

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 827**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09727511 .9**  
96 Fecha de presentación: **24.03.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2274016**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2011**

54 Título: **Uso de variantes de IGF-I PEGiladas para el tratamiento de trastornos neuromusculares**

30 Prioridad:  
**03.04.2008 EP 08153994**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.10.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**HOLTMANN, Bettina;**  
**METZGER, Friedrich y**  
**SENDTNER, Michael**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

ES 2 388 827 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

Uso de variantes de IGF-I PEGiladas para el tratamiento de trastornos neuromusculares

5 La presente invención se refiere a variantes del IGF-I modificadas con polietilenglicol (= PEGiladas) para uso en el tratamiento, prevención y/o retardo de la progresión de trastornos neuromusculares de conformidad con las reivindicaciones, en particular de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una variante de la IGF-I PEGilada para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento, prevención y/o retardo de trastornos neuromusculares de conformidad con las  
10 reivindicaciones, en particular de la ELA, en el que la variante PEGilada de la IGF-I se caracteriza porque se deriva de la secuencia de aminoácidos de la IGF-I humana de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) y lleva una o dos alteraciones de aminoácidos de las posiciones 27, 65 y 68 de modo que uno o dos aminoácidos de las posiciones 27, 65 y 68 es/son un aminoácido polar, pero no la lisina y el PEG está insertado por lo menos en un resto lisina.

15 Los trastornos neuromusculares abarcan un amplio abanico de estados patológicos que incluyen neuropatías (ya sea adquiridas, ya sea hereditarias), distrofias musculares, ELA, atrofia muscular espinal (AME), así como una serie de trastornos musculares muy raros. Los trastornos neuromusculares afectan a los nervios que controlan los músculos voluntarios. Las neuronas enferman o mueren, se interrumpe la comunicación entre el sistema nervioso y los músculos. De ello resulta que los músculos se debilitan y se atrofian. La debilidad puede conducir a  
20 contracciones, calambres, dolores y problemas de articulaciones y movimientos. Algunas veces afecta también al funcionamiento del corazón y a la capacidad de respirar. Hay muchas causas de este debilitamiento muscular progresivo, que pueden aparecer en cualquier época de la vida, desde la infancia hasta la edad adulta.

La distrofia muscular (DM) es un subgrupo de trastornos neuromusculares. La DM constituye un grupo de  
25 enfermedades hereditarias de los músculos. Algunas formas afectan a los niños (p.ej., distrofia de Duchenne) y son letales en el curso de dos o tres décadas. Otras formas aparecen en la edad adulta y progresan más lentamente. Se han identificado los genes de varias distrofias, incluida la distrofia de Duchenne (causada por mutaciones en el gen de la distrofina) y la distrofia de Miyoshi, o su variante, distrofia muscular de la cintura pelviana 2B o LGMD-2B (causada por mutaciones en el gen de la disferlina). Estas son mutaciones de "pérdida de función" que impiden la  
30 expresión de la proteína relevante en el músculo y, por tanto, provocan la disfunción muscular. Existen modelos murinos de estas mutaciones, ya sean espontáneas en la naturaleza, ya sean generadas por inactivación o delección de los genes relevantes. Estos modelos son útiles para terapias de ensayo que pueden reemplazar la proteína que falta en el músculo y restablecer el funcionamiento muscular normal.

35 Los trastornos neuromusculares incluyen también a las enfermedades de neuronas motoras (MND), que pertenecen al grupo de los trastornos neurológicos atribuidos a la destrucción de neuronas motoras del sistema nervioso central y los cambios degenerativos de las vías de transmisión de las neuronas motoras, y son diferentes de otras enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la atrofia olivopontocerebelosa, etc., causadas por la destrucción de neuronas distintas de las neuronas motoras. El National  
40 Institute of Neurological Diseases and Stroke (NINDS, Instituto Nacional de Enfermedades Neurológicas y Apoplejía) define las enfermedades de las neuronas motoras (MND) como trastornos degenerativos progresivos, que afectan a los nervios de las partes superior o inferior del cuerpo. Algunas son hereditarias, según el NINDS. En general, las MND aparecen en la edad adulta. Los síntomas pueden incluir dificultades de deglución, debilidad de las extremidades, lenguaje bulbar, trastornos de marcha, debilidad facial y calambres musculares. La respiración puede  
45 resultar afectada en los últimos estadios de estas enfermedades. La causa o causas de la mayoría de las MND son desconocidas, pero existen sospechas de la intervención de factores medioambientales, tóxicos, víricos y genéticos. Las formas de las MND incluyen la atrofia muscular espiral (AME) adulta, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, la atrofia muscular espiral progresiva infantil (AME1), también conocida como AME de tipo 1 o de Werdnig-Hoffman, la atrofia muscular espiral intermedia (AME2), también conocida como AME de tipo 2, la atrofia muscular espiral juvenil (AME3), también conocida como AME de tipo 3 o de Kugelberg-Welander, atrofia muscular bulbar espinal (AMBE), también conocida como enfermedad de Kennedy o  
50 AMBE asociada a X. Las enfermedades de neuronas motoras son trastornos, en los que las neuronas motoras degeneran o mueren. Las neuronas motoras, incluidas las neuronas motoras superiores y las inferiores, afectan a los músculos voluntarios, los estimulan para que se contraigan. Las neuronas motoras superiores tienen su origen en la corteza cerebral y envían fibras a través del tronco encefálico y la médula espinal, participan en el control de las neuronas motoras inferiores. Las neuronas motoras inferiores están situadas en el tronco encefálico y en la médula espinal y envían fibras hacia los músculos. Las enfermedades de las neuronas motoras inferiores son enfermedades que incluyen la degeneración de dichas neuronas motoras inferiores. Cuando una neurona motora se degenera, las fibras musculares que normalmente se activan por ella, se desconectan y no se contraen, originándose una debilidad muscular y pérdida de reflejos. La pérdida de uno de los dos tipos de neuronas se  
60 traduce en debilidad, atrofia muscular y debilidad dolorosa son las características clínicas de la MND.

