



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 676**

51 Int. Cl.:
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07872378 .0**
96 Fecha de presentación : **17.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118137**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **Péptidos y polipéptidos de estabilidad mejorada útiles para la regeneración del sistema nervioso.**

30 Prioridad: **18.12.2006 FR 06 11005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2011

73 Titular/es: **NEURONAX**
Biopole Clermont-Limagne
63360 Saint-Beauzire, FR

72 Inventor/es: **Gobron, Stéphane**

74 Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

ES 2 363 676 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos peptídicos de estabilidad mejorada cuya secuencia deriva de uno de los dominios de consenso conservados de la SCO-espondina, llamada "repetición de tromboespondina de tipo 1 o TSR", así como a las composiciones farmacéuticas que comprenden a título de principio activo al menos uno de estos compuestos peptídicos novedosos.

Estado de la técnica

10 Las modulaciones de adhesión de las células entre sí o entre las células y el sustrato, así como los fenómenos de atracción / repulsión, son unos mecanismos importantes para la migración de las células, y especialmente, durante las etapas de crecimiento y de guiado de los axones durante el desarrollo del SNC (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996: Varela-Echavarría y Guthrie, 1997). La fasciculación de las neuritas es una etapa importante del desarrollo, ya que interviene en el guiado correcto de los axones hasta su diana, y en su modulación hace intervenir varias moléculas implicadas en los fenómenos de interacción célula-célula o de adhesión celular como las moléculas de adhesión celular de los nervios (N-CAMs), las N-caderinas, las semaforinas o las moléculas de matrices extracelulares como la laminina, la tenascina, los colágenos, la familia de las tromboespondinas, la fibronectina, la vitronectina o los proteoglicanos. Estas diferentes moléculas pueden actuar como inductores o como inhibidores, lo más habitual mediante una unión ligando / receptor.

20 La glicoproteína SCO-espondina es una proteína específica del sistema nervioso central (SNC) de todos los vertebrados. Se sintetiza de forma natural en el órgano subconural y forma parte de la fibra de Reissner presente en el canal central de la médula espinal. La SCO-espondina forma parte de la superfamilia de las tromboespondinas (véase S. Gobron y col., Journal of Cell Science, vol. 109, p. 1053 - 1061 (1996) y J.C Adams y col., Developmental Dynamics, vol. 218, p. 280 - 29 (2000)). Las tromboespondinas se producen en numerosas células sanas. Comprenden tres cadenas de polipéptidos unidos mediante dos puentes disulfuro.

25 La SCO-espondina posee unas homologías con los miembros de esta superfamilia de las tromboespondinas cuyos miembros también se expresan en el SNC: las tromboespondinas 1 y 2, algunas semaforinas, las mindinas o la F-espondina, como ejemplos (S. Gobron y col., Glia, vol 32, p. 177-191 (2000)). La secuencia de todas estas moléculas comprende unos motivos proteicos de consenso denominados repeticiones de la tromboespondina de tipo 1 (TSR).

30 La SCO-espondina comprende aproximadamente 4500 aminoácidos (4560 según S. Gobron y col., Glia, vol 32, p. 177-191 (2000)), y su estructura muestra una disposición única de varios dominios conservados que incluyen veintiséis motivos TSR, nueve dominios de receptores de tipo A de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R), dos dominios de factores de crecimiento de la epidermis (EGF), y unos dominios N-terminal y C-terminal del factor de von Willebrand (vWF) ricos en cisteína, siendo todos unos sitios potenciales para interacciones proteína-proteína (S. Gobron y col., Glia, vol 32, p. 177-191 (2000)). La estructura de la glicoproteína SCO-espondina ha sido descrita, por ejemplo, por A. Meiniel (Microscopie Research and Technique. vol 52, p. 484-495 (2001)).

35 Las tromboespondinas son unos compuestos de las matrices extracelulares que están implicados en un gran número de procesos fisiológicos y que presentan, de forma general, unas propiedades adhesivas o antiadhesivas *in vitro*, sugiriendo su papel en el comportamiento de las células *in vivo*. En efecto, se sospecha que diferentes partes de la molécula interaccionan con otras moléculas de las matrices extracelulares así como con diferentes receptores celulares modulando de este modo los contactos célula-célula (J. C. Adams y col., Molecular Biology Intelligence Unit- ed. R.G. Landes, Company - Springer Verlag, p. 1-188 (1995)). La unión directa de la tromboespondina -1- a células diferentes de varios tejidos tales como las células hematopoyéticas, las células neuronales, las células epiteliales, igualmente ha sido demostrada, así como las modificaciones de su expresión en diferentes patologías, en particular en cánceres, y en los procesos de cicatrización (Adams y col., 1995, citado anteriormente, para revisión). Además, diferentes tipos de neuronas cultivadas *in vitro* en presencia de tromboespondina 1 mostraron unas extensiones neuríticas mayores, este fenómeno puede estar relacionado con la presencia de una parte de la molécula que comprende unos motivos proteicos especialmente denominados "repeticiones de la tromboespondina de tipo 1" o TSR (K. O'Shea y col. Neuron, vol. 7 p. 231-237 (1991)):

40 De hecho, la tromboespondina contiene, entre otros, tres de estos motivos TSR. La función de cada uno de estos motivos ha sido bien estudiada (para una revisión, consultar: H. Chen y col. Matrix Biology, vol. 19 p. 597-614 (2000)) y la cristalización de estos motivos TSR ha proporcionado unos conocimientos suplementarios (K. Tan, The Journal of Cell Biology, vol. 159 (2), 373-3.82 (2002)). Por ejemplo, se ha demostrado que los péptidos que proceden de los tres motivos TSR se unen a los compuestos glicoconjugados sulfatados incluyendo heparina o el sulfátido (patente US 5.357.041) y han resultado ser útiles en las composiciones farmacéuticas para unir los compuestos glicoconjugados.

55 Los motivos TSR son regiones proteicas de aproximadamente 55 residuos, basados en el alineación de aminoácidos conservados de cisteína, triptófano y arginina.

Estos motivos se aislaron en primer lugar en la tromboespondina 1 que es una molécula que interviene en la coagulación, posteriormente se han descrito en otras muchas moléculas con funciones biológicas diversas entre las que se incluyen la unión celular, la movilidad, la proliferación, la agregación celular, la modulación de proteasas o la

inhibición de la angiogénesis (Adams y col., 1995, para revisión).

Así, estos motivos se han observado en:

- la F-espondina, molécula secretada durante el desarrollo embrionario por las células de la capa basal del tubo neural, o "floor plate" (A. Klar y col., Cell, vol. 69, p. 95-110 1992), y que se ha implicado en los fenómenos de adhesión celular y de crecimiento neurítico por medio de diferentes regiones de la proteína (Y. Feinstein y A. Klar, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 36 p. 975-980 2004, D. Schubert, A. Klar y col., Journal of Neurochemistry, vol. 96, p. 444-453 2006, para revisión);
- las semaforinas F y G, miembros de una familia de proteínas secretadas en los medios extracelulares y de membrana, implicadas en los fenómenos de guiado de los axones, pero cuya función exacta aún es bien conocida (A. Varela-Echavarría y S. Guthrie, Gene & Development, vol. 11 p. 545-557 1997, para revisión).

Estos motivos proteicos se han identificado igualmente en otras moléculas expresadas fuera del SNC, tales como la properdina, que es una proteína de unión del sistema del complemento, y que contiene seis TSR (D. Goundis y K. Reid, Nature, vol. 335 p. 82-85 1988).

Estos motivos TRS se han encontrado en diferentes organismos.

Por ejemplo, en la proteína CS, proteína expresada por el "*plasmodium*", vector esporozoíto de la malaria (K. Robson y col., Nature, vol. 335 p. 79-82 1988), se ha demostrado que la presencia de este motivo TSR tiene un papel primordial en la etapa de unión del esporozoíto a la célula hospedadora (Tewari R. y col., The Journal of Biological Chemistry, vol. 277, p.47613-47618, 2002).

Igualmente, en una molécula que interviene en el crecimiento axonal, en el nematodo *C. elegans*, denominada Une-5 (E. Hedgecock y col., Neuron, vol. 2, p. 61-85 (1990)), y en la que la mutación de su gen origina unos defectos en el guiado de los axones en *C. elegans* (C. Leung-Hagesteijn y col., Cell, vol. 71, p. 289-299 1992).

Además, se ha demostrado que la tromboespondina es especialmente abundante en los haces de fibras en desarrollo y en las regiones de crecimiento de los axones, lo que sugiere por tanto un papel en el establecimiento de un entorno favorable que permita el crecimiento de los axones (K. S. O'Shea y V. M. Dixit, The Journal of Cell Biology, vol. 107 p. 2737-2748 (1988)).

En la tromboespondina, de forma general, se ha demostrado que los motivos TSR pueden estar implicados en los mecanismos de modulación de la adhesividad celular; este fenómeno puede tener un papel en el crecimiento neurítico y en el guiado axonal.

Por lo que respecta al efecto de la tromboespondina 1 sobre la inducción de las extensiones neuríticas, se ha sugerido la intervención de receptores específicos presentes en la superficie de las células nerviosas. De este modo, los anticuerpos específicamente dirigidos contra la integrina $\alpha\beta 1$ han permitido inhibir el crecimiento neurítico de neuronas simpáticas cultivadas sobre tromboespondina-1 (M. De Freitas y col., Neuron, vol. 15 p. 333-343 (1995)).

Es sabido de una manera general que algunos fragmentos peptídicos de la tromboespondina, así como algunos péptidos sintéticos cuya estructura es análoga a la de estos fragmentos peptídicos, muestran una actividad biológica similar a la de la tromboespondina. A título de ejemplo, las patentes US 6.239.110 (W. R. Grace & Co. - Conn. y Facultad de Medicina de PA), US 5.840.692 (Facultad de Ciencias de la Salud de Allegheny y W.R. Grace, Co. - Conn.), US 5.849.701 (Estados Unidos de América), US 5.491.130 y US 6.051.549 (Estados Unidos de América), US 5.190.918 y US 5.200.397 (W.R. Grace & Co. - Conn. y Facultad de Medicina de Pennsylvania), y US 6.384.189 describen la estructura y los efectos biológicos de varios de estos fragmentos peptídicos deducidos de la tromboespondina y de sus análogos sintéticos.

Pero se sabe también que los péptidos específicamente deducidos de la SCO-espondina presentan una actividad biológica sobre las células nerviosas (solicitud de patente WO 99/03890), y que la SCO-espondina actúa sobre las células mediante un receptor celular específico que difiere de los anteriormente descritos para la tromboespondina (M. Bamdad y col., Cell & Tissue Research, vol. 315, 15-25 (2004)).

Las características detalladas de estos motivos TSR son ahora bien conocidas en la actualidad.

De este modo, las propiedades de unión celular, de unión a la heparina, a la fibronectina o al factor de crecimiento transformante β (TGF β) se han informado para determinadas secuencias específicamente presentes dentro del dominio TSR (Adams y col., 1995, para revisión).

Las propiedades de adhesión que confiere la secuencia peptídica V-T-C-G (SEQ ID N° 11) igualmente también se han demostrado en el caso de la proteína CS del *plasmodium* (K. Rich y col., Science, vol. 249 p. 1574-1577 1990), o sus variantes, V-S-C-G (SEQ ID N° 12) y A-T-C-G (SEQ ID N° 13), en la función biológica de la properdina (C. Prater y col., The Journal of Cell Biology, vol. 112 p. 1031-1040 1991).

La secuencia V-T-C-G (SEC ID N°11) de la tromboespondina puede unirse al receptor CD 36 o gpIV de las plaquetas.

La secuencia R-G-D-A (SEQ ID N° 14) puede unirse a la integrina $\alpha\beta 3$ y la región carboxiterminal puede

unirse al receptor heterodimérico 105/80 kDa.

La secuencia B-B-X-B (SEQ ID N° 15) (en la que B es un aminoácido básico y X un aminoácido cualquiera) puede unirse a los proteoglicanos (W. A. Frazier, Current Opinion in Cell Biology, vol. 3, P. 792-799 1991, Adams y col., (1995)).

5 Es sabido que los motivos W-S-X-W (SEQ ID N° 16) C-S-X-X-C-G (SEC ID N°17) o V-T-C-G (SEC ID N°11) tienen cada uno de ellos actividades biológicas diferentes.

10 El motivo W-S-X-W (SEQ ID N° 16) se ha revelado como capaz de unir la heparina y los proteoglicanos permitiendo de este modo un efecto biológico variable dependiendo del tipo de células. Igualmente se ha revelado que este motivo interviene en el proceso de activación del TGFβ mediante la tromboespondina-1. Aunque esta actividad ha sido atribuida a una región por encima de este motivo en el dominio TSR, la presencia de este motivo W-S-X-W (SEQ ID N° 16) parece necesaria, pero no suficiente por sí misma, para esta activación de la citocina, que entonces podría intervenir en diferentes sucesos biológicos tales como la inflamación, la angiogénesis o el desarrollo embrionario (G. D. Young y J. E. Murphy-Ulrich, The Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 47633-47642 (2004)). Esta propiedad del W-S-X-W (SEQ ID N° 16) de tener afinidad por la heparina o por los proteoglicanos parece igualmente intervenir en las propiedades antiangiogénicas de la tromboespondina-1, ya que este motivo parece actuar como competidor de diferentes factores de crecimiento proangiogénicos debido a su unión a los proteoglicanos presentes en la superficie de las células endoteliales (T. Vogel y col., The Journal of Cellular Biochemistry, vol. 53 p. 74-84 (1993)). En efecto, una de las actividades de las tromboespondinas particularmente estudiada es su capacidad de inhibir la neovascularización. Estudios diferentes han tratado de identificar la región de la molécula responsable de esta actividad (para una revisión consultar M.L. Iruela-Arispe, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol 36 p. 1070-1078(2004)).

25 A título de ejemplo, se puede citar a S.S. Tolsma y col. (The Journal of Cell Biology, vol. 122 p.497-511 (1993)) quien ha mostrado que la actividad antiangiogénica de la tromboespondina-1 estaba localizada en dos regiones diferentes. De este modo, la actividad de la molécula podría reproducirse *in vitro* e *in vivo* con diferentes péptidos sintéticos, y concretamente dos secuencias deducidas del dominio TSR y que tienen en posición central el motivo C-S-V-T-C-G (SEC ID N°19).

Estudios posteriores determinaron con precisión que esta actividad de inhibición de la neovascularización mediante la tromboespondina-1 se podía desarrollar según dos mecanismos diferentes que hacen intervenir dos regiones diferentes del TSR:

- una región que contenga el motivo W-S-X-W (SEC ID N° 16), y
- 30 – otra región que contiene el motivo C-S-V-T-C-G (SEC ID N°19) (M.L. Iruela-Arispe, Circulation, vol. 100 p.1423-31 (1999)).

35 Se sabe igualmente que en el caso de los péptidos que contienen el motivo W-S-X-W (SEC ID N°16), la constitución exacta del aminoácido variante (X) o de los aminoácidos adicionales situados hacia arriba o abajo de este motivo es importante para la actividad del péptido. Es este el caso concreto de la eficacia de la unión a la heparina y de la inducción de la adhesión celular que aparecen aumentadas mediante un pentapéptido en el que X es prolina (P) o en péptidos más grandes que contengan unos aminoácidos básicos alrededor del motivo W-S-X-W (SEC ID N°16) (N.H. Guo, The Journal of Biological Chemistry, vol. 267 p.19349-55 (1992)).

40 Igualmente, este es el caso de la unión con la fibronectina que es más importante para los péptidos que contienen dos residuos de glicina (G) hacia arriba del motivo W-S-H-W (SEC ID N°20) (J.M. Sipes. The Journal of Cell Biology, vol. 121 p. 469-477 (1993)).

Igualmente, las capacidades de los dominios TSR para intervenir en los fenómenos de adhesión celular se deberían esencialmente a la presencia del motivo W-S-X-W (SEC ID N°16) y no a la de C-S-X-X-C-G (SEC ID N°17).

45 Sin embargo, se han obtenido resultados respecto a la implicación de este último motivo, C-S-X-X-C-G (SEC ID N°17), en la unión de los TSR a las células. De este modo, Tuszyński y col. confirmaron trabajos anteriores, mostrando que C-S-V-T-C-G (SEC ID N°19) y sus derivados eran importantes para la interacción en los fenómenos de adhesión celular (The Journal of Cell Biology, vol. 116 p. 209-217 (1992)), mientras que Gantt y col. mostraron que los aminoácidos básicos situados hacia abajo del motivo C-S-V-T-C-G (SEC ID N°19), una variante de C-S-X-X-C-G (SEC ID N°17) eran necesarios para el enlace directo del dominio TSR a las células (S.M. Gantt. The Journal of Biological Chemistry, vol. 272 p. 19205-19213 (1997)). Debe resaltarse que estos últimos autores sugieren igualmente que los procesos de adhesión de las moléculas de tromboespondina por los dominios TSR se desarrollarían en varias etapas, en las que:

- la primera consistiría en un enlace entre W-S-X-W (SEQ ID N° 16) a los proteoglicanos presentes en la superficie celular, y
- 55 – la segunda consistiría en el reconocimiento mediante C-S-X-X-C-G (SEQ ID N° 17) de un receptor celular específico.

Además, en otros sistemas celulares:

- el péptido W-S-P-W-S (SEC ID N°18) puede afectar al crecimiento neurítico de neuronas embrionarias de rata *in vitro* (D. Osterhout y col., Annual Meeting - Washington (1993)),
- el péptido C-S-V-T-C-G (SEC ID N°19) se ha demostrado claramente como el responsable del fenómeno de unión celular de la proteína CS del *plasmodium* a las células hematopoyéticas (K.A. Hich, Science, vol. 249 p.1574-1517 (1990)), habiéndose considerado incluso que la región de la molécula que contiene este motivo tenía un papel crítico en la infectividad del *plasmodium in vivo* (K. Tewari, The Journal of Biological Chemistry, vol. 277p. 47613-4761B (2002)). De lo anterior se puede deducir que la presencia del motivo C-S-X-X-C-G (SEC ID N°17) era realmente necesaria para la fijación y la actividad del dominio TSR que se deriva.

Es sabido igualmente que todas las actividades biológicas de las tromboespondinas, y de la tromboespondina 1 en particular, no se deben únicamente a la presencia de estos dominios TSR ya que otras regiones, y especialmente la región carboxiterminal de esta proteína, contienen unos motivos de naturaleza diferente, que igualmente están implicados en los diferentes fenómenos de adhesión, migración o proliferación celular (para una revisión, consultar J. C. Adams, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol. 36 p. 1102-1114 (2004)). Esto es análogo para las restantes moléculas que contienen los motivos TSR para las que finalmente se ha determinado la vinculación de sus actividades a otros dominios funcionales diferentes de los TSR. De esta forma, como ejemplo, la F-espondina ha demostrado en primer lugar las capacidades de inducir el crecimiento neurítico *in vitro*, capacidades que se sugirieron por la caracterización de motivos TSR en su secuencia (Klar y col. 1992). Sin embargo, trabajos experimentales posteriores demostraron que los anticuerpos específicamente dirigidos contra los dominios TSR de la F-espondina no bloqueaban la actividad de inducción del crecimiento neurítico observado al cultivar neuronas en presencia de F-espondina, mientras que los anticuerpos dirigidos contra otro dominio de esta molécula y denominado "espondina" sí resultaron bloqueantes (T. Burstyn-Cohen y col., The Journal of Neuroscience, vol. 18 p.8875-8885 (1998)), lo que sugiere por tanto que la presencia de estos motivos TSR en una molécula no significa obligatoriamente una actividad de inducción de crecimiento neurítico.

Este es el caso igualmente de Une-5, en la que no se ha establecido claramente el papel exacto de los dominios TRS, aunque aparentemente son importantes para la función de la proteína natural tanto *in vitro* como *in vivo* (R.P. Kruger, The Journal of Neuroscience, vol. 24 p. 10826- 10834 (2004)).

Siendo tan numerosos los motivos TSR en la secuencia de la SCO-espondina, se ensayó la actividad biológica de un péptido de síntesis cuya secuencia de aminoácidos:

W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1),

corresponde a la secuencia más representativa de un motivo TSR de la SCO-espondina, en modelos de cultivos de células nerviosas, concretamente las células B104, procedentes de un neuroblastoma de rata. Los resultados obtenidos muestran que el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) desencadena una diferenciación celular: induce el crecimiento neurítico y la agregación celular (véase H. Monnerie y col., Cell Tissue Res., vol. 293, p. 407 - 418 (1998); véase F. El-Bitar y col., Cell Tissue Res., vol. 304, p. 361-369 (2001); véase la solicitud de patente WO 99/03890 (Universidad de Auvergne) y especialmente la secuencia SEQ ID N° 8 del presente documento).

En particular, Gobron y col. (Glia, vol. 32, p. 177-191 (2000)) han demostrado que para el modelo elegido, el efecto del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) sobre el crecimiento neurítico depende de la dosis de péptido utilizado. En estas experiencias, las células de la línea B104 se sembraron en pocillos de cultivo y posteriormente se pusieron en contacto con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEQ ID N° 1) en un intervalo creciente de concentraciones de péptido.

Tras 18 horas de cultivo, en ausencia de suero, las células comenzaron a esbozar una o dos prolongaciones neuronales, y esto independientemente de la presencia o ausencia de péptido.

Tras tres días de cultivo, se observaron crecimientos neuríticos importantes en las células tratadas con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), mientras que en los cultivos testigo (sin péptido), las células no mostraban prácticamente ninguna excrecencia neurítica.

Los autores han constatado que esta respuesta de las células B104 era proporcional a la concentración de péptido agregada al medio. En efecto, el número de neuritas y el tamaño de la neurita más larga por célula aumentarían progresivamente con el aumento de las concentraciones de péptido.

La observación morfológica del crecimiento neurítico y de la agregación celular descrita por F. El-Bitar y col. (Cell and Tissue Research vol. 304, 361-369 (2001)) ha demostrado que el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) induce un aumento:

- del número de neuritas, así como
- del tamaño de la neurita más larga

mientras que en los cultivos testigos no se observó ningún cambio celular.

En efecto, durante las primeras veinticuatro horas, las células B104 quedaron extendidas en los cultivos tratados y testigos.

En los pocillos tratados con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), los autores notaron; tras 2 días de cultivo, que las células mostraban importantes extensiones neuríticas. Estas extensiones estaban aún más marcadas al tercer día de cultivo. Sin embargo, en los cultivos testigo, las células solo mostraron unas pocas modificaciones morfológicas.

5 A partir de 3 o 4 días de cultivo en presencia del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), los autores pudieron observar la aparición de agrupamientos de estas células B 104 diferenciadas, y era imposible distinguir las propias neuritas de cada célula. Posteriormente, estos agrupamientos celulares se acentuaron a los 5 días de cultivo, y dieron origen a unos pequeños cúmulos densos, unidos entre sí por haces neuríticos, tras el sexto día de cultivo.

10 En los cultivos testigo, no apareció ningún agrupamiento celular, las células constituían un tapiz celular homogéneo en el fondo de los pocillos.

Resulta evidente, entonces, que el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) tiene actividades biológicas interesantes sobre las células del sistema nervioso, lo que le convierte en un buen fármaco candidato para el tratamiento de determinadas patologías del sistema nervioso.

15 Se ha demostrado que el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) actúa por medio de un receptor específico presente en la superficie de las células, activando este una cascada intracelular que conduce a modificaciones morfológicas, siendo una en particular la inducción del crecimiento neurítico. Esta cascada provoca la intervención, en función del tiempo, una cinética de diferentes compañeros moleculares sucesivos (tales como las fosforilasas, que constituyen los microfilamentos) que finalmente conduce a la formación de las extensiones nerviosas.

20 Este efecto del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) se ha demostrado igualmente como dependiente de la dosis empleada: pudiendo caracterizarse la dosis óptima dependiendo del sistema celular (células nerviosas primarias o células procedentes de líneas) utilizado. Igualmente, parece que se podría obtener una optimización del efecto de este péptido si este se administra regularmente a la célula diana. De este modo, parece que cuando este péptido se agrega diariamente al medio de cultivo de células nerviosas a su dosis óptima, el efecto observado se acentúa.

25 Sin embargo, la presente invención ha encontrado que la estabilidad del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), constituido por 12 aminoácidos naturales, disminuye con el tiempo en disolución acuosa. Por tanto, es posible que el péptido tenga que prepararse extemporáneamente respecto de los tratamientos.

30 En determinadas situaciones, esto podría complicar la administración del medicamento a los pacientes, y de una manera general, presentar algún inconveniente para el desarrollo de conceptos terapéuticos basados en este péptido.

La presente invención desea mejorar la estabilidad del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) en disolución acuosa.

Descripción de las figuras

35 la fig. 1 muestra la pureza de los péptidos en % determinado mediante HPLC tras una duración de almacenamiento determinada a 22°C;

la fig. 2 muestra un resultado comparativo de la actividad biológica de los tres péptidos;

● Péptido A = el péptido de secuencia SEC ID N°2 que se muestra en la forma: W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-NH₂;

40 ● Péptido TSR N° 1 = el péptido de secuencia SEC ID N°1 que se muestra en la forma: W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G-OH;

● Péptido TSR N° 2 = el péptido de secuencia SEC ID N°1 que se muestra en la forma: W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G-NH₂.

Las concentraciones de péptido se expresan para un volumen total de 200 µl por pocillo. El testigo es un cultivo celular en medio desprovisto de suero.

45 la fig. 3 muestra un resultado comparativo del número de brotaciones por célula tras 3 días de cultivo;

la fig. 4 muestra un resultado comparativo del número de neuritas por célula tras 3 días de cultivo;

la fig. 5 muestra la longitud del crecimiento neurítico tras 3 días;

50 las figs. 6 y 7 muestran los resultados obtenidos con los compuestos peptídicos con SEC ID N° 4 para un grupo de control de ratas que habían experimentado una lesión de la médula espinal, sin tratamiento (curva 1), y con una concentración del péptido de 0,8 mg/ml (curva 2) o 0,22 mg/ml (curva 3). La figura 7 muestra el número de ratas que estaban tras 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas sin control vesical. La figura 6 muestra, en unidades arbitrarias, el tamaño de la vejiga urinaria tras 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas.

En las figuras 3, 4 y 5, las concentraciones de péptido se expresan para un volumen total de 200 µl por pocillo. El testigo representa un cultivo de células en un medio desprovisto de suero.

Objeto de la invención

5 Un primer objeto de la presente invención es un compuesto peptídico que contiene como mínimo la secuencia en aminoácidos siguiente:

X2-G-W-S-S-X 1-S-X3 (SEC IDN° 10)

en la que

X 1 es C o Abu;

X2 es W-S o W-Abu o L-Nal2-S;

10 X3 es R-S, R-Abu o K-(iPr)-S;

estando caracterizado dicho compuesto en que la secuencia (SEC ID N° 10) se selecciona entre el grupo constituido por las secuencias:

W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S (SEC ID N° 4)

W-S-G-W-S-S-C-S-R-Abu (SEC ID N° 5)

15 **W-S-G-W-S-S-C-S-K-(iPr)-S (SEC ID N° 6)**

W-Abu-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 7)

L-Nal2-S-G-W-S-S-G-S-R-S (SEC ID N° 8).

Un segundo objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como principio activo al menos uno de los compuestos peptídicos indicados anteriormente como primer objeto.

20 Un tercer objeto de la invención es la utilización, y especialmente el uso extracorporal, de los compuestos peptídicos indicados anteriormente como primer objeto en la regeneración de células del sistema nervioso.

Un cuarto objeto de la invención es la utilización de los compuestos peptídicos indicados anteriormente como primer objeto para la preparación de los medicamentos, y especialmente, para la realización de medicamentos, destinados al tratamiento de dolencias neurodegenerativas y/o para la regeneración de la médula espinal o de los nervios periféricos tras un traumatismo.

25 Un quinto objeto de la invención es un aditivo para cultivos celulares de células nerviosas, caracterizado porque contiene al menos uno de los compuestos peptídicos indicados anteriormente como primer objeto.

Este aditivo puede utilizarse en un soporte para el cultivo de células nerviosas, lo que constituye el sexto objeto de la invención.

30 Descripción de la invención

1. Definiciones

En el marco de la presente invención, los autores entienden por "aminoácido": los aminoácidos naturales y los aminoácidos no naturales.

35 Los aminoácidos "naturales" comprenden la forma de los aminoácidos L que pueden encontrarse en las proteínas de origen natural, es decir: alanina (A), arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), cisteína (C), glutamina (Q), ácido glutámico (E), glicina (G), histidina (H), isoleucina (I), leucina (L), lisina (K), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y) y valina (V).

40 Los aminoácidos "no naturales" que comprenden la forma D de los aminoácidos naturales, las formas *homo* de algunos aminoácidos naturales (tales como: arginina, lisina, fenilalanina y serina), y las formas *nor* de la leucina y de la valina. Comprenden igualmente los aminoácidos sintéticos tales como:

Abu ácido 2-aminobutírico $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$

iPr isopropilisina $(\text{CH}_3)_2\text{C-NH}-(\text{CH}_2)_4\text{-CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$

Aib ácido 2-aminoisobutírico

F-trp N-formil-triptófano

45 Orn ornitina

Nal2 2-naftilalanina

Se entiende por "crecimiento neurítico": el alargamiento, es decir, el crecimiento de las prolongaciones de las neuronas, tanto la prolongación axonal como dendrítica.

Se entiende por "agregación" el reagrupamiento de las células que forman un cúmulo.

5 Se entiende por "defasciculación": el resultado de una disminución de la adherencia entre neuritas, lo que conduce a una red suelta de prolongaciones neuronales.

Los "compuestos peptídicos" comprenden especialmente péptidos y polipéptidos".

2. Descripción detallada de la invención

10 El inventor ha encontrado que una modificación de la secuencia en el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) puede conducir a la mejora de su estabilidad, salvaguardando al mismo tiempo una actividad biológica comparable o incluso superior a la del péptido de partida. Más concretamente, la secuencia:

X2-G-W-S-S-XI-S-X3 (SEC ID N° 10)

en la cual:

- X1 significa bien C bien Abu, y
- X2 significa bien W-S, bien W-Abu, bien adicionalmente L-Nal2-S, y
- 15 - X3 significa R-S, R-Abu o K=(iPr)-S, estando dicho compuesto caracterizado porque la secuencia (SEC ID N° 10) se selecciona entre el grupo constituido por las secuencias:

W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S (SEC ID N° 4)

W-S-G-W-S-S-C-S-R-Abu (SEC ID N° 5)

W-S-G-W-S-S-C-S-K-(iPr)-S (SEC ID N° 6)

20 **W-Abu-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 7)**

L-Nal2-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 8),

muestra, con respecto a la secuencia inicial (SEC ID N° 1) a la vez:

- una estabilidad en disolución mejorada, y
- una buena actividad biológica.

25 2.1 Diseño de nuevos péptidos

Sobre la base de la idea que la inestabilidad del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) podría ser debida a un cambio de conformación, y concretamente ligado a las interacciones entra las dos unidades de cisteína de la secuencia, el inventor ha pensado inicialmente en dos primeros péptidos A y B:

- El péptido A tiene la secuencia lineal

30 **W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 2),**

en la cual con respecto a la secuencia inicial W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), se han suprimido los dos últimos aminoácidos cisteína y glicina.

Se ha preparado según los estándares habituales en la forma:

NH₂-W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-COOH.

- 35 - El péptido B tiene la secuencia lineal:

W-S-G-W-S (SEC ID N° 3),

que corresponde a un motivo proteico de consenso descrito en la bibliografía pero que no parece intervenir en los fenómenos de crecimiento neurítico.

Se ha preparado en la forma NH₂-W-S-G-W-S-COOH.

40 Se ha indicado que el péptido A de secuencia W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N°2) no contiene el motivo B C-S-V-X-C-G (SEC ID N° 21) descrito ampliamente como interviniente en los fenómenos de adhesión celular (ejemplo, la malaria).

Se han realizado igualmente dos manipulaciones con respecto al péptido A que han mostrado resultados significativos.

45 En efecto, se ha demostrado que dicho péptido A, aunque flanqueado por los dos aminoácidos terminales

cisteína y glicina implicados en el motivo de consenso C-S-V-X-C-G (SEQ ID N° 21), ha conservado su actividad biológica.

5 Parece, entonces, que el efecto inicialmente observado por el péptido de secuencia W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) haga intervenir un mecanismo diferente del clásicamente descrito para moléculas que tengan motivos de ese tipo y en las que el motivo C-S-V-X-C-G (SEC ID N° 21) se ha descrito como responsable de la actividad biológica.

Así, con el fin de comparar la estabilidad de los diferentes péptidos derivados del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), se prepararon otros péptidos de la secuencia:

X2-G-W-S-S-X1-S-X3 (SEC ID N° 10)

10 se han preparado:

W-SG-WS-S-Abu-S-R-S (SEC ID N° 4)

W-S-G-W-S-S-C-S-R-Abu (SEC ID N° 5)

W-S-G-W-S-S-C-S-K-(iPr)-S (SEC ID N° 6)

W-Abu-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 7)

15 **L-Nal2-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 8)**

Se debe indicar que todos los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención pueden obtenerse por los distintos modos de síntesis química para péptidos, como la síntesis sobre soporte sólido, por ejemplo.

20 Igualmente, se pueden obtener mediante unos sistemas de expresión y de construcciones genéticas que incluyan una secuencia o un fragmento de ADN, que pueda codificar los compuestos peptídicos descritos de acuerdo con la invención.

De forma general, estos compuestos peptídicos o polipeptídicos pueden obtenerse mediante cualquier sistema procarionta o eucariota en el cual la correspondiente secuencia de ácidos nucleicos, que puede expresar dichos péptidos o polipéptidos, se ha introducido de manera que se pueda recoger su producto de expresión.

25 Se prefiere en el marco de la presente invención muy especialmente de los compuestos peptídicos o polipeptídicos que contienen al menos 150 aminoácidos, y aún más especialmente como máximo 100 aminoácidos, salvo si dicho péptido o polipéptido contiene:

varias veces una misma secuencia según X2-G-W-S-S-X1-S-X3 (SEQ ID N° 10), o

- diferentes secuencias según X2-G-W-S-S-X1-S-X3 (SEC ID N° 10), o
- una secuencia derivada de la misma, tal como la secuencia

30 Igualmente, se pueden utilizar los péptidos que contienen la secuencia según X2-G-W-S-S-X1-S-X3 (SEC ID N° 10) o en una secuencia derivada de la misma.

2.2 Determinación de la estabilidad de los péptidos:

Los péptidos sintéticos se pusieron en disolución acuosa (1,5 mg de péptido disuelto en 1000 µl, de agua estéril).

35 Su pureza fue probada mediante HPLC, siendo ella de al menos un 97,0%.

A continuación, estas disoluciones fueron diluidas: a 0,4 ml de cada una de estas disoluciones se agregó 1,1 ml de agua purificada.

Estas disoluciones se colocaron en una estufa a 22°C y 50% de humedad relativa, y analizadas tras: 0, 3, 7, 11 y 22 días.

40 El análisis se realizó mediante HPLC en gradiente de fase inversa a una concentración de 0,4 mg/ml, con los parámetros siguientes:

- cartucho Symétrie RP18 (Waters) 125 x 4,6 mm
- fases móviles
- A: H₂O + TFA 0,1 % (p/v)
- 45 - B: Acetonitrilo + TFA 0,1 % (v/v)
- detección: 210 nm
- caudal: 1 ml/min

- volumen de inyección: 20 µl de disolución (es decir, 8 µg de péptido)
- gradiente:

	A	B
0 min	90%	10%
25 min	40%	60%
26 min	90%	10%
40 min	90%	10%

5 Las muestras se colocaron en una estufa a 22°C y 50% de humedad relativa, y analizadas tras: 0 días, 3 días, 7 días, 11 días y 22 días.

Los resultados se presentan en la Tabla 1 y en la Figura 1.

El parámetro "TR" expresa el tiempo de retención del péptido en minutos en la columna del HPLC.

El parámetro "Pureza" expresa la pureza del péptido en % según se ha determinado mediante HPLC.

10 La columna "Impurezas: TR es %" indica para el pico suplementario más intenso, el tiempo de retención en minutos y el porcentaje en masa. La columna SEC indica el número de la secuencia (SEC ID N° X).

Tabla 1

SEC	Tras 0 días		Tras 3 días			Tras 7 días		
	TR [min]	Pureza [%]	TR [min]	Pureza [%]	Impurezas: TR [min] y %	TR [min]	Pureza [%]	Impurezas: TR [min] y %
SEC 1	12,2	79,8	12,1	57,9	11,5 / 28,9%	12,3	22,4	11,6 / 61,4%
SEC 2	11,7	97,0	11,7	75,0	13,7/ 20,5%	11,8	50,9	13,7 / 40,4%
SEC 4	11,6	99,9	11,6	99,8	-	11,7	99,6	-
SEC 5	12,8	97,9	12,8	89,7	14,7 / 9,3%	12,9	72,5	14,8 / 22,5%
SEC 6	12,2	98,0	12,1	91,5	14,1 / 6,9%	12,3	78,5	14,2 / 16,7%
SEC 7	12,6	96,0	12,5	85,2	14,9 12,1%	12,7	66,3	15,1 / 26,2%
SEC 8	13,4	98,6	13,4	92,3	15,7 / 5,8 %	13,5	79,4	15,8 / 15,7%

Tabla 1 (Continuación)

SEC	Tras 11 días			Tras 22 días		
	TR [min]	Pureza [%]	Impurezas: TR [min] y %	TR [min]	Pureza [%]	Impurezas: TR [min] y %
SEC 1	12,2	1,7	11,5 / 76,7%	12,0	0,21	11,5 / 80,9% 14,0 / 6,5%
SEC 2	11,9	35,7	13,9 / 52,8%	11,8	19,0	13,8 / 63,6%
SEC 4	11,5	99,5	-	11,7	37,6	12,9 / 32,8%-
SEC 5	12,8	61,4	14,7 / 29,5%	12,9	44,7	14,8 / 45,6%
SEC 6	12,1	63,2	14,0 / 28,2%	12,2	42,1	14,1 / 37,4%
SEC 7	12,6	60,5	14,9 / 33,0%	12,6	38,3	15,0 / 49,3%
SEC 8	13,4	63,4	15,6 / 27,5%	13,5	38,1	15,7 / 47,3%

Los resultados obtenidos (Fig. 1) muestran claramente que los análogos son por lo general más estables que el péptido de (SEC ID N°1) que se degrada más rápido. Esta degradación es principalmente debida a un cambio de conformación (ciclización).

5 2.2 Determinación *in vitro* de la actividad biológica de los péptidos en las células nerviosas de rata

La actividad biológica de los diferentes péptidos fue analizada por adición de cada uno de los péptidos en los cultivos de las células nerviosas y seguido por las modificaciones morfológicas de dichas células.

10 Entre los péptidos de acuerdo con la invención, la secuencia W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S (SEC ID N° 4) finalmente fue preferida mediante la sustitución del aminoácido cisteína por el aminoácido ácido 2-aminobutírico (Abu); lo que permitiría impedir las posibles interacciones entre dos péptidos mediante la formación de puentes entre cadenas. Sintetizado de la manera convencional bajo la forma de un péptido que tiene los extremos NH₂ y -COOH terminales, este péptido no se mostró eficaz para la inducción del crecimiento neurítico.

15 En cualquier caso, y de forma sorprendente, la actividad de inducción de esta secuencia fue recuperada cuando el extremo carboxiterminal fue sustituido por un extremo aminado. De esta forma, el péptido de secuencia NH₂-W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S-NH₂ resultó activo. Debe resaltarse que esta sustitución del extremo carboxiterminal por el extremo aminado no tiene ninguna incidencia sobre el efecto del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1). Los resultados se indican en la figura 2.

a) Materiales y procedimientos

20 Las células de la línea B104, obtenidas de neuroblastoma de rata, se cultivaron a razón de 1000 células por pocillo en placas de 48 pocillos anteriormente revestidas de polilisina (suministrada por Sigma-Aldrich), en un medio Eagle modificado por Dubelco (DMEM), suplementadas con glutamina y antibiótico, y con adición de un 10% de suero de ternera fetal durante la fase de adhesión. A continuación, el medio se sustituyó por un medio DMEM nuevo que no contenía suero y que permitía la diferenciación de las células. Tras el tratamiento, es decir, tras la adición del compuesto a ensayar, las células se mantuvieron en cultivo a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 10%. La evaluación de la morfología celular y la proliferación se siguieron mediante examen microscópico con contraste de fase a diario durante el periodo de cultivo. Se midió entonces la diferenciación celular, y en concreto el efecto sobre el crecimiento neurítico.

b) Efecto sobre la adhesión celular de los péptidos

30 La adhesión de las neuronas a su sustrato es una etapa clave en el proceso de crecimiento neurítico. Es importante resaltar que 24 horas después de la adición de los péptidos de acuerdo con la invención, la dispersión del cuerpo celular se favorece en los pocillos tratados con los péptidos mientras que, en los cultivo testigo, las células son esencialmente fusiformes.

Además, se puede observar que este efecto está presente tanto para las células tratadas con el péptido W-S-G-W-S-8-C-S-FI-SC-G (SEC ID N° 1) como para las células tratadas con el péptido W-S-G-W-S-S-C-8-R-S (SEC ID N°2) y los péptidos de acuerdo con la invención.

35 c) Efecto dosis-respuesta

Al cabo de 24 horas de inicio del cultivo, las células comienzan a mostrar el esbozo de una o dos prolongaciones neuronales, independientemente de la presencia o de la ausencia de los péptidos.

40 Tras 3 días de cultivo, se observaron crecimientos neuríticos importantes en las células cultivadas en presencia de los péptidos W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), W-8-G-W-S-S-C-S-R-S (SEQ ID N° 2) y los péptido de acuerdo con la invención, mientras que los cultivos testigo mostraron solo unos pocos crecimientos neuríticos, durante este periodo de cultivo y se presentan en forma de haz característico.

Para los péptidos biológicamente activos, la respuesta de las células B104 es proporcional a la concentración de péptido presente en el medio de cultivo, análogamente para el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) de referencia que para el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N°2) y los péptidos de acuerdo con la invención.

45 En efecto, el número de brotaciones y de neuritas, así como el tamaño de la neurita más larga por célula aumentan con la concentración de péptido activo.

En las condiciones de este ensayo, el péptido W-S-G-W-S (SEC ID N° 3) no tiene efecto biológico.

d) Medición del número de brotaciones por célula

50 Las células tratadas mediante los péptidos de acuerdo con la invención o mediante los péptidos W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1) y W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 2) muestran un aumento del número de brotaciones, mientras que se aprecian pocos botones de extensión neurítica en el cultivo testigo.

Al cabo de 3 días de cultivo, los cultivos testigo muestran aproximadamente un brotación por célula, mientras que en los cultivos tratados con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), las células muestran aproximadamente 1,5 brotaciones de media.

Igualmente, y por comparación, el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 2) parece tan activo como el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1).

El efecto dosis-respuesta igualmente se observó con este péptido (Figura 3).

Por el contrario, el péptido W-S-G-W-S (SEC ID N° 3) parece no tener ninguna actividad de inducción durante las experimentaciones efectuadas.

e) Medición del número de neuritas por célula

Se observó un efecto inductor del crecimiento neurítico en presencia de los péptidos W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N°2) y de los péptidos de acuerdo con la invención, con respecto al testigo.

No se observa ningún efecto en presencia del péptido W-S-G-W-S (SEC ID N° 3).

Igualmente, al cabo de 3 días de cultivo, las células tratadas muestran de media más del doble de neuritas por célula con respecto a los cultivos testigo (Figure 4).

f) Medición de la longitud del crecimiento neurítico

La medición de las prolongaciones neuríticas muestra una simulación del fenómeno de crecimiento neurítico en las células tratadas mediante los péptidos con respecto a las células testigo.

Así, tras 3 días de cultivo, en los cultivos testigo, la talla de la neurita más larga es de 0,148 mm \pm 0,03 mm, mientras que la obtenida en los cultivos tratados con los péptidos biológicamente activos, tales como los péptidos de acuerdo con la invención, es significativamente superior.

Con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEC ID N°1), el tamaño de la neurita más larga es de 0,181 mm \pm 0,02 mm, y es de 0,196 mm \pm 0,028 mm en los cultivos tratados con el péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEC ID N° 2) (Figura. 5).

2.3 Actividad *in vivo*

Se ha efectuado una primera caracterización *in vivo* de los fenómenos de crecimiento neurítico y de la supervivencia neuronal sobre dos modelos de animales diferentes en el caso del trauma de la médula espinal (reparación de la médula tras rotura).

De este modo, en el caso de ratón con lesión isquémica parcial que provoca una parálisis, que puede tener una evolución positiva espontánea, se ha observado una actividad regeneradora del péptido W-S-G-W-S-S-C-S-R-S-C-G (SEQ ID N° 1) y de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención (evaluación funcional a nivel de la marcha principalmente).

En el caso de ratas con lesión de la médula espinal (lesión provocada por la aspiración de la materia gris), se ha observado que un tubo de colágeno relleno con el péptido colocado en la cavidad ha mostrado un crecimiento de las fibras nerviosas en el tubo (evaluación inmunohistoquímica).

Estos resultados muestran que los compuestos peptídicos o polipeptídicos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento destinado a:

- estimular el crecimiento neurítico, o
- mejorar la supervivencia neuronal en caso de trauma de la médula espinal, o
- utilizarse como principio activo de un tal medicamento, solo o en combinación con otros principios activos.

Sin embargo, los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención pueden utilizarse para la preparación de un medicamento destinado a mejorar los síntomas o a sanar las enfermedades en las que algunas neuronas (tales como las neuronas colinérgicas, dopaminérgicas y neuronas motoras) quedan afectadas o desaparecen, tales como en la enfermedad de Parkinson y en la amiotrofia lateral espinal, o como principio activo de dicho medicamento, solo o en combinación con otros principios activos.

Sin desear quedar vinculados a teoría alguna, los inventores piensan que uno de los efectos de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención es el de permitir el restablecimiento de los contactos sinápticos entre neuronas en curso de destrucción.

En lo que se refiere a la dosificación de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención, el estudio de su efecto sobre las células O-2A (línea celular oligodendrocítica) de rata en cultivo primario muestra que las indicaciones son diferentes según la cantidad de péptido utilizado. A título de ejemplos:

- a una dosis de aproximadamente 25 μ g, el péptido de acuerdo con la invención debe emplearse más bien para estudiar los fenómenos de proliferación,
- a una dosis de aproximadamente 50 μ g, el péptido de acuerdo con la invención tiene un efecto de

supervivencia superior que con el cóctel de factores de crecimiento utilizado clásicamente. Sin embargo, conserva también un efecto sobre la proliferación de células. Farmacológicamente, una dosis de aproximadamente 50 µg es especialmente adecuada en el caso de la manipulación *ex vivo* de las células, con vistas a su trasplante por ejemplo.

- 5
- a una dosis de alrededor de 75 o 100 µg, el péptido de acuerdo con la invención induce más bien la supervivencia, incluso la diferenciación de las neuronas.
 - conviene señalar que a una dosis de alrededor de 150 µg, algunos péptidos de acuerdo con la invención muestran un efecto letal (fenómeno no observado con las neuronas).

10 Otros indicios sobre la dosificación del péptido de acuerdo con la invención se desprenden de los ensayos *in vitro*.

15 Los inventores describen aquí otro ensayo *in vivo* para demostrar el efecto biológico de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención. Este ensayo se refiere a un modelo de lesión de la médula espinal por contusión, imita el observado en seres humanos cuando la médula espinal ha resultado dañada en un accidente de circulación por ejemplo. Se anestesiaron las ratas mediante una inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina y de xilazina respectivamente a las concentraciones de 80 y de 10 mg/kg. Se vació sistemáticamente la vejiga urinaria de las ratas antes del procedimiento quirúrgico. El dorso fue rasurado y desinfectado cuidadosamente. Se realizó una laminectomía en T9-T10, se retiró el periostio y se fijó y estabilizó la médula espinal utilizando las pinzas solidarias del impactador denominado "dispositivo NYU" que permite una lesión controlada mediante una mazarota de 10 g dejada caer desde una altura regulada a 25 mm sobre el sitio de la lesión. La lesión así originada se consideró bastante grave y provocó una parálisis de la parte posterior de los animales (patas traseras, control de la vejiga urinaria,...). Se administró el compuesto peptídico de acuerdo con la invención a los animales mediante un pequeño cubo de alrededor de 2 mm³ de Surgicoll (Collin) saturado de 30 µl del compuesto a ensayar, que se colocó en el lugar de la lesión. Se cerraron los planos musculares y cutáneos y se colocaron los animales bajo una lámpara calefactora hasta su despertar. Se evaluó la eficacia del tratamiento utilizando el ensayo de BBB, la escala sensorimotora utilizada en los laboratorios que trabajan sobre lesiones de la médula espinal pero que verifican igualmente el retorno correcto del control vesical durante toda la fase postoperatoria. Así, en lo que se refiere a la locomoción no pudo extraerse ninguna conclusión entre los animales tratados con el péptido de acuerdo con la invención a las dosis utilizadas y el grupo del control. En cambio, el análisis del tiempo de recuperación de la función urinaria autónoma y del tamaño de la vejiga urinaria durante el transcurso del tiempo, indica la presencia de diferencias significativas (p<0,05) entre los perfiles de los grupos tratados y del grupo testigo. Esto demuestra que los animales tratados con los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención recuperan más rápidamente una función vesical autónoma. En las figuras 6 y 7 se muestran los resultados (compuesto peptídico NS de acuerdo con la invención, SEQ ID N° 4).

2.4 Experiencias *in vitro* para la extrapolación *in vivo*

35 Estos experimentos tuvieron por objetivo poder precisar las condiciones de la inyección de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención en el animal durante las pruebas de validación de la actividad *in vivo*. Así, es importante saber el momento de la inyección, la cantidad y el modo de administración. Es igualmente importante saber si una inyección única es suficiente o si se debe inyectar en varias ocasiones.

a) Varias inyecciones frente a una única inyección

40 Se observa un aumento del número de células con una única adición de péptido (como se ha descrito anteriormente), se amplificó este efecto con 3 adiciones diarias del compuesto peptídico de acuerdo con la invención.

Se observó igualmente esta amplificación del efecto por la diferenciación (tamaño de la neurita) con las adiciones repetidas.

Estos resultados aparentemente favorecen una inyección repetida del compuesto peptídico de acuerdo con la invención

b) Retirada del péptido cada 24 horas

Respecto de la supervivencia y/o de la proliferación, se encuentra el perfil esperado con un ligero aumento del número de células en presencia del péptido (10%). Con la retirada, se observa la diferencia únicamente a partir de las 24 horas y no en 1 hora. De acuerdo con estos resultados, la ventana de acción del péptido está pues comprendida entre 1 hora y 24 horas.

2.5 Otros efectos biológicos de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención

a) Crecimiento de oligodendrocitos

Los experimentos sobre otra población celular de origen animal, los oligodendrocitos, han mostrado que a una concentración particular, los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención tienen también un papel sobre estas células, estimulan la supervivencia y favorecen la diferenciación.

55 Esta acción sobre este tipo de célula es interesante en varias maneras y especialmente en el caso de rotura de la médula espinal (lo que provoca una desmielinización que será necesario subsanar durante el fenómeno de la

reparación)

5 Por otra parte, se abren otras perspectivas de aplicaciones potenciales, por ejemplo para las enfermedades degenerativas que afectan otras células diferentes de las neuronas, como la esclerosis en placa. La esclerosis en placas ataca, en efecto, a las células sintetizadoras de mielina, los oligodendrocitos. Se caracteriza también por un amplio fenómeno inflamatorio, con una activación masiva de los astrocitos. Los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención podrían pues intervenir complementando una terapia antiinflamatoria.

Se ha descrito anteriormente en el punto 2.4 un primer ensayo. Los inventores describen aquí otro ensayo en detalle:

10 Se cultivaron oligodendrocitos obtenidos tras la disección a razón de 50000 células por pocillo en las placas multipocillos de 24 pocillos en 500 µl de medio DMEM + 10% de suero de ternera fetal. Después de 16 h de adhesión, el medio se sustituyó por 480 µl de medio Neurobasal + complementos N2 (Invitrogen). Se añadió un compuesto peptídico de acuerdo con la invención o su vehículo (agua) a razón de 20 µl por pocillo. Se colocaron los cultivos a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Al cabo de 72 horas de cultivo, la mitad del medio de cultivo por pocillo se había cambiado y completado por una nueva solución de tratamiento (medio + péptido o su vehículo). Los cultivos se han mantenido a 15 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. Se observaron regularmente los cultivos y se evaluó tanto la densidad como la morfología celular. Los resultados indicaron que el compuesto peptídico de acuerdo con la invención favorece la supervivencia de las células a la vez que el crecimiento de sus extensiones.

b) Crecimiento de células nerviosas humanas

20 Se cultivaron células de la línea SY5Y, características de un neuroblastoma humano en un medio de Eagle modificado por Dubelco (DMEM) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (SVF), diferenciadas posteriormente en frasco en presencia de ácido retinoico (ATRA, Sigma) 20 µM durante 6 días. A continuación se tripsinizaron los frascos, y se sembraron las células en DMEM + 10% SVF en placas multipocillo durante el tiempo de adhesión retirándose posteriormente el suero completamente. Las células se trataron con el compuesto peptídico de acuerdo con la invención.

25 Se observó que en estas condiciones, las células SY5Y emitían unas prolongaciones de manera más importante en las condiciones tratadas con el péptido estabilizado con respecto a la condición del control que en ausencia de este. Se formó una densa red de extensiones nerviosas en los pocillos, indicando que el péptido de acuerdo con la invención es capaz de estimular el crecimiento de las extensiones nerviosas e inducir la formación de una red neurítica importante.

30 c) Actividad neuroprotectora

Los compuestos peptídicos ejercen igualmente una actividad neuroprotectora, que puede ponerse en evidencia tratando por ejemplo un cultivo de SY5Y con un agente estresante, tal como:

- agua oxigenada (H₂O₂) que induce un estrés oxidativo y provoca la muerte de las células;
- 35 – el glutamato, un aminoácido excitador, que es un agente convulsivo y un agente que participa en el proceso de progresión de los daños (extensión de la zona de lesión) provocados por un traumatismo nervioso;
- el péptido beta amiloideo, que está en el origen de la formación de las placas seniles que provocan las lesiones observadas en la enfermedad de Alzheimer y es una de las dianas para combatir y tratar esta enfermedad.

40 d) Degeneración axonal

Se probó la actividad de un compuesto peptídico de acuerdo con la invención en el animal de un modelo de degeneración de la médula espinal y de degeneración axonal en particular. Se basa en la utilización del modelo animal Plp^{-/-}, relevante de la patología humana SPG2 (formas leves de paraplejas espásticas). Se realizó una primera etapa de inyecciones intratecales del péptido NS (SEQ ID N° 4) a una dosis de 37,5 µg/kg en animales normales controlados 45 durante 5 meses (de 2 meses a 7 meses) para probar la toxicidad potencial de inyecciones repetidas (n=20). Los resultados han demostrado la inocuidad del producto administrado de manera crónica, y han permitido además proseguir las experimentaciones. La estrategia de tratamiento consistió en la administración del péptido a ratones PLP^{-/-} de 6 meses de edad, es decir, antes del inicio de la degeneración axonal. Se compararon los efectos del tratamiento en un grupo controlado que se tratará con el vehículo de suspensión del péptido únicamente y se midió la eficacia del principio activo de acuerdo con diversos procedimientos de análisis que incluían unas pruebas de comportamiento que permitirán seguir las capacidades sensorimotoras y la actividad locomotriz de los diferentes grupos de animales 50 (sistema Rotarod), además de los análisis neuropatológicos.

2.6 Utilización de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención

Los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención pueden utilizarse de diferentes maneras.

55 Pueden utilizarse en una composición farmacéutica o en la realización de un medicamento. En estas composiciones o medicamentos, el agente bioactivo puede presentarse en formas diversas de composiciones, a saber,

en forma de disoluciones, en general acuosas, o en forma liofilizada, o en forma de gel o de hidrogel, o en forma de emulsión o bien en cualquier otra forma farmacéutica y fisiológicamente aceptable. Estos medicamentos o composiciones se destinan principalmente al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o a la regeneración de la médula espinal o de los nervios periféricos después de traumatismos. Su utilización en la regeneración de las células del sistema nervioso puede hacerse ya sea por aplicación directa a un paciente, o bien de manera extracorpórea.

Los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención pueden utilizarse también como aditivo para los cultivos celulares de células nerviosas. Un aditivo de ese tipo contiene al menos uno de los compuestos peptídicos de acuerdo con la invención. Este aditivo puede utilizarse en un soporte para cultivo de células nerviosas. Un soporte para cultivo de acuerdo con la invención comporta un cuerpo de base, de forma generalmente hueca, y un revestimiento sobre el cual se pueden fijar las células. El cuerpo de base puede ser una placa con pocillos. El revestimiento contiene los aditivos activos, de los que al menos uno de los compuestos peptídicos es según la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NEURONAX

<120> Nuevos péptidos y polipéptidos con estabilidad mejorada novedosos útiles para la regeneración del sistema nervioso

<130> Neuronax

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 12

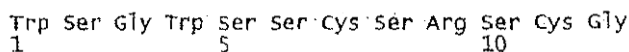
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 1



<210> 2

<211> 10

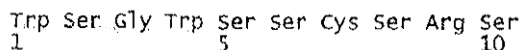
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 2



<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 3

Trp Ser Gly Trp Ser
1 5

- <210> 4
- <211> 10
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- 10 <222> (7)..(7)
- <223> Abu
- <400> 4

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Xaa Ser Arg Ser
1 5 10

- <210> 5
- 15 <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
- 20 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10)..(10)
- <223> Abu
- <400> 5

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Cys Ser Arg Xaa
1 5 10

- <210> 6
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10)..(10)
- 35 <223> isopropil-lisina (CH₃)₂C-NH-(CH₂)₄-CH(COOH)(NH₂)
- <400> 6

ES 2 363 676 T3

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Cys Ser Lys Xaa Ser
1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (2)..(2)

<223> Abu

<400> 7

Trp Xaa Gly Trp Ser Ser Cys Ser Arg Ser
1 5 10

<210> 8

15 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Nla2

<400> 8

Leu Xaa Ser Gly Trp Ser Ser Cys Ser Arg Ser
1 5 10

25

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

35 <223> Cys o Abu

<400> 9

Trp Ser Gly Trp Ser Ser Xaa Ser Arg Ser
 1 5 10

- <210> 10
- <211> 12
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
- <220>
- <221> MOD_RES
- 10 <222> (1)..(3)
- <223> Trip ser, Trip Abu o Leu Na12 ser
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (8)..(8)
- 15 <223> cys o Abu
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10)..(12)
- <223> Arg Ser, Arg Abu o Lys iPr Ser
- 20 <400> 10

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Ser Ser Xaa Ser Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

- <210> 11
- <211> 4
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <400> 11
- Val Thr cys Gly
 1
- <210> 12
- <211> 4
- 30 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
- <400> 12
- Val ser cys Gly
 1
- 35 <210> 13

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 <400> 13

Ala Thr Cys Gly
 1

<210> 14
 <211> 4
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial; péptido sintético
 <400> 14

Arg Gly Asp Ala
 1

15 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(2)
 25 <223> Cualquier aminoácido básico
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido que se produce naturalmente
 30 <220>
 <221> MOS_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido básico
 <400> 15

Asx Asx Xaa Asx
 1

35 <210> 16
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 16

 Trp Ser Xaa Trp
 1
 10 <210> 17
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 20 <223> Cualquier aminoácido
 <400> 17

 Cys Ser Xaa Xaa Cys Gly
 1 5
 <210> 18
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 <400> 18

 Trp Ser Pro Trp Ser
 1 5
 30 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético
 <400> 19

Cys Ser Val Thr Cys Gly
 1 5

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<400> 20

Trp Ser His Trp
 1

10 <210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Cualquier aminoácido

20 <400> 21

Cys Ser Val Xaa Cys Gly
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto peptídico que comprende al menos la siguiente secuencia de aminoácidos:

X2-G-W-S-S-X1-S-X3 (SEQ ID N° 10)

5 en la que:

X1 es C o Abu;

X2 es W – S o W – Abu o L – Nal2 – S;

X3 es R – S, R – Abu o K-(iPr)-S;

10 **caracterizándose** dicho compuesto **porque** la secuencia (SEQ ID N° 10) se selecciona entre el grupo formado por las siguientes secuencias:

W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S (SEQ ID N° 4)

W-S-G-W-S-S-C-S-R-Abu (SEQ ID N° 5)

W-S-G-W-S-S-C-S-K-(lpr)-S (SEQ ID N° 6)

W-Abu-G-W-S-S-C-S-R-S (SEQ ID N° 7)

15

L-Nal2-S-G-W-S-S-C-S-R-S (SEQ ID N° 8)

2. Compuesto peptídico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia (SEQ ID N° 4) bajo la forma $\text{NH}_2\text{-W-S-G-W-S-S-Abu-S-R-S-NH}_2$

3. Composición farmacéutica que comprende como principio activo al menos un compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

20

4. Uso extracorpóreo de compuestos peptídicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la regeneración de las células del sistema nervioso.

5. Uso de compuestos peptídicos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

25

6. Uso de compuestos peptídicos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la preparación de fármacos para la regeneración de la médula espinal o de los nervios periféricos tras lesión traumática.

7. Aditivo para cultivos celulares de células nerviosas, **caracterizado porque** éste comprende al menos un compuesto peptídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

8. Sustrato para el cultivo de células nerviosas, **caracterizado porque** comprende el aditivo de acuerdo con la reivindicación 7.

30

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5

Documentos de patente indicados en la descripción

- US 5357041 A [0007]
- US 6239110 B [0017]
- US 5840692 A [0017]
- US 5849701 A [0017]
- US 5491130 A [0017]
- US 6051549 A [0017]
- US 5190918 A [0017]
- US 5200397 A [0017]
- US 6384189 B [0017]
- WO 9903890 A [0018] [0036]

Literatura no citada en la descripción de la patente

- S. Gobron et al. *Journal of Cell Science*, 1996, vol. 109, 1053-1061 [0003]
- J.C. Adams et al. *Developmental Dynamics*, 2000, vol. 218, 280-29 [0003]
- S. Gobron et al. *Glia*, 2000, vol. 32, 177-191 [0004] [0005]
- A. Meinzel. *Microscopic Research and Technique*, 2001, vol. 52, 484-495 [0005]
- J. C. Adams et al. *Molecular Biology Intelligence Unit. Company - Springer Verlag*, 1995, 1-188 [0006]
- K. O'Shea et al. *Neuron*, 1991, vol. 7, 231-237 [0006]
- H. Chen et al. *Matrix Biology*, 2000, vol. 19, 597-614 [0007]
- K. Tan. *The Journal of Cell Biology*, 2002, vol. 159 (2), 373-3.82 [0007]
- A. Klar et al. *Cell*, 1992, vol. 69, 95-110 [0009]
- Y. Feinstein ; A. Klar. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, vol. 36, 975-980 [0009]
- D. Schubert ; A. Klar et al. *Journal of Neurochemistry*, 2006, vol. 96, 444-453 [0009]
- A. Varela-Echavarría ; S. Guthrie. *Gene & Development*, 1997, vol. 11, 545-557 [0009]
- D. Goundis ; K. Reid. *Nature*, 1988, vol. 335, 82-85 [0010]
- K. Robson et al. *Nature*, 1988, vol. 335, 79-82 [0012]
- Tewari R. et al. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, 47613-47618 [0012]
- E. Hedgecock et al. *Neuron*, 1990, vol. 2, 61-85 [0013]
- C. Leung-Hagesteijn et al. *Cell*, 1992, vol. 71, 289-299 [0013]
- K. S. O'Shea ; V. M. Dixit. *The Journal of Cell Biology*, 1988, vol. 107, 2737-2748 [0014]
- M. De Freitas et al. *Neuron*, 1995, vol. 15, 333-343 [0016]
- M. Bamdad. *Cell & Tissue Research*, 2004, vol. 315, 15-25 [0018]
- K. Rich et al. *Science*, 1990, vol. 249, 1574-1577 [0021]
- G. Prater et al. *The Journal of Cell Biology*, 1991, vol. 112, 1031-1040 [0021]
- W. A. Frazier. *Current Opinion in Cell Biology*, 1991, vol. 3, 792-799 [0024]
- G. D. Young ; J. E. Murphy-Ullrich. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, 47633-47642 [0026]
- T. Vogel et al. *The Journal of Cellular Biochemistry*, 1993, vol. 53, 74-84 [0026]
- M.L. Iruela-Arispe. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, vol. 36, 1070-1078 [0026]
- S.S. Tolsma et al. *The Journal of Cell Biology*, 1993, vol. 122, 497-511 [0027]
- M.L. Iruela-Arispe. *Circulation*, 1999, vol. 100, 1423-31 [0028]
- N.H. Guo. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, vol. 267, 19349-55 [0029]
- J.M. Sipes. *The Journal of Cell Biology*, 1993, vol. 121, 469-477 [0030]
- *The Journal of Cell Biology*, 1992, vol. 116, 209-217 [0032]
- S.M. Gantt. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, 19205-19213 [0032]
- D. Osterhout et al. *Annual Meeting - Washington*, 1993 [0033]
- K.A. Rich. *Science*, 1990, vol. 249, 1574-1577 [0033]
- K. Tewari. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, 47613-47618 [0033]
- J. C. Adams. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 36, 1102-1114 [0034]
- T. Burstyn-Cohen et al. *The Journal of Neuroscience*, 1998, vol. 18, 8875-8885 [0034]
- R.P. Kruger. *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, 10826-10834 [0035]
- H. Monnerie et al. *Cell Tissue Res.*, 1998, vol. 293, 407-418 [0036]
- F. El-Bitar et al. *Cell Tissue Res.*, 2001, vol. 304, 361-369 [0036]
- F. El-Bitar et al. *Cell and Tissue Research*, 2001, vol. 304, 361-369 [0041]
- *Glia*, 2000, vol. 32, 177-191 [0037]

10