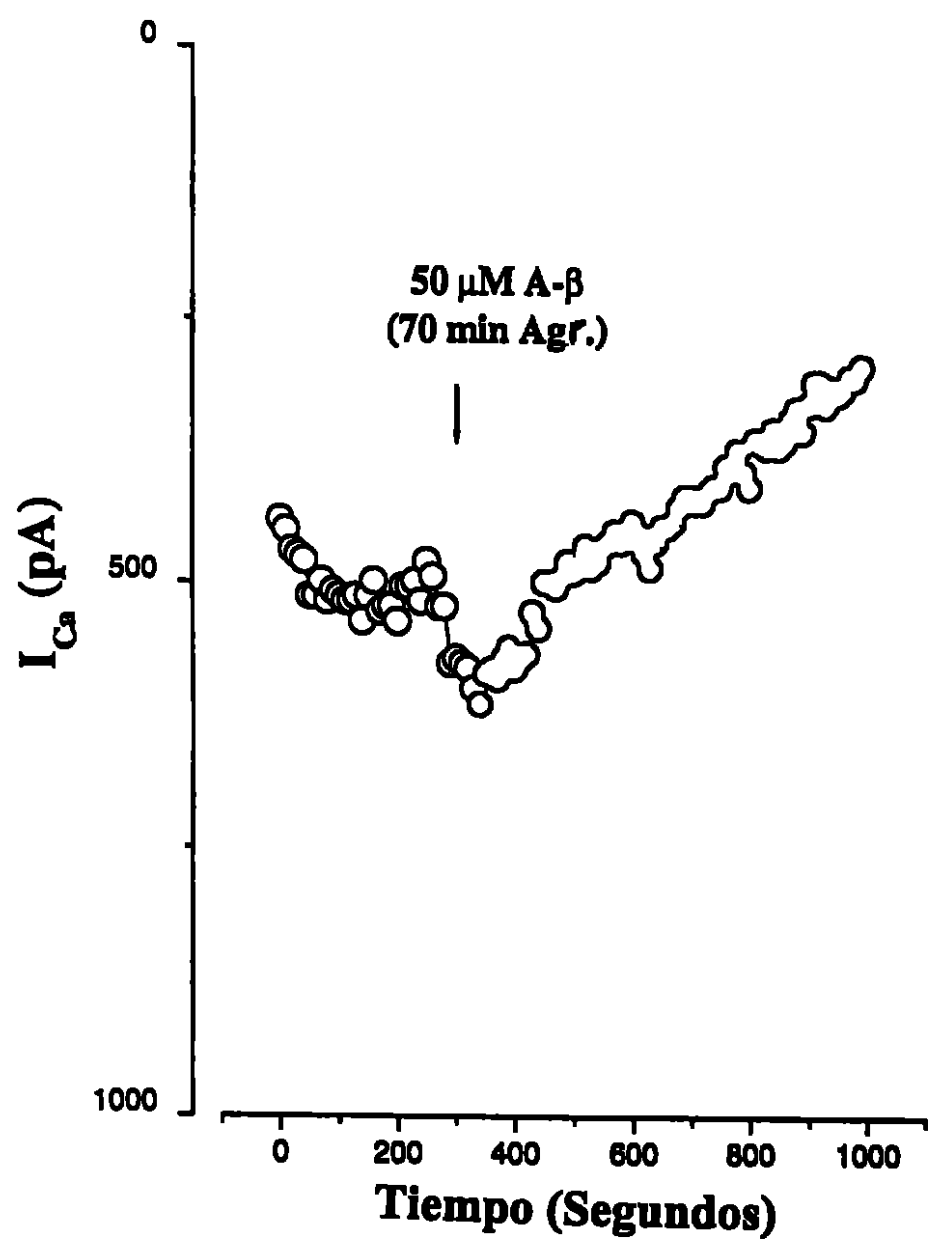


Fig. 10

9/11

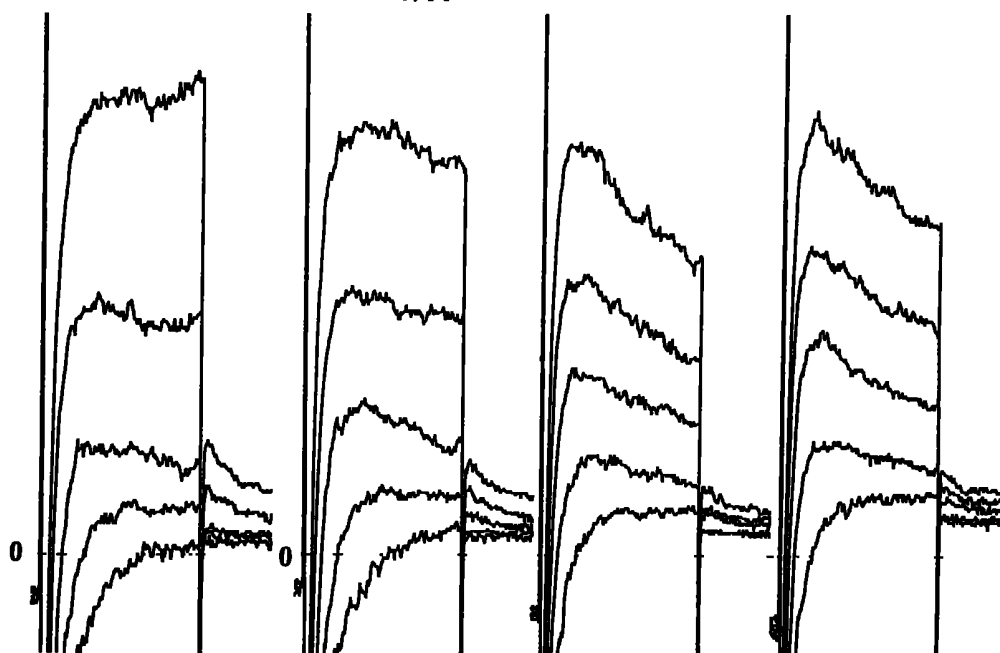


Fig. 11A

Fig. 11B

Fig. 11C

Fig. 11D

[Handwritten signature]

10/11

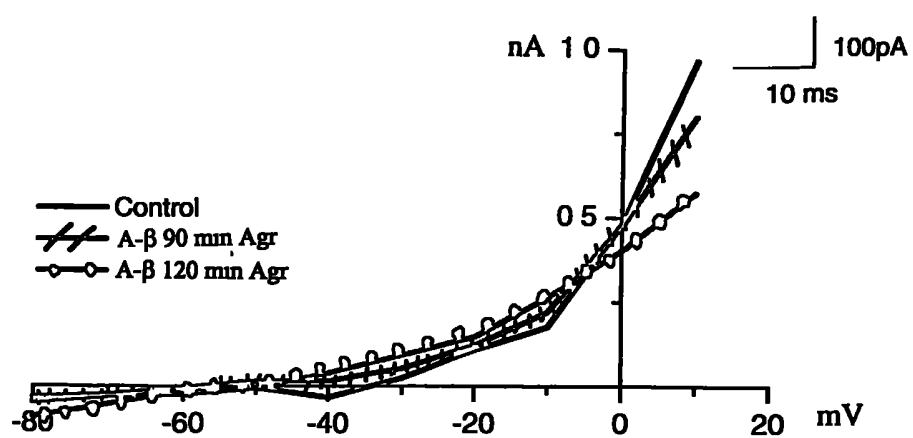


Fig. 12

69

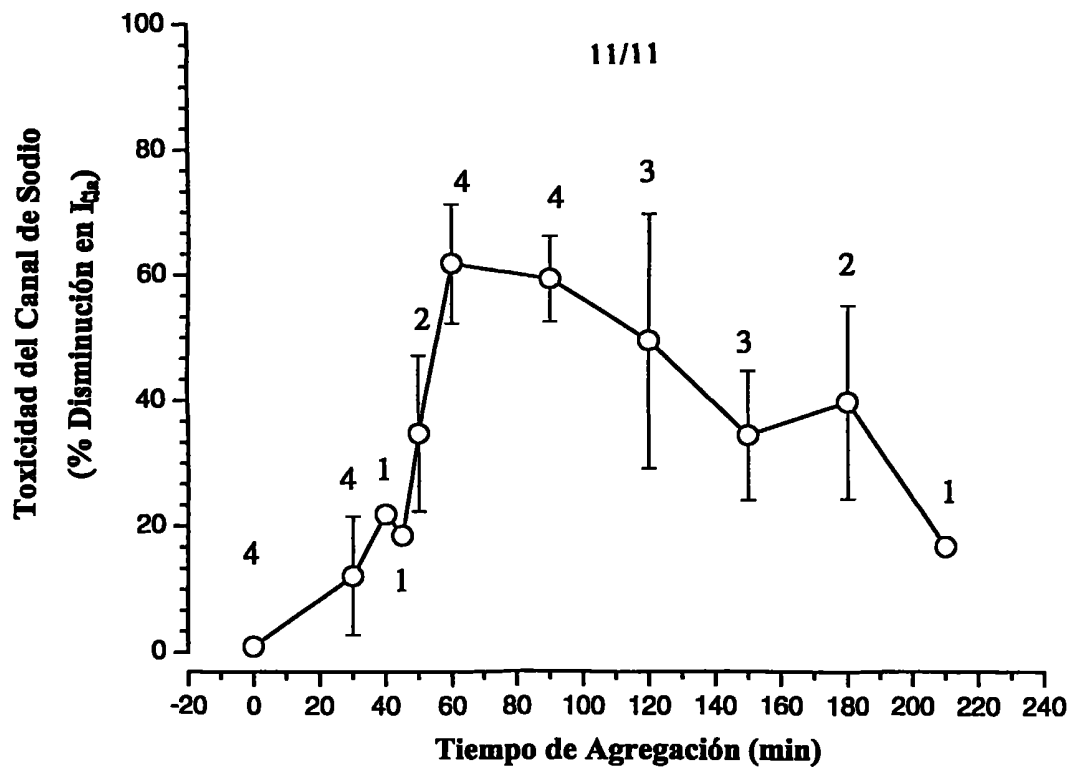


Fig. 13

[Handwritten signature]

Folios 70 y 71
tarjetas

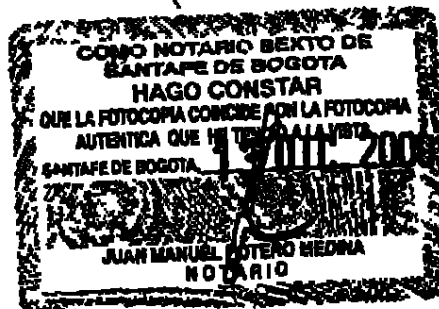
Q

folio 69 extracto para
publicación 23-10-02

22
70

EL SUSCRITO JEFE DEL AREA DE
LEGALIZACIONES DE MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES.

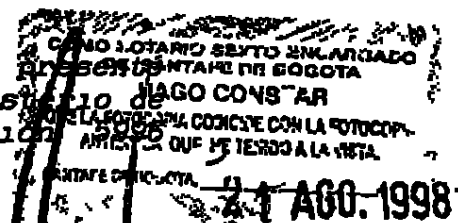
HACE CONSTAR



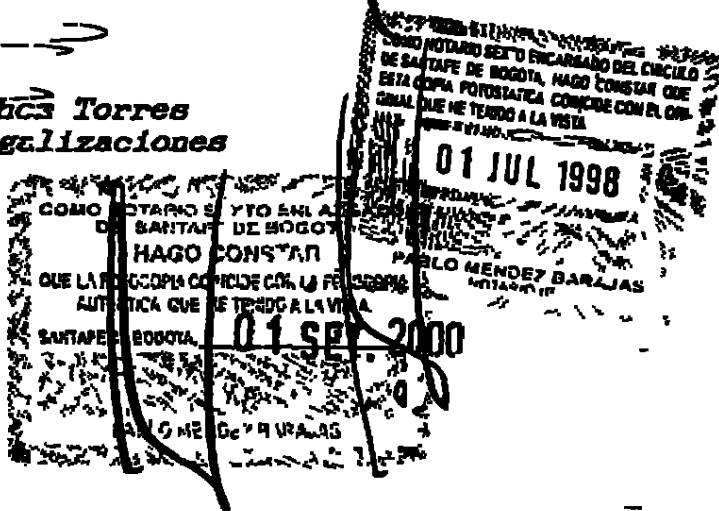
Que el señor Gabriel Rueda, se encuentra debidamente registrado ante este Ministerio, como traductor e intérprete oficial para los idiomas INGLES -ESPAÑOL, ESPAÑOL - INGLES.

Para efectos de ésta certificación el interesado presenta copia autenticada de la certificación del Ministerio de Justicia acerca de la vigencia de la resolución 1982

Dada en Santafé de Bogotá, D.C , a los diez y nueve días (19) del mes de diciembre de 1994.



Neibón Sánchez Torres
Jefe Area de Legalizaciones



NST/gtm



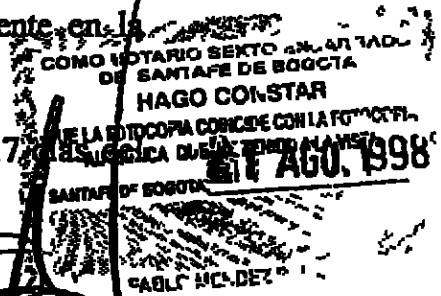
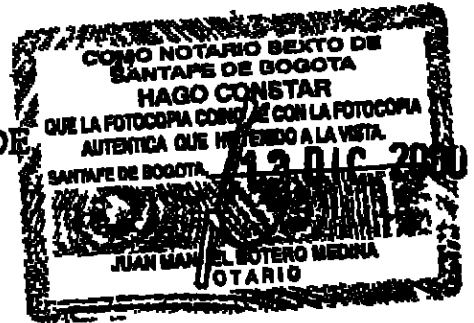
Ministerio de Justicia y del Derecho

EL SECRETARIO GENERAL DEL MINISTERIO DE
JUSTICIA Y DEL DERECHO

CERTIFICA

Que por Resolución 5996 del 29 de noviembre de 1982, le fue expedida licencia para ejercer funciones de Traductor e Intérprete Oficial en los idiomas INGLÉS-ESPAÑOL, ESPAÑOL-INGLÉS a GABRIEL RUEDA CHADID, identificado con la cedula de ciudadanía No 17 124 145 expedida en Bogotá. Que dicha resolución se encuentra vigente en la fecha.

A solicitud del interesado, en Santafé de Bogotá D C, a los 17
mes de noviembre de 1994



[Handwritten signature of Jorge Luis Sabogal Sabogal]
JORGE LUIS SABOGAL SABOGAL
SECRETARIO GENERAL

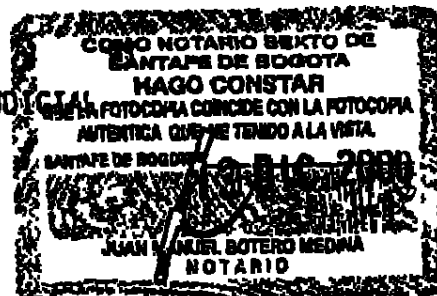


[Handwritten signature]

72

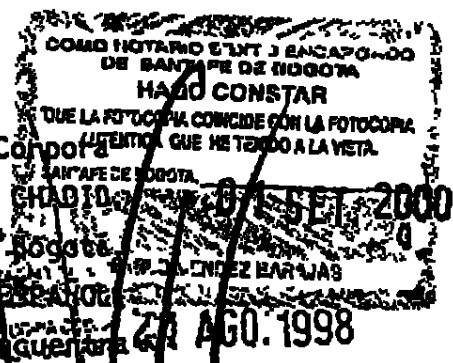
TRIBUNAL SUPERIOR DEL DISTRITO JUDICIAL DE SANTAFE DE BOGOTA
SECRETARIA GENERAL

LA SUSCRITA SECRETARIA DEL H. TRIBUNAL SUPERIOR DEL DISTRITO JUDICIAL
DE SANTAFE DE BOGOTA,

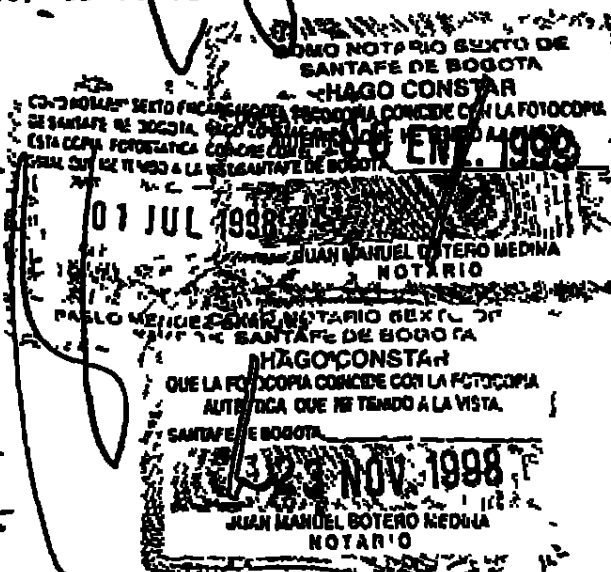
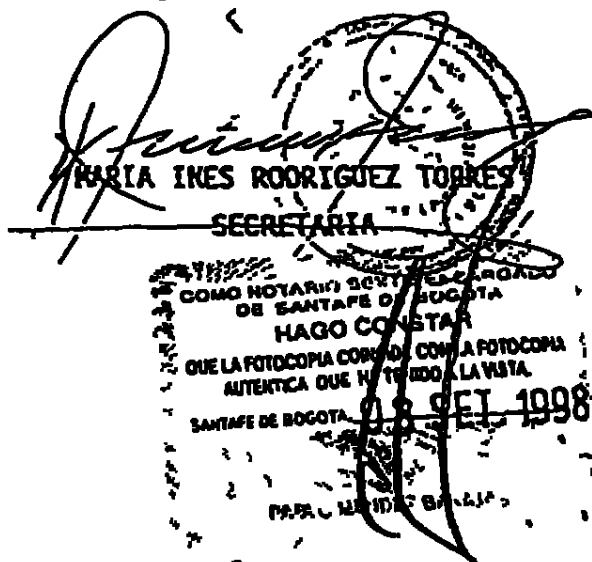


CERTIFICA

Que el Acuerdo No. 183 de diciembre 3 de 1982 emanado de esta Corporación, por medio del cual dió posesión al señor GABRIEL RUEDA CHADID, identificado con Cédula de Ciudadanía número 17 124.145 de Bogotá como TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL de los idiomas INGLES ESPAÑOL-ESPAÑOL-INGLES, en virtud de la Resolución No. 5996, de la Corporación, se acuerda que sea VIGENTE.



expide en Santafé de Bogotá D C , a dieciseis (16) de noviembre de mil novecientos noventa y cuatro (1994).



crm /

75
73

Pharmacia & Upjohn Company. 28341/6278

REF: LLC-139-2000 La presente es Traducción Oficial de un documento presentado originalmente en inglés Esta traducción es elaborada por Gabriel Rueda Chadid (Traductor Oficial)

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A TODOS AQUELLOS QUE LLEGAREN A LEER EL CONTENIDO DEL
PRESENTE DOCUMENTO LES CERTIFICAMOS:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Diciembre 05, 2000

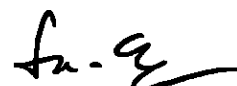
Se certifica que anexo se encuentra fiel copia de los Registros de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos correspondientes a los documentos de la patente solicitada y cuya identificación aparece más adelante, la cual cumplió con los requerimientos exigidos para que se otorgue una fecha de presentación de acuerdo con los dispuesto en la Sección 35 USC 111

Número de Solicitud: 60/172 032 ✓
Fecha de presentación: Diciembre 23, 1999 ✓

Por autorización del
COMISIONADO DE MARCAS REGISTRADAS Y PATENTES

L. EDELEN

Funcionario Encargado de Certificaciones (Hay firma y sello)


GABRIEL RUEDA CHADID
TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 5994 DE NOV 29-92
MINISTERIO DE JUSTICIA

26
74

SOLICITUD PROVISIONAL DE PATENTE
OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
Expediente No 28341/6278
TRANSMISION DE SOLICITUD PROVISIONAL DE PATENTES

Box Provisional Patent Applications
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D C , 20231

Apreciados Señores

Les adjuntamos para sus archivos la solicitud provisional de patente según lo ordena el numeral 37 CFR 1 53(c) de

Inventores: Kai S Lee, Xiao-Dong Sun, Bruce M Taylor, Dennis E Epps, Allen E Buhl

Residencias: Portage, Michigan, Portage, Michigan, Kalamazoo, Michigan, Kalamazoo, Michigan, Portage, Michigan

Título: Ensayos y Métodos de Diagnóstico y Tratamiento con Base en el Uso de Canales de Sodio como Blancos para Amiloide β o sus Agregados

- 1. Documentos de Solicitud que se Adjuntan**
- 1 Página Título**
- 39 Páginas de Especificaciones (excluyendo las Reivindicaciones, Resúmenes y Dibujos)**
- 4 Páginas de Reivindicaciones**
- 1 Página de Resumen**
- 13 Hojas de Dibujos de Información (Figs. 1A-C hasta 13)**

77
75

CERTIFICACION SEGUN EL NUMERAL 37 CFR 1.10

Certifico que la presente transmisión de Solicitud Provisional de Patente y los documentos a los cuales se les hace referencia y que se adjuntan se depositan en el Servicio Postal de los Estados Unidos en Diciembre 23 de 1999 en sobre dirigido al Assistant Commissioner for Patents, Washington, D C 20231 utilizando el servicio de "Oficina de Correo Expreso al Destinatario" del Servicio Postal de los Estados Unidos según Etiqueta de Correos No EM578442296US

(Hay firma)

2. Documentos Adicionales Adjuntos

3. Calculo de Derechos de Presentación (37 CFR 1.16)

[X] Solicitud Provisional (\$75 00/\$150 00)

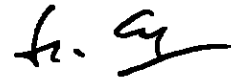
Derechos de Presentación	\$150 00
--------------------------	----------

4. Forma de Pagos de Derechos

[X] Se adjunta cheque por la suma de \$150.00

5. Depósito en Cuenta y Autorización de Reembolso

El Comisionado queda autorizado para cobrar los faltantes de las sumas adjuntas o los derechos adicionales que puedan ser requeridos durante la duración de esta solicitud según lo dispone el numeral 37 CFR 1.16 o 37 CFR 1 17 o de acuerdo con las demás normas pertinentes (exceptuando el pago de derechos de expedición, en la Cuenta No. 13-2855 Se adjunta copia de esta operación



78
76

Favor reembolsar cualquier exceso de pago a Marshall,
O'Toole, Gerstein, Murray & Borun a la dirección siguiente

Favor dirigir todas las comunicaciones futuras a Audrey L
Bartnicki, a la siguiente dirección

Atentamente,

MARSHALL, O'TOOLE, GERSTEIN,

MURRAY & CORUN

6300 Sears Tower

233 South Wacker Drive

Chicago, Illinois 60606-8402

(312) 474-6300

Por y en representación de Firmado

Audrey L Bartnicki

Registro No 40 499

Diciembre 23, 1999

fr ay

GABRIEL RUEDA CHADID
TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 5996 DE NOV 29-82
MINISTERIO DE JUSTICIA

INVENTORES CONJUNTOS

Expediente N . 28341/6278

SOLICITUD PROVISIONAL PARA CARTAS PATENTE
DE LOS ESTADOS UNIDOS

ESPECIFICACION

A QUIEN INTERESE:

Se certifica que los abajo firmantes Kai S Lee, ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en Portage, Estado de Michigan, Xiao-Dong Sun ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en Portage, Estado de Michigan, Bruce M Taylor, ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en Kalamazoo, Estado de Michigan, Dennis E Epps, ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en Kalamazoo, Estado de Michigan, y Allen E Buhl, ciudadano de los Estados Unidos de América, residente en Portage, Estado de Michigan, hemos desarrollado un nuevo y útil trabajo de ENSAYOS Y METODOS DE DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CON BASE EN EL USO DE CANALES DE SODIO COMO BLANCOS PARA AMILOIDE S O SUS AGREGADOS, por lo cual se presenta la respectiva especificación

Representantes legales de los Solicitantes

Audrey L Bartnicki (Reg No 40 499)

Marshall, O'Toole, Gerstein,

Murray & Borun

6300 Sears Tower

233 South Wacker Drive

Chicago, Illinois 60606-6402

78-1

REIVINDICACIONES

1 Un método para identificar compuestos que modulan la interacción de amiloides β o sus agregados con un canal de sodio donde dicho método comprende

(a) la obtención de una célula neuronal que comprende un canal de sodio,

(b) la puesta en contacto de dicho canal de sodio con amiloide β o sus agregados, en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y

(c) determinación de la actividad del mencionado canal de sodio en presencia del mencionado compuesto de prueba comparando con la ausencia, donde un compuesto de prueba que ejerce actividad se considera como un modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con el mencionado canal de sodio

2 El método de la reivindicación 1, donde la actividad antes señalada está determinada por un método seleccionado a partir del grupo conformado por el examen de potencial de la membrana en reposo, examen del potencial de acción y medición de la corriente de sodio que penetra con rapidez

3 Un método para tamizar compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio, donde dicho método comprende

(a) la obtención de una célula neuronal que produce

h. ay

81
79

amiloide β o sus agregados, donde dicha célula comprende un canal de sodio,

(b) el contacto del mencionado canal de sodio con compuesto de prueba, y

(c) la determinación de la actividad del mencionado canal de sodio en presencia del señalado compuesto de prueba en comparación con la ausencia, donde un compuesto de prueba que ejerce actividad se considera como un modulador de la interacción del amiloide β o sus agregados con el ya señalado canal de sodio

4 El método de la reivindicación 3, donde la mencionada actividad está determinada por un método que se selecciona del grupo conformado por el examen de potencial de membrana en reposo, examen del potencial de acción y medición de la corriente de sodio e ingresa rápidamente

5 Un método para identificar los compuestos que modulan la interacción del amiloide β o sus agregados con un canal de sodio, donde dicho método comprende

(a) la obtención de una composición que comprende un canal de sodio purificado,

(b) el contacto de dicho canal de sodio con el amiloide β o sus agregados en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y

(c) la determinación de la actividad del mencionado canal de sodio en presencia del mencionado compuesto de prueba en comparación con su ausencia, donde un compuesto de prueba que ejerce actividad se considera como un modulador de

la interacción del amiloide β o sus agregados con el mencionado canal de sodio

6 El método de la reivindicación 5, donde dicha actividad está determinada por un método que se selecciona a partir del grupo conformado por el examen de potencial de membrana en reposo con el examen de potencial de acción y la medición de la corriente de sodio de rápido ingreso

7 Un método para diagnosticar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero del cual se sospecha tiene dicha enfermedad, donde este método comprende el paso de medir la actividad de un canal de sodio en una célula neuronal del mencionado mamífero, donde la actividad reducida del mencionado canal de sodio se correlaciona con la existencia de un estado de enfermedad de Alzheimer

8 El método de la reivindicación 7, donde dicha actividad es determinada por un método que se selecciona a partir del grupo conformado por el examen de potencial de membrana en reposo, el examen de potencial de acción y la medición de la corriente de sodio de rápido ingreso

9 El método de la reivindicación 7, que comprende además un paso de medir el amiloide β en la mencionada célula o en fluido extracelular proveniente del mencionado mamífero, que hace contacto con la célula, donde la presencia del amiloide β en la mencionada célula o fluido y la presencia de la actividad reducida del canal de sodio se correlacionan con la existencia de un estado de enfermedad de Alzheimer

10 El método de la reivindicación 9 donde el fluido es líquido cefalorraquídeo

11 El método de la reivindicación 7 donde la mencionada célula se ha aislado del mamífero antes mencionado

12. Un método de tamización de un mamífero para establecer su susceptibilidad a la enfermedad de Alzheimer, que comprende los siguientes pasos

(a) aislar un célula neuronal del mencionado mamífero, donde la mencionada célula neuronal comprende un canal de sodio, y

(b) medir la actividad del mencionado canal de sodio en ausencia y en presencia de la proteína amiloide β ,

donde la actividad reducida del mencionado canal de sodio en presencia del amiloide β en comparación con la ausencia se correlacionan con una susceptibilidad de desarrollar la enfermedad de Alzheimer

13 Un método para diagnosticar la enfermedad prion en un mamífero del cual se sospecha tiene dicha enfermedad, donde este método comprende el paso de medir la actividad de un canal de sodio en una célula neuronal de dicho mamífero, donde la actividad reducida del mencionado canal de sodio se correlaciona con la existencia de un estado de enfermedad prion.

14 El método de la reivindicación 13, donde dicha actividad es determinada por un método que se selecciona a partir del grupo conformado por el examen del potencial de membrana en reposo, examen de potencial de acción y medición de la corriente de sodio de rápido ingreso

15 Un método para prevenir, tratar o reversar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, donde este método comprende la puesta en contacto de un canal de sodio del mencionado mamífero con un compuesto que proteja dicho canal de sodio de una reducción de su actividad debido al amiloide β o sus agregados

16 El método de la reivindicación 15, donde la mencionada actividad está determinada por un método que se selecciona a partir del grupo conformado por el examen del potencial de membrana de reposo, examen de potencial de acción y medición de la corriente de sodio de rápido ingreso

17 Un método para prevenir, tratar o reversar la enfermedad prion en un mamífero, donde dicho método comprende la puesta en contacto de un canal de sodio de dicho mamífero con un compuesto que proteja dicho canal de sodio de la reducción de su actividad debido al amiloide β o sus agregados

18 El método de la reivindicación 17, donde la mencionada actividad está determinada por un método seleccionado del grupo conformado por potencial de membrana de reposo, examen del potencial de acción y medición de la

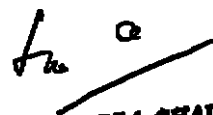
corriente de sodio de rápido ingreso

(19) Un método para prevenir, tratar o reversar la enfermedad de Alzheimer en un mamífero, donde dicho método comprende la puesta en contacto de un canal de sodio de dicho mamífero con un compuesto que abra el mencionado canal de sodio

(20) Un método para prevenir, tratar o reversar la enfermedad prion en un mamífero, donde dicho método comprend la puesta en contacto de un canal de sodio de dicho mamífero con un compuesto que abre el ya mencionado canal de sodio

La anterior es Traducción Oficial de un documento presentado originalmente en inglés Esta traducción fue realizada por GABRIEL RUEDA CHADID (Traductor Oficial) Resolución 5996 del Minjusticia, por lo cual estampo mi Sello y Firmo

Bogotá D C , Diciembre 20 del 2000


GABRIEL RUEDA CHADID
TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 5996 DE NOV 29-00
MINISTERIO DE JUSTICIA

FOUR LI ORKDA

DIACHO & 086
Pharmacia
28341/6278
84

PA 337864

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

December 05, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER. 60/172,032

FILING DATE December 23, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

L. Edelen

L. EDELEN
Certifying Officer

85

12/23/99
1-500 U.S. PTO

PROVISIONAL PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Docket No 28341/6278

PROVISIONAL PATENT APPLICATION TRANSMITTAL

1-500 U.S. PTO
60/172032
12/23/99

**Box Provisional Patent Application
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231**

Sir

Transmitted herewith for filing is the provisional patent application under 37 CFR 1.53(e) of

Inventor(s): Kai S. Lee; Xiao-Dong Sun; Bruce M. Taylor Dennis E. Epps; Allen E. Buhi

Residence(s): Portage, Michigan, Portage, Michigan; Kalamazoo, Michigan; Kalamazoo, Michigan, Portage, Michigan

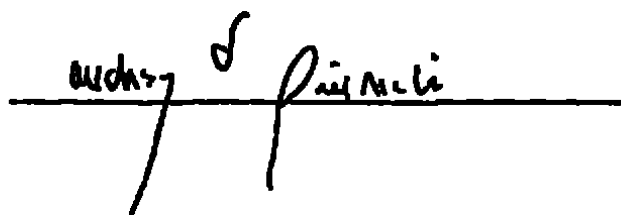
Title: Assays and Methods of Diagnosis and Treatment Based on Use of Sodium Channels As Targets for Amyloid β or its Aggregates

1 Application Papers Enclosed

- 1 Title Page
- 39 Pages of Specification (excluding Claims, Abstract & Drawings)
- 4 Page(s) of Claims
- 1 Page(s) of Abstract
- 13 Sheet(s) of Informal Drawings (Figs. 1A-C to 13)

CERTIFICATION UNDER 37 CFR 1.10

I hereby certify that this Provisional Patent Application Transmittal and the documents referred to as enclosed therewith are being deposited with the United States Postal Service on December 23, 1999, in an envelope addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231 utilizing the "Express Mail Post Office to Addressee" service of the United States Postal Service under Mailing Label No. EM578442298US.



60172032-122399

98
86

66E22T-2E02709

2. Additional Papers Enclosed

- ☐ Declaration of Biological Deposit
- ☐ Computer readable copy of sequence listing containing nucleotide and/or amino acid sequence
- ☐ Microfiche computer program
- ☐ Verified statement(s) claiming small entity status under 37 CFR 1.9 and 1.27
- ☐ Associate power of attorney
- ☐ Verified translation of a non-English patent application
- ☐ An assignment of the invention
- ☐ Return Receipt Postcard
- ☐ Other (e.g. declaration or oath)

3. Filing Fee Calculation (37 CFR 1.16)

- | | | |
|--|-------------|----------|
| ☒ Provisional Application (\$75.00/\$150.00) | Filing Fee | \$150.00 |
| ☐ Other Fees (e.g. Recording Assignment) | Filing Fee: | \$_____ |
| Total Fees Enclosed | | \$150.00 |

4. Method of Payment of Fees

- ☒ Enclosed is our firm check in the amount of \$150.00
- ☐ Charge Deposit Account No. 13-2855 in the amount of \$_____
A copy of this Transmittal is enclosed
- ☐ Not enclosed

5. Deposit Account and Refund Authorization

The Commissioner is hereby authorized to charge any deficiency in the amount enclosed or any additional fees which may be required during the pendency of this application under 37 CFR 1.16 or 37 CFR 1.17 or under other applicable rules (except payment of issue fees), to Deposit Account No. 13-2855. A copy of this Transmittal is enclosed.

Please refund any overpayment to Marshall, O'Toole, Garstein, Murray & Borun at the address below

87

Please direct all future communications to Audrey L. Bartnicki at the address below

Respectfully submitted,

MARSHALL, O'TOOLE, GERSTEIN
MURRAY & BORUN
6300 Sears Tower
233 South Wacker Drive
Chicago, Illinois 60606-6402
(312) 474-6300

By Audrey L. Bartnicki
Audrey L. Bartnicki
Reg No: 40499

December 23, 1999

410728

666221-2602709

JOINT INVENTORS

Attorney Docket No. 28341/8278

**"EXPRESS MAIL, mailing label No. EM57844228US.
Date of Deposit: December 23, 1999
I hereby certify that this paper (or fee) is being deposited with the
United States Postal Service "EXPRESS MAIL POST OFFICE
TO ADDRESSEE" service under 37 CFR §1.10 on the date
indicated above and is addressed to: Assistant Commissioner for
Patents, Washington, D.C. 20231**

Audrey L. Bartnicki

**PROVISIONAL APPLICATION FOR
UNITED STATES LETTERS PATENT**

SPECIFICATION

TO ALL WHOM IT MAY CONCERN

**Be It known that we, Kai S. Lee, a citizen of the United States of
America, residing in Portage, in the State of Michigan, and Xiao-Dong Sun, a
citizen of the United States of America, residing in Portage, in the State of
Michigan, and Bruce M Taylor, a citizen of the United States of America,
residing in Kalamazoo, in the State of Michigan, and Dennis E Eppe, a citizen
of the United States of America, residing in Kalamazoo, in the State of
Michigan, and Allen E. Buhl, a citizen of the United States of America, residing
in Portage, in the State of Michigan, have invented a new and useful ASSAYS
AND METHODS OF DIAGNOSIS AND TREATMENT BASED ON USE OF
SODIUM CHANNELS AS TARGETS FOR AMYLOID β OR ITS AGGREGATES, of
which the following is a specification**

Attorneys for Applicants:

**Audrey L. Bartnicki (Reg. No. 40,499)
Marshall, O'Toole, Gerstein,
Murray & Borun
6300 Sears Tower
233 South Wacker Drive
Chicago, Illinois 60606-8402**

60172032-122399

**Assays and Methods of Diagnosis and Treatment Based on Use of Sodium
Channels As Targets for Amyloid β or its Aggregates**

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention provides, among other things, assays and methods of
diagnosis and treatment that are based on the surprising observation of an interaction
between amyloid β or its aggregates with sodium channels. In particular, the present
invention provides methods to identify compounds that modulate this interaction, and
methods of diagnosis and treatment that are based on this interaction.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Certain neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Down's
syndrome are characterized by the presence of insoluble aggregates of amyloid β (A β).
This 39-43 amino acid peptide is derived by abnormal proteolysis from the Amyloid
Precursor Protein (APP). It is well known that the amyloid β aggregates/plaques widely
15 found in the brain and intraneuronal neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease
patients can modulate neurite outgrowth, synaptogenesis, synaptic plasticity or cause
neuronal death (Mattson et al, *Trends Neurosci.*, 16, 406-415 (1993)). The mechanism(s)
by which these effects are accomplished remain elusive, however (Fraser et al, *Trends*
20 *Neurosci.*, 20, 67-72 (1997)).

 Presently, one theory maintains that these deleterious effects may originate from
amyloid β 's ability to promote chronic calcium influx into neurons through modulation
of neuronal calcium ion channels (Dudson et al., *Brain Res.*, 643, 324-327 (1994)), or
to form transmembrane cation-permeable channels (Kawahara et al., *Biophysiol. J.*, 73,
25 67-75 (1997)) that indiscriminately allow calcium, sodium, and other cations to flood a
cell's interior and destroy its calcium homeostasis. Calcium channel blockers such as
nimodipine that can cross the blood-brain barrier have been shown to slow the
progression of Alzheimer's disease in some patients (Tollefson, *Biol. Psychiatry*, 27,
1133-1142 (1990)). Similarly, zinc cation, which is known to bind at specific amyloid
30 β 1-40 sites (Bush et al, *Science*, 265, 1464-1467 (1994)), can block the calcium influx

through amyloid β 1-40 channels (Arispe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 1710-1715 (1996)).

In addition, amyloid β aggregates have been shown to induce abnormal potassium ion channel activity. In cultured hippocampal neurons, amyloid β opens a calcium-sensitive, large conductance potassium channel (i.e., ibertoxin-sensitive BK) (Furukawa et al., *Nature*, 379, 74-78 (1996)), which could lead to chronic loss of cytoplasmic potassium and destroy the ability of the neurons to generate and propagate action potentials critical for brain signaling functions. Such aberrant potassium channel activity has in fact been noted in Alzheimer's disease patients (Etcheberry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8209-8213 (1993)). Likewise, in the cultured cholinergic septal cell line SNS6, amyloid β (e.g., amyloid β 1-40) causes cell death by impacting a TEA-sensitive potassium channel (Colom et al., *J. Neurochemistry*, 70, 1925-1934 (1998)).

These studies suggest that amyloid β aggregates exert their effects through multiple targets. None of the targets that have been described, however, would result in the rapid and complete inhibition of neuronal electrical impulses critical for brain function that is observed with advanced stage Alzheimer's disease. Furthermore, the ion channel studies described above were performed on cultured neurons, whose properties may have been changed significantly through dedifferentiation in culture conditions. Therefore, the data currently available likely does not represent the true response of native neurons.

Recent genetic studies have shown that mutations in the amyloid protein precursor and presenilin genes affect the processing and production of amyloid β and thus are related to age of onset and susceptibility to Alzheimer's disease. Additional studies have shown that variants in ApoE genes also affect susceptibility and age of onset for Alzheimer's disease. Spontaneous Alzheimer's disease is hypothesized to be under the control of other genes and environmental factors that have yet to be identified.

Additionally, inhibition of amyloid β aggregation, and hence toxicity, is believed to be beneficial therapeutically in the treatment of Alzheimer's disease. Several reports have appeared providing evidence that small, diffusible aggregates (Lambert et al., *Proc.*

Natl. Acad. Sci., 95, 6448-6453 (1998); PCT International Application WO 98/33815), and protofibrils (Harper et al., *Chem. Biol.*, 4, 119-125 (1997), Harper et al., *Chem. Biol.*, 4, 951-959 (1997), Walsh et al., *J. Biol. Chem.*, 272, 22364-22374 (1997)), and not the completely fibrillar peptide, might be the A β species toxic to living cells. The physical differences in the alleged toxic species identified by these different research groups "supports the concept that different A β assemblies have distinct neurobiological activities, which may be manifested differently using an electrophysiological readout" (Hartley et al., *J. Neuroscience*, 19, 8876-8884 (1999)). Thus, the etiology of Alzheimer's disease may be quite complex, and may warrant a variety of different avenues of diagnosis and treatment.

Along these lines, U.S. Patent 5,876,948 describes screening methods to identify inhibitors of the neurotoxic effect of amyloid β . In particular, the '948 patent purportedly provides a method of screening candidate compounds, wherein the method comprises obtaining a cell such as a primary neuron, a neuronal cell, or a cell developmentally derived from neuronal tissue. The cell is contacted with a candidate compound in the presence of a neurotoxin selected from the group consisting of amyloid β 1-38, β 1-40, β 1-43, and β 29-35, and it is determined whether the compound reduces the effect of the neurotoxin (e.g., reduces cell death), or reduces accumulation of amyloid β on the cell surface. Accordingly, this patent provides no information on how to screen for compounds that target cell events that precede cell death, apart from accumulation of the peptide on the cell surface. A need thus remains for useful assays to screen for compounds that exert protective effects at a stage prior to cell death mediated by amyloid β , and for compounds that exert their effect apart from interference with amyloid β deposition on the cell surface. Furthermore, the '948 patent does not appear to consider any effect of the aggregation state of amyloid β on neurotoxicity. A related patent, U.S. Patent 5,137,873, claims a method for treating a disease that is characterized by accumulation of amyloid β , which comprises administration of a therapeutically effective amount of a tachykinin agonist such as substance P.

U.S. Patent 5,892,018 pertains to DNA sequences encoding a novel subfamily of amiloride-sensitive sodium channel proteins from the human central nervous system.

PCT International Application WO 98/54316 describes a new class of sodium channel protein that may function as a sodium channel receptor. Both the '018 patent and the '316 application suggest that ion channels may play some role in the pathogenesis or treatment of Alzheimer's disease (see, '316 application, pages 1 and 15, see, '018 patent, column 1, lines 50-54). However, neither document presents any assay for diagnosis of

5 Alzheimer's disease, much less any methods for its treatment.

Thus, there remains a need for further understanding of the functioning of amyloid β or its aggregates, and means to diagnose, predict, prevent and treat diseases, disorders, and conditions that result from amyloid β or its aggregates. These and other

10 objects and advantages of the present invention, as well as additional inventive features, will be apparent from the description of the invention provided herein.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a surprising observation of an interaction between

15 amyloid β or its aggregates with sodium channels. Based on this novel and unexpected interaction, the present invention provides a method for identifying compounds that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with a sodium channel, wherein the method preferably comprises contacting a cell which comprises a sodium channel with amyloid β or its aggregates in the presence and in the absence of a test compound, and then determining whether there is any impact on the sodium channel in the presence

20 of the test compound as compared with in the absence, with a compound that exhibits an impact being considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with said sodium channel. In preferred embodiments, impact on the sodium channel is assessed by either examining resting membrane potential, action potential, or measuring the fast inward sodium current.

The invention also provides a method for diagnosing Alzheimer's disease (or prion disease) in a mammal suspected of having Alzheimer's disease (or prion disease), the method comprising the step of measuring the activity of a sodium channel in a neuronal cell of the mammal, wherein reduced activity of the sodium channel is

25 correlated with the existence of an Alzheimer's disease state (or a prion disease state).

30

The invention further provides a method of screening a mammal for susceptibility to Alzheimer's disease, comprising the steps of

(a) isolating a neuronal cell from the mammal, the neuronal cell comprising a sodium channel, and

5 (b) measuring activity of the sodium channel in the absence and in the presence of amyloid β protein,

wherein reduced activity of the sodium channel in the presence of amyloid β as compared to in the absence is correlated with a susceptibility to developing Alzheimer's disease.

10 Additionally, the invention provides a method for preventing, treating, or reversing diseases such as Alzheimer's disease and prion disease in a mammal, wherein the method preferably comprises contacting a sodium channel of the mammal with a compound that protects the sodium channel from a negative impact of amyloid β or its aggregates. This method optionally is carried out with use of a compound that opens the sodium channel.

15 Furthermore, the invention provides for the use of a compound that modulates the interaction of amyloid β or its aggregates with neuronal sodium channels for the manufacture of a medicament for the treatment of a neurological disorder (e.g., Alzheimer's disease).

20 Additional features and variations of the invention will be apparent to those skilled in the art from the entirety of this application, including the detailed description, and all such features are intended as aspects of the invention. Likewise, features of the invention described herein can be recombined into additional embodiments that also are intended as aspects of the invention, irrespective of whether the combination of features is specifically mentioned above as an aspect or embodiment of the invention. Also, only such limitations which are described herein as critical to the invention should be viewed as such, variations of the invention lacking limitations which have not been described herein as critical are intended as aspects of the invention.

25 In addition to the foregoing, the invention includes, as an additional aspect, all embodiments of the invention narrower in scope in any way than the variations

30

60172032-122399

specifically mentioned above. Although the applicant(s) invented the full scope of the claims appended hereto, the claims appended hereto are not intended to encompass within their scope the prior art work of others. Therefore, in the event that statutory prior art within the scope of a claim is brought to the attention of the applicants by a Patent Office or other entity or individual, the applicant(s) reserve the right to exercise amendment rights under applicable patent laws to redefine the subject matter of such a claim to specifically exclude such statutory prior art or obvious variations of prior art from the scope of such a claim. Variations of the invention defined by such amended claims also are intended as aspects of the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figures 1A-C are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show changes of an action potential recorded from a single cortical neuron. (A) in the absence of amyloid β 1-40 peptide; (B) in the presence of 11.5 μ M amyloid β 1-40 peptide; or (C) following washing of the neuron with peptide-free solution.

Figures 2A-C are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show changes of an action potential recorded from a single hippocampal neuron. (A) in the absence of amyloid β 1-40 peptide; (B) in the presence of 11.5 μ M amyloid β 1-40 peptide; or (C) following washing of the neuron with peptide-free solution.

Figures 3A-C are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show the progressive reduction in a fast inward sodium current of a hippocampal neuron elicited by step potential change from -80 mV (millivolt) to -30 mV in the absence of amyloid β 1-40 (Figure 3A), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 3B), and in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation. The arrow indicates the direction of progressive current depression by the peptide.

Figure 4 is a graph which shows the progressive change of peak amplitude of inward sodium current (I_{Na}) measured in pico ampere (pA) (Y-axis) with time (second) (X-axis), in the absence of amyloid β 1-40 (open circles), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes of shake-induced amyloid β aggregation

(solid circles), and in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation (solid squares). The readings were from the same experiment as in Figure 3A-C.

Figures 5A-D are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show the effect of amyloid β 1-40 on the fast inward sodium current of a hippocampal neuron over a broad range of membrane potentials ranging from about -50 to +20 mV, with each panel showing eight fast inward sodium current traces superimposed on the same time frame elicited by step potential changes from a holding potential of -80 mV to -50 mV, then in 10 mV increments, to +20 mV in the absence of amyloid β 1-40 (Figure 5A), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 5B), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 5C), and following wash out of the peptide (Figure 5D).

Figure 6 is a graph which shows peak amplitude of fast inward sodium current in pA (Y-axis) over a broad range of membrane potential in mV (X-axis) in the absence of amyloid β 1-40 (open circles), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes shake-induced amyloid β aggregation (solid circles), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation (open squares), and following wash out of the peptide (solid squares). The readings were from the same experiment as in Figures 5A-D

Figures 7A-C are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show superimposed sodium current traces of a hippocampal neuron elicited from a holding potential of -80 mV to -70 mV, and then at 10 mV increments to +10 mV, and obtained in the absence of the specific fast inward sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) (Figure 7A), in the presence of 1 μ M TTX (Figure 7B), and in washing out of TTX (Figure 7C).

Figure 8 is a graph which shows peak amplitude of fast inward sodium current in pA (Y-axis) over a broad range of membrane potential in mV (X-axis) in the absence of TTX (open circles), in the presence of 1 μ M TTX (solid circles), and following wash

out of TTX (solid squares). The readings were from the same experiment as in Figures 7A-C

Figures 9A-B are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show a single calcium current elicited in isolated hippocampal neurons from a holding potential of -40 mV to +10 mV, in the absence of amyloid β 1-40 (Figure 9A), and in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 peptide following about 70 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 9B).

Figure 10 is a graph which shows peak calcium current (I_{Ca}) amplitude in pA (Y-axis) over time in seconds (sec) (X-axis) in the absence of amyloid β (open circles), and in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 70 minutes shake-induced amyloid β aggregation (solid circles). The readings were from the same experiment as in Figures 9A-B.

Figures 11A-D are recordings taken from an Axopatch 200 Amplifier which show potassium currents elicited by a step potential from a holding potential of -40 mV to +10 mV, in 10 mV increments in the absence of amyloid β 1-40 (Figure 11A), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 11B), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation (Figure 11C), and following wash out of the peptide (Figure 11D)

Figure 12 is a graph which shows peak amplitude of potassium currents in nanoampere (nA) (Y-axis) over a broad range of membrane potential in mV (X-axis) in the absence of amyloid β 1-40 (solid line), in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 90 minutes shake-induced amyloid β aggregation (cross-hatched line), and in the presence of 50 μ M amyloid β 1-40 following about 120 minutes shake-induced amyloid β aggregation (dotted line). The readings were from the same experiments as in Figure 11A-D

Figure 13 is a graph which shows amyloid β toxicity on sodium channel (Y-axis, % decrease in I_{Na}) at different time points (X-axis, in minutes) of aggregation. The peak toxicity appears at about 60-80 minutes of shake-induced aggregation of the 50 μ M

एन०३६१७८२ - एन०३९४

1. **What is the purpose of the study?**

5

10

20

25

30

Furthermore, "amyloid β " includes any amino acid substitutions in the foregoing sequences that result in a modified peptide/protein having aggregation properties similar to the native peptide/protein. In particular, amyloid β is a protein (or peptide) comprising residues 1-38, 1-40, 1-43 or 29-35 of APP, as set forth in U.S. Patent 5,876,948, and which can be produced by recombinant or synthetic means.

Amyloid β can be purchased from a variety of commercial suppliers including but not limited to Polypeptide Laboratories (Torrance, CA, Catalog number P-0036) and Bachem Biochemica (Heidelberg, Germany). A β also can be produced by a cell naturally, produced by a cell using recombinant means, employed in its polypeptide form (either pre-aggregated or not) to contact a sodium channel, or employed as part of a composition (e.g., including micelles) to contact a sodium channel. All these various permutations, as well as additional variations that would be obvious to one skilled in the art, are encompassed by the subject invention.

"Aggregates" of amyloid β include any higher order structure formed by an association of more than one A β monomer with an ability to inhibit the fast inward sodium current (I_{Na}), and especially include a tetramer of amyloid β (i.e., a higher order structure formed by the association of four amyloid β monomers).

Aggregation of amyloid β preferably is done in an appropriate buffer. If the aggregated amyloid β subsequently is not to be used with cells, then the buffer desirably comprises about 10 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4, or another similar buffer. If the amyloid β subsequently is to be used with cells (e.g., whole cells, isolated cells, or other), then the buffer employed for aggregation desirably comprises the same tissue culture medium in which the cells are aggregated (e.g., Hank's balanced salt solution). Aggregation desirably is carried out by shaking the mixture of amyloid β in buffer (e.g., desirably at a rate of from about 700 to 800 rpm). Optimally, aggregation is carried out for various times, particularly as described in the Examples. Desirably, aggregation is monitored, e.g., by measuring light scattering at 405 nm. More detailed information on aggregation can be obtained from the Examples, as well as the reference of Findley et al., *Biochemistry*, 38, 6791-6800 (1999).

Furthermore, preferably prior to dissolution in the appropriate buffer, the amyloid β first preferably is treated in an appropriate fashion to obtain random coil monomer. This can be done, for instance, by treatment with hexafluoroisopropyl alcohol (HFIPA) (as described in the Examples which follow), or by acid treatment (as described in the Examples which follow, and in Findaus et al., *supra*)

Sodium Channels

The sodium channels for use in the invention include but are not limited to all native sodium channels in all tissues, especially in the nervous system, and most particularly in the brain and spinal cord, which are targets for $A\beta$ of various forms and at various stages of aggregation (i.e., which are sensitive at some level to the deleterious effects of $A\beta$ or its aggregates). Preferably a sodium channel is a fast inward sodium channel. A "fast inward sodium channel" is a large trans-membrane, voltage-sensitive protein that opens (i.e., provides a passage through the cell membrane, from a cell's exterior to its interior) in response to membrane depolarization. Once opened, the channel allows massive influx of sodium ion into the cell, for a few milliseconds only, to generate the action potential that is critical for conducting nerve impulses. Without opening of fast inward sodium channels, a neuronal network stays silent and becomes non-functional. The sodium channels that are contemplated for use in the invention include those known in the art as "voltage-gated", "non-voltage-gated", and "exchangers". The current measured at a fast inward sodium channel is the fast inward sodium current.

All tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-insensitive sodium channels from tissue sources stated above are the key targets for amyloid β of various forms and at various stages of aggregation. However, in preferred embodiments, the invention is practiced using sodium channels that are TTX-sensitive.

The sodium channels useful for practice of the invention further include non-native sodium channels (e.g., those obtained by recombinant means, such as molecularly cloned sodium channels, including those cloned from all tissues, particularly from the central nervous system, and especially from brain) as targets for amyloid β of various

forms and at various stages of aggregation. Non-native sodium channels useful for conducting assays of the invention are sensitive at some level to the deleterious effects of amyloid β or its aggregates. However, non-native sodium channels that are not sensitive to the deleterious effects of amyloid β or its aggregates are useful for determining those regions at which amyloid β interacts with the channel (e.g., by comparing the structure of the non-native channel with that of the native channel). Such non-native sodium channels include but are not limited to those described in U S Patent 5,892,018, and PCT International Application WO 98/54316

Thus, the deleterious activity of amyloid β or its aggregates can be studied and modulated by introducing into cells expression vectors that result in production of high levels of a sodium channel. Along these lines, the invention further provides methods of using purified sodium channels (or portions thereof) and genetically engineered host cells that express recombinant sodium channels to evaluate and screen for modulators of the interaction between amyloid β peptide and the sodium channel.

Assay for Modulators of the Interaction of Amyloid β or its Aggregates with the Sodium Channel

The present invention provides methods of screening for putative modulators using any of a variety of drug screening techniques. Such modulators will provide the basis for pharmaceutical compositions for the treatment and amelioration of symptoms associated with the activity of amyloid β or its aggregates.

Modulators of the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel include modulators that facilitate (i.e., increase the effectiveness of, or make happen more readily) the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel, and compounds that impair (i.e., decrease the effectiveness of, or make happen less readily) the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel. In the context of the present invention, compounds that impair the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel may find particular use in the prevention and/or treatment of Alzheimer's disease and prion disease, as well as other disorders, as further described herein.

According to the invention, modulators that impair the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel allow a reduction of no more than from 0% to about 20% in the fast inward sodium current when a sodium channel is contacted with amyloid β or its aggregates and the modulator (i.e., as compared to when a sodium channel is contacted with amyloid β or its aggregates in the absence of the modulator), or cause the reduction that occurs following such contacting to have a delayed onset and/or less prolonged duration (i.e., as compared to when a sodium channel is contacted with amyloid β or its aggregates in the absence of the modulator).

By comparison, modulators that facilitate the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel increase the reduction in the fast inward sodium current when a sodium channel is exposed to amyloid β or its aggregates by at least from about 10 to about 20% (i.e., as compared to when a sodium channel is exposed to amyloid β or its aggregates in the absence of the modulator), or cause the reduction that occurs following such exposure to have a more rapid onset and/or more prolonged duration (i.e., as compared to when a sodium channel is contacted with amyloid β or its aggregates in the absence of the modulator).

In one embodiment, the invention provides a method for identifying compounds that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with a sodium channel comprising:

- (a) obtaining a neuronal cell that comprises a sodium channel,
- (b) contacting the sodium channel with amyloid β or its aggregates in the presence and absence of a test compound, and
- (c) determining the activity of the sodium channel in the presence of the test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel.

According to the invention, a "cell" preferably is a primary neuron, a neuronal cell, or a cell that is developmentally derived from neuronal tissue. Preferably the cell is an avian cell, or a mammalian cell including but not limited to that of a rodent, primate (e.g., monkey, ape, gorilla, chimpanzee, gibbon, orangutan, and the like), feline, canine, . . .

ungulate (e.g., ruminant or swine), and particularly that of a human. Desirably the cell is of a mammalian (especially a human) species. A cell can be present as a single entity, or can be part of a larger collection of cells, such as, for instance, a cell culture, a tissue (e.g., neural tissue), an organ (e.g., brain or spinal cord), an organ system (e.g., central nervous system), or an organism (e.g., mammal).

The sodium channels employed in the assay methods of the invention may be free in solution, affixed to a solid support, present on a cell surface, or located in micelles or other structures. Additionally, as discussed above, the sodium channel (and/or amyloid β or its aggregates) can be provided to a cell by recombinant means (e.g., produced within the cell by virtue of recombinant DNA modifications of the cell). The amyloid β as applied for contacting the sodium channel optionally is in polypeptide form, and, as so supplied, can be either pre-aggregated for various lengths of time (e.g., as previously described and as set out in the Examples which follow), or can be employed for contacting in its monomer form.

In one variation, the method can be carried out by

- (a) obtaining a neuronal cell that produces amyloid β or its aggregates, said cell comprising a sodium channel,
- (b) contacting the cell with a test compound, and
- (c) determining the activity of the sodium channel in the presence of the test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel.

The method also optionally can be carried out by

- (a) obtaining a composition comprising a purified sodium channel,
- (b) contacting the sodium channel with amyloid β or its aggregates in the presence and absence of a test compound, and
- (c) determining the activity of the sodium channel in the presence of the test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel.

103
103

The assay methods described herein preferably are carried out wherein the activity of the sodium channel (and hence the impact on the sodium channel) in the presence of the test compound as compared with in the absence is determined or assessed by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, or measuring the fast inward sodium current. In comparison to the fast inward sodium current, there are slow inward sodium currents, but these play a minimal role in the generation of action potentials. In particular, reduction and/or abrogation of action potential can be assessed, as well as the relief of such reduction or blockage (e.g., by so-called "sodium channel openers", as described below). Likewise, reduction or blockage of the fast inward sodium current can be assessed, as well as the relief of such reduction or blockage (e.g., by so-called sodium channel "openers"). Such measurements can be done using methods known in the art, and described in the Examples that follow

The modulation of the effects of amyloid β or its aggregates on a sodium channel by an agent being tested (i.e., a "test compound") may be measured by means described herein, or other means known in the art, which are amenable to biochemical or cell-based high throughput screening (HTS) assays (e.g., melanophore assay systems to investigate receptor-ligand interactions, yeast-based assay systems, and potentially mammalian cell expression systems, and the like). For a review, see Jayawickreme and Kost, *Curr Opin Biotechnol.*, 8, 629-634 (1997). Automated and miniaturized HTS assays are also comprehended as described, for example, in Houston and Banks, *Curr Opin Biotechnol.*, 8, 734-740 (1997)

Such HTS assays are used to screen libraries of compounds to identify particular compounds that exhibit a desired ability to modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel. Any library of compounds may be used, including chemical libraries, natural product libraries, combinatorial libraries comprising random or designed oligopeptides, oligonucleotides, or other organic compounds.

Chemical libraries may contain known compounds, proprietary structural analogs of known compounds, or compounds that are identified from natural product screening.

50172033-172794

10/10/2010 10:10:10 AM 10/10/2010 10:10:10 AM 10/10/2010 10:10:10 AM

Natural product libraries are collections of materials isolated from natural sources, typically, microorganisms, animals, plants, or marine organisms. Natural products are isolated from their sources by fermentation of microorganisms followed by isolation and extraction of the fermentation broths or by direct extraction from the microorganisms or tissues (plants or animal) themselves. Natural product libraries include polyketides, non-ribosomal peptides, and variants (including non-naturally occurring variants) thereof. For a review, see Cane et al., *Science*, 282, 63-68 (1998).

Combinatorial libraries are composed of large numbers of related compounds, such as peptides, oligonucleotides, or other organic compounds as a mixture. Such compounds are relatively straightforward to design and prepare by traditional automated synthesis protocols, PCR, cloning or proprietary synthetic methods. Of particular interest are peptide and oligonucleotide combinatorial libraries.

Still other libraries of interest include peptide, protein, peptidomimetic, multiparallel synthetic collection, recombinatorial, and polypeptide libraries. For a review of combinatorial chemistry and libraries created thereby, see Myers, *Curr Opin Biotechnol.*, 8, 701-707 (1997).

Once compounds have been identified that show activity as modulators of the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel, a program of optimization can be undertaken in an effort to improve the potency and or selectivity of the activity, if so desired. This analysis of structure-activity relationships (SAR) typically involves an iterative series of selective modifications of compound structures and their correlation to biochemical or biological activity. Families of related compounds can be designed that all exhibit the desired activity, with certain members of the family potentially qualifying as therapeutic candidates.

Accordingly, the invention provides for the use of a compound that modulates the interaction of amyloid β or its aggregates with neuronal sodium channels for the manufacture of a medicament for the treatment of a neurological disorder (e.g., Alzheimer's disease). In particular, the present provides compounds that protect sodium channels from the inhibitory action of amyloid β of various forms and at various stages of aggregation.

The present invention further provides compounds that open sodium channels in the presence of amyloid β of various forms and at various stages of aggregation. Such compounds ("sodium channel openers") can be employed to impact all action potentials generated by sodium channels, as viable targets for amyloid β of various forms and at various stages of aggregation. Desirably according to the invention, a sodium channel opener also can be a compound that opens sodium channels in the absence of amyloid β of various forms and at various stages of aggregation. Examples of sodium channel openers include but are not limited to veratridine and DP1201. Veratridine and DP1201, however, change the gating mechanism of the channel allowing too much sodium in the cell, and thus while useful in a research context, may not prove as useful in the treatment of disease.

Similarly, these and other compounds according to the invention can be employed to impact all calcium and/or potassium channels as viable targets for amyloid of various forms and at various stages of aggregation.

Host Cell Expression Systems

As previously indicated, both the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β can be provided to cells in the form of their encoding nucleic acids, and thus produced by the neuronal cell, or can be introduced into a host cell in their polypeptide form. The term "polypeptide" as used herein shall include all peptides (e.g., portions of proteins) and proteins (i.e., having an amino and carboxyl terminus) whether recombinant, synthetic, or purified from natural sources.

Accordingly, host cells are provided, including prokaryotic or eukaryotic cells, either stably or transiently modified by introduction of a polynucleotide to permit expression of the encoded sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β , or stably or transiently modified by introduction of the sodium channel itself (or constituent components thereof) and/or amyloid β . While eukaryotic cells such as neuronal cells can be applied directly in the assays of the invention, other eukaryotic cells or prokaryotic cells may prove useful in other ways (e.g., for *in vitro* protein production, or for construction of other expression vectors appropriate for use in neuronal cells).

The form in which polynucleotides that encode the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β , and the sodium channel itself (or constituent components thereof) and/or amyloid β , are introduced into cells can be further described as a "construct". A "construct" is any form of molecule in which a polypeptide sequence (e.g., sodium channel or constituent components thereof and/or amyloid β) or its encoding polynucleotide sequence is joined to or forms part of a larger molecule. The connection between the polynucleotide and/or polypeptide sequence and its site of attachment in the molecule preferably can be by a noncovalent bond (e.g., as in antibody/antigen binding), or by a covalent bond.

Along these lines, a "construct" includes, but is not limited to a vector (e.g., having genetic incorporation of a polypeptide coding sequence into a polynucleotide vector), or a conjugate-type vector (e.g., wherein a coding sequence, polypeptide sequence, or other moiety is noncovalently associated with a vector), or other appropriate moiety that can be employed for effecting cell entry. As used herein a "vector" is a vehicle capable of effecting entry into a cell, e.g., particularly for gene transfer, and has the general meaning of that term as understood by those of skill in the art.

The invention accordingly contemplates expression constructs comprising polynucleotides that encode the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β operatively linked to an endogenous or exogenous expression control DNA sequence and a transcription terminator. Expression control DNA sequences include promoters, enhancers, and operators, and are generally selected based on the expression systems in which the expression construct is to be used. Preferred promoter and enhancer sequences are generally selected for the ability to increase gene expression, while operator sequences are generally selected for the ability to regulate gene expression. Preferred constructs of the invention also include sequences necessary for replication in a host cell. Expression constructs are preferably used for production of an encoded sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β .

Thus, polynucleotides of the invention may be introduced into the host cell desirably as part of a circular plasmid, or as linear DNA comprising an isolated protein coding region, contained on a viral vector, or by any other appropriate means. Methods

for introducing DNA in to a host cell include transformation, transfection, electroporation, nuclear injection, or fusion with carriers such as liposomes, micelles, ghost cells, and protoplasts, to name but a few

Any appropriate expression vector (e.g., as described in Pourwels et al, *Cloning Vectors A Laboratory Manual* (Elsevier, N Y 1985)) and corresponding suitable host can be employed for production of polypeptides/proteins for practice of the invention. Expression hosts include, but are not limited to, bacteria, yeast, fungal, mammalian, plant, and insect host cell systems including baculovirus systems (e.g., as described by Luckow et al., *BioTechnology*, 6, 47 (1988)) to name but a few, and established cell lines such as the COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa, BHK cell line, and the like. Preferably the host cell is a neuronal cell.

For introduction into cells (e.g., a neuronal cell), use of a construct that is capable of entering that cell is preferred (e.g., a herpes virus vector). Other viral vectors include, but are not limited to expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, or vaccinia virus. Alternately, the proteins can be delivered to target cells in liposomes.

Similarly, in the different hosts, the nature of the non-coding DNA upstream of the coding region of the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β polynucleotide sequences should be composed of transcription/translation signals appropriate for the host.

Host cells of the invention are useful in methods for large-scale production or use of sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β polypeptides. For example, recombinant sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β products can be produced and isolated from host cells for use in *in vitro* assays such as drug screening assays. In such methods, the host cells are grown in a suitable culture medium and the desired polypeptide product is isolated from the cells or from the medium in which the cells are grown.

The polypeptide product (e.g., sodium channel or A β) optionally can be isolated by purification methods known in the art, such as conventional chromatographic methods including immunoaffinity chromatography, receptor affinity chromatography, hydrophobic interaction chromatography, lectin affinity chromatography, size exclusion

filtration, cation or anion exchange chromatography high performance liquid chromatography (HPLC) reverse-phase HPLC, and the like.

Still other methods of purification include those in which the desired protein is expressed and purified as a fusion protein in which the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β is ligated to a heterologous amino acid sequence. Suitable heterologous sequences can include a specific tag, label, or chelating moiety that is recognized by a specific binding partner or agent. For example, for screening of peptide libraries for modulators of the interaction between the sodium channel and amyloid β , it is possible to produce either component fused to a selected heterologous protein selected to be specifically identifiable, e.g., using a probe antibody. A fusion protein also may be engineered to contain a cleavage site (e.g., a factor XA or enterokinase sensitive sequence) located between the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β sequence and the heterologous protein sequence, to permit the sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β to be cleaved from the heterologous protein and subsequently purified. Cleavage of the fusion component may produce a form of the desired protein having additional amino acid residues resulting from the cleavage process.

In a preferred embodiment of the present invention, a sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β , or a host cell that expresses coding sequences for a sodium channel (or constituent components thereof) and/or amyloid β may be used to screen for peptides, or other molecules, such as organic or inorganic molecules, that act as modulators of the interaction between the sodium channel (or constituent components thereof) and amyloid β . For example, screening of peptide libraries or organic libraries made by combinatorial chemistry with the aforementioned polypeptides or cell lines may be useful for identification of therapeutic molecules that function by modulating the interaction between a sodium channel and amyloid β . Synthetic compounds, natural products, and other sources of potentially biologically active materials can be screened in a number of ways deemed routine by those of skill in the art.

109 |

Contacting

The "contacting" described above between amyloid β or its aggregates with a sodium channel, and optionally, with a modulator according to the invention can be done by any means known to those skilled in the art, and described herein, by which the apparent touching or mutual tangency of amyloid β or its aggregates with a sodium channel, and optionally, with a modulator according to the invention, can be effected. For instance, contacting can be done by mixing these components in a small volume of the same solution. Alternately, the components need not necessarily be brought into contact in a small volume, as, for instance, in cases where the one or more of the components is present in, and/or is administered to, a host, and travels within the host by the bloodstream, cerebrospinal fluid, or other bodily fluid. Also, the components need not always be added all at the same time; it suffices that all the components necessary for the assay just are present together at some time during the assay (or treatment, as described further below).

The method of the present invention can be employed for means of contact either *in vitro* or *in vivo*, for instance for research, diagnosis, or therapy. According to the invention "contacting" comprises any means of contact; the method is not dependent on any particular means and is not to be so construed. Such means are well known to those skilled in the art, and also are exemplified herein.

However, for components provided in the form of a construct (e.g., polynucleotide forms of sodium channel proteins and amyloid β), contacting can be effected for instance, either *in vitro* (e.g., in tissue culture studies) or *in vivo* by electroporation, transformation, transduction, conjugation or triparental mating, (co)transfection, (co-)infection, membrane fusion with cationic lipids, high velocity bombardment with DNA-coated microprojectiles, incubation with calcium phosphate-DNA precipitate, direct microinjection into single cells, and the like. Similarly, the constructs can be introduced by means of cationic lipids, e.g., liposomes. Such liposomes are commercially available (e.g., Lipofectin[®], Lipofectamine[™], and the like, supplied by Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, Md., and other

50172032.122399

2. 10/10/2011 10:10:10 AM

commercial vendors). Other methods also are available and are known to those skilled in the art

Diagnostic and Therapeutic Methods

5 The compounds uncovered according to the invention that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel potentially can be employed in the diagnosis, prevention, treatment, or reversal of disorders that are due to deleterious effects of amyloid β within the central nervous system, i.e., mediated by the effect of A β on the sodium channel

10 "Prevention" as used herein refers to preventing a disorder from occurring in a mammal (especially a human) that may be predisposed to the disorder, but has not yet been diagnosed as having it. "Treating" means inhibiting the disorder, i.e., arresting its development, relieving the disorder, i.e., causing its regression, or ameliorating the disorder, i.e., reducing the severity of symptoms associated with the disorder. "Disorder" is intended to encompass medical disorders, diseases, conditions, syndromes, and the like, without limitation.

15 In particular, the method of the invention may be employed to treat mammals (i.e., especially humans) therapeutically or prophylactically, for instance, mammals that are or may be subject to disorders that include but are not limited to Alzheimer's disease, adult Down's syndrome (i.e., over the age of 40 years), hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis, non-inherited congophilic angiopathy with cerebral hemorrhage, and senile dementia. These are all disorders that are characterized by the presence of A β , for instance, deposited in aggregates/plaques. It is demonstrated for the first time herein that A β deleteriously impacts sodium channel functioning. Such an impact on sodium
20 channel functioning could produce the neural and cognitive defects and other symptoms that are observed with these disorders. Thus, it is reasonable to expect that modulators that impair the ability of A β to deleteriously impact sodium channel functioning can be employed to reduce, if not entirely prevent, the neural and cognitive defects and other symptoms that are observed with these disorders.

Accordingly, the present invention provides a method for diagnosing Alzheimer's disease in a mammal (e.g., a human) suspected of having Alzheimer's disease, the method comprising the step of measuring the activity of a sodium channel in a neuronal cell of the mammal, wherein reduced activity of the sodium channel is correlated with the existence of an Alzheimer's disease state. Desirably the activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current. It is expected that the methods of the invention will prove useful in such diagnosis or prediction since it is anticipated that an impact on the sodium ion channel can occur prior to manifestation of all the symptoms of the disorder (e.g., prior to all the symptoms of Alzheimer's disease). If the functionality of the sodium channel appears to be reduced, optionally further tests can be carried out to confirm that the reduced functioning is due to an impact of amyloid β or its aggregates on the sodium channel. For instance, the method further optionally can comprise a step of measuring amyloid β in the cell (e.g., wherein the cell has been isolated from the mammal) or in extracellular fluid from the mammal that contacts the cell, wherein the presence of amyloid β in the cell or fluid and the presence of reduced sodium channel activity is correlated with the existence of an Alzheimer's disease state. Preferably according to the invention, the fluid tested is cerebrospinal fluid.

The invention further provides a method of screening a mammal for susceptibility to Alzheimer's disease, comprising the steps of:

(a) isolating a neuronal cell from the mammal, the neuronal cell comprising a sodium channel, and

(b) measuring activity of the sodium channel in the absence and in the presence of amyloid β protein,

wherein reduced activity of the sodium channel in the presence of amyloid β as compared to in the absence is correlated with a susceptibility to developing Alzheimer's disease.

The present invention also provides a method for preventing, treating, or reversing Alzheimer's disease in a mammal, the method preferably comprising contacting

50172032-122399

112

a sodium channel of the mammal with a compound that protects the sodium channel from a reduction in sodium channel activity due to amyloid β or its aggregates.

Also, like Alzheimer's disease, prion disease is a neurodegenerative disease in which prion protein causes neurotoxicity. Those knowledgeable in the art would understand that prion protein, like amyloid β or its aggregates, can affect neural sodium channel function as part of the pathology of prion disease. In like manner, the sodium channel toxicity of prion proteins can be useful in finding new therapies for prion disease. For instance, certain of the modulators identified as useful for Alzheimer's disease may be expected to have beneficial effects in prion disease by virtue of restoring or alleviating a block on sodium channel functioning. Analysis of sodium channel proteins and sodium channel regulatory proteins will provide the basis for diagnostic tests of Alzheimer's disease and clinical markers for following progression and the efficacy of prion therapy.

The invention accordingly further provides method for diagnosing prion disease in a mammal suspected of having prion disease, the method comprising the step of measuring the activity of a sodium channel in a neuronal cell of the mammal, wherein reduced activity of the sodium channel is correlated with the existence of a prion disease state.

Similarly, the present invention provides a method for preventing, treating, or reversing prion disease in a mammal, the method desirably comprising contacting a sodium channel of the mammal with a compound that protects the sodium channel from a reduction in sodium channel activity due to amyloid β or its aggregates.

In a preferred embodiment, the present invention provides compounds that are capable of opening the sodium channel, i.e., "sodium channel openers". Accordingly, the present invention provides a method for preventing, treating, or reversing Alzheimer's disease in a mammal, wherein the method desirably comprises contacting a sodium channel of the mammal with a compound that opens the sodium channel.

Also, the invention provides a method for preventing, treating, or reversing prion disease in a mammal, wherein the method preferably comprises contacting a sodium channel of the mammal with a compound that opens the sodium channel.

175
113

5 In terms of therapeutic uses, various assays will be employed to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen, and to determine a normal or standard profile. Such assays include the specific sodium ion channel studies set out in the Examples that follow. Such assays may be tailored to suit a particular application, and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient.

10 To provide a basis for the diagnosis and treatment of disease, a normal or standard profile must be established. This is accomplished by combining a biological sample taken from a normal subject. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to the deleterious effects of A β or its aggregates. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, a therapeutic agent is administered, if so desired, and treatment profile or values may be generated. The assay may be repeated on a regular basis to
15 evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Other Uses

20 Apart from the diagnostic and therapeutic uses described above, there are many additional uses and discoveries that stem from the present invention.

For instance, the discovery described herein of sodium channels as a novel mechanism of toxicity for A β indicates that sodium channels are one of previously unknown elements linked to Alzheimer's susceptibility. Thus, sodium channel genes or
25 genes for regulators of the sodium channel involved in A β toxicity are associated with susceptibility for Alzheimer's disease. Analysis of genetic variants of both the structural genes sodium channel and sodium channel regulatory proteins can be used for linkage of specific mutants or variants of these genes with susceptibility to Alzheimer's disease. Tests for those mutant or variant genes will be diagnostic for Alzheimer's disease and
30 susceptibility to this disease. Thus, the discovery as described herein of the link between

60172032-122399

from the original document

246
114

sodium channels and the toxicity associated with A β will provide the basis for both diagnostic tests for Alzheimer's disease and clinical markers for following the progression and efficacy of treatments for Alzheimer's disease

5 Additionally, the present invention also provides for the use of kinetic measurements of A β peptide effects (as described in Example 5) in conjunction with measurements of the inward sodium current. Such a kinetic approach similarly can be employed to discover drugs used to treat Alzheimer's disease

Pharmaceutical Compositions

10 The present invention thus further provides pharmaceutical compositions. Pharmaceutical compositions optionally comprise as an active agent modulators (as previously described), or polynucleotides that encode a sodium channel (or a peptide thereof) and/or amyloid β , along with a biocompatible pharmaceutical carrier, adjuvant, or vehicle. Preferably, the active agent is active in treating a medical condition that is
15 due to the negative effects of amyloid β or its aggregates. The composition can include the agent as the only active moiety or in combination with other active agents, optionally mixed with excipient(s) or other pharmaceutically acceptable carriers.

Pharmaceutically acceptable excipients to be added to pharmaceutical compositions are well-known to those who are skilled in the art, and are readily available.
20 The choice of excipient will be determined in part by the particular method used to administer the composition according to the invention. Accordingly, there is a wide variety of suitable formulations for use in the context of the present invention. The following methods and excipients are merely exemplary and are in no way limiting.

Techniques for formulation and administration of pharmaceutical compositions may be found in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th Ed., Mack Publishing Co, Easton PA, 1990, and are well known to those skilled in the art. The pharmaceutical compositions of the present invention may be manufactured using any conventional method, e.g., mixing, dissolving, granulating, dragée-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, melt-spinning, spray-drying, or lyophilizing processes
25
30 However, the optimal pharmaceutical formulation will be determined by one of skill in

60172032.122399

177
115 |

the art depending on the route of administration and the desired dosage. Such formulations may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the administered agent. Depending on the condition being treated, these pharmaceutical compositions may be formulated and administered systemically or locally

The pharmaceutical compositions may be administered to the subject by any conventional method, including parenteral and enteral techniques. Parenteral administration modalities include those in which the composition is administered by a route other than through the gastrointestinal tract, for example, intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramedullary, intramuscular, intraarticular, intrathecal, and intraventricular injections. Enteral administration modalities include, for example, oral (including buccal and sublingual) and rectal administration. Transepithelial administration modalities include, for example, transmucosal administration and transdermal administration. Transmucosal administration includes, for example, enteral administration as well as nasal, inhalation, and deep lung administration, vaginal administration; and rectal administration. Transdermal administration includes passive or active transdermal or transcutaneous modalities, including, for example, patches and iontophoretic devices, as well as topical application of pastes, salves, or ointments. Surgical techniques include implantation of depot (reservoir) compositions, osmotic pumps, and the like.

The pharmaceutical compositions are formulated to contain suitable pharmaceutically acceptable carriers, and may optionally comprise excipients and additives that facilitate processing of the active compounds into preparations that can be used pharmaceutically. The administration modality will generally determine the nature of the carrier. For example, formulations for parenteral administration may comprise aqueous solutions of the active compounds in water-soluble form. Carriers suitable for parenteral administration can be selected from among saline, buffered saline, dextrose, water, and other physiologically compatible solutions. Preferred carriers for parenteral administration are physiologically compatible buffers such as Hank's solution, Ringer's solutions, or physiologically buffered saline. For tissue or cellular

748
1161

administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art. For preparations comprising proteins, the formulation may include stabilizing materials, such as polyols (e.g., sucrose) and/or surfactants (e.g., nonionic surfactants), and the like.

5 Alternatively, formulations for parenteral use may comprise suspensions of the active compounds prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils, such as sesame oil, and synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. Emulsions, e.g., oil-in-water and water-in-oil dispersions, can also be used, optionally stabilized by an emulsifying agent or dispersant (surface-active materials; surfactants). Liposomes containing the active agent may also be employed for parenteral administration.

10 Alternatively, the pharmaceutical compositions comprising the agent in dosages suitable for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art. The preparations formulated for oral administration may be in the form of tablets, pills, capsules, cachets, dragées, lozenges, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, or powders. To illustrate, pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by combining the active compounds with a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries if desired, to obtain tablets or dragée cores. Note that oral formulations may employ liquid carriers similar in type to those described for parenteral use, e.g., buffered aqueous solutions, suspensions, and the like.

20 Preferred oral formulations include tablets, dragées, and gelatin capsules. These preparations may contain one or excipients, which include, without limitation.

25 a) diluents such as sugars, including lactose, dextrose, sucrose, mannitol, or sorbitol,

1121

b) binders such as magnesium aluminum silicate, starch from corn, wheat, rice, potato, etc ,

5 c) cellulose materials such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, and sodium carboxymethyl cellulose, polyvinyl pyrrolidone, gums such as gum arabic and gum tragacanth, and proteins such as gelatin and collagen,

d) disintegrating or solubilizing agents such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, starches, agar, alginic acid or a salt thereof such as sodium alginate, or effervescent compositions,

10 e) lubricants such as silica, talc, stearic acid or its magnesium or calcium salt, and polyethylene glycol,

f) flavorants, and sweeteners,

g) colorants or pigments, e.g., to identify the product or to characterize the quantity (dosage) of active compound, and

15 h) other ingredients such as preservatives, stabilizers, swelling agents, emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating osmotic pressure, and buffers.

20 Gelatin capsules include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain the active ingredient(s) mixed with fillers, binders, lubricants, and/or stabilizers, etc. In soft capsules, the active compounds may be dissolved or suspended in suitable fluids, such as fatty oils, liquid paraffin, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

25 Dragée cores can be provided with suitable coatings such as concentrated sugar solutions, which may also contain gum arabic, talc, polyvinyl pyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures

The pharmaceutical composition may be provided as a salt of the active agent, which can be formed with many acids, including but not limited to hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms.

120
1181

As noted above, the characteristics of the agent itself and the formulation of the agent can influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the administered agent. Such pharmacokinetic and pharmacodynamic information can be collected through pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies, later confirmed in humans during the course of clinical trials. Thus, for any compound used in the method of the invention, a therapeutically effective dose in mammals, particularly humans, can be estimated initially from biochemical and/or cell-based assays. Then, dosage can be formulated in animal models to achieve a desirable circulating concentration range (e.g., of the modulator). As human studies are conducted, further information will emerge regarding the appropriate dosage levels and duration of treatment for various diseases and conditions.

Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the "therapeutic index," which is typically expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds that exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from such cell culture assays and additional animal studies can be used in formulating a range of dosage for human use. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity.

For the method of the invention, any effective administration regimen regulating the timing and sequence of doses may be used. Doses of the agent preferably include pharmaceutical dosage units comprising an effective amount of the agent. As used herein, "effective amount" refers to an amount sufficient to provide or modulate interaction of amyloid β or its aggregates with the sodium channel through administration of one or more of the pharmaceutical dosage units.

Exemplary dosage levels for a human subject are of the order of from about 0.001 milligram of active agent per kilogram body weight (mg/kg) to about 100 mg/kg. Typically, dosage units of the active agent comprise from about 0.01 mg to about 10,000

227
119

mg, preferably from about 0.1 mg to about 1,000 mg, depending upon the indication, route of administration, etc. Depending on the route of administration, a suitable dose may be calculated according to body weight, body surface area, or organ size. The final dosage regimen will be determined by the attending physician in view of good medical practice, considering various factors that modify the action of drugs, e.g., the agent's specific activity, the severity of the disease state, the responsiveness of the patient, the age, condition, body weight, sex, and diet of the patient, the severity of any infection, and the like. Additional factors that may be taken into account include time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Further refinement of the dosage appropriate for treatment involving any of the formulations mentioned herein is done routinely by the skilled practitioner without undue experimentation, especially in light of the dosage information and assays disclosed, as well as the pharmacokinetic data observed in yeast clinical trials. Appropriate dosages may be ascertained through use of established assays for determining concentration of the agent in a body fluid or other sample together with dose response data.

The frequency of dosing will depend on the pharmacokinetic parameters of the agent and the route of administration. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Accordingly, the pharmaceutical compositions can be administered in a single dose, multiple discrete doses, continuous infusion, sustained release depots, or combinations thereof, as required to maintain desired minimum level of the agent. Short-acting pharmaceutical compositions (i.e., short half-life) can be administered once a day or more than once a day (e.g., two, three, or four times a day). Long acting pharmaceutical compositions might be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks. Pumps, such as subcutaneous, intraperitoneal, or subdural pumps, may be preferred for continuous infusion.

Compositions comprising an active agent of the invention formulated in a pharmaceutical acceptable carrier may be prepared, placed in an appropriate container, and labeled for treatment of an indicated condition. Conditions indicated on the label may include, but are not limited to, treatment and diagnosis of Alzheimer's disease and

122
120

prion disease. Kits are also contemplated, wherein the kit comprises a dosage form of a pharmaceutical composition and a package insert containing instructions for use of the composition in treatment of a medical condition

5 **Examples**

The following examples further illustrate the present invention but should not be construed as in any way limiting its scope

60172032-122399
10 The examples presuppose an understanding of conventional methods well-known to those persons having ordinary skill in the art to which the examples pertain, e.g., the techniques for isolation and assessment of neuronal cells. Such methods are described in detail in numerous publications including, for example, in Hille, *In, Ionic Channels of Excitable Membranes* Sinauer Associates, Inc. (1992) The contents of this publication and other publications cited in the Examples are incorporated by reference, in their entirety

15 For all studies as described herein, single neurons freshly dissociated from adult rats (Chad et al, *In, Cellular Neurobiology*, Ed. J. Chad and H. Wheal, Oxford University Press (1991)) were examined using the suction pipette method (Leo et al., *J. Neurosci. Methods*, 2, 51-78 (1980)) under current- or voltage-clamp, with use of an Axopatch 200 Amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Amyloid β 1-40 was obtained from
20 Polypeptide Laboratories, Torrance, CA, or from Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany

25 Shaken aggregation assays (i.e., as in Examples 1-4) were performed as described previously (e.g., Finden et al, *Biochemistry*, 38, 6791-6800 (1999)) This aggregation performed prior to use of the aggregated amyloid for contacting cells was done in the same media as the cells were contained, i.e., Hank's Balanced Salt Solution. Aggregation of amyloid for kinetic studies (i.e., as in Example 5), was done in a buffer composed of
30 10 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 7.4. In each case, aggregation was carried out in 96 well plates containing 25-50 μ M amyloid β 1-40 in a final volume of 250 μ l The plates were rotary shaken using a titer plate shaker (Lab-Line Model 4623, Lab-Line Inst., Melrose Park, IL) at a rate of from about 700 to 800 rpm (monitored by a tachometer) to

123
121

induce aggregation. At given times, the turbidities of the reaction mixture were read by measuring light scattering at 405 nm in a Molecular Devices (Menlo Park, CA) Vmax Microplate Reader. For all the Examples, the aggregating material was removed at timed intervals and added to isolated neurons to examine its effect.

5 Prior to aggregation, to prepare amyloid β in monomeric form, amyloid β 1-40 (e.g., to be used as an HPLC standard) was treated with hexafluoroisopropyl alcohol (HFIPA), which had been dried over Molecular Sieves, Type 4A, at 4°C and centrifuged at 15,000 X g for 10 minutes to remove molecular sieve dust. For aggregation assays, the peptide was dissolved in the HFIPA at 8 mg/ml and held in the solvent for 18 to 24 hours
10 to disaggregate any preformed particles. Following this monomerization step, 20 μ l aliquots of this solution were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -195°C until use. Without thawing, the HFIPA in the peptide was removed by lyophilization under dry ice. Complete removal of the HFIPA without thawing was essential to achieve non-aggregated starting material, e.g., if the frozen pellets melt prior complete lyophilization, there is a high probability that multimers will reform. The lyophilized A β 1-40 was
15 dissolved in anhydrous DMSO (usually 20 μ l) and sonicated in a bath sonicator for 15 minutes. Since the above procedure is lengthy and cumbersome, for some experiments, the acid treatment procedure wherein the A β 1-40 is dissolved in 0.1% acetic acid prior to aggregation (Finkbeiner et al., *supra*) was employed, and was found to be acceptable for peptide randomization.
20

Example 1

In this experiment, the firing patterns of isolated adult rat cortical and hippocampal neurons were examined using an Axopatch 200 Amplifier in the presence
25 or absence of amyloid β 1-40 peptide.

In current-clamp, the resting membrane potential and action potentials of single neurons were continuously monitored for at least 10-20 minutes until the neuronal activity became stable. Then, 10-50 μ M amyloid β 1-40 preaggregated for different times was added to the neuron slowly without causing any flow artifact. In 5-10 minutes,
30 resting potentials started to move to either a depolarized or hyperpolarized direction.

60172032-122399

depending on the neuronal type examined. However, the common effect was the slow disappearance of spontaneous or evoked action potentials. After about 20-30 minutes of peptide exposure, the action potentials in most of the neurons examined disappeared altogether. These amyloid β treated neurons became silent, non-functional, and in a vegetative state after prolonged exposure (i.e., about 30 to 60 minutes) to amyloid β .

These results are depicted in Figures 1A-C for cortical neurons, and Figures 2A-C for hippocampal neurons. These results confirm an abrogation of action potentials in cortical and hippocampal neurons with addition to the neuron of 11.5 μ M amyloid β 1-40.

These results thus confirm that amyloid β 1-40 peptide alters the firing patterns of adult rat cortical and hippocampal neurons.

Example 2

In this experiment, the effect of amyloid β 1-40 on the fast inward sodium current (I_{Na}) of isolated rat hippocampal neurons was studied using an Axopatch 200 Amplifier.

These studies were done by voltage-clamping the neurons at a holding potential of -50 to -80 mV where the sodium channels were fully activated. Again, a stable control was obtained. Then, 10-50 μ M amyloid β 1-40 aggregated for various times at room temperature (23°C) in 10 mM phosphate, 100 mM NaCl at pH 7.4 was applied to the neurons. In about 5-30 minutes, approximately the same time frame for the action potentials to disappear, the fast inward sodium current was blocked by amyloid β 1-40 by as much as 90%, as can be seen by comparing results in Figures 3A (control) with those in Figure 3B (90 minute aggregated amyloid β) and Figure 3C (120 minute aggregated amyloid β). The progressive change of peak amplitude of inward sodium current for the same experiments with hippocampal neurons is graphed in Figure 4 for 90 minute aggregated amyloid β (solid circles), and 120 minute aggregated amyloid β (solid squares).

Also, at this time, switching back to current-clamp, the neuron failed to fire action potentials (as can be seen in Figures 1B and Figures 2B), thus confirming that the

mechanism of action potential elimination by amyloid β 1-40 is through blockade of the fast inward sodium channels.

5 This further can be seen for rat hippocampal neurons, by comparing readings obtained for resting potential in Figure 5A (control) and Figure 5D (wash condition) with those obtained in Figure 5B (90 minute aggregated amyloid β) and Figure 5C (120 minute aggregated amyloid β). For the same experiment, switching back to current-clamp, the neuron failed to fire action-potentials, as can be seen in Figure 6 for 90 minute aggregated amyloid β (solid circles), and 120 minute aggregated amyloid β (open squares).

10 Additionally, it was shown that this fast inward sodium current is sensitive to tetrodotoxin (TTX). This can be seen by comparing sodium current traces obtained from hippocampal neurons in Figures 7A (control, having no TTX exposure) and Figure 7C (wash) with those obtained in Figure 7B (10^{-6} M TTX). For the same experiment, changes of peak amplitude of inward sodium current over a broad potential range from -80 mV to +10 mV are shown in Figure 8 for the control (open circles) and wash condition (closed squares) as compared to the neurons exposed to TTX (closed circles).

15 These results confirm that amyloid β 1-40 inhibits the fast inward sodium current (I_{Na}). This is a novel and unexpected finding, since prior results focused on the impact of amyloid β on calcium and/or potassium channels. Furthermore, the results confirm that the amyloid β 1-40-targeted a fast inward sodium channel and is sensitive to tetrodotoxin. However, other types of sodium channels may also be involved, and/or may be sensitive to the negative effects of amyloid β .

Example 3

25 In this experiment, the effect of amyloid β 1-40 on the calcium ion channel was studied using the methods described in Experiment 2 for the sodium channel.

The amyloid β 1-40 peptide also was found to depress neuronal inward calcium currents (see, Figures 9A-B and Figure 10). However, the calcium channel may be more resistant to the inhibitory action of amyloid β 1-40.

30 These results confirm that amyloid β 1-40 affects neuronal calcium currents.

Example 4

In this experiment, the effect of amyloid B 1-40 on the potassium ion channel was studied using the methods described in Experiment 2 for the sodium channel.

5 In voltage-clamp, within the first 2-5 minutes, in some cells the peptide induced an outward holding current measuring about 10-50 pA, but this small current was enough to hyperpolarize the resting membrane potential from -50 mV to -90 mV. In other cells, the peptide instead caused a gradual depolarization to about -40mV due to a slight inhibition of the outward holding current. In all cells, amyloid B 1-40 blocked the
10 delayed outward potassium current by about 30-40% at all step potentials. The corresponding action potential measurement showed that this effect resulted in broadening of normal action potential duration (shown in Figure 1B). These results are presented in Figures 11A-B and Figure 12

15 These results thus confirm that amyloid B 1-40 affects major neuronal potassium currents.

Example 5

In this experiment, the relationship between sodium channel toxicity and amyloid B 1-40 aggregation was studied.

20 By way of background, the kinetics of amyloid peptide spontaneous aggregation are characterized by a long lag phase in which at least a small quantity of the aggregate can be detected by thioflavine T fluorescence. The lag phase is followed by a log phase which is rapid and results in the depletion of peptide until the solution is totally depleted of amyloid B monomers. The rapid acceleration (propagation) of fibril growth occurs
25 from a preformed nucleus. The most important step in the whole process is nucleation from which fibril formation proceeds rapidly. Inhibition of nucleation halts the entire process and an assay capable of measuring this early event would be highly desirable. The sharp, exponential rise during the propagation phase is indicative of the presence of higher order aggregation and growth of the aggregate. The kinetics of spontaneous
30 aggregation were studied from experiments done herein, as well as making use of

literature reported data (e.g., Lansbury et al *Arch For Drug Research*, 45, 432-434 (1995), Pilot et al, *Eur J Biochem*, 243, 650-659 (1997)).

For these studies, in order to learn more about the toxic form of the amyloid β peptide, kinetic experiments were first performed to establish the time course of the formation of the β -turn form of $A\beta$ 1-40 (activated monomer), and of the tetramer. Then, aliquots of the peptide were taken at select time points from the actively aggregating solution of $A\beta$ 1-40, and were added to isolated rat hippocampal neurons. The toxicity of various aggregated forms of $A\beta$ were studied using a variety of tests, as further described

The data obtained from the kinetic studies was assessed using several multiple order kinetic models for spontaneous aggregation. It was found that the simplest scheme (as set out in Equations 1-3 below) consistent with these data is one in which the nonnucleating, random coil structure, monomeric peptide (inactive A) is converted to an active, nucleatable form (B) according to the equation.



B then oligomerizes to a tetrameric intermediate (C)



that binds species A rapidly to form the insoluble fibrillar structure (P):



The system of differential equations describing this model is.

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 A - k_p C \cdot A \quad (\text{Equation 4})$$

$$\frac{dB}{dt} = k_1 A - k_2 B^4 \quad (\text{Equation 5})$$

$$\frac{dC}{dt} = k_2 B^4 - k_p C \cdot A \quad (\text{Equation 6})$$

128
126

$$\frac{dP}{dt} = k_p C \cdot A \quad \text{(Equation 7)}$$

5

Because the solution to the differential equations 4-7 is nonintegrable, the data had to be fit using a proper nonlinear least squares fitting algorithm chained to a fifth-order Runge-Kutta numerical integration algorithm. The nonlinear least squares fitting program used in this case was one written by Dr Ferenc Kézdy (Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, Michigan)

10

The data are consistent with a model of a slow change of the peptide in solution from an inactive, non-nucleating form to an active form that can initiate amyloid β aggregation. The analysis showed that a tetramer form of the peptide is responsible for nucleation. After nucleation, the determining factor in the steep portion of the kinetics is propagation, and the compound that forms the tetramer reaches a steady state at this point. The kinetics of all spontaneous aggregation experiments performed herein, and by others (Lansbury et al, *Arzn. For Drug Res*, 45, 432-434 (1991), Pillot et al., *Eur J Biochem.*, 243, 650-659 (1997)) were consistent only with this model. The results may suggest that the toxicity produced by the amyloid peptide is due to the amyloid tetramer forming a pore in biological membranes, similar to the toxic, tetrameric form of melittin.

15

20

Following the kinetic studies, aliquots of amyloid β were taken at select time points from the actively aggregating solution of A β 1-40, and were added to rat hippocampal cortical neurons. The inward sodium current was then measured continuously. The percentage decrease in the inward sodium current was determined for each test point as the rate at which the sodium current was generated. Additionally, the various aggregated forms of A β were assessed for any impact on resting membrane potential, action potential, calcium channel, and outward potassium channel.

25

Monomers of amyloid β 1-40 did not show significant toxicity. But as the monomers aggregate, to form dimers, tetramers and then polymers, the toxicity of amyloid β 1-40 then appeared, and increased exponentially, approximately following the time course of peptide aggregation. The most toxic fraction appeared just before the

30

65E22T-2E02/T09

monomers' complete disappearance and saturation of peptide aggregation. After reaching the saturation, the peak toxicity decreased, but was still above the 50% inhibition level of the fast inward sodium channels (shown in Figure 13, which is the mean values of four experiments with 29 cells each)

5 The toxicity of amyloid β was seen in terms of its negative impact on five levels of neuronal activities (1) resting membrane potentials, (2) action potentials, (3) fast inward sodium channels (TTX-sensitive), (4) calcium channels, and (5) outward potassium channels. However, the main ion channel target for amyloid β 1-40 is the TTX-sensitive fast inward sodium channel. This confirms that the deleterious effects of an amyloid β aggregate are upon the fast inward sodium channel, which disables the neurons in terms of generating electrical impulses that are critical for brain and nerve functions.

10 These results further confirm that low molecular weight peptide aggregates of amyloid β 1-40 monomer have higher potency for inhibiting the fast inward sodium channels.

15 All of the references cited herein are hereby incorporated in their entireties by reference.

20 While this invention has been described with an emphasis upon a preferred embodiment, it will be obvious to those of ordinary skill in the art that variations in the preferred composition and method may be used and that it is intended that the invention may be practiced otherwise than as specifically described herein. Accordingly, this invention includes all modifications encompassed within the spirit and scope of the invention as defined by the following claims.

25

130
128

WHAT IS CLAIMED IS

1 A method for identifying compounds that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with a sodium channel, said method comprising.

- 5 (a) obtaining a neuronal cell that comprises a sodium channel,
- (b) contacting said sodium channel with amyloid β or its aggregates in the presence and absence of a test compound, and
- (c) determining the activity of said sodium channel in the presence of said test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with said sodium channel
- 10

2 The method of claim 1, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

15

3 A method for screening for compounds that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with a sodium channel, said method comprising.

- 20 (a) obtaining a neuronal cell that produces amyloid β or its aggregates, said cell comprising a sodium channel,
- (b) contacting said sodium channel with a test compound, and
- (c) determining the activity of said sodium channel in the presence of said test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with said sodium channel
- 25

4 The method of claim 3, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

30

66472032-122399

131
129

5 A method for identifying compounds that modulate the interaction of amyloid β or its aggregates with a sodium channel, said method comprising

(a) obtaining a composition comprising a purified sodium channel,

5 (b) contacting said sodium channel with amyloid β or its aggregates in the presence and absence of a test compound, and

(c) determining the activity of said sodium channel in the presence of said test compound as compared with in the absence, wherein a test compound that impacts activity is considered a modulator of the interaction of amyloid β or its aggregates with said sodium channel.

10

6 The method of claim 5, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

15

7 A method for diagnosing Alzheimer's disease in a mammal suspected of having Alzheimer's disease, said method comprising the step of measuring the activity of a sodium channel in a neuronal cell of said mammal, wherein reduced activity of said sodium channel is correlated with the existence of an Alzheimer's disease state

20

8 The method of claim 7, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

25

9 The method of claim 7, further comprising a step of measuring amyloid β in said cell or in extracellular fluid from said mammal that contacts the cell, wherein the presence of amyloid β in said cell or fluid and the presence of reduced sodium channel activity is correlated with the existence of an Alzheimer's disease state.

30

10 The method of claim 9, wherein said fluid is cerebrospinal fluid

60172032.122399

232
130

- 42 -

11 The method of claim 7 wherein said cell has been isolated from said mammal

5 12 A method of screening a mammal for susceptibility to Alzheimer's disease, comprising the steps of

(a) isolating a neuronal cell from said mammal, said neuronal cell comprising a sodium channel, and

(b) measuring activity of said sodium channel in the absence and in the presence of amyloid β protein,

10 wherein reduced activity of said sodium channel in the presence of amyloid β as compared to in the absence is correlated with a susceptibility to developing Alzheimer's disease.

15 13 A method for diagnosing prion disease in a mammal suspected of having prion disease, said method comprising the step of measuring the activity of a sodium channel in a neuronal cell of said mammal, wherein reduced activity of said sodium channel is correlated with the existence of a prion disease state.

20 14 The method of claim 13, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

25 15 A method for preventing, treating, or reversing Alzheimer's disease in a mammal, said method comprising contacting a sodium channel of said mammal with a compound that protects said sodium channel from a reduction in sodium channel activity due to amyloid β or its aggregates.

30 16 The method of claim 15, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

50172032-122399

17 A method for preventing, treating, or reversing prion disease in a mammal, said method comprising contacting a sodium channel of said mammal with a compound that protects said sodium channel from a reduction in sodium channel activity due to amyloid β or its aggregates.

5

18 The method of claim 17, wherein said activity is determined by a method selected from the group consisting of examining resting membrane potential, examining action potential, and measuring the fast inward sodium current.

10

19 A method for preventing, treating, or reversing Alzheimer's disease in a mammal, said method comprising contacting a sodium channel of said mammal with a compound that opens said sodium channel

15

20 A method for preventing, treating, or reversing prion disease in a mammal, said method comprising contacting a sodium channel of said mammal with a compound that opens said sodium channel

60172032-122399

134
132

- 44 -

ABSTRACT

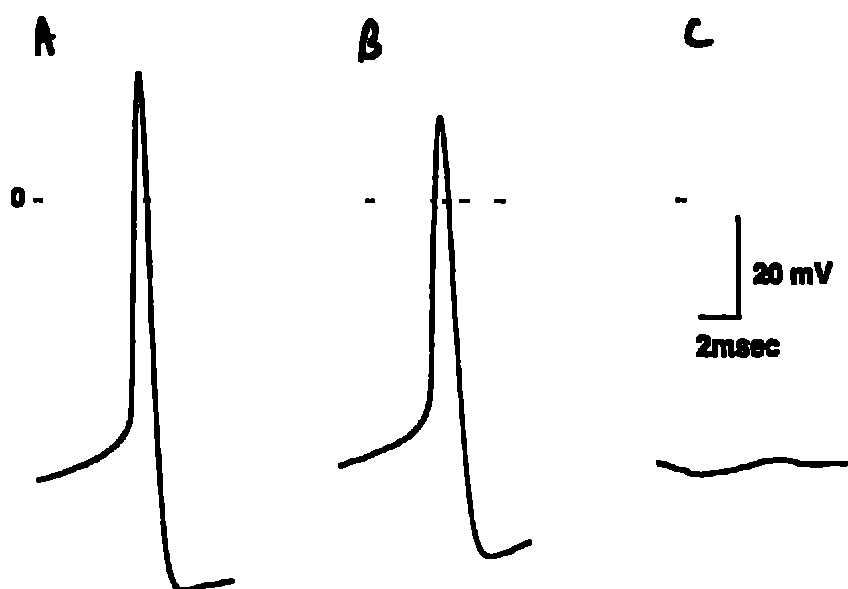
Among other things, assays and methods of diagnosis and treatment of disease (e.g., Alzheimer's disease) based on the surprising observation of an interaction between amyloid β or its aggregates with the sodium channel are provided. In particular, methods to identify compounds that modulate this interaction are provided, as well as methods of diagnosis and treatment that are based on this interaction.

J407802

0172032.122399

135
133

60172032.12239



Figures 1A - C

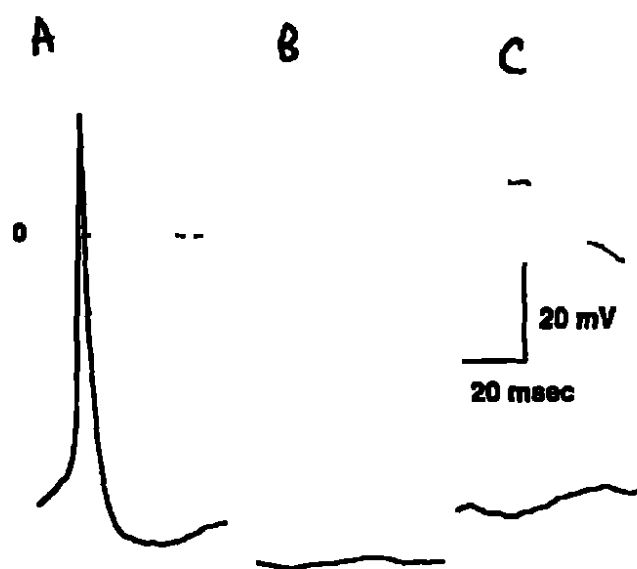


Figure 2A-C

0172032.122399

135
135
135

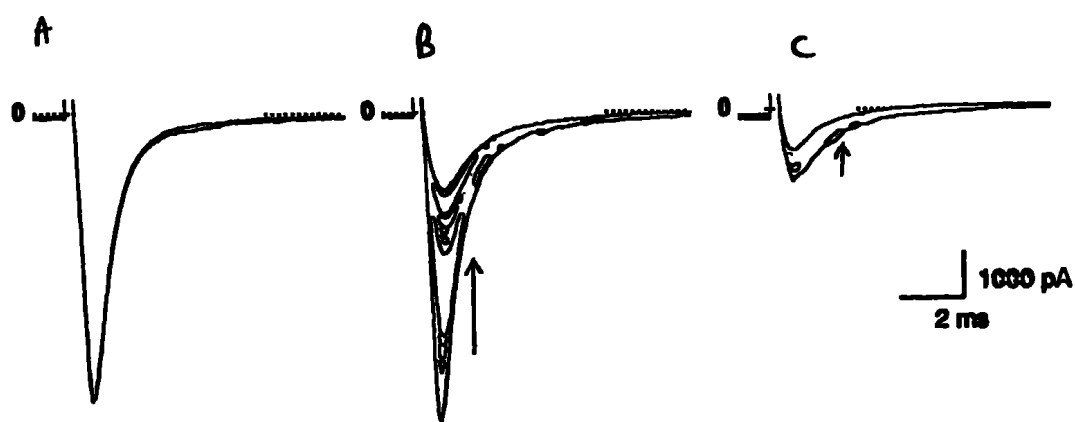


Figure 3A-C

0172032.122399



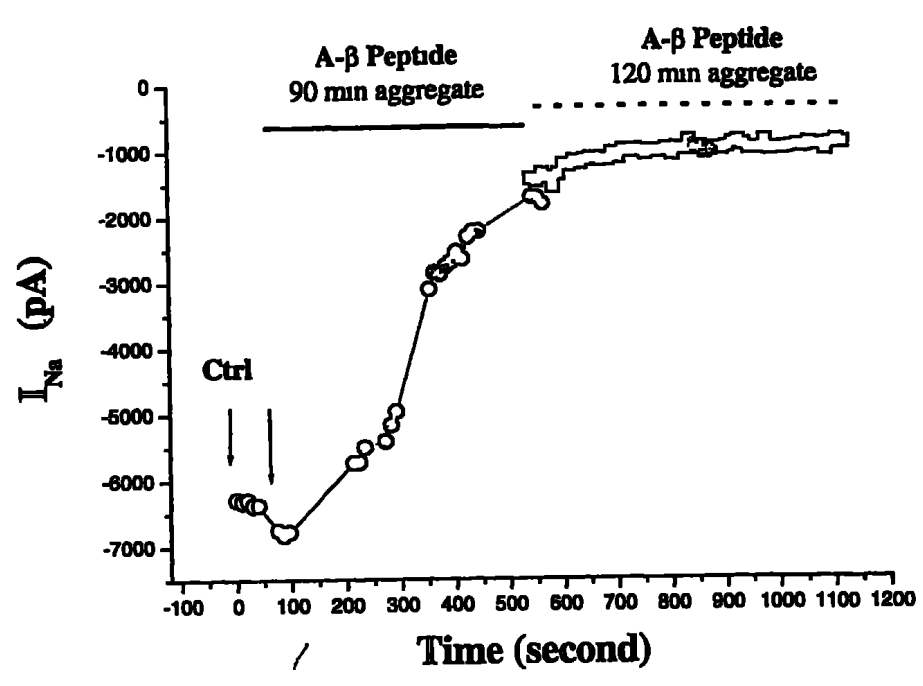
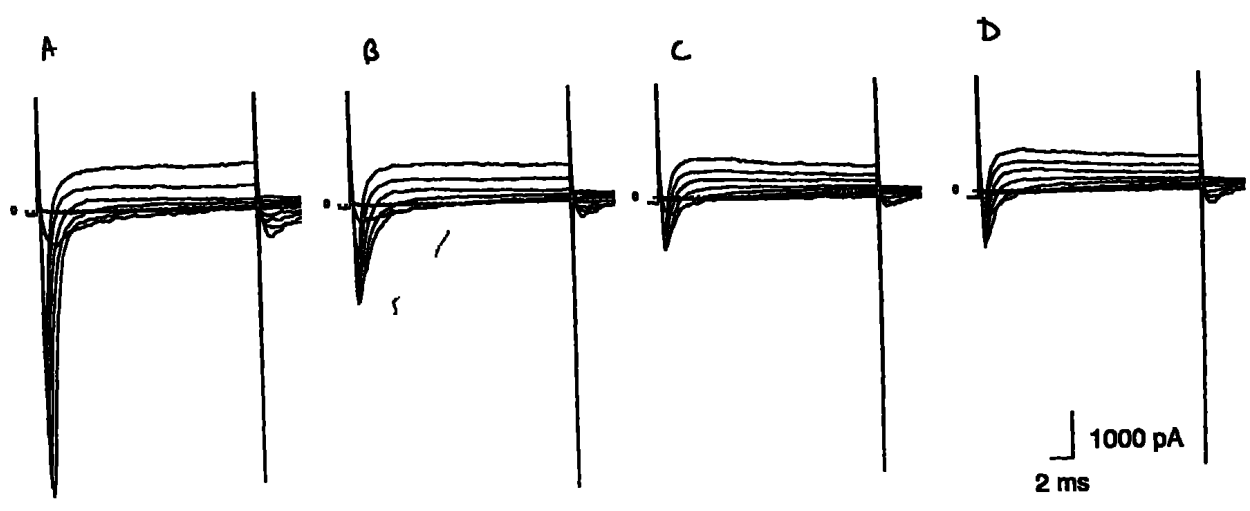


Figure 9

60172032.122399

439

13.7



Figures 5A-D

60172032.122399

66E22T-2E02709

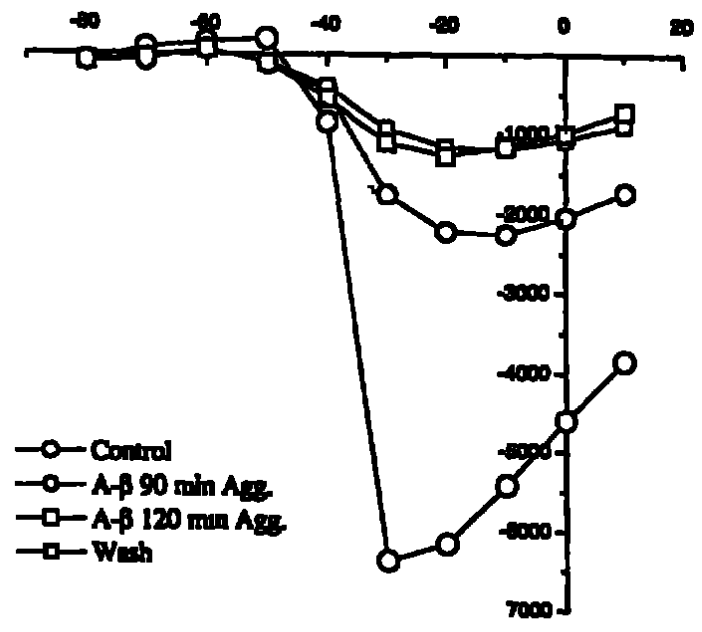


Figure 6

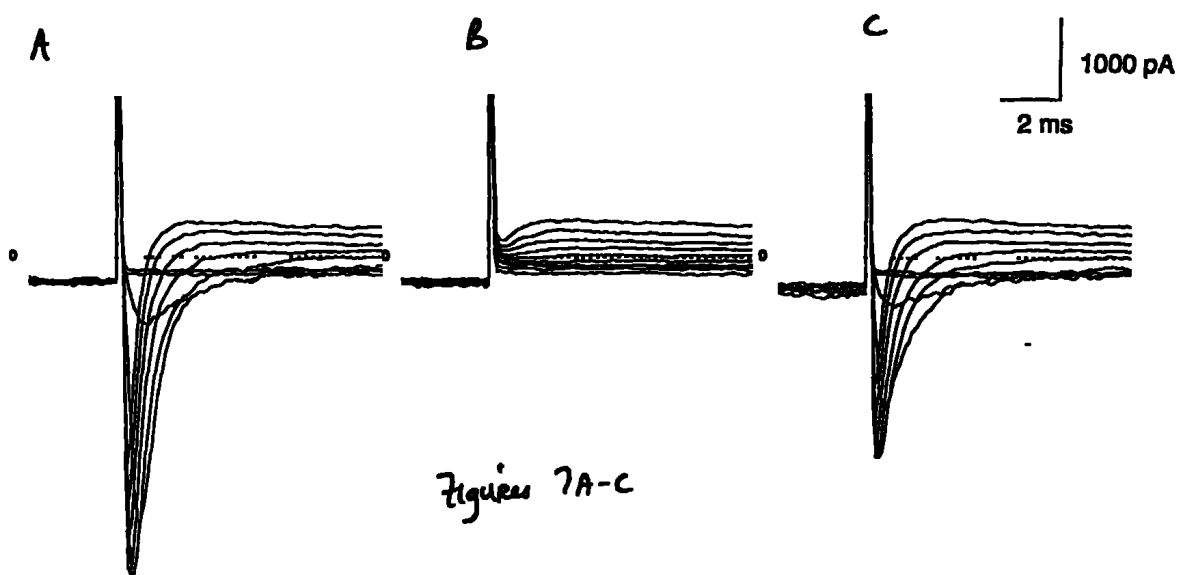


Figure 7A-C

60172032.122399

142
140

60172032-122399

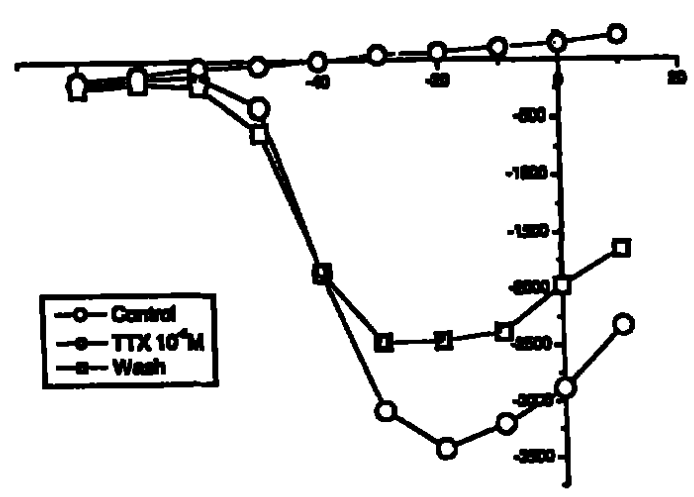
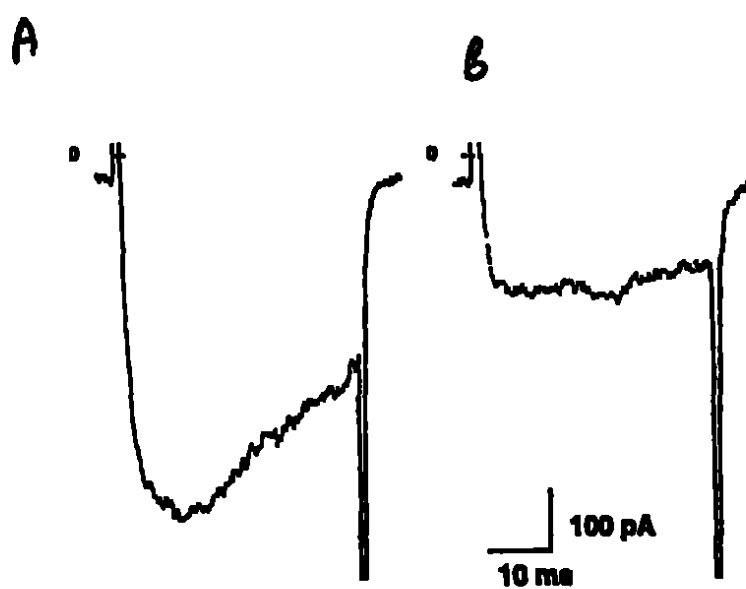


Figure 8

143
191

60172032.122399



Figures 9A-B

142 ~~744~~

666221-2802709

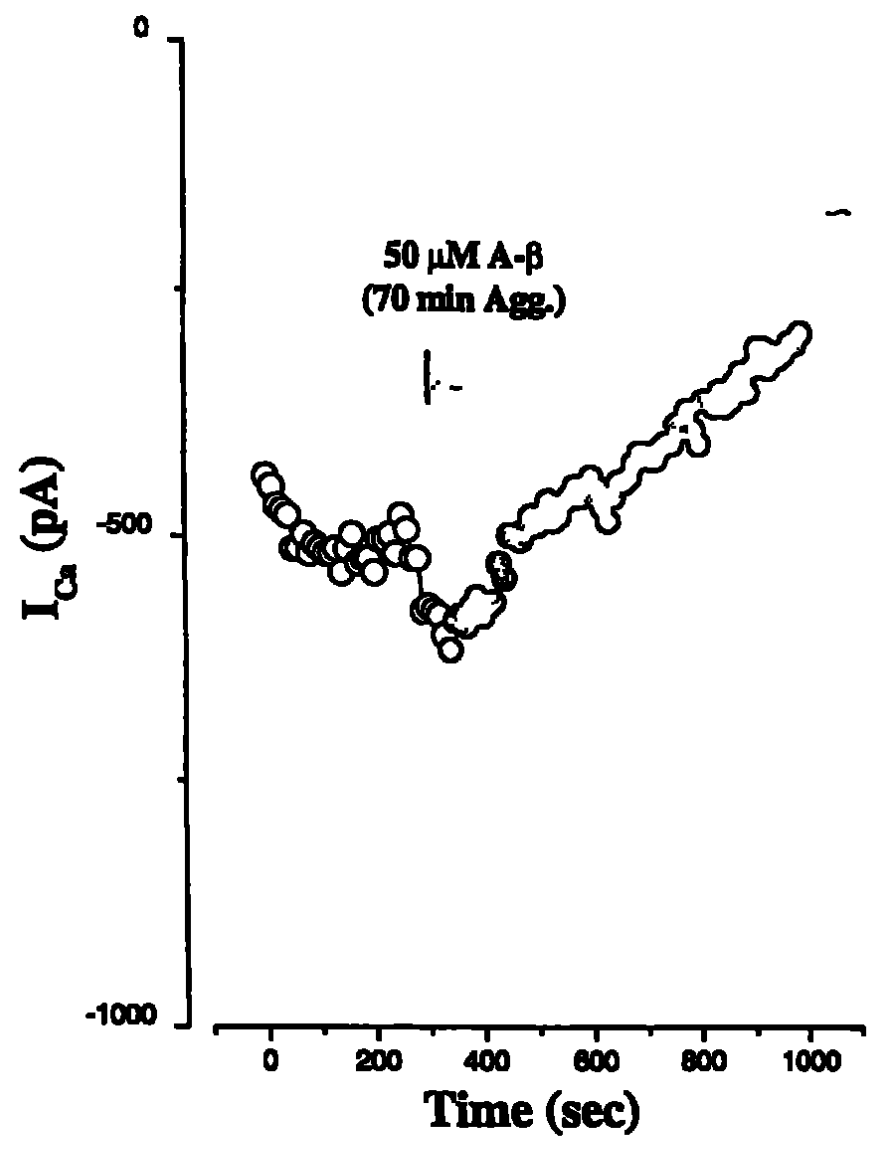
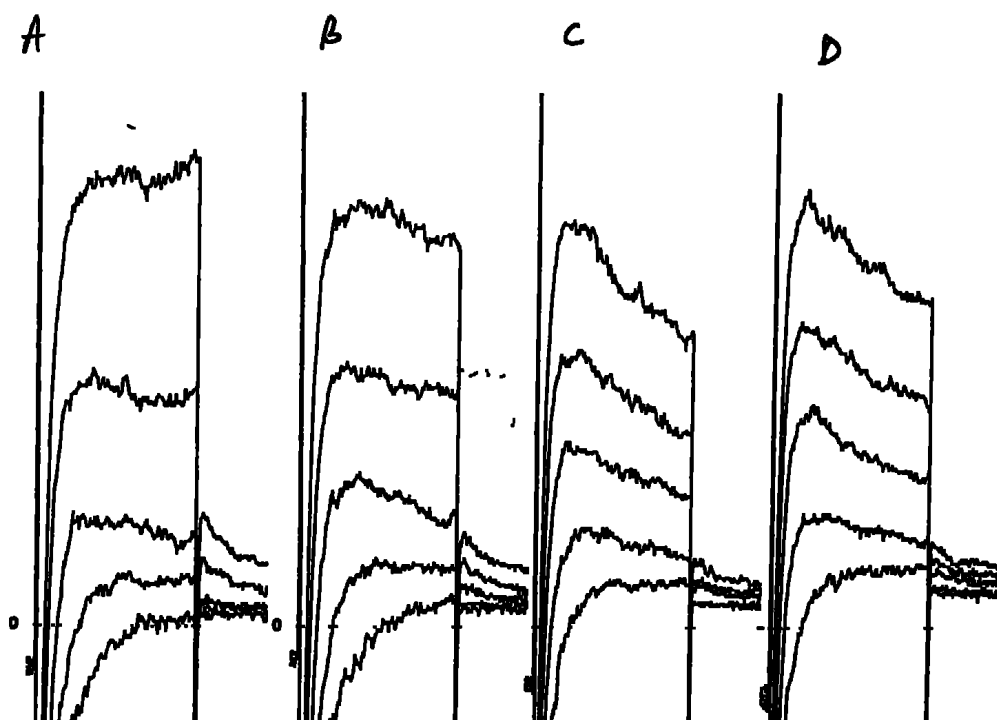


Figure 10

AS



Figures 11A - D

60172032.122399



9/13

149

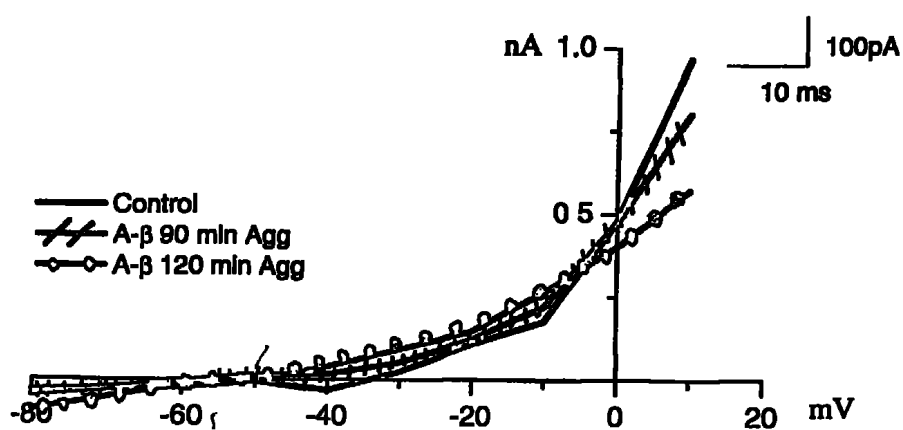


Figure 12

60172032.122399

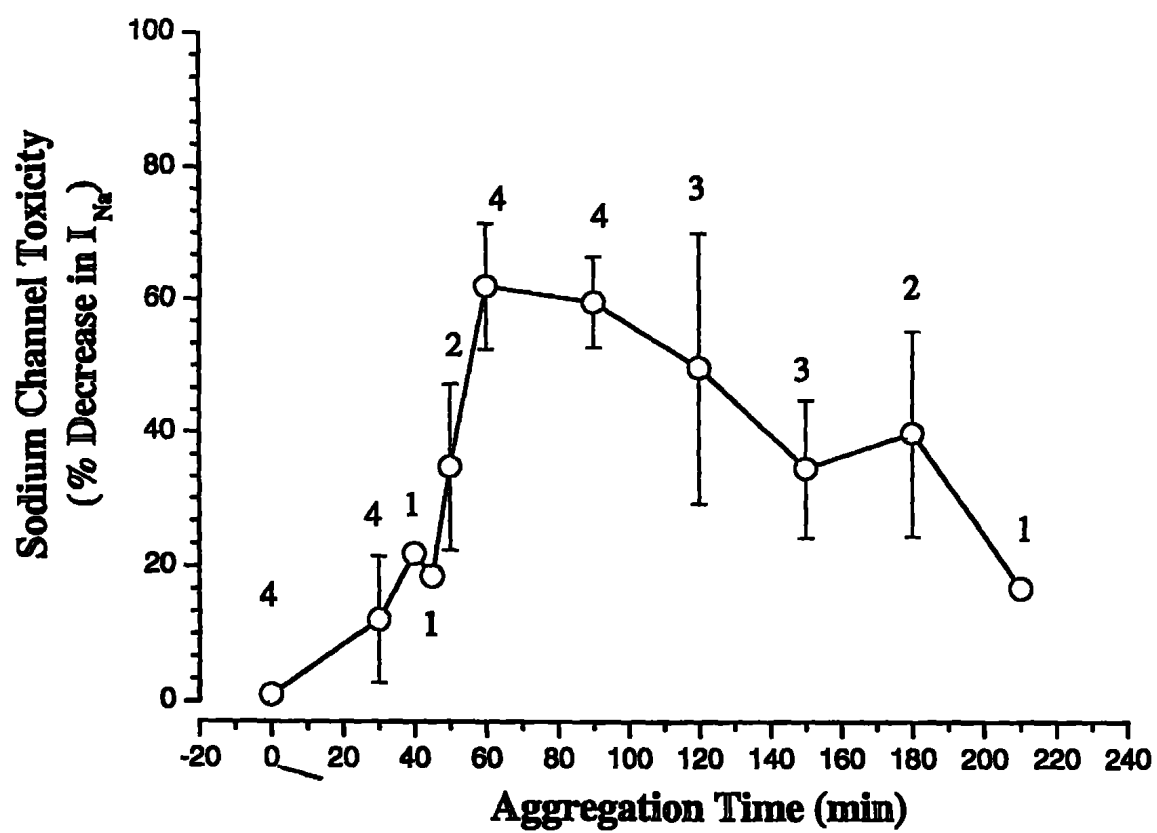


Figure 13

60172032.122399

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Indicacion de que se solicita la concesión de una patente ☒
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- Descripción de la invencion ☒
- Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

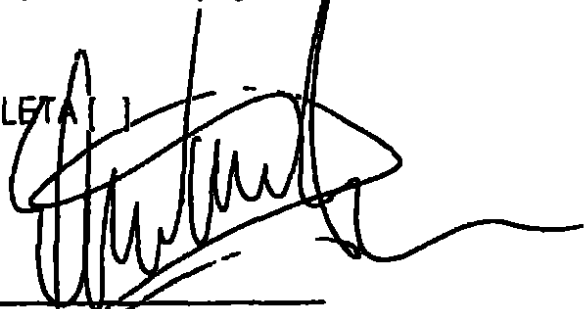
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- Indicacion de que se solicita el registro de un Esquema de trazado ☐
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- Representación gráfica del esquema de trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 03067116 03000000 Folios: 148
 Fecha (AÑO): 2009-12-21 16 31:35
 Trámite: 002 PATENTES D 1 REGISTRO 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
 Conmutador 334 12 21-2-3-4
 Fax 281 31 25 e-mail info@ac.gov.co
 Santa Fe de Bogotá D.C. Colombia

INFORME DE PROTOCOLO

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Expediente 00-97116

Fecha 22 de Marzo del 2001

Se certifica que

Desde fecha 29 de noviembre de 1996 ,
del folio 88676 al folio 88681
del libro de documento N° 305 , obra el
documento N° 17.109 conferido por
PHARMACIA & UPJOHN COMPANY

_____ domiciliado(a) en Kalamazoo,
Michigan, E.U.A.

_____ al doctor JOSE
LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA
y/o AURA DUEÑAS RODRIGUEZ y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO.

Representante en Santafé de Bogotá D C Los
mismos

Facultad para desistir si

Revisado _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 382 2695
E-mail Info@slc.gov.co
Bogotá, D C , Colombia

2020
Bogotá, D C

Doctor
JOSE ANTONIO LLOREDA
Representante

REFERENCIA	Radicación No	00-97116
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No	0887
	Folios	001

L Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000)

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No 210 del 15 de enero del 2001


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

29 MAR. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____

202027/202022

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 382 2695
E-mail Info@slc.gov.co
Bogotá, D C, Colombia