La ELA es una enfermedad fatal de las neuronas motoras, caracterizada por la pérdida selectiva y progresiva de  
65 neuronas motoras de la médula espinal, del tronco encefálico y de la corteza cerebral. De forma típica conduce a la debilidad muscular progresiva y al fallo respiratorio neuromuscular. Aproximadamente el 10% de las ELA están asociadas con mutaciones puntuales del gen que codifica a la enzima superóxido-dismutasa 1 (SOD1) de Cu/Zn. El

descubrimiento de esta causa genética primaria de la ELA ha proporcionado una base para explorar varias posibilidades terapéuticas. Las potentes actividades neuroprotectoras de los factores neurotróficos (NTF), que van desde la prevención de la atrofia neuronal, la degeneración de los axones y la muerte celular, generaron una gran esperanza para el tratamiento de la ELA a principio de la década de los años 90. El factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1) ya se han evaluado en pacientes de ELA. La razón fundamental para evaluar estos factores en pacientes de ELA se basa en sus efectos tróficos en los paradigmas de muerte celular de tipo natural durante el desarrollo, la lesión nerviosa traumática o en modelos animales similares a la ELA, por ejemplo pmn o ratones cojos. Excepto el IGF-1 (Lai, E.C. y col. *Neurology* **49**, 1621-1630, 1997), el suministro sistémico de estas proteínas recombinantes no conduce a efectos clínicamente beneficiosos en los pacientes de ELA (Turner, M.R. y col., *Semin. Neurol.* **21**, 167-175, 2001). Los efectos secundarios molestos y la biodisponibilidad limitada han dificultado la evaluación de sus potenciales beneficios clínicos. Una dificultad práctica para la aplicación de las neurotrofinas consiste en que estas proteínas tienen todas ellas una vida media relativamente corta, mientras que las enfermedades neurodegenerativas son crónicas y requieren un tratamiento de larga duración.

En fechas contemporáneas se han generado varias cepas de ratones transgénicos que sobreexpresan diferentes mutaciones SOD1 asociadas a ELA (Newbery, H.J. y col., *Trends Genet.* **17**, S2-S6, 2001). Imitando estrechamente muchos de los rasgos clínicos y neuropatológicos de la ELA, estos ratones han proporcionado más modelos animales relevantes para investigar el potencial preclínico de los factores neurotróficos. La administración directa de proteínas tróficas recombinantes ha sido decepcionante. Los efectos beneficiosos en la neuropatología de las neuronas motoras han sido insignificantes o nulos (Azari, M.F. y col., *Brain Res.* **982**, 92-97, 2003; Feeney, S.J. y col., *Cytokine* **23**, 108-118, 2003; Dreibelbis, J.E. y col., *Muscle Nerve* **25**, 122-123, 2002). Sin embargo, el suministro de factores neurotróficos mediado por vectores víricos, por ejemplo el factor neurotrófico derivado de líneas celulares gliales (GDNF), el IGF-I o la cardiotrofina-1 (CT-1), revela una mejora del comportamiento o de la neuropatología (Wang, L.J. y col., *J. Neurosci.* **22**, 6920-6928, 2002; Bordet, T. y col., *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1925-1933, 2001; y Kaspar, B.K. y col., *Science* **301**, 839-842, 2003), lo cual sugiere que con un régimen apropiado de aplicación se puede lograr eficacia.

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) es una hormona anabólica circulante, estructuralmente similar a la insulina. En su circulación, más del 99 % del IGF-I se une a proteínas de fijación del IGF-I (IGFBP), que tienen una gran afinidad con los IGF y modulan la función del IGF-I. Este factor puede liberarse localmente a partir de los IGFBP por proteólisis causada por proteasas específicas. La principal fuente del IGF-I del suero (~75 %) es el hígado (Sjögren, K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 7088-7092, 1999; Yakar, S. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 7324-7329, 1999), a pesar de que el IGF-I se produce localmente en cada célula del organismo. Además de su función endocrina, el IGF-I tiene un rol paracrino en el cerebro en desarrollo y en el maduro (Werther, G.A. y col., *Mol. Endocrinol.* **4**, 773-778, 1990). Los estudios "in vitro" indica que el IGF-I es potente agente trófico no selectivo para diversos tipos de neuronas del SNC (Knusel, B. y col., *J. Neurosci.* **10**, 558-570, 1990; Svrzic, D. y Schubert, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 54-60, 1990), incluidas las neuronas dopaminérgicas (Knusel, B. y col., *J. Neurosci.* **10**, 558-570, 1990), oligodendrocitos (McMorris, F.A. y Dubois-Dalq, M., *J. Neurosci. Res.* **21**, 199-209, 1988; McMorris, F.A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 822-826, 1986; Mozell, R.L. y McMorris, F.A., *J. Neurosci. Res.* **30**, 382-390, 1991) y neuronas motoras espinales (Hughes, R.A. y col., *J. Neurosci. Res.* **36**, 663-671, 1993; Neff, N.T. y col., *J. Neurobiol.* **24**, 1578-1588, 1993; Li, L. y col., *J. Neurobiol.* **25**, 759-766, 1994). Se ha demostrado la entrada del IGF-I periférico en el cerebro por transporte mediado por receptor a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Rosenfeld, R.G. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 159-166, 1987; Duffy, K.R. y col., *Metab. Clin. Exp.* **37**, 136-140, 1988; Pan, W. y Kastin, A.J., *Neuroendocrinology* **72**, 171-178, 2000). Los datos preclínicos generados principalmente en ratones transgénicos de SOD1 proporcionan una gran evidencia de que el IGF-I despliega su eficacia en los parámetros relativos a la ELA, cuando se administra por vía intratecal o mediante dispositivos de liberación lenta o mediante estrategias terapéuticas genéticas (Kaspar y col., *Science* **301**, 839, 2003; Boillee y Cleveland, *Trends Neurosci* **27**, 235, 2004; Dobrowolny y col., *J. Cell. Biol.* **168**, 193, 2005; Nagano y col., *J. Neurol. Sci.* **235**, 61, 2005; Narai y col., *J. Neurosci. Res.* **82**, 452, 2005). Esto sugiere que se requiere un suministro constante de IGF-I, dado que de momento no se han publicado datos sobre modelos de ELA por aplicación parenteral del IGF-I en dosis adecuadas para el uso en humanos.

En la patente US-5,093,317 se menciona que la supervivencia de las células neuronales colinérgicas aumenta con la administración del IGF-I. Se sabe además que el IGF-I estimula la regeneración de los nervios periféricos (Kanje, M. y col., *Brain Res.* **486**, 396-398, 1989) y aumenta la actividad de la ornitina-descarboxilasa (patente US-5,093,317). En la patente US-5,861,373 y en WO 93/02695 A1 se menciona un método para tratar lesiones o enfermedades del sistema nervioso central que afecta principalmente a las células neuronales gliales y/o no colinérgicas aumentando la o las concentraciones activas del IGF-I y/o análogos del mismo en el sistema nervioso central del paciente. El documento WO 02/32449 A1 se refiere a métodos para reducir o prevenir la lesión isquémica del sistema nervioso central de un mamífero por administración a la cavidad nasal de dicho mamífero de una composición farmacéutica que contenga una cantidad eficaz del IGF-I o una variante biológicamente activa del mismo. El IGF-I o la variante del mismo se absorbe a través de la cavidad nasal y se transporta al sistema nervioso central del mamífero en una cantidad eficaz para reducir o prevenir la lesión isquémica asociada con un acontecimiento isquémico. En EP 0 874 641 A1 se reivindica el uso de un IGF-I o de un IGF-II para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la lesión neuronal del sistema nervioso central, debida a la demencia relacionada con el SIDA, la demencia de

Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Pick, la enfermedad de Huntington, la encefalopatía hepática, los síndromes ganglónicos córtico-basales, la demencia progresiva, la demencia hereditaria con paraparesia espástica, la parálisis supranuclear progresiva, la esclerosis múltiple, la esclerosis cerebral de Schilder o la encefalomielitis hemorrágica necrotizante aguda, en las que el medicamento es una cantidad eficaz de dicho IGF

5 que se administra por vía parenteral fuera de la barrera hematoencefálica o de la barrera hematocefalorraquídea.

Sin embargo, para el uso clínico, la corta vida media del IGF-I en la periferia después de la aplicación exógena constituye un inconveniente claro y requiere una frecuencia alta de dosificación, que genera objeciones graves. Los efectos secundarios (por ejemplo la hipoglucemia, observada a menudo en ensayos clínicos con el IGF-I, véase

10 también el informe 21-839 ([http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2005/021839\\_S000\\_Increlex\\_Pharm.pdf](http://www.fda.gov/cder/foi/nda/2005/021839_S000_Increlex_Pharm.pdf)), debidos a la fuerte sobrecarga de IGF-I, limitan la dosis máxima tolerada a un nivel, en el que ya no se alcanza la eficacia sostenida. Para paliar este inconveniente y conseguir dosis más elevadas con vistas a una mejor actividad se necesitaría un IGF-I modificado, de velocidad de absorción más lenta, permanencia en sangre larga y estable, pero conservando la bioactividad. Con el fin de asegurar que dicho IGF-I modificado puede desplegar todavía su acción

15 neuroprotectora se requiere también que el transporte a través de la barrera hematoencefálica sea plenamente activo.

En el uso preclínico se ha intentado superar por lo menos alguna de las dificultades recién mencionadas mediante el encapsulado del IGF-I en envases de liberación lenta, por ejemplo minibombas y microsferas, para conseguir el suministro constante sin fluctuaciones excesivas de concentración de compuesto a la sangre (Carrascosa, C. y col., Biomaterials 25, 707-714; WO 03/077940 A1). Sin embargo, aplicando esta estrategia se observa un fuerte aumento inicial del IGF-I en la sangre, que puede generar en los humanos los mismos efectos secundarios agudos que la inyección s.c. del IGF-I.

25 De modo sorprendente se ha encontrado que las variantes del IGF-I PEGiladas específicamente (PEG-IGF-I), inyectadas por vía parenteral, tienen el perfil farmacocinético requerido. Dichas variantes PEGiladas del IGF-I no despliegan actividad hipoglucémica aguda en dosis y/o concentraciones en plasma de hasta >10 veces superiores a las del IGF-I no PEGilado. Cabía esperar claramente que la PEGilación desequilibrara la unión y la penetración del IGF-I a través de la barrera hematoencefálica mediada por un receptor. Las variantes IGF-I PEGiladas descritas con

30 detalle a continuación son sorprendentemente neuroprotectora y funcionales en animales, es decir, en modelos murinos de trastornos neuromusculares en dos mucho menores que las requeridas para un IGF-I no PEGilado, que indican 1) que el transporte a través de la barrera hematoencefálica está plenamente activo, 2) que la molécula conserva plenamente su actividad biológica "in vivo" y 3) que la hipoglucemia se observa solamente para dosis del PEG-IGF-I >10 veces superiores a las del IGF-I, lo cual permite aplicar una dosificación incluso más alta del PEG-IGF-I a los humanos para conseguir una mejor eficacia.

#### Resumen de la invención

40 En una primera forma de ejecución, la presente invención se refiere a una cantidad farmacéuticamente eficaz de una variante de IGF-I PEGilada de conformidad con las reivindicaciones para uso en un método para el tratamiento de trastornos neuromusculares de conformidad con las reivindicaciones a un paciente que lo necesite.

45 En una forma preferida de ejecución, la presente invención se refiere a una cantidad farmacéuticamente eficaz de una variante de IGF-I PEGilada de conformidad con las reivindicaciones para uso en un método para el tratamiento de MND, en particular ELA en a un paciente que lo necesite.

50 En otra forma de ejecución, la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que contiene una variante de IGF-I PEGilada de conformidad con las reivindicaciones junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento, prevención y/o retraso de la progresión de los trastornos neuromusculares, con preferencia de las MND y con mayor preferencia todavía de la ELA.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una variante de IGF-I PEGilada de conformidad con las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de trastornos neuromusculares de conformidad con las reivindicaciones, con preferencia de las MND y con mayor preferencia todavía de la ELA.

#### Descripción detallada de la invención

60 Salvo que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean aquí tienen los significados entendidos habitualmente por los expertos del ámbito técnico al que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier método o material similar o equivalente a los descritos aquí para llevar a la práctica o verificar la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

Definiciones

- El término “trastornos neuromusculares” abarca a las enfermedades y dolencias que desequilibran el funcionamiento de los músculos ya sea directamente (por una patología muscular intrínseca), ya sea indirectamente (por una patología nerviosa). Los ejemplos de trastornos neuromusculares incluyen:
- 5 enfermedades de neuronas motoras, por ejemplo la ELA (también conocida como enfermedad de Lou Gehrig), atrofia muscular espinal de tipo 1 (AME1, enfermedad de Werdnig-Hoffmann), atrofia muscular espinal de tipo 2 (AME2), atrofia muscular espinal de tipo 3 (AME3, enfermedad de Kugelberg-Welander), atrofia muscular bulbar espinal (AMBE, también conocida como enfermedad de Kennedy y AMBE asociada a X),
- 10 las distrofias musculares por ejemplo la distrofia muscular de Duchenne (DMD, también conocida como pseudohipertrófica), la distrofia muscular de Becker (DMB), la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED), la distrofia muscular de la cintura pelviana (LGMD), la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSH o FSHD, también conocida como enfermedad de Landouzy-Dejerine), la distrofia miotónica (MMD, también conocida como enfermedad de Steinert), la distrofia muscular oculofaríngea (DMOF), la distrofia muscular distal (DD, enfermedad de Miyoshi), la distrofia muscular congénita (DMC),
- 15 las enfermedades metabólicas de los músculos, por ejemplo la deficiencia de fosforilasa (MPD o PYGM, también conocida como enfermedad de McArdle), la deficiencia de ácido-maltasa (AMD, también conocida como enfermedad de Pompe), la deficiencia de fosfofructo-quinasa (también conocida como enfermedad de Tarui), deficiencia de la enzima dextrina-1,6-glucosidasa (DBD, también conocida como enfermedad de Cori o de Forbes), la miopatía mitocondrial (MITO), la deficiencia de carnitina (CD), la deficiencia de carnitina-palmitil-transferasa (CPT), la deficiencia de fosfolicerato-quinasa, la deficiencia de fosfoglicerato-mutasa, la deficiencia de lactato-deshidrogenasa,
- 20 la deficiencia de mioadenilato-desaminasa;
- enfermedades nerviosas periféricas, por ejemplo la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT, también conocida como neuropatía sensorial y motora hereditaria, NSMH) o la atrofia muscular peroneal (AMP), la ataxia de Friedreich (AF), la enfermedad de Dejerine-Sottas (DS),
- 30 las miopatías inflamatorias, por ejemplo la dermatomiositis (DM), la polimiositis (PM), la miositis de cuerpos de inclusión (MCI),
- 35 las enfermedades de las inserciones neuromusculares, por ejemplo la miastenia grave (MG), el síndrome de Lambert-Eaton (SLE), el síndrome miasténico congénito (SMC);
- las miopatías debidas a anomalías endocrinas, por ejemplo la miopatía hipertiroidea (MHIPT), la miopatía hipotiroidea (MHIPOT);
- 40 otra miopatías, por ejemplo la mionía congénita (MC, también conocida como enfermedad de Thomsen y Becker), la paramionía congénita (PC), la miopatía fibrilar central (MFC), la miopatía nemalínica (MN),
- 45 la miopatía miotubular/miopatía centronuclear (MMT o MCN), la parálisis periódica (PP, dos formas: la hipocalémica y la hipercalémica).
- Se entiende por “MND” una enfermedad que afecta a una neurona de función motora, es decir, una neurona que transporta impulsos motores. Estas neuronas se denominan también “neuronas motoras”. Estas neuronas incluyen las neuronas alfa de la médula espinal anterior, que dan lugar a las fibras alfa que inervan a las fibras musculares esqueléticas; las neuronas betas de la médula espinal anterior, que dan lugar a las fibras beta que inervan a las fibras musculares extrafusales e intrafusales; las neuronas gamma de la médula espinal anterior, que dan lugar a las fibras gamma (fusimotoras), que inervan a las fibras intrafusales del huso muscular; las neuronas heterónimas, que abastecen a músculos diferentes, de los que originan impulsos aferentes; las neuronas homónimas, que abastecen a músculos, de los que se originan impulsos aferentes; las neuronas periféricas inferiores, cuyas fibrillas celulares se sitúan en las columnas grises ventrales de la médula espinal y cuyas terminaciones se sitúan en la musculatura esquelética; las neuronas periféricas que reciben impulsos de las interneuronas; y las neuronas superiores de la corteza cerebral, que conducen impulsos desde la corteza motora a los núcleos motores de los nervios cerebrales o a las columnas grises ventrales de la médula espinal.
- 50 Ejemplos de trastornos neuromotores incluyen a varias amiotrofias, por ejemplo las amiotrofias hereditarias, incluida la atrofia muscular espinal hereditaria, la atrofia muscular espinal infantil aguda, por ejemplo la enfermedad de Werdnig-Hoffman, la atrofia muscular progresiva de niños, por ejemplo los tipos proximal, distal y bulbar, la atrofia muscular espinal de aparición en la adolescencia o en la edad adulta, incluidos los tipos proximal, escapulooperoneal, facioescapulohumeral y distal, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la esclerosis lateral primaria (ELP). Dentro del
- 60 término se incluye también la lesión neuromotora.
- 65

El término “esclerosis lateral amiotrófica” (o “ELA”), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es una enfermedad fatal que afecta a las neuronas motoras de la corteza del cerebro, del tronco encefálico y de la médula espinal (Hirano, *Neurology* 47(4 supl. 2), S63-6, 1996). Aunque se desconoce la etiología de esta enfermedad, una teoría consiste en que la muerte de las células neuronales en caso de ELA es el resultado de una sobreexcitación de las células neuronales, debida a un exceso de glutamato extracelular. El glutamato es un neurotransmisor que se libera en las neuronas glutaminérgicas y se absorbe en células gliales, en las que se convierte en glutamina por acción de la enzima glutamina-sintetasa, después la glutamina retorna a las neuronas y se hidroliza por acción de la glutaminasa para formar el glutamato, con lo cual se rellenan las existencias de neurotransmisores. En la médula espinal y el tronco encefálico normales, el nivel de glutamato extracelular se mantiene en un nivel bajo, micromolar, en el líquido extracelular porque las células gliales, que actúan en parte para apoyar a las neuronas, emplean la proteína transportadora de aminoácido excitador de tipo 2 (EAAT2) para absorber inmediatamente al glutamato. La deficiencia de la proteína EAAT2 normal en pacientes de ELA se ha identificado como un factor importante en la patología de la enfermedad (véase p.ej. Meyer y col., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65, 594-596, 1998; Aoki y col., *Ann. Neurol.* 43, 645-653, 1998; Bristol y col., *Ann. Neurol.* 39, 676-679, 1996). Una explicación de los niveles bajos de EAAT2 es que la EAAT2 se empalme de forma aberrante (Lin y col., *Neuron* 20, 589-602, 1998). El empalme aberrante produce una variante empalmada que presenta una deleción de 45 a 107 aminoácidos situada en la región del extremo C de la proteína EAAT2 (Meyer y col., *Neurosci. Lett.* 241, 68-70, 1998). Debido a la falta o al estado defectuoso de la EAAT2, el glutamato extracelular se acumula, provocando que las neuronas se disparen de forma continua. La acumulación de glutamato tiene un efecto tóxico en las células neuronales porque el disparo continuo de las neuronas conduce a una muerte prematura de las células. Aunque se tienen amplios conocimientos sobre la patología de la ELA, no se sabe casi nada de la patogénesis de la forma esporádica ni sobre las propiedades causantes de la proteína mutante SOD en caso de la ELA congénita (Bruijn y col., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22, 373-87, 1996; Bruijn y col., *Science* 281, 1851-54, 1998). Se han propuesto muchos modelos, incluida la toxicidad del glutamato, la hipoxia, el estrés oxidante, los agregados proteicos, las disfunción de neurofilamentos y mitocondrios (Cleveland y col., *Nature* 378, 342-43, 1995; Cleveland y col., *Neurology* 47(4 supl. 2), S54-61, discusión S61-2, 1996; Cleveland, *Neuron* 24, 515-20, 1999; Cleveland y col., *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806-19, 2001; Couillard-Despres y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9626-30, 1998; Mitsumoto, *Ann. Pharmacother.* 31, 779-81, 1997; Skene y col., *Nat. Genet.* 28, 107-8, 2001; Williamson y col., *Science* 288, 399, 2000).

Actualmente no existe curación para la ELA, ni hay terapias que hayan demostrado ser eficaces para prevenir o invertir el curso de la enfermedad. La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado recientemente varios fármacos. Hasta el presente, las estrategias de tratamiento de la ELA han consistido en tratar la degeneración neuronal con alcoholes grasos de cadena larga, que tienen efectos citoprotectores (véase la patente US-5,135,956); o con una sal del ácido pirúvico (véase la patente US-5,395,822); y en utilizar la glutamina-sintetasa para bloquear la cascada del glutamato (véase la patente US-5,906,976). Por ejemplo, el riluzol, un inhibidor de la liberación del glutamato, se ha aprobado en los EE.UU. para el tratamiento de la ELA, y parece que ha prolongado en tres meses la vida por lo menos de algunos pacientes de ELA. Sin embargo, algunos artículos publicados indican que aunque la terapia con riluzol prolonga marginalmente el tiempo de supervivencia, no parece que aporte ninguna mejora a la fuerza muscular de los pacientes. Por consiguiente, el efecto del riluzol es limitado ya que la terapia no modifica la calidad de vida del paciente (Borras-Blasco y col., *Rev. Neurol.* 27, 1021-1027, 1998).

Tal como se emplea a continuación, “peso molecular” indica el peso molecular medio del PEG.

“PEG o grupo PEG” según la invención indica un resto que contiene poli(etilenglicol) como parte esencial. Tal PEG puede contener otros grupos químicos, que son necesarios para las reacciones de unión; ello se deriva de la síntesis química de la molécula; o que es un espaciador para crear una distancia óptima entre las partes de la molécula. Además, tal PEG puede contener uno o más cadenas laterales PEG, que están unidas entre sí. Los grupos PEG de más de una cadena PEG se denominan PEG ramificados o multibrazo. Los PEG ramificados pueden obtenerse, por ejemplo, por adición de poli(óxido de etileno) a varios polioles, incluidas la glicerina, la pentaeritrita y la sorbita. Por ejemplo, un PEG de cuatro brazos puede obtenerse a partir de pentaeritrita y óxido de etileno. Los PEG ramificados tienen por lo general de 2 a 8 brazos y se han descrito por ejemplo en EP-A 0 473 084 y en la patente US-5,932,462. Son especialmente preferidos los PEG de dos cadenas laterales PEG (PEG2) unidas a través de grupos amino primarios de la lisina (Monfardini, C. y col., *Bioconjugate Chem.* 6, 62-69, 1995).

“Sustancialmente homogéneo” se emplea aquí para indicar que solamente se producen, contienen o utilizan moléculas de la variante de IGF-I PEGilada que llevan unidos uno o dos grupos PEG. El producto resultante puede contener pequeñas cantidades de la proteína sin reaccionar (es decir, proteína que carece de grupos PEG). Tal como se comprueba por mapeo de péptidos y secuenciación del extremo N, un ejemplo de los que siguen proporciona un producto que contiene por lo menos un 90 % del conjugado de la variante PEG-IGF-I y, como máximo, un 5 % de proteína sin reaccionar. El aislamiento y la purificación de tales producto homogéneos de la variante de IGF-I PEGilada pueden realizarse por los métodos habituales de purificación, con preferencia por cromatografía de exclusión de tamaños.

“MonoPEGilado” se emplea aquí para indicar que la variante de IGF-I está PEGilada solamente en una lisina por cada molécula de variante de IGF-I, con lo cual solamente un grupo PEG está unido mediante enlace covalente a este sitio. La variante de IGF-I monoPEGilada pura (sin PEGilación del extremo N) constituye por lo menos el 80 %

del producto obtenido, con preferencia el 90 % y, con preferencia especial, la variante de IGF-I monoPEGilada constituye el 92%, o más, del producto obtenido, el resto es p.ej. IGF-I sin reaccionar (no PEGilado) y/o variante de IGF-I PEGilado en el extremo N. Los productos de obtención de la variante de IGF-I monoPEGilada según la invención son, pues, lo suficientemente homogéneas para proporcionar las ventajas de una preparación homogénea, p.ej. en una aplicación farmacéutica. Lo mismo se diga de los compuestos diPEGilados.

La “variante de IGF-I PEGilada” o “PEGilación reactiva del grupo amino” se emplea aquí para indicar que una variante de IGF-I está unida mediante enlace covalente a uno o dos grupos poli(etilenglicol) por condensación reactiva sobre el grupo amino de una o dos lisinas de la molécula de la variante del IGF-I. El o los grupos PEG está o están unidos a los sitios de la molécula de la variante de IGF-I que son grupos amino primarios (epsilon) de las cadenas laterales de lisina. También es posible realizar la PEGilación en los grupos amino (alfa) del extremo N. Debido al método de síntesis y a la variante empleada, la variante de IGF-I PEGilada puede estar formada por una mezcla de variantes de IGF-I, PEGiladas en K65, K68 y/o K27 con o sin PEGilación del extremo N, los sitios de PEGilación pueden ser diferentes en moléculas diferentes o pueden ser sustancialmente homogéneas en lo que respecta a la cantidad de cadenas laterales de poli(etilenglicol) por molécula y/o el sitio de PEGilación de la molécula. Las variantes de IGF-I son con preferencia mono- y/o diPEGiladas y especialmente libres de variantes de IGF-I PEGiladas en el extremo N.

“PEG o poli(etilenglicol)” se emplea aquí para indicar un polímero soluble en agua, que es un producto comercial o un compuesto que puede obtenerse o por polimerización del etilenglicol con apertura de anillo según métodos ya conocidos de la técnica (Kodera, Y. y col., *Progress in Polymer Science* 23, 1233-1271, 1998; Francis, G.E. y col., *Int. J. Hematol.* 68, 1-18, 1998). El término “PEG” se emplea en sentido amplio para indicar cualquier molécula de polietilenglicol en la que el número de unidades etilenglicol (EG) es por lo menos de 460, con preferencia de 460 a 2300 y con preferencia especial de 460 a 1840 (230 unidades de EG equivalen aproximadamente a un peso molecular de 10 kDa). El número superior de unidades EG está limitado solamente por la solubilidad de las variantes de IGF-I PEGiladas. Por lo general no se utilizan los PEG que son mayores que los PEG que contienen 2300 unidades EG. Se emplea con preferencia un PEG en la invención que tiene un extremo terminado en hidroxilo o metoxi (metoxi-PEG, mPEG) y por el otro extremo está unido mediante enlace covalente a un resto engarce (linker) mediante un enlace oxígeno de éter. El polímero es lineal o ramificado. Los PEG ramificados se han descrito p.ej. en Veronese, F.M. y col., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 12, 196-207, 1997.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una variante del IGF-I PEGilada de conformidad con las reivindicaciones para uso en un método para el tratamiento de trastornos neuromusculares, con preferencia una enfermedad de neuronas motoras y con preferencia especial la ELA, mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de dicha variante del IGF-I PEGilada a un paciente que lo necesite. En una forma de ejecución todavía más preferida, la enfermedad a tratar es la ELA causada por un defecto genético que conduce a la mutación de la superóxido-dismutasa 1.

Esta variante IGF-I PEGilada se caracteriza porque el PEG está unido a un resto lisina de la muteína IGF-I humana recombinante, que lleva uno o dos alteraciones de aminoácidos en las posiciones 27, 65 y 68 de la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), de modo que uno o dos aminoácidos de las posiciones 27, 65 y 68 es o son un aminoácido polar, pero no la lisina.

Un “aminoácido polar” se emplea aquí para indicar un aminoácido elegido entre el grupo formado por la cisteína (C), el ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), histidina (H), asparagina (N), glutamina (Q), arginina (R), serina (S) y treonina (T). La lisina también es un aminoácido polar, pero se excluye porque la lisina se ha reemplazado según la invención. Como aminoácido polar se emplea con preferencia la arginina.

Son preferidas las formas PEGiladas de las muteínas del IGF-I humano recombinante que se caracterizan por las siguientes alteraciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del IGF-I de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1):

- (a) K65R y K68R (SEQ ID NO: 2)
- (b) K27R y K68R (SEQ ID NO: 3)
- (c) K27R y K65R (SEQ ID NO: 4).

Se concede una preferencia especial a la forma PEGilada de la muteína del IGF-I humano recombinante con alteraciones de aminoácidos K27R y K65R (SEQ ID NO: 4), caracterizada por la monoPEGilación en K68.

Se concede también preferencia a composiciones de una variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina, ya descrita antes, y una variante de IGF-I que está PEGilada en el extremo N, dichas variantes IGF-I son idénticas en términos de secuencia primaria de aminoácidos y en que llevan una o dos alteraciones de aminoácidos en las posiciones 27, 65 y 68 de la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1), de modo que uno o dos de los aminoácidos de las posiciones 27, 65 y 68 es o son un aminoácido polar, pero no la lisina. La proporción molecular se sitúa con preferencia entre 9:1 y 1:9 (proporción significa variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina/variante de IGF-I PEGilada sobre el extremo N). Es también preferida una composición, en la que la proporción molar se sitúa por lo menos en 1:1 (por lo menos una parte de variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina por una

parte de variante de IGF-I PEGilada sobre el extremo N), con preferencia por lo menos de 6:4 por lo menos seis partes de variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina por cada cuatro partes de variante de IGF-I PEGilada sobre el extremo N). Con preferencia las dos variantes, la variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina y la variante de IGF-I PEGilada sobre el extremo N, están monoPEGiladas. Con preferencia, en esta composición, la variante es idéntica tanto en la variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina como la en variante de IGF-I PEGilada sobre el extremo N. La variante de IGF-I se elige con preferencia entre las muteínas de IGF-I que tienen las siguientes alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1):

- (a) K65R y K68R (SEQ ID NO: 2)
- (b) K27R y K68R (SEQ ID NO: 3)
- (c) K27R y K65R (SEQ ID NO: 4).

Las formas PEGiladas preferidas de las muteínas de IGF-I humano recombinante según las SEQ ID NO: 2-4 se pueden obtener con arreglo al procedimiento de obtención de un IGF-I PEGilado sobre la lisina o de una variante de IGF-I PEGilada sobre la lisina, dicha variante contiene uno o dos aminoácidos elegidos entre el grupo formado por la lisina 27, 65 y/o 68, sustituida con independencia por otro aminoácido polar del modo descrito en WO 2008/025528 A1. El o los procesos descritos en WO 2008/025528 A1 permite(n) la obtención de las muteínas de IGF-I humano recombinante según las SEQ ID NO: 2-4, que no llevan PEGilación sobre el extremo N.

Es también preferido que la variante de IGF-I PEGilada sea una variante en la que hasta tres (con preferencia los tres) aminoácidos del extremo N estén truncados. La correspondiente mutante de tipo salvaje se llama Des(1-3)-IGF-I y carece de los restos aminoácidos glicina, prolina y glutamato en el extremo N (Kummer, A. y col., *Int. J. Exp. Diabesity Res.* 4, 45-57, 2003).

El o los grupos polietilenglicol tienen con preferencia un peso molecular total por lo menos de 20 kDa, con mayor preferencia de 20 a 100 kDa y con preferencia especial de 20 a 80 kDa. El o los grupos polietilenglicol son lineales o ramificados.

La PEGilación reactiva sobre amino se emplea aquí para indicar un método de unir aleatoriamente cadenas de polietilenglicol a grupo(s) amino primario de lisina de la variante IGF-I mediante el uso de polietilenglicol (activado) reactivo, con preferencia mediante el uso de ésteres de N-hidroxisuccinimidilo del (con preferencia) metoxipolietilenglicol. La reacción de condensación une el polietilenglicol a grupos amino primarios [epsilon] de los restos lisina y opcionalmente a grupos amino [alfa] del aminoácidos del extremo N del IGF-I. Tal conjugación de grupos amino del PEG con las proteínas es bien conocida en la técnica. Por ejemplo se encontrará un repaso de tales métodos en Veronese, F.M., *Biomaterials* 22, 405-417, 2001. Según Veronese, la conjugación del PEG con los grupos amino primarios de las proteínas puede realizarse empleando PEG activados, que efectúan una alquilación de dichos grupos amino primarios. Para tal reacción pueden utilizarse PEG alquilantes activados, por ejemplo un aldehído PEG, un cloruro de tresilo PEG o un epóxido PEG. Otros reactivos útiles son los PEG acilantes, por ejemplo los ésteres de hidroxisuccinimidilo de PEG carboxilados o los PEG en los que el grupo hidroxilo terminal se ha activado con cloroformatos o carbonilimidazoles. Son también reactivos PEG útiles los PEG que tienen brazos aminoácido. Tales reactivos pueden contener los llamados PEG ramificados, en los que por lo menos dos moléculas de PEG idénticas o diferentes están unidas entre sí mediante un espaciador peptídico (con preferencia la lisina) y, por ejemplo, unidos a la variante de IGF-I en forma de carboxilato activado del espaciador lisina. La unión individual sobre el extremo N se describe también en Kinstler, O. y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 477-485, 2002.

Los reactivos PEG útiles son los que suministra p.ej. la empresa Nektar Therapeutics Inc.

Se puede emplear cualquier peso molecular de un PEG que se desee en la práctica, p.ej. entre 20 kDa y 100 kDa (n entre 460 y 2300). El número de unidades repetitivas "n" del PEG es aproximadamente el peso molecular expresado en daltones. Por ejemplo, si se unen dos moléculas de PEG a un engarce (linker), de modo que cada molécula de PEG tenga el mismo peso molecular de 10 kDa (cada n se sitúa en 230 aprox.), entonces el peso molecular total del PEG sobre el engarce se sitúa en 20 kDa. Los pesos moleculares del PEG unido al engarce pueden ser también diferentes, p.ej. de las dos moléculas sobre un engarce, una molécula de PEG puede tener 5 kDa y la otra molécula de PEG puede tener 15 kDa. El peso molecular significa siempre el peso molecular promedio.

Los procesos idóneos y los reactivos preferidos para la obtención de variantes de IGF-I PEGiladas amino-activas se describen en WO 2006/066891. Se da por supuesto que se pueden introducir modificaciones, por ejemplo en base a los métodos descritos por Veronese, F.M., *Biomaterials* 22, 405-417, 2001, en los procedimientos, en el supuesto de que el proceso permita obtener variantes de IGF-I PEGiladas descritas en párrafos anteriores. Los procesos especialmente preferidos para la obtención de variantes de IGF-I PEGiladas según la presente invención se describen en WO 2008/025528 A1.

La aparición de hasta tres grupos amino primarios potencialmente reactivos en la proteína diana (hasta dos lisinas y un aminoácido terminal) conduce a una serie de isómeros de variantes de IGF-I PEGiladas que difieren en el punto de unión de la cadena polietilenglicol.

Las variantes de IGF-I PEGiladas contienen uno o dos grupos PEG lineales o ramificados y unidos aleatoriamente a ellas, situándose el peso molecular total de todos los grupos PEG de la variante de IGF-I PEGilada entre 20 y 80 kDa. Son posibles ligeras desviaciones de este intervalo de pesos moleculares. Sin embargo, se espera que la actividad disminuya a medida que aumenta el peso molecular, debido a que una menor activación del receptor del IGF-I y al transporte a través de la barrera hematoencefálica. Por consiguiente, el intervalo de pesos moleculares de 20 a 100 kDa tiene que entenderse como intervalo optimizado para un conjugado de PEG y una variante de IGF-I útiles para el tratamiento eficaz de las MND, en particular de la ELA.

#### Formulaciones farmacéuticas

Las variantes del IGF-I PEGiladas descritas a continuación se caracterizan por una mejor estabilidad en circulación que permite un acceso sostenido a los receptores del IGF-I de todo el organismo con intervalos de aplicación bajos, es decir, intervalos prolongados.

Las variantes del IGF-I PEGiladas pueden formularse con arreglo a métodos de fabricación de composiciones farmacéuticas, dichos métodos ya son conocidos de los expertos en la materia. Para la fabricación de tales composiciones se combina una variante del IGF-I PEGilada según la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable formando una mezcla, en especial por diálisis frente a una solución acuosa que contenga los ingredientes deseados de las composiciones farmacéuticas.

Los vehículos aceptables se describen, por ejemplo, en el manual Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, 1990, Mack Publishing Company, coordinado por Oslo y col. (p.ej. en las pp. 1435-1712). Las composiciones típicas contienen una cantidad eficaz de la sustancia de la invención, por ejemplo de 0,1 a 100 mg/ml, junto con una cantidad adecuada de un vehículo. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. El IGF-I PEGilado según la invención se administra con preferencia por vía intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o intranasal.

Las formulaciones farmacéuticas de la invención pueden fabricarse con arreglo a métodos ya conocidos de la técnica. Por lo general, las soluciones de la variante de IGF-I PEGilada se dializan frente a un tampón idóneo para el uso en la composición farmacéutica y se ajusta la concentración deseada de proteína final por concentración o dilución.

Tales composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para la administración por inyección o infusión, con preferencia por vía intraperitoneal, subcutánea, intravenosa o intranasal y contienen una cantidad eficaz de la variante de IGF-I PEGilada junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (p.ej. arginina, acetato, fosfato), de varios pH y fuerza iónica, aditivos, tales como detergentes y solubilizantes (p.ej. Tween™ 80/polisorbato, Pluronic™ F68/antioxidantes (p.ej. ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (Timersol™, alcohol bencílico) y cargas de relleno (p.ej. sacarosa, manita), el material puede incorporarse a partículas de compuestos poliméricos, por ejemplo ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o a liposomas. Tales composiciones pueden influir en la estabilidad del estado físico, en la velocidad de liberación y en la eliminación o secreción de las variantes del IGF-I PEGiladas.

#### Dosificaciones y concentraciones de fármacos

En un régimen estándar de tratamiento, los pacientes se tratan por ejemplo con dosis comprendidas entre 0,001 y 20 mg, con preferencia entre 0,01 y 8 mg de la variante del IGF-I PEGilada por kg por semana durante un cierto período de tiempo, que dura de una semana a unos 3 meses o incluso más. Se aplica el fármaco en forma de inyección de bolo por vía s.c., i.v. o i.p. (intraperitoneal) una vez por semana, de una formulación farmacéutica que contiene de 0,1 a 100 mg de una variante de IGF-I PEGilada descrita antes por ml. Este tratamiento puede combinarse con cualquier tratamiento estándar (p.ej. quimioterapéutico) aplicando el IGF-I PEGilado antes, durante o después del tratamiento estándar. Esto se traduce en un resultado mejorado si se compara con el tratamiento estándar solo.

Se ha encontrado que las variantes de IGF-I PEGilado antes descritas pueden administrarse solamente una o dos veces por semana para el éxito del tratamiento. Un método para el tratamiento de un trastorno neuromuscular, con preferencia una MND y con más preferencia todavía la ELA podría consistir, pues, en administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de IGF-I PEGilada descrita en párrafos anteriores en una dosis que, en cada caso, se sitúe entre 0,001 y 3 mg, con preferencia entre 0,01 y 3 mg de variante de IGF-I PEGilada por kg y por 3-8 días, con preferencia por 7 días. Como variante de IGF-I PEGilada se emplea con preferencia una variante de IGF-I monoPEGilada.

Las variantes de IGF-I PEGiladas aquí descritas pueden utilizarse para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno neuromuscular, con preferencia de una MND y con mayor preferencia todavía de la ELA, que se administra a un paciente que lo necesite en una cantidad terapéuticamente eficaz y con una o dos dosis comprendidas entre 0,001 y 3 mg, con preferencia entre 0,01 y 3 mg de variante de IGF-I PEGilada por kg y por 6-8 días, con preferencia por 7 días. Como variante de IGF-I PEGilada se emplea con preferencia una variante de IGF-I monoPEGilada.

Las variantes de IGF-I PEGiladas descritas en párrafos anteriores pueden utilizarse también por separado, de modo sucesivo o simultáneo, en combinación con un segundo compuesto activo farmacológicamente para el tratamiento de un trastorno neuromuscular, con preferencia una MND e incluso con mayor preferencia la ELA. Con preferencia, el segundo compuesto farmacológicamente activo de la combinación es por lo menos un neuroprotector que tiene un efecto inhibitor en la liberación del glutamato o el efecto de inactivación de canales de sodio dependiente del voltaje o la capacidad de interferir en episodios intracelulares, consecuencia de la unión del transmisor a receptores de aminoácidos excitantes.

El segundo compuesto farmacológicamente activo es con preferencia el riluzol. El riluzol bloquea los canales de sodio TTX-S, asociados a neuronas dañadas (Song, J.H., Huