

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 797**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04704005 .0**
96 Fecha de presentación: **21.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1587526**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **PÉPTIDOS Y COMPUESTOS DE FACTORES TRÓFICOS DE MOTONEURONAS Y SUS PROCEDIMIENTOS DE UTILIZACIÓN.**

30 Prioridad:
21.01.2003 US 441772 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.03.2012

73 Titular/es:
**GENERVON BIOPHARMACEUTICALS LLC
830 NORTH WILCOX AVENUE
MONTEBELLO, CALIFORNIA 90640, US**

72 Inventor/es:
**CHAU, Raymond Ming Wah y
KO, Pui-Yuk Dorothy**

74 Agente: **García Egea, Isidro José**

ES 2 375 797 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

Peptidos y compuestos de factores tróficos de motoneuronas y sus procedimientos de utilización

5

ANTECEDENTES

Los Factores Neurotróficos (FNTs) son un grupo especializado de proteínas con la función de promover la supervivencia, crecimiento, mantenimiento y capacidades funcionales de poblaciones selectas de neuronas. Recientes estudios han demostrado que la muerte neuronal tiene lugar en los sistemas nerviosos de vertebrados durante ciertos períodos de crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la adición factores tróficos neuronales solubles de tejidos objeto asociados sirve para paliar este fenómeno de la muerte neuronal. Las siguientes citas discuten sobre factores tróficos neuronales: Chau, R.M.W., et al., *Neurotrophic Factor*, 6 Chin. Neuroanatomy 129 (1990); Kuno, M., *Target Dependence of Motoneuronal Survival: The Current Status*, 9 Neurosci. Res. 155 (1960); Bard, Y.A., *Trophic Factors and Neuronal Survival*, 2 Neuron 1525 (1989); Oppenheim, R.W., *The Neurotrophic Theory and Naturally Occurring Motoneuron Death*, 12 TINS 252 (1989); Bard, Y.A., *What, If Anything, is a Neurotrophic Factor?*, 11 TINS 343 (1988); y Thoenen, H., y Edgard, D., *Neurotrophic Factors*, 229 Science 238 (1985).

En el sistema neuromuscular vertebrado, se ha comprobado que la supervivencia de motoneuronas embrionarias es dependiente de sustancias tróficas específicas derivadas de los músculos esqueléticos. Se ha comprobado, tanto es estudios *in vivo* como *in vitro*, que los músculos esqueléticos producen sustancias capaces de fortalecer la supervivencia y desarrollo de motoneuronas al impedir la degeneración y subsiguiente muerte celular natural de las motoneuronas embrionarias. Ver O'Brian, R.J. y Fischbach, G.D., *Isolation of Embryonic Chick Motoneurons and Their Survival In Vitro*, 6 J. Neurosci. 3265 (1986); Hollyday, M. y Hamburger, V., *Reduction of the Naturally Occurring Motor Neuron Loss by Enlargement of the Periphery*, 170 J. Comp. Neurol. 311 (1976). De forma similar, diversos investigadores han informado que los músculos esqueléticos de polluelos y ratas poseen ciertos factores tróficos que pueden impedir la muerte celular natural de motoneuronas embrionarias tanto *in vivo* como *in vitro*. Ver McManaman, J.L., et al., *Purification of a Skeletal Muscle Polypeptide Which Stimulates Choline Acetyltransferase Activity in Cultured Spinal Cord Neurons*, 263 J. Biol. Chem. 5890 (1988); Oppenheim, R.W., et al., *Reduction of Naturally Occurring Motoneuron Death In Vitro by a Target Derived Neurotrophic Factor*, 240 Science 919 (1988); y Smith, R.G., et al., *Selective Effects of Skeletal Muscle Extract Fractions on Motoneurons Development In Vivo*, 6 J. Neurosci. 439 (1986).

O'Leary, P.D., et al., 1998, J. Neurochem., Vol. 70, No. 4, pp. 1712-1721, describen análogos de péptido con – formacionalmente constreñidos del bucle 2 del factor neurotrófico derivado del cerebro (FNDC).

Longo, F.M., et al., 1990, Cell Regulation, Vol. 1, No. 2, pp. 189-196, describe péptidos sintéticos que se corresponden con tres regiones de factor de crecimiento nervioso (FCN).

La patente estadounidense US 2002 086831 A1 describe un procedimiento de administración de factores motoneuronotróficos para promocionar la supervivencia, crecimiento, proliferación o mantenimiento de neuronas de mamíferos.

Adicionalmente, un polipéptido ha sido aislado del musculo esquelético de la rata del que se ha comprobado que incrementa, de forma selectiva, la supervivencia de motoneuronas embrionarias de polluelo in vivo, además de la actividad de acetiltransferasa colina en estas motoneuronas. Este polipéptido ha sido llamado Factor de Desarrollo de Colina Acetiltransferasa (FDC) y se ha demostrado que su función biológica es diferente de otros factores tróficos tales como Factor del Crecimiento del Nervio (FCN), Factor Neurotrófico de Ganglio Ciliar (FNGC), Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (FNDC), y Factor Neurotrófico de Ganglio Retinal (FNGR). Ver Levi-Montalcini, R., *Developmental Neurobiology and the Natural History of Nerve Growth Factor*, 5 Ann. Rev. Neurosci. 341 (1982); Varon, S., et al., *Growth Factors*. En: *Advances in Neurology*, Vol 47: *Functional Recovery in Neurological Disease*, Waxman, S.G. (ed.), Raven Press, Nueva York, pp. 493-521 (1988); Barde, Y.A., *Trophic Factors and Neuronal Survival*, 2 Neuron 1525 (1989); Chau, R.M.W., et al., *The Effect of a 30 kD Protein from Tectal Extract of Rat on Cultured Retinal Neurons*, 34 Science in China, Series B, 908 (1991).

El aislamiento y caracterización de dos factores motoneuronotróficos de tejido de músculo de rata que tengan pesos moleculares aparentes de 35 kD y 22 kD fueron informados por Chau et al. Ver Chau, R.M.W., et al., *Muscle Neurotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord*. En: *Recent Advances in Cellular and Molecular Biology*, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pp. 89-94 (1992). La proteína 35 kD ha sido definida por el Dr. Chau como factor motoneuronotrófico 1 (FMNT1) y la proteína 22 kD aparente como factor motoneuronotrófico 2 (FMNT2). Se ha demostrado *in vitro* que estos dos factores tróficos apoyan el crecimiento y/o regeneración de ambas motoneuronas del asta anterior aisladas y de explantes de médula espinal lumbar de rata.

Subsiguientemente, en 1993, Chau et al. Informaron de la exploración inmunológica de clones lambda gt11 de una genoteca de ADNc de retinoblastoma humano usando un anticuerpo monoclonal para FMNT1 como inmunoprobio. Unos inmunocoágulos de extractos de un clon inmunopositivo mancharon una proteína de FMNT1 que tenía un peso molecular aparente de 55 kD. Ver Chau, R.M.W., et al., *Cloning of Genes for Muscle-Derived*

Motoneuronotrophic Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (abstract), 19 Soc. For Neurosci. Part 1, 252 (1993). 252 (1993). Un extracto conteniendo el FMNT1 humano clonado mostró tener actividad biológica similar a la de la proteína FMNT1 "nativa" en que apoyaba el crecimiento *in vitro* de motoneuronas del asta anterior de rata.

Más recientemente, la Patente estadounidense US 6.309.877 divulgó una familia de factores neuronotróficos que poseen la capacidad de ejercer un efecto trófico sobre las motoneuronas. Los factores motoneurotróficos fueron aislados, las secuencias de ácido nucleico codificadoras de estos factores fueron clonadas y expresadas, y se pusieron a disposición tanto el ácido nucleico como secuencias polipéptidas. En concreto, las proteínas recombinantes FMNT1-T3 y FMNT1-T6, codificadas por materias insertadas de par de base 1443 y 972, respectivamente, fueron expresadas o bien como proteínas de fusión o como fragmentos purificados. Los factores aislados y los factores expresados, recombinantes, fueron aptos para inducir la viabilidad continua y la excrecencia neurita de motoneuronas. En consecuencia, estos factores han sido clasificados como "factores motoneuronotróficos" o "FMNTs".

Los clones FMNT1-T6 divulgados en la patente estadounidense N° 6.309.877 codifican un fragmento de aminoácido 33 de FMNT1. Una proteína recombinante que contiene esta secuencia reaccionó con un anticuerpo monoclonal a FMNT1, mantuvo la viabilidad motoneuronal, incrementó la excrecencia neurita, redujo la muerte celular/apoptosis y apoyó el crecimiento y "extensión" de motoneuronas en neuronas activas, gigantes con axones que contienen conos, de crecimiento extendido. En consecuencia, los siguientes estudios fueron implementados para determinar si un péptido que comprende una zona activa "mínima" puede ser sintetizado, lo que todavía retiene la actividad biológica de este fragmento de FMNT1.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a péptidos y composiciones nuevas – tal y como se definen en las reivindicaciones – que contengan partes de la molécula FMNT, que son útiles para modular la viabilidad y proliferación de células neuronales, poniendo a disposición, en consecuencia, péptidos neurotróficos que pueden ser inmediatamente sintetizados.

En concreto, la presente invención se dirige a un nuevo dominio proteico generalmente significativo para las acciones de factores motoneuronotróficos, que ha sido identificado y cartografiado en dos breves sub – secuencias superpuestas en la molécula FMNT1. Estos dominios proteicos no reconocidos hasta ahora, que se designan aquí como dominios "WMLSAFS" y "FSRYAR", son suficientes para modular la viabilidad y proliferación de células neuronales. Además, las especies FMNT1 que abarcan estos dominios son por sí mismas suficientes para estimular el crecimiento de híbridos celulares de motoneuronas/neuroblastomas en pruebas de proliferación celular.

En un aspecto, entonces, la invención se dirige a análogos de péptidos FMNT que comprenden los dominios WMLSAFS ó FSRYAR y que son como se define en las reivindicaciones, útiles para inducir o modular la viabilidad y crecimiento de una célula neuronal. 1. Se divulgan aquí realizaciones particulares de tales análogos de péptidos FMNT como NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7.

La presente invención también se relaciona con compuestos, como se definen en las reivindicaciones, para su uso en procedimientos para modular la viabilidad y/o crecimiento de células neuronales por administración de los análogos de péptidos de FMNT, como se definen en las reivindicaciones, *in vitro*, a cultivos celulares o *in vivo* a un individuo que sufra de daños en los nervios o un trastorno neurodegenerativo, con objeto de promover la proliferación celular o estabilizar la muerte celular inapropiada, y/o, en cada caso, restaurar el comportamiento celular normal. La presente invención está también dirigida a análogos de péptidos FMNT como se definen en las reivindicaciones en las reivindicaciones y útiles para sus efectos anti – proliferación en células no – neuronales, concretamente para su uso como un agente anti – fibrótico o anti – inflamatorio en la curación de heridas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención serán mejor comprendidas con relación a la siguiente descripción y dibujos que se acompañan, donde:

La Fig. 1 muestra secuencias de amino ácidos de diversos péptidos FMNT1;

La Fig. 2 muestra incrementos porcentuales en la proliferación de células VSC4.1 por 33mer de FMNT1-T6 y sus derivados de péptidos en diversas dosis;

La Fig. 3 también muestra incrementos en la proliferación de células VSC4.1 por 33mer de FMNT1-T6 altamente purificado (GLP_g) y sus derivados de péptidos en diversas dosis;

La Fig. 4 muestra incrementos porcentuales en la proliferación de células VSC4.1 por 33mer de FMNT1-T6 y derivados adicionales de péptidos en diversas dosis; y

La Fig. 5 muestra la re-innervación selectiva de células musculares objeto por neuronas motoras tratadas con 6mer de FMNT en dosis variadas.

DESCRIPCION DETALLADA

Los términos técnicos y científicos usados aquí tienen los significados comúnmente entendidos por un experto normal en la materia a la que pertenece la presente invención, a menos que se indique de otra forma. Se hace referencia aquí a diversas metodologías conocidas por el experto en la materia. Las obras de referencia normalizadas que explican los principios generales de tecnología de ADN incluyen Sambrook, J., et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York (1989); McPherson, M.J., Ed., Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991); Jones, J., Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Science Publications, Oxford (1992); Austen, B.M. and Westwood, O. M. R., Protein Targeting and Secretion, IRL Press, Oxford (1991). Cualesquiera materiales y/o procedimientos adecuados conocidos por los expertos pueden ser utilizados para implementar la presente invención; sin embargo, se describen aquí los materiales y/o procedimientos preferidos.

Visión general

El aislamiento y caracterización de dos factores mononeuronotróficos (FMNT1 y FMNT2) de tejidos de músculo de rata además de la clonación subsiguiente de un gen recombinante FMNT1-F6 derivado de un genoteca de ADNc de retinoblastoma humano, se describe en la patente estadounidense nº 6.309.877. La secuencia génica FMNT1-F6 codifica una secuencia amino ácida 33 referida aquí como NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.

Los polipéptidos FMNT1, que se dan de forma natural y son recombinantes, demostraron intensificar de forma selectiva la supervivencia *in vitro* de neuronas motoras del asta anterior de explantes de médula espinal lumbar de ratas. Las microfotografías de cultivos tratados exhibieron una excrecencia neurita de fibras de nervio con mielina y una notoria reducción en el crecimiento de células no neuronales, por ejemplo células gliales y fibroblastos. De forma similar, la administración *in vivo* de FMNT1 a nervios periféricos de ratas axotomizadas quirúrgicamente resultó en un porcentaje notoriamente más elevado de neuronas motoras supervivientes que en los controles no tratados, que podrían ser bloqueados por co-administración de anticuerpo monoclonal anti-FMNT1.

Se demostraron beneficios ulteriores de FMNT1 en ratas sujetas a hemi-sección de médula espinal, reparadas por autoinjerto de nervio periférico e implantado con porciones de gel que contiene FMNT1 en cercana proximidad a las juntas del injerto de nervio con la médula espinal. Los animales tratados con FMNT1 exhibieron cantidades más elevadas de neuronas motoras supervivientes, recuperación mejorada de las funciones motora y sensorial, respuesta inflamatoria reducida (menos macrófagos y linfocitos infiltrándose), formación reducida de cicatriz de tejido conteniendo colágeno en la zona del injerto, morfología celular de Schwann normal y formación de fibra nerviosa con y sin mielina.

La eficacia de FMNT en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas fue demostrada también en el modelo animal de ratón Wobbler. Los ratones Wobbler llevan una mutación génica doblemente recesiva autosómica que lleva a la progresiva degeneración de neuronas motoras troncales del cerebro. Aproximadamente tres semanas después del parto, los ratones wobbler comienzan a desarrollar la sintomatología del "balanceo" (Etapa 1) con degeneración concomitante de las neuronas del motor cervical, lo que lleva tanto a la debilitación del músculo de los miembros delanteros y a una incapacidad para extender los dedos y garras. Por los tres meses de edad, la sintomatología patológica progresa hasta la etapa 4, con un agrupamiento de todas las articulaciones asociadas en los miembros anteriores, por ejemplo, las articulaciones de muñeca, codo y hombro, además de una extensa pérdida de peso corporal y fatiga crónica. Sin embargo, la mayor parte de los ratones "wobbler" mueren previamente a alcanzar los tres meses de edad. La implantación de porciones de gel que contenga FMNT1 entre los músculos trapeciales y romboides y la región C7-T3 de la médula espinal retrasaron la progresión de los síntomas en ratones "wobbler", resultando en una mejora general en la longevidad, salud, respiración, peso corporal, fuerza de los miembros anteriores además de una reducida formación de cavidades y cromatolisis de sus neuronas motoras cervicales en comparación con el grupo de control.

Han sido ahora reconocidos dos dominios que se superponen, previamente no reconocidos, en el interior de la molécula FMNT1-F6, que aparentan ser suficientes para las actividades biológicas conocidas del FMNT1. Cada uno de estos dominios, designados aquí como los dominios "WMLSAFS" y "FSRYAR", es suficiente para estimular la proliferación de líneas celulares derivadas de neuronas motoras en una forma similar al FMNT1-F6 33-mer. De forma similar, el dominio "FSRYAR" es suficiente para dirigir la re-innervación selectiva de objetivos musculares por neuronas motoras *in vivo* de una forma similar al FMNT1-F6 33-mer. Adicionalmente, el dominio "FSRYAR" proporciona un epitopo antigénico suficiente para incrementar el anticuerpo que reconoce cualquier péptido FMNT que contenga la secuencia "FSRYAR", incluyendo el FMNT1-F6 33-mer.

Como apreciará el experto en la materia y la presente invención, las secuencias que comprende el/los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR proporcionan análogos del péptido FMNT para su uso en la modulación selectiva de la viabilidad y morfología de células neuronales en contraposición a las células no neuronales *in vitro* e *in vivo*. Además, los compuestos y composiciones capaces de enlazar con el/los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR, proporcionan agentes para uso en la detección y/o modulación de actividad de FMNT1 en células y tejidos objetivo.

Péptidos

Usado aquí, el término "dominio WMLSAFS" o "dominio FSRYAR" hace referencia a un dominio polipéptido que ha demostrado aquí ser suficiente para el mantenimiento selectivo y la regeneración axónica de células neuronales. Las realizaciones preferidas de la presente invención comprende un péptido con la secuencia de amino ácido: FSRYAR [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2] ó WMLSAFS [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3], siempre que dicho péptido sea uno de los definidos en las reivindicaciones.

Usados aquí, los términos "péptido activo biológicamente" y "fragmento activo biológicamente" hacen referencia a un péptido o polipéptido de acuerdo con la descripción *supra* de factores motoneuronotróficos (FMNT) en los que el FMNT exhibe un efecto protector sobre neuronas motoras y/o un efecto de proliferación en líneas celulares derivadas de neuronas motoras.

La secuencia de residuos de amino ácidos en una proteína o péptido que comprenda los análogos de péptido FMNT de la presente invención se designan aquí o bien mediante el uso de sus designaciones de tres letras comúnmente usadas o por sus designaciones de letra única. Una lista de estas designaciones de tres letras y de una letra puede encontrarse en libros de texto como Biochemistry, Segunda Edición, Lehninger, A., Worth Publishers, Nueva York, N.Y. (1975). Cuando la secuencia de amino ácido está citada horizontalmente, el término amino está destinado a estar en el extremo izquierdo mientras que el término carboxilo está destinado a estar en el derecho.

Aquí, la referencia a la sustitución "conservadora" de amino ácido trata de significar la intercambiabilidad de residuos de amino ácido que tengan cadenas laterales similares. Por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina forman un grupo de amino ácidos con cadenas laterales alifáticas; la serina y la treonina son amino ácidos que tienen cadenas laterales alifático-hidroxilas; la asparagina y la glutamina son amino ácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida; la fenilalanina, la tirosina y el triptófano son amino ácidos que tienen cadenas laterales aromáticas; la lisina, la arginina y la histidina son amino ácidos que tienen cadenas laterales básicas; y la cisteína y la metionina son amino ácidos que tienen cadenas laterales que contienen sulfuro. El intercambio de un amino ácido de un grupo dado con otro amino ácido del mismo grupo sería considerado una sustitución conservadora. Los grupos de sustitución conservadora preferidos incluyen asparagina-glutamina, alanina-valina, lisina-arginina, fenilalanina-tirosina y valina-leucina-isoleucina.

Se apreciará por el experto en la materia que la estructura química precisa de los péptidos que comprendan los variados análogos de péptido FMNT variará dependiendo de un número de factores. Por ejemplo, un polipéptido dado puede ser obtenido como una sal ácida o básica, o en forma neutra, en cuanto el carboxilo ionizable y los grupos aminos se encuentran en la molécula. A los fines de la invención, entonces, cualquiera forma de los péptidos que comprenda el/los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR, que retienen la actividad biológica del péptido FMNT1-F6 33-mer está destinada a estar dentro del alcance de la presente invención, siempre que dicho péptido sea como se define en las reivindicaciones.

FMNT1-F6 33-mero

En la patente estadounidense nº 6.309.877, se pone a disposición un polipéptido (al que se hace referencia como NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4) con la siguiente secuencia de amino ácido:

LGTFWGD~~T~~LNCWMLSAFSRYARCLAEGHDGPTQ [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1]

La proteína recombinante que contiene esta secuencia reaccionó con anticuerpo monoclonal a, FMNT1, viabilidad de motoneurona mantenida, excrecencia neurita incrementada, muerte celular reducida de motoneuronas/apoptosis y apoyó el crecimiento y "dispersión" de motoneuronas en neuronas gigantes, con axones que contienen conos de crecimiento. El 33-mer de FMNT1, referido aquí como NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, fue sintetizado por síntesis de fase sólida y servido como un control positivo en pruebas de proliferación celular, como se describe en los ejemplos *infra*. Se descubrió que el 33-mer lineal era efectivo para incrementar la proliferación de células de motoneurona/neuroblastoma, mientras que una versión cíclica del péptido fue menos efectiva.

La presente invención incluye análogos de péptido de FMNT1, como se define en las reivindicaciones, que retienen la capacidad del FMNT1 de promover la supervivencia y mantenimiento de las neuronas motoras. Un análogo de péptido de FMNT de acuerdo con la presente invención es de 6 a 32 amino ácidos de longitud y

5 contiene al menos una o dos secuencia de amino ácidos, en concreto el dominio WMLSAFS (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3) correspondiente los residuos de amino ácidos 12 a 18 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, o el dominio FSRYAR (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2) correspondiendo a los residuos amino ácidos 17 a 22 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Las realizaciones preferidas del análogo de péptido FMNT como se define en las reivindicaciones incluyen un fragmento de seis a 32 residuos de amino ácidos consecutivos del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.

10 En realizaciones alternativas, la amino secuencia del análogo del péptido de factor motoneuronotrófico es, al menos, en un 70% idéntica a de nueve a 32 residuos de amino ácidos consecutivos del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, al menos en un 80% idéntica a de ocho a 32 residuos de amino ácidos consecutivos del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, y, más preferiblemente, en al menos en un 90% idéntica a de siete a 32 residuos de amino ácidos consecutivos del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 como se determina por análisis BLAST.

15 Para comparar una secuencia de polipéptido con el correspondiente fragmento del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, puede ser llevado a cabo un alineamiento global de las secuencias, usando los programas BLAST públicamente disponibles por medio del Centro Nacional de Información de Biotecnología (en internet en la dirección ncbi.nlm.nih.gov). Previamente a llevar a cabo un alineamiento global, el NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 puede ser sometido al GenBank. Los parámetros por defecto proporcionados por el Centro Nacional para Información de Biotecnología puede ser usada para un alineamiento global.

6-mer

25 En una realización especialmente preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

FSRYAR

30 Fe-Ser-Arg-Tir-Ala-Arg [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2]

Correspondiente a los residuos amino ácidos 17-22 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1, del que se descubrió que era suficiente para incrementar la proliferación celular de células de neurona de motor/neuroblastoma. Esta parte de la molécula FMNT1 será referida de aquí en adelante como dominio "FSRYAR".

7-mer

35 En otra realización preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

WMLSAFS

40 Trp Met Leu Ser Ala Fe Ser [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3]

45 Correspondiente a los residuos amino ácidos 12-18 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Este fragmento de amino ácido 7 de FMNT1 se superpone a los residuos FS del dominio FSRYAR. También se descubrió que el péptido es un estimulador potente de células de neurona de motor/neuroblastoma *in vitro* sobre un amplio intervalo de niveles de dosificación. Esta parte de la molécula FMNT1 será referida de aquí en adelante como dominio "WMLSAFS".

10-mer

50 En otra realización preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

MLSAFSRYAR

55 Met Leu Ser Ala Fe Ser Arg Tir Ala Arg [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4]

60 Correspondiente a los residuos amino ácidos 13-22 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Este fragmento FMNT incluye la mayoría del dominio "WMLSAFS" además del dominio FSRYAR al completo. El 10mer fue tal menos tan efectivo como el FMNT 33mer en su longitud total en la estimulación de células de neurona de motor/neuroblastoma *in vitro* en concentraciones tan bajas como 0.01 µg/ml.

11-mero

65 En otra realización preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

FSRYARCLAEG

Fe-Ser-Arg-Tir-Ala-Arg-Cis-Leu-Ala-Glu-Gli [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5]

5 Correspondiente a los residuos amino ácidos 17-27 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Este 11-mer contiene el dominio FSRYAR y se encontró que era suficiente para incrementar la proliferación celular de células de neurona de motor/neuroblastoma.

13-mer

10 En otra realización preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

CWMLSAFSRYARC

15 Cis Trp Met Leu Ser Ala Fe Ser Arg Tir Ala Arg Cis [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6]

Correspondiente a los residuos amino ácidos 11 a 23 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Este 13-mer contiene tanto los dominios WMLSAFS como FSRYAR y se encontró también que era suficiente para incrementar la proliferación celular de células de neurona de motor/neuroblastoma. Sin embargo, una versión cíclica del 13-mer no fue tan efectiva en la estimulación de la proliferación celular *in vitro*.

20 **21-mer**
En otra realización especialmente preferida, se proporciona un péptido con la siguiente secuencia de amino ácido:

25 MLSAFSRYARCLAEGHDGPTQ

30 Met Leu Ser Ala Fe Ser Arg Tir Ala Arg Cis Leu Ala Glu Gli His Asp Gli Pro Tr Gln [NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7]

Correspondiente a los residuos amino ácidos 13 a 33 del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1. Este 21-mer contiene la mayoría del dominio "WMLSAFS" además del dominio FSRYAR al completo y se encontró también que era suficiente para incrementar la proliferación celular de células de neurona de motor/neuroblastoma.

35 Análogos de Péptido de FMNT

Debe entenderse que dentro del ámbito de la presente invención se encuentran análogos de péptidos como los descritos e identificados aquí en los uno o más amino ácidos son sustituidos con otros amino ácidos. En una alternativa preferida, el análogo de péptido de factor motoneuronotrófico contiene uno o más substitutivos de amino ácido conservantes a un fragmento de siete a 32 residuos de amino ácidos consecutivos de NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.

40 Un análogo de péptido de FMNT dentro del ámbito de esta invención puede ser una forma alterada de un péptido FMNT1 proporcionando, de forma general, desde luego, que la actividad esencial del péptido permanece esencialmente sin modificar, y siempre que dicho análogo de péptido sea como se define en las reivindicaciones. Tal y como se usa aquí, el término "forma alterada" hace referencia a un péptido que haya sido tratado para modificar la estructura del mismo que se da de forma natural. Una forma alterada puede ser preparada, por ejemplo, por modificación covalente de un fragmento de péptido de FMNT1, por reticulación de fragmento de péptido de FMNT1 a una matriz de soporte insoluble, o reticulación de fragmento de péptido de FMNT1 a una proteína portadora.

45 Un análogo de péptido de FMNT1 dentro del ámbito de esta invención puede ser una proteína de fusión que contenga un fragmento de péptido de FMNT1 adjunto a una proteína heteróloga, siempre que dicho análogo de péptido sea como se define en las reivindicaciones. Una proteína heteróloga tiene una secuencia de amino ácido no esencialmente similar a la del fragmento de péptido de FMNT1. La proteína heteróloga puede ser fusionada al término-N o al término-C del fragmento de péptido de FMNT1. Las proteínas pueden incluir, pero no se limitan a proteínas de fusiones de polipéptido histidina, proteínas de fusiones marcadas con gen myc, proteínas de fusiones Ig y proteínas de fusiones enzimáticas, por ejemplo, fusiones de beta-galactosidasa. Tales proteínas de fusión, en concreto de fusiones de polipéptido histidina, pueden facilitar la purificación de fragmentos de péptidos recombinantes de FMNT1.

50 Los miméticos de péptidos del/ de los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR se describen también aquí y pueden actuar como drogas para la modulación de viabilidad y crecimiento celular neuronal por, por ejemplo, bloqueo de la función de proteínas que comprendan los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR. En la industria farmacéutica, se entiende generalmente que los miméticos de péptidos incluyen drogas no péptidas que tienen propiedades análogas a las de las del péptido mimetizado. Los principios y prácticas de diseño de miméticos de

péptidos se conocen en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Fauchere, J., *Adv. Drug. Res.* 15:29 (1986); y Evans et al., *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987).

Los miméticos de péptidos que llevan una similitud estructural con los péptidos terapéuticamente útiles pueden ser usados para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, tales miméticos de péptidos tienen uno o más enlaces de péptidos opcionalmente reemplazados por un enlace, que puede convertir propiedades deseables tales como la resistencia a la descomposición química *in vivo*. Tales enlaces pueden incluir –CH₂NH–, –CH₂S–, –CH₂–CH₂–, –CH=CH–, –COCH₂–, –CH(OH)CH₂–, y –CH₂SO–. Los miméticos de péptidos pueden mostrar unas propiedades farmacológicas intensificadas (vida media biológica, índices de absorción, etc.), especificidad diferente, estabilidad incrementada, economías de producción, antigenicidad disminuida y similares, lo que hace su uso terapéutico especialmente deseable.

El diseño racional de los miméticos o moléculas enlazantes de los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR, basados en estructuras de péptidos modeladas (o determinadas experimentalmente), puede ser llevado a cabo por los expertos en la materia, usando procedimientos conocidos de diseño racional de sustancias. La finalidad del diseño racional de sustancias es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos o compuestos objeto. Por la creación de dichos análogos, es posible modelar drogas que sean más activas o estables que las moléculas naturales, que tienen diferente susceptibilidad a la alteración o que pueden afectar a la función de diversas otras moléculas. En una aproximación, una generaría una estructura tri-dimensional para una molécula objeto, o un fragmento de la misma. Esto podría ser llevado a cabo por cristalografía de rayos x, modelado por ordenador o por una combinación de ambas aproximaciones.

Métodos de producción

Se entiende que una composición de péptido FMNT de la presente invención puede ser producida por un método que sea conocido en el estado de la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, síntesis química por síntesis de fase sólida y purificación de los demás productos de las reacciones químicas por HPLC, o producción por la expresión de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN), codificando un péptido o polipéptido que comprenda un péptido FMNT de la presente invención en un sistema de traslación *in vitro* o en una célula viviente. Preferiblemente, el péptido FMNT de la composición es aislado y extensivamente dializado para eliminar una o más moléculas de peso molecular pequeño no deseadas y/o es liofilizado para una formulación más preparada para un portador deseado. Se entiende que los amino ácidos adicionales, las mutaciones, la modificación química y similares, si hay algo de eso, que son producidas en un componente de péptido FMNT, de forma preferible, no interferirá sustancialmente con el reconocimiento de receptor de la secuencia de acoplamiento de FMNT.

Un péptido o polipéptido correspondiente a uno o más fragmentos de FMNT1 de la presente invención es de una longitud de seis a 32 residuos amino ácidos, y puede contener hasta alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 15, alrededor de 20 o alrededor de 30 residuos o así. Una secuencia de péptido puede ser sintetizada por métodos conocidos por los expertos en la materia, como, por ejemplo, la síntesis de péptidos usando máquinas automáticas de síntesis de péptidos, tales como las disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA). La invención proporciona además la síntesis y uso de péptidos cíclicos como los derivados de (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1) y (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6) según se muestra en la Tabla 1 *infra*.

Se pueden introducir modificaciones covalentes en un péptido por reacción de residuos objeto de amino ácidos con agente de derivación orgánica que sea apto para reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. La modificación covalente de polipéptidos usando agentes de derivación orgánica es conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, los residuos cisteínicos pueden ser reaccionados con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para obtener carboximetilo o derivados carboxiamidometilos. Pueden ser derivados residuos histidilos por reacción con dietilpirocarbonato a un pH 5.5-7.0, o con bromuro para-bromofenacilo a un pH 6 en 1 M de cacodilato de sodio. Los residuos terminales de lisinila y aminos pueden ser reaccionados con anhídridos succínicos u otros de ácido carboxílico. Los residuos arginilos pueden ser modificados por reacción con uno o varios re – agentes convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanediona, y ninhidrina. Los marcadores espectrales pueden ser introducidos en residuos tírosilos por reacción con compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano: más comúnmente, se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de tírosilo O-acetilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los grupos del área de carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden ser selectivamente modificados por reacción con carbodiimidos (R'-N-C-N-R') tales como carbodiimida 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinilo-(4-etilo) o carbodiimida 1-etil-3 (4 azonia 4,4-dimetilpentilo). Ulteriormente, los residuos de aspartilo y glutaminilo son transformados en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacciones con iones de amonio. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo pueden ser de – amidados para obtener los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidróxilos de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -aminos de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, 1983, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86), acetilación de la amina N-terminal, y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilos C-terminales.

La invención proporciona ulteriormente los novedosos análogos de péptidos FMNT como se define en las reivindicaciones para uso en ensayos y equipos para ensayos, tanto en forma libre como enlazado a una molécula portadora tal como una proteína o una partícula sólida, además de péptidos modificados enlazados a un marcador o trazador, por ejemplo, isotiocianato de biotina o fluoresceína.

La reticulación del fragmento de péptido FMNT1 para obtener una matriz de soporte no soluble en agua puede ser llevada a cabo con agentes bi – funcionales conocidos en el estado de la técnica, incluyendo esteros de 1,1-bis(diazoacetilo)-2-feniletano, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, esteros con ácido 4-azidosalicílico, imidoesteros homobifuncionales, incluyendo esteros disuccinimidilos tales como 3,3'-ditiobis(succinidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes bifuncionales tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato producen intermediarios foto-activables que son capaces de formar retículas en la presencia de luz. De forma alternativa, las matrices reactivas no solubles en agua, como los carbohidratos cianógenos activados por bromuro pueden ser utilizados para la inmovilización de proteínas.

La reticulación de un fragmento de péptido FMNT1 a una segunda proteína, incluyendo un segundo fragmento de péptido FMNT1, puede ser llevada a cabo usando los reagentes bifuncionales descritos aquí. En otra alternativa, se inserta un espaciador, por ejemplo, un grupo ditiolo o un grupo diamino o múltiples residuos de amino ácidos, por ejemplo, glicina. El espaciador puede ser también un reticulador homo- o hetero-bifuncional, por ejemplo, el reticulador heterobifuncional N-(4-carboxi-ciclohexil-metil)-maleimida.

Los anticuerpos a un fragmento de péptido FMNT1 pueden ser preparados por procedimientos conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Una amplio intervalo de especies animales pueden ser usadas para la producción de anticuerpos. Generalmente, el animal usado para la producción de anticuerpos es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, un cerdo de guinea y/o una cabra. El antisuero puede ser usado como tal para diversas aplicaciones. De forma alternativa, la fracción de anticuerpo deseada puede ser purificada por procedimientos bien conocidos tales como cromatografía de afinidad usando otro anticuerpo, cromatografía de proteína A y proteína G, y cromatografía usando un péptido enlazado a una matriz sólida.

La reactividad inmunológica de reticulación puede ser determinada usando análisis inmunológicos ordinarios conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, puede ser llevado a cabo el análisis inmunoabsorbente enlazado de enzima (AIAEE) por la inmovilización de un análogo de péptido FMNT1 sobre la superficie de los pocillos de una placa microtituladora, contactando entonces el análogo de péptido FMNT1 inmovilizado con anticuerpos a un fragmento de péptido FMNT1. Después de lavar para eliminar el anticuerpo no enlazado y no específicamente enlazado, puede ser detectado el anticuerpo enlazado. Mientras que los anticuerpos iniciales están enlazados a un marcador detectable, el anticuerpo enlazado puede ser directamente detectado. De forma alternativa, el anticuerpo enlazado puede ser detectado usando un segundo anticuerpo que tiene afinidad de enlazado para el primer anticuerpo, estando el segundo anticuerpo enlazado a un marcador detectable.

Los péptidos o polipéptidos más largos, por ejemplo, una proteína de fusión, pueden ser producidos por técnicas convencionales de ADN recombinante. Por ejemplo, una fragmento de ADN que codifica un fragmento de péptido FMNT1 puede ser clonado en un vector de expresión disponible en el mercado que ya contenga una proteína heteróloga, siendo el resultado un fragmento de péptido FMNT1 fusionado estructuralmente a la proteína heteróloga.

En ciertas realizaciones, puede ser usado un ácido nucleico que codifique un péptido FMNT y/o un componente descrito aquí, por ejemplo, para producir un péptido *in vitro* o *in vivo* para las diversas composiciones y procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifique un péptido FMNT es un componente de, por ejemplo, un vector en una célula recombinante. El ácido nucleico puede ser expresado para producir un péptido o un polipéptido que comprenda una secuencia de péptido FMNT. El péptido o polipéptido puede ser secretado de la célula, o como para de o en el interior de la célula.

Composiciones

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los análogos de péptido de la presente invención, como se definen en las reivindicaciones, conjuntamente con un diluyente farmacéuticamente aceptable y/o portador. En el estado de la técnica son bien conocidos portadores/diluyentes adecuados e incluyen solución salina u otros medios acuosos estériles, incluyendo opcionalmente componentes adicionales tales como sales de amortiguación y conservantes, o azúcares, almidones, sales o mezclas de los mismos.

Las composiciones farmacológicas de la presente invención se preparan en formas unitarias de dosificación convencional por la incorporación de uno o más de los análogos de péptido FMNT con un medio "portador" farmacéutico no tóxico, inerte, de acuerdo con metodologías aceptadas, en una concentración no tóxica suficiente para producir la actividad fisiológica deseada en un mamífero y, en concreto, un sujeto humano. Preferiblemente, la

composición contiene el ingrediente activo en una concentración biológicamente activa, pero no tóxica, por ejemplo, una concentración de aproximadamente 5 ng a 50 mg de ingrediente activo por unidad de dosificación (por ejemplo, por kilogramo de peso del cuerpo del sujeto). La concentración utilizada será dependiente de tales factores como la actividad biológica específica en su conjunto del ingrediente, actividad biológica específica deseada, además de las condiciones y peso corporal del sujeto.

El portador o vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido o un líquido y puede ser usada una diversidad de fórmulas farmacéuticas. Así, cuando se utiliza un portador sólido, la preparación puede ser molida hasta dejarla plana, micronizada en aceite, tabulada, ubicada en una gelatina dura o una cápsula entéricamente revestida en forma de polvo micronizado o de bolita, o en forma de un troqueo, rombo o supositorio. El portador sólido, que contiene el análogo de péptido FMNT, puede ser también pulverizado previamente a su uso.

Cuando se utiliza en un portador líquido, la preparación puede estar en forma de un líquido, tal como una ampolla, o como una suspensión líquida acuosa o no acuosa. Para la administración tópica, el ingrediente activo puede ser formulado usando bases suaves, humidificadoras, tales como ungüentos o cremas. Ejemplos de bases de ungüentos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, vaselina más siliconas volátiles, lanolina y agua en emulsiones de aceite tales como Eucerin® (Beiersdorf). Los ejemplos de bases de cremas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, Nivea Cream® (Beiersdorf), cold cream (USP), Purpose Cream® (Johnson & Johnson), ungüento hidrofílico (USP), y Lubriderm® (Warner-Lambert).

Adicionalmente, con relación a la presente invención, el ingrediente activo puede ser aplicado de forma interna a o cerca de la zona de la motoneurona afectada. Por ejemplo, un medio sólido o gelificado que sea suficientemente permeable para permitir la liberación del ingrediente activo, preferiblemente en una forma de liberación temporizada, puede ser utilizado para tal aplicación interna. Los ejemplos de tales geles incluyen, pero no se limitan a, hidrogeles tales como poliacrilamida, agarosa, gelatina, alginato, u otras gomas polisacáridas. Además, el ingrediente activo puede estar incrustado en un material sólido, tal como papel de filtro, que es apto para absorber y, subsiguientemente, liberar el ingrediente activo, en el tiempo y ubicación apropiados.

Los péptidos FMNT de acuerdo con la presente invención pueden ser suministrados para su uso en cualquier forma adecuada, apropiada para el protocolo de administración y/o las necesidades de un paciente.

Aparte de las composiciones farmacéuticamente aceptables referidas supra, los péptidos pueden por ejemplo ser suministrados, o bien de forma singular o en combinación, en formas sólidas liofilizadas o secadas por congelación.

Procedimientos de uso

Se ha demostrado aquí que las moléculas FMNT truncadas que comprenden los dominio(s) WMLSAFS y/o FSRYAR, tales como NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6, NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7, así como otros pequeños derivados de péptidos que constituyen un dominio WMLSAFS y/o FSRYAR, mantienen las funciones neurotróficas y neurotrópicas mostradas por el FMNT1-F6 33-mero. Estos análogos de péptido FMNT introducen el crecimiento celular en líneas celulares neuronales al proporcionar la misma señal biológica producida por la expresión de alto nivel de FMNT1 (que ha mostrado promover selectivamente la viabilidad neuronal motora y la regeneración axónica *in vitro* e *in vivo*). Tales agentes comprenden una clase novedosa de droga neurotrófica y neurotrópica.

El FMNT1 y/o sus análogos de péptido promueven la supervivencia de neuronas motoras de mamíferos *in vitro* y estimulan la proliferación de la línea celular VSC4.1, un híbrido entre neuronas motoras y células de neuroblastoma. De forma acorde, la presente invención proporciona un análogo de péptido FMNT como se define en las reivindicaciones para su uso como un factor/suplemento de crecimiento para cultivos celulares neuronales, incluyendo la promoción de la supervivencia de cultivos primarios de neuronas o estimulación de la proliferación celular de líneas celulares neuronales, mediante el cultivo de células neuronales *in vitro* con una cantidad efectiva de un análogo de péptido de FMNT como se definió *supra*.

La administración *in vivo* de FMNT1 a nervios periféricos de rata quirúrgicamente axotomizados resultó en un porcentaje notablemente superior de neuronas motoras supervivientes que en los controles no tratados, que podrían ser bloqueados por la co-administración de anticuerpo monoclonal anti-FMNT1. Se demostraron efectos beneficiosos ulteriores del FMNT1 en ratas sujetas a hemi-sección de médula espinal, reparada por un auto-injerto de nervio periférico e implantado con porciones de gel que contienen FMNT1 en estrecha cercanía a las uniones del injerto de nervio con la médula espinal. Los animales tratados con FMNT1 exhibieron índices más elevados de neuronas motoras supervivientes además de una recuperación mejorada de la función motora y sensorial. Además, como se demostró en el modelo de nervio femoral, descrito con mayor detalle en los ejemplos infra, el tratamiento de nervios femorales de ratas, transeccionados y suturados, con péptidos FMNT1 resultaron en incrementos significativos en las proyecciones correctas de neuronas motoras a tejidos objeto de músculo *in vivo*, además de

significativas reducciones en el número de proyecciones incorrectas para desechar. Así, los péptidos FMNT1 de la presente invención son aptos para promover la re – innervación selectiva del tejido objeto muscular.

De forma acorde, la presente invención proporciona una composición como se define en las reivindicaciones para uso en procedimientos terapéuticos o profilácticos para tratar motoneuronas dañadas o enfermas, o condiciones patológicas, tales como enfermedad neurodegenerativas y similares, que se llevan a cabo por la administración de una cantidad efectiva de agente terapéutico apto para promover específicamente la viabilidad celular neuronal y/o la regeneración axiónica. Las indicaciones terapéuticas o profilácticas pueden incluir el tratamiento de (prevención y/o reducción de la severidad) de enfermedades neurológicas incluyendo:

- a) Daño agudo, sub – agudo o crónico al sistema nervioso, incluyendo daño traumático, daño químico, daño vascular y déficits (tales como la isquemia que resulta del ictus), con daño infeccioso/inflamatorio e inducido por tumor.
- b) Envejecimiento del sistema nervioso,
- c) Enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo la esclerosis múltiple,
- d) Enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso y enfermedades musculoesqueléticas incluyendo enfermedades motoneuronales hereditarias tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal;
- e) Daños en los nervios periféricos, en la espina dorsal y en la cabeza,
- f) Neuropatía periférica, neuropatía periférica diabética, neuropatía periférica resultante de SIDA, neuropatía resultante de tratamiento de radioterapia para el cáncer,

La administración del FMNT1 ha sido asociada también como una menor formación de cicatrices y una menor inflamación posterior a la incisión quirúrgica y reparación de las médulas espinales de ratas. Además el FMNT1 recombinante estuvo asociado con una reducción significativa en el crecimiento de células no neuronales, por ejemplo, células gliales y fibroblastos, en explantes de médula espinal *in vivo*. Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona análogos de péptidos FMNT1 novedosos como se definen en las reivindicaciones y composiciones como se definen en las reivindicaciones, que, o bien consisten en los mismos, o bien los contienen para su uso como agentes anti – proliferativos, en concreto agentes anti – inflamatorios o antifibróticos. Además, la presente invención también proporciona un péptido de FMNT, análogo a lo definido en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de inhibición de proliferación y/o migración de células no neuronales, en concreto fibroblastos y células inflamatorias, por administración de dicho análogo de péptido FMNT a un cultivo celular, más en concreto tejido de cicatriz hiperproliferativa o fibroblastos queloides, o su administración a la zona del daño y/o cicatrización en un huésped mamífero. La invención también proporciona tales análogos de péptidos FMNT1 novedosos como se define en las reivindicaciones y composiciones como se define en las reivindicaciones que consisten en los mismos y composiciones que los contienen para su uso en la curación de heridas y para aplicaciones cosméticas.

Los FMNTs de la presente invención pueden ser así utilizados de forma inmediata en aplicaciones farmacológicas. Las aplicaciones *in vivo* incluyen la administración de los factores a sujetos mamíferos y, en concreto, a sujetos humanos. Cualquier forma de administración que resulte en el suministro del agente terapéutico a la célula deseada se contempla dentro del ámbito de la presente invención. La zona de la administración y las células serán seleccionadas por un experto en la materia basándose en una comprensión del trastorno en concreto que está siendo tratado. Los principios de dosificación farmacológica y suministro de droga son conocidos y se describen, por ejemplo, en Ansel, H.C., y Popovich, N. G., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, quinta edición, Lea & Febigar, Publisher, Filadelfia, Pa. (1990).

La administración de péptidos de la invención en cualquiera de los procedimientos aquí descritos puede ser por medio de cualquier protocolo adecuado. El modo concreto de administración puede ser también seleccionado, de forma inmediata, por un experto en la materia y puede incluir, por ejemplo, administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc., siendo la forma preferida la administración tópica en la zona afectada o cerca de la misma. Adicionalmente, la dosificación, frecuencia de dosificación, y duración del tratamiento, pueden ser determinados y optimizados por un experto en la materia dependiendo del trastorno degenerativo en concreto que está siendo tratado. Tal administración de péptidos de la invención lo es en tal cantidad como para producir el resultado efectivo deseado de la actividad del péptido en la zona en cuestión. Así, una cantidad que sea realmente una “cantidad efectiva” puede depender de diversos parámetros, tales como el peso corporal del paciente, grado de actividad requerida, zona de actividad, severidad de la dolencia que va a ser tratada o prevenida, todos los cuales serán mejor comprendidos y apreciados por expertos en la materia.

El término “administrar”, usado aquí, incluye la aplicación del péptido purificado a células o tejidos neuronales o no neuronales lo suficientemente próximos a la zona afectada para que el polipéptido sea efectivo al promover la supervivencia de neuronas de mamíferos y/o la reducida proliferación o infiltración de células no neuronales, tales como fibroblastos o células inflamatorias.

Además, los análogos de péptidos FMNT definidos *supra*, concretamente los análogos de péptido enlazado de la invención, pueden ser usados como inmunógenos para la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales al FMNT1, especialmente para usos terapéuticos, de diagnóstico y de pronóstico. Tales procedimientos de producción de anticuerpos policlonales o monoclonales se describen aquí.

EJEMPLOS

La invención puede ser apreciada, en ciertos aspectos, con referencia a los siguientes ejemplos, ofrecidos a título ejemplificativo, pero no limitativo. Ciertos ejemplos se incluyen a fines comparativos.

Los materiales, reagentes y similares a los que se hace referencia en los siguientes ejemplos se obtienen en el mercado, a menos que se señale lo contrario.

Ejemplo 1 – Procedimiento de producción para Bio Péptidos de FMNT

Este ejemplo muestra cómo fabricar péptidos de FMNT

- 1.) Síntesis – Todos los péptidos fueron sintetizados por vía de química t-Boc usando un Sintetizador de Péptidos Automatizado CS536 (CS Bio Inc.). La desprotección de los grupos Boc fue llevada a cabo usando 40% de ATF (ácido trifluoroacético) en Cloruro de Metileno. Las reacciones de emparejamiento fueron llevadas a cabo durante un periodo de 2 horas usando Diisopropilcarbodiimida (DIC). Las pruebas de Káiser (basadas en la ninhidrina) se llevaron a cabo al completar cada ciclo de emparejamiento para comprobar la eficiencia del emparejamiento.
- 2.) El péptido fue entonces separado de la resina usando FH (fluoruro de hidrógeno). Después de la reacción de FH, el péptido fue entonces extraído con ATF. El material extraído fue entonces liofilizado para obtener un peso exacto previamente al procedimiento de purificación.
- 3.) El péptido en bruto fue entonces cargado en una columna HPLC envuelta con resina C18 de fase reversa. Un gradiente fue extendido desde el Amortiguador A (0.1 % de ATF en H₂O) al Amortiguador B (60 % de acetonitrilo en 0.1 % de ATF/ H₂O) y fueron recogidos fragmentos del eluyente. Los fragmentos resultantes fueron analizados por HPLC analítica y los fragmentos que contenía material con una pureza de >95 % fueron reunidos y liofilizados.
- 4.) El péptido fue entonces congelado y liofilizado. Después del procedimiento final de liofilización, el péptido fue examinado en CS Bio de su pureza HPLC y de su conformación espectral masiva.

Ejemplo 2 – Examen IN VITRO de Derivados de FMNT

Introducción

Los estudios sobre la función de las neuronas motoras han sido alentados por el desarrollo de líneas celulares que mimetizan su función. Varias líneas celulares neuronales que incluyen células de neuroblastoma adrenérgico-N1-115, sensoriales-F11 y motoras-VSC 4.1, además de células Schwann, se han usado como modelos neuronales para la detección in vitro de muerte celular programada (MCP) o apoptosis y/o efectos inhibitorios de sueros de pacientes de esclerosis lateral amiotrófica o pacientes de diabetes como neuropatía en desarrollo, proliferación y diferenciación. En concreto, la línea celular VSC 4.1, un híbrido entre neuronas motoras y células de neuroblastoma desarrollada por el Dr. Stanley Appel, ha sido usada intensivamente en estudios sobre la patogénesis de la esclerosis lateral amiotrófica (Kimura, F., et al., *Annals of Neurology* 35:164-171, 1994; Smith RG, et al. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:3393-3397, 1994; Alexianu, ME, et al. *J Neurochem* 63:2365-2368, 1994; Appel et al. *Clin Neurosci* 3: 368-374, 1995-1996; y Mosier DR, et al. *Ann Neurol* 37:102-109, 1995). Así, las células VSC 4.1 han sido útiles para examinar la patogénesis de neuropatías motoras y para el examen de factores que puedan proteger las células del daño en la eventualidad de factores sistémicos.

Este ejemplo muestra que ciertos péptidos FMNT truncados estimulan la proliferación de células VSC 4.1 de una forma comparable al FMNT1 33-mero. Estos efectos proliferativos pueden estar relacionados con la capacidad del FMNT de bloquear o hacer reversibles menoscabos en los nervios motores.

Procedimientos

Se llevaron a cabo estudios de proliferación en 96 planchas con pocillos utilizando un equipo de examen de proliferación celular de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania). Las células VSC 4.1, un híbrido celular de neuroblastomas/neuronas motoras, fueron cultivados en DMEM con 2% de FBS sin contener FMNT o conteniendo un intervalo de dosificación de FMNT entre 10⁻⁸ a 10⁻⁵ g/ml. Cada tratamiento fue aplicado en pocillos triplicados. Las células fueron cultivadas durante 21 horas y se añadió 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) del equipo de examen a cada pocillo. Después de marcado con BrdU durante 3 horas, las células fueron lavadas, fijadas y secadas. Las células fueron entonces fijadas y el ADN desnaturalizado para mejorar el acceso para el enlace subsiguiente de anticuerpos. Se aplicó anticuerpo anti-BrdU monoclonal de ratón marcado con POD, del equipo de examen, durante 2 horas, seguido por un lavado. El examen fue cuantificado por la adición de la solución de examen colorimétrico (bencidina

de tetrametilo) y lectura a 450 nm sobre un lector de plancha Wallac Vector 2. Las células de los grupos de tratamiento fueron cuantificadas por comparación a los pocillos plancheados con un gradiente de células de 0 a 20.000 células/pocillo sobre la misma plancha. Los datos se expresan como % de control para permitir la variabilidad de plancha a plancha.

5

Resultados

La siguiente tabla resume los resultados de tres conjuntos de exámenes de proliferación celular implementados en ocasiones separadas (10-27-02, 3-28-03 y 8-4-03).

10

TABLA 1

FMNT	Lot#**	M.W.	Grado*	Función Biológica
	10-27-02			
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 16064A1	3706	Rg, L	Efectivo. Dosis Optima a 10 ug/ml
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 16062A2	3706	Rg, C	
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 CS1456	3706	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 0.1 ug/ml
13-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6 43426	1594	Rg, C	
7-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3 43425	841	Rg, L	Efectivo. Dosis Optima a 1 ug/ml
6-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2 43427	799	Rg, L	Efectivo. Dosis Optima a 10 ug/ml
11-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5 43428	1273	Rg, L	Efectivo. Dosis Optima a 10 ug/ml
	3-28-03			
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 16064A1	3706	Rg, L	Efectivo. Dosis Optima a 100 ug/ml
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 CS-C118=CS1456	3706	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 10 ug/ml
13-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6 CS-C171=CS1510	1594	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 0.1 ug/ml
7-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3 CS-C173=CS1511	841	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 100 ug/ml
6-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2 CS-C158=CS1507	799	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 1 ug/ml
11-mer	NUMERO DE	1273	GLPg,L	Efectivo. Dosis

	IDENTIFICACION SECUENCIAL:5			Optima a 1 ug/ml
	8-4-03			
33-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1 CS-C1456=CS-C297	3706	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 0.01 ug/ml
21-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7 CS-C1616=CS-C382	2311	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 0.1 ug/ml
10-mer	NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4 CS-C1597=CS-C337	1201	GLPg,L	Efectivo. Dosis Optima a 0.01 ug/ml

*Rg= grado de investigación (-70% de pureza), GLPg=grado GLP (90-99.8 % de pureza), L= péptido linear, C= péptido cíclico, DO= Dosis Optima

5 **CS-C###= número de serie de un catálogo de procedimiento de fabricación número CS#### de CS Bio Inc., el fabricante de producto GMP. Los números de lote sin "CS" son productos de grado de investigación de Genemed Synthesis.

10 Con referencia a los estudios tempranos de la lista de la Tabla 1, y mostrados en la Figura 2, el FMNT 33mer (grado de investigación) aplicado, solo, a los cultivos, resultó en un incremento máximo del 31.7 % en la proliferación celular de células híbridas de neuroblastoma/neurona motora VSC4.1 en una dosis de 10 µg/ml. No fueron examinadas dosis más altas. El FMNT 33mer cíclico fue de eficacia limitada, estimulando una respuesta máxima de 12.9 % aunque en una dosis más baja que el FMNT, 100 ng/ml.

15 De los otros péptidos suministrados, el más efectivo en este examen fue el 33mero FMNT grado GLP que estimuló una respuesta máxima de 34.3 %, también en una dosis de 100 ng/ml (Figura 2). De los otros péptidos, el FMNT 6mer y 11mer fueron comparablemente efectivos (Figura 2), alcanzando respuestas máximas de 35.1 % y 32.2 %, respectivamente. Estas respuestas fueron también vistas en la dosis más elevada analizada, 10 µg/ml. El FMNT 7mer fue algo menos efectivo con un efecto máximo de 25.1 % en una dosis de 1 µg/ml (Figura 2), aunque este péptido tenía un intervalo de dosis activa más amplio que las otras preparaciones. El péptido 13mer FMNT cíclico fue el menos efectivo de todos los péptidos testados, con un efecto máximo del 17.3 % a 1 µg/ml (Figura 2). Además, en dosis más altas el péptido 13mer FMNT aparentó inhibir la proliferación.

25 Aunque los incrementos de porcentaje divulgados en estos experimentos preliminares no fueron altos, esto se debió, probablemente, al alto índice de proliferación de estas células bajo condiciones basales. Con tal advertencia, los análogos de péptidos FMNT aparentan ser relativamente efectivos en una forma dependiente de las dosis, con la excepción de versiones cíclicas de los péptidos. De los péptidos analizados, el 33mer de grado GLP (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1) fue el más biológicamente activo en este examen, dado el alto índice de proliferación y la baja dosis necesitada para la inducción. El 6mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2) y 11mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5) de grado de investigación son comparablemente efectivos, no sólo entre sí sino también para los FMNT 33mer. El 13mer cíclico (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4) fue significativamente menos efectivo que los otros péptidos derivados. Además, el péptido 33mer FMNT cíclico mostró una actividad de proliferación muy débil en dosis bajas.

35 Otros exámenes de proliferación celular, llevados a cabo de forma esencial como se describió supra, fueron implementados para comparar los efectos de péptidos FMNT de grado GLP.

Las preparaciones de FMNT utilizadas para este examen fueron:

40 16064A-1 33mer de grado de investigación
 CS-C 118 33mer de grado GLP
 CS-C158 6mer de grado GLP
 CS-C173 7mer de grado GLP
 CS-C 172 11mer de grado GLP
 CS-C171 13mer de grado GLP

45 Como se mostró en la Tabla 1 y en la Figura 3, todas las preparaciones de péptido FMNT ejercieron efectos de proliferación sobre células VSC4.1, aunque en grados variantes. La preparación más potente entre el intervalo total de dosis fue el 7mero, mostrado un incremento de pliegue 2.5 incluso en la dosis más baja aplicada, mientras que se ejerce un casi un incremento de pliegue de 3.5 en la proliferación en la dosis más elevada. Aunque el 13mer

mostró alguna eficacia en la dosis más baja, este efecto cayó en dosis más altas. Los dos 33mer mostraron un incremento continuo en respuesta al incremento en la dosificación incrementada, con el 33mer de grado de investigación alcanzando un incremento máximo de alrededor de 3-plegue en la dosis más elevada, mientras que el grado GLP alcanzó un máximo de respuesta de pliegue 3 a 10 µg/ml sin incrementos ulteriores con la elevación de la dosificación. En este conjunto de pruebas, tuvieron resultados menos halagüeños el 6mer, y el 11mer. Aunque estas preparaciones estimularon un incremento casi un 2.5 de pliegue en la proliferación a 1 µg/ml, los resultados en todo el intervalo de dosificación no fueron tan potentes como las otras isoformas de FMNT.

En esta segunda ronda de experimentos, la prueba en su conjunto fue más exitosa, con el agente de proliferación más activo, el 7mer, produciendo un incremento de 350% sobre los controles. Cuatro de seis isoformas de FMNT proporcionaron una proliferación celular VSC4.1 estimulada de 250% o superior. Sin embargo, uno de estos, el 13mer, lo hizo solamente en una dosis única. Las otras dos isoformas de FMNT, esto es, el 6mer y el 11mer, aunque estimularon la proliferación, lo hicieron de forma menos efectiva que los otros. La eficacia relativa sería: 7mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3) > 33mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1) >>6mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2), 11mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5) > 13mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6).

Se llevaron a cabo ulteriores estudios de proliferación celular, esencialmente como se describe *supra*, para examinar la respuesta de las células de neuroblastoma/neuronas motoras a tres nuevas preparaciones de FMNT. Las preparaciones de FMNT utilizadas para estos ensayos fueron:

1456 33mer
1597 10mer
1616 21mer

Como se muestra en la Tabla 1 y en la Figura 4, todas las tres isoformas de FMNT estimularon de forma significativa la proliferación celular VSC4.1 (ANOVA, como se indicó) cuando se expresó como un incremento de porcentaje sobre el control. Además, el 10mer, el 21mer, y el 33mer estimularon de forma significativa ($p < 0.05$) la proliferación sobre el control en dosis específicas. 33mer: $p < 0.02$. 10mer: $p < 0.001$, 21mer: $p < 0.002$.

Como en los experimentos previos, el ensayo en su conjunto fue exitoso. El agente de proliferación más activo resultó ser el 10mero, produciendo aproximadamente un 200% de incremento sobre los controles en los tres niveles inferiores de dosis usados ($p < 0.005$, ANOVA). Todas las tres de esas dosis fueron significativamente diferentes del control (análisis post-hoc de Tukey-Karmer). El 33mer estimuló la proliferación celular ($p < 0.01$, ANOVA) casi tanto como el 10mero en dosis bajas (10^{-9} y 10^{-8} g/ml sensible al análisis post-hoc de Tukey-Karmer), aproximándose cerca de la respuesta al 10mer en dosis más elevadas. Mientras que el 21mero estimuló significativamente la proliferación ($p < 0.05$, ANOVA), el incremento sobre los controles fue de aproximadamente la mitad de las otras dos isoformas de FMNT y no difería significativamente de una dosis a otra, aunque a dosis altas, las respuestas a todos los tres fueron similares.

Así, todas las tres isoformas de FMNT estimularon significativamente la proliferación de neuronas motoras, aunque el 10mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4) y el 33mer (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1) fueron claramente superiores al 21mero (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7). Mientras que estas respuestas porcentuales aparentan ser algo menores que en las pruebas previas, esto podría ser debido a la variabilidad entre los exámenes, causada por diferentes actividades de diferentes pasos celulares en el cultivo.

Ejemplo 3 – Exámenes *in vivo* de actividad neurotrófica

El modelo de nervio femoral

La especificidad de regeneración axónica motora fue investigada en el nervio femoral de la rata. De forma próxima, en la zona de transección y sutura del nervio, los axones que contribuyen tanto a la rama cutánea como a la muscular se entremezclan por todo el nervio. Cuando estos axones se regeneran, tienen igual acceso a los conductos celulares de Schwann motores y sensoriales vecinos, en el fragmento de nervio distal. Esto asegura un elemento de "elección" a nivel axónico. Distalmente, donde la especificidad de regeneración está comprobada, los axones son separados en ramas cutánea y muscular. Los axones motores se encuentran normalmente sólo en la rama muscular, de tal forma que cualquiera re - innervación motora de la rama cutánea representa un fracaso en la búsqueda de la vía. La especificidad de la regeneración axónica se evalúa por aplicación simultánea de peroxidasa de jaramago (PJ) una rama femoral distante y flúor-gold® (FG) en relación con la otra. La regeneración axónica motora se produce al azar en tres semanas, pero el número de proyecciones al músculo correctas se incrementa significativamente en momentos posteriores. Muchas neuronas contienen inicialmente ambos trazadores y, así, proyectan colaterales a ambas ramas cutánea y muscular. El número de estas neuronas de doble marcador disminuye con el tiempo. Las colaterales axónicas motoras son así podadas de la rama cutánea, incrementando el número de proyecciones correctas al músculo a costa de neuronas de doble marcador. Así, tiene lugar una

interacción específica entre los axones motores que se regeneran y el músculo y/o nervio muscular que hemos llamado Re – innervación Motora Preferencial (RMP).

Experimentos de Bomba FMNT

En experimentos preliminares, intentamos modificar la regeneración axónica motora en el nervio femoral por bombeo de 33mer de FMNT a 10^{-4} sobre la zona de reparación, usando una bomba osmótica Alzet que descarga durante al menos 2 semanas. El resultado del bombeo fue cosido al músculo adyacente a la reparación del nervio, de tal forma que la herida del nervio fuera continuamente bañada con el factor. La re – innervación de las ramas cutánea y muscular femoral distal fue cuantificada con trazadoras como se describió *supra*.

Los controles para estos experimentos preliminares fueron un grupo de 10 nervios que fueron sometidos a una sutura y evaluación rutinarias tras tres semanas de regeneración. Una media de 92 neuronas motoras se proyectó correctamente al músculo en tres semanas, mientras que un número mayor (117, de media) se proyectó incorrectamente a la piel. Sin embargo, el tratamiento con 33mer de FMNT en tres animales, más que dobló el número de proyecciones correctas (media= 210) mientras que se reducía dramáticamente el número de proyecciones incorrectas a la piel (media= 31). Estas diferencias fueron altamente significativas a pesar del pequeño número de animales examinados.

En un subsiguiente experimento, el 33mero de FMNT fue administrado a ocho nervios femorales de ratas transectados y suturados a 10^{-4} M, esencialmente como se describió *supra*. Los controles fueron un grupo de seis nervios que fueron sometidos a sutura rutinaria con bombas que suministraban solución salina pero no FMNT. Una media de 100 neuronas motoras se proyectó correctamente en los seis controles, mientras que una media de 87 neuronas motoras se proyectó incorrectamente a la piel. El tratamiento de FMNT una vez más supuso un incremento significativo en proyecciones correctas (media=173) y una considerable reducción en el número de proyecciones incorrectas a la piel (media=59).

Para determinar si un péptido de FMNT truncado podría ser sustituido por un 33mer de FMNT, se llevaron a cabo experimentos subsiguientes, sustancialmente como se describe *supra*, usando el 6mer de FMNT FSRYAR, a 10^{-4} (n=8), 10^{-5} M (n=8) y 10^{-6} M (n=8), con un total de 22 controles salinos para comparación. Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento con el péptido FSRYAR (NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2) resultó en incrementos significativos en proyecciones correctas en cada dosis examinada además de notorias reducciones en el número de proyecciones incorrectas a la piel. Para los controles salinos, el número medio de células que se proyectan correctamente al músculo fue de 85, el número medio de proyecciones incorrectas a la piel fue de 85 y las neuronas de doble marcado tuvieron un promedio de alrededor de 41. En la dosis óptima de 6mer FMNT (10^{-4} M) el número medio de proyecciones correctas se incrementó hasta 125, las proyecciones incorrectas fueron reducidas a 46 y las neuronas de doble marcado disminuyeron hasta 23. Así, el 6mero es capaz de promover la re – innervación selectiva de músculos objeto en una forma similar al 33mer FMNT1.

Estos resultados demuestran una estimulación dramática de la regeneración en el modelo de nervio femoral de la rata usando 33mer de FMNT además del péptido 6mer de FMNT, FSRYAR (NUMERO DE IDENTIFICACION NUMERO: 2). No tenemos datos de otros modelos que muestren un efecto tan significativo. La mayoría de las manipulaciones resultaron en cambios de 20-30 % en el mejor caso, mientras que estos resultados muestran cambios de 36 % a más de 100 %. Resultados tan dramáticos sugieren que FMNT y sus análogos de péptidos están entre los estimuladores más potentes de la regeneración del nervio periférico actualmente en el mercado.

Ejemplo 4- Producción de anticuerpos de péptido anti-FMNT y su uso en exámenes de inmunidad

Los anticuerpos policlónicos de conejo al 33mer de FMNT1 además del 6mero de FMNT, FSRYAR, fueron producidos por Harlan Bioproducts for Sciences, Inc (Indianapolis), siguiendo su protocolo de producción normalizado, que incluyó la conjugación del péptido FMNT con KLH antes de inoculación en conejos. Más péptidos de FMNT fueron conjugados a OVA para ELISA en sangrados periódicos para examen para confirmar el alto título de anticuerpos antes de la producción de sangrados. Los anticuerpos policlónicos fueron purificados entonces por purificación IgG y por purificación *Affinity*.

Los protocolos ELISA competitivos de FMNT fueron desarrollados por Genetel Laboratories, LLC (Madison, Wisconsin), para la detección o medida de péptidos de FMNT, por ejemplo, usando anti-FMNT6mero purificado para detectar la aptitud de de péptidos de FMNT no marcados tales como un 6mero o 10mero para competir con sus contrapuestos biotinilados para el enlace de anticuerpos.

Además, un protocolo ELISA Sandwich de FMNT fue desarrollado, usando anticuerpos de anti - 6mer de FMNT para inmovilizar péptidos de FMNT más grandes que contenían el epítipo de 6mer, por ejemplo 21mer y 33mer, que fueron subsiguientemente detectados usando anticuerpos de 33mer de anti-FMNT biotinilados.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chau, Raymond M.W.
Ko, Dorothy

5

<120> PEPTIDOS DE FMNT Y COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO

<130> 7353-101-XPC

10

<140> PCT/US
<141> 2004-01-21

<150> 60/441.772
<151>2003-01-21

15

<160>7

<170> versión PatentIn 3.1

20

<210>1
<211>33
<212>PRT
<213>Péptido sintético

25

<400>1

Leu Gly Thr Phe Trp Gly Asp Thr Leu Asn Cys Trp Met Leu Ser Ala
1 5 10 15

Phe Ser Arg Tyr Ala Arg Cys Leu Ala Glu Gly His Asp Gly Pro Thr
20 25 30

Gln

30

<210>2
<211>6
<212>PRT
<213>Péptido sintético

<400>2

35

Phe Ser Arg Tyr Ala Arg
1 5

40

<210>3
<211>7
<212>PRT
<213>Péptido sintético

<400>3

45

Trp Met Leu Ser Ala Phe Ser
1 5

50

<210>4
<211>10
<212>PRT
<213>Péptido sintético

<400>4

Met Leu Ser Ala Phe Ser Arg Tyr Ala Arg
 1 5 10

5 <210>5
 <211>11
 <212>PRT
 <213>Péptido sintético

10 <400>5

phe Ser Arg Tyr Ala Arg Cys Leu Ala Glu Gly
 1 5 10

15 <210>6
 <211>13
 <212>PRT
 <213>Péptido sintético

20 <400>6

Cys Trp Met Leu Ser Ala Phe Ser Arg Tyr Ala Arg Cys
 1 5 10

25 <210>7
 <211>21
 <212>PRT
 <213>Péptido sintético

<400>7

Met Leu Ser Ala Phe Ser Arg Tyr Ala Arg Cys Leu Ala Glu Gly His
 1 5 10 15

30 Asp Gly Pro Thr Gln
 20

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de una longitud de 6 a 32 amino ácidos, conteniendo dicho análogo de péptido una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente en:
 - (a) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2; y
 - 5 (b) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3

En el que dicho análogo de péptido incrementa la viabilidad de neuronas motoras.
2. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia amino ácida de dicho péptido es al menos en un 70 % idéntica a de nueve a 32 residuos consecutivos de amino ácido del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.
- 10 3. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia amino ácida de dicho péptido es al menos en un 80 % idéntica a de nueve a 32 residuos consecutivos de amino ácido del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.
- 15 4. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia amino ácida de dicho péptido es al menos en un 90 % idéntica a de nueve a 32 residuos consecutivos de amino ácido del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.
5. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 4, que contiene uno o más substitutivos conservativos de amino ácido a las de siete a 32 residuos consecutivos de amino ácido del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.
- 20 6. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 1, conteniendo dicho péptido un fragmento de seis a 32 residuos consecutivos de amino ácido del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:1.
7. Un análogo de péptido de factor motoneuronotrófico de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo consistente en:
 - (a) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2,
 - 25 (b) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3,
 - (c) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:4,
 - (d) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:5,
 - (e) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:6, y
 - (f) NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:7.
- 30 8. Un conjugado que comprenda:
 - (a) Un péptido de factor motoneurotrófico de 6 a 32 amino ácidos de longitud que contenga una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2 y del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3; y
 - (b) Una partícula sólida, proteína portadora o marcador enlazado al péptido de factor motoneuronotrófico.
- 35 9. Una proteína de fusión que comprenda:
 - (a) Un péptido de factor motoneurotrófico de 6 a 32 amino ácidos de longitud que contenga una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:2 y del NUMERO DE IDENTIFICACION SECUENCIAL:3
 - (b) Una proteína heteróloga fusionada al péptido de factor motoneuronotrófico.
- 40 10. Una composición que comprenda el análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador.
11. Una composición para la promoción selectiva de la viabilidad de neuronas motoras y la regeneración axiónica que comprenda una cantidad efectiva del análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacológicamente aceptable.

12. Una composición para uso en la re – innervación de músculo objeto que comprenda una cantidad efectiva del análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacológicamente aceptable.
- 5 13. Una composición para uso en el tratamiento de daños nerviosos periféricos que comprenda una cantidad efectiva del análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacológicamente aceptable.
14. Una composición para uso en el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa que comprenda una cantidad efectiva del análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacológicamente aceptable.
- 10 15. Una composición para uso en la curación de heridas que comprenda una cantidad efectiva del análogo de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacológicamente aceptable.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la cantidad efectiva es una cantidad suficiente para reducir la formación de tejido de cicatriz.
- 15 17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la cantidad efectiva es una cantidad suficiente para reducir la proliferación o infiltración de células inflamatorias.
18. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para la promoción selectiva de la viabilidad de neuronas motoras y la regeneración axiónica.
- 20 19. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para la reducción de la apoptosis de motoneuronas dañadas y las células de Schwann asociadas en una zona de daño.
20. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para la inhibición del crecimiento, viabilidad o migración de células no neuronales seleccionadas del grupo consistente de fibroblastos, macrófagos y linfocitos en una zona de daño.
- 25 21. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del daño en la médula espinal.
22. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad degenerativa neuromuscular, siendo dicha enfermedad neurodegenerativa neuromuscular una enfermedad en la que los músculos asociados con las
- 30 23. El uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para la protección de motoneuronas de la degeneración en una zona de daño nervioso periférico.
- 35 24. Uso de un análogo de péptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la preparación de un medicamento para el alivio de la neuropatía periférica y del daño neuropático en una zona de daño neuropático.

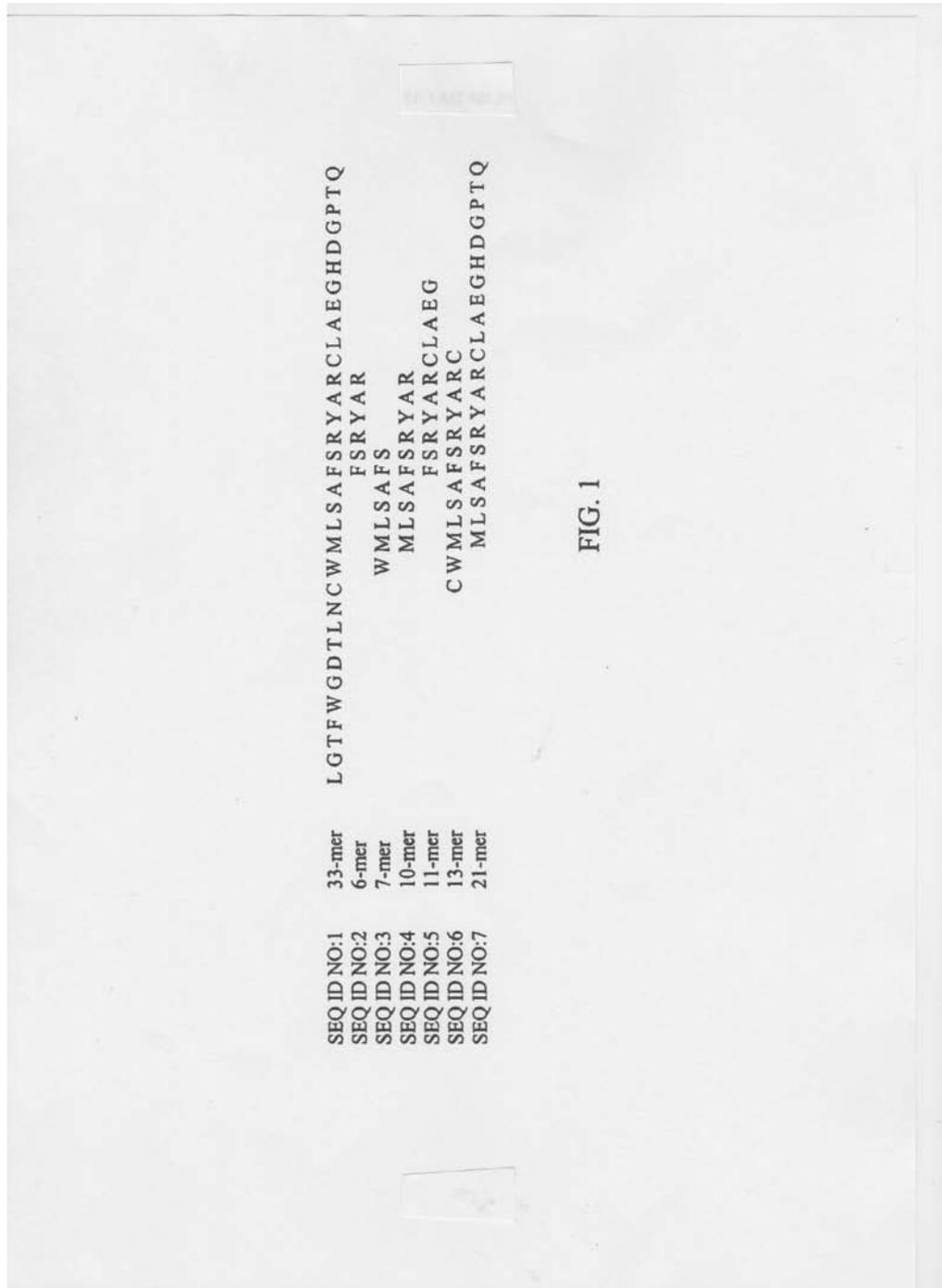


FIG. 1

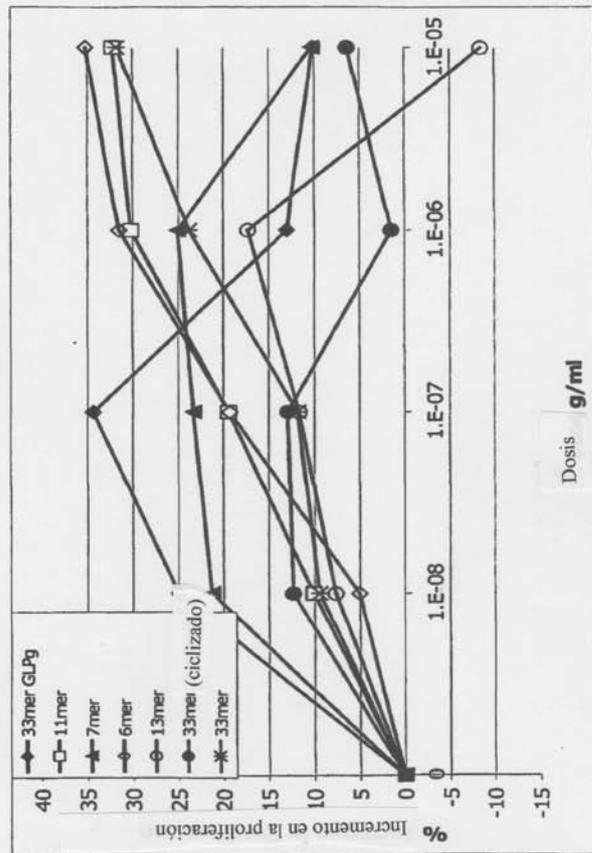


FIG 2

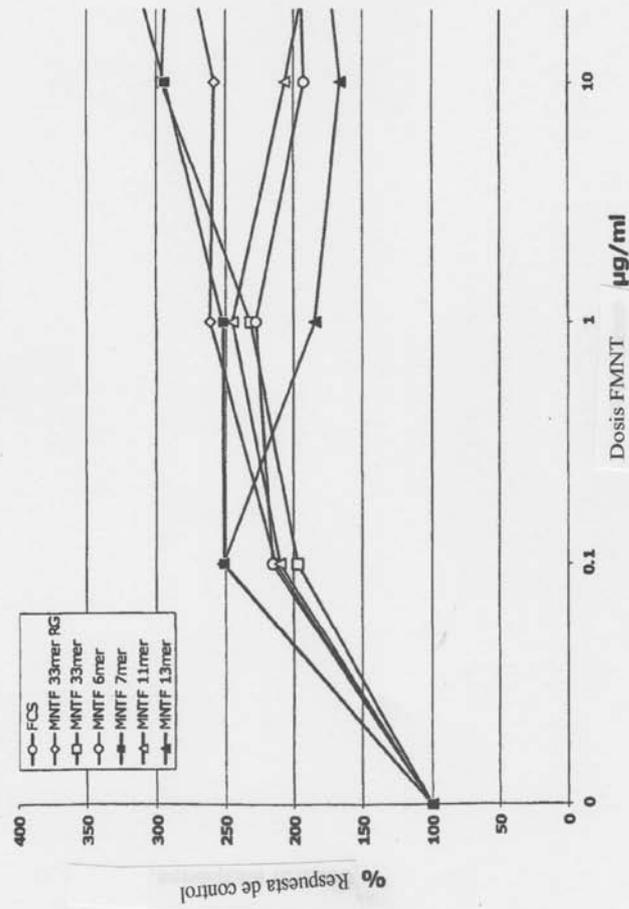


FIG. 3

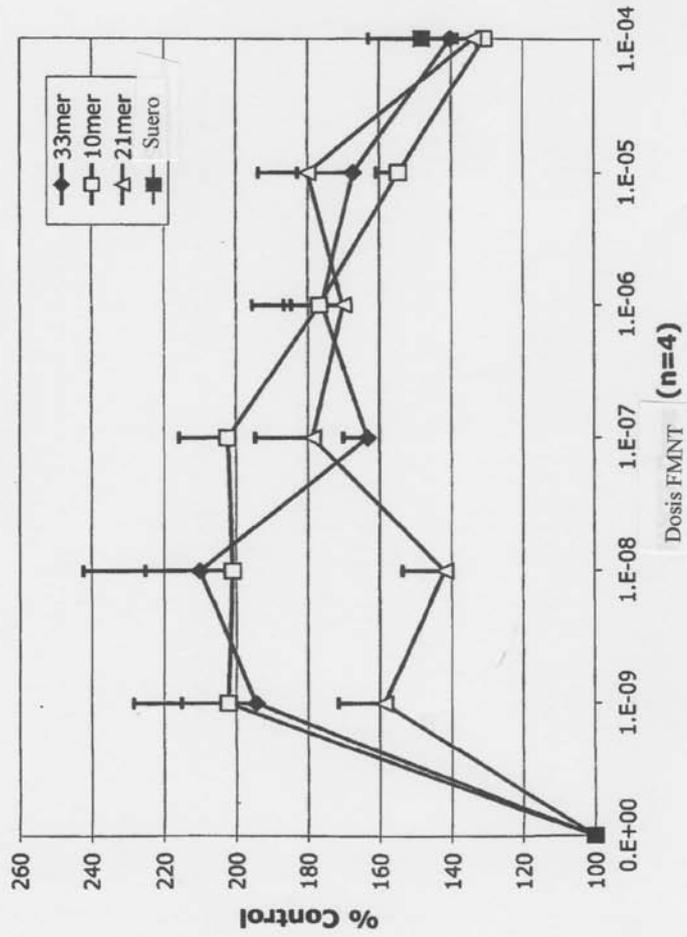


FIG. 4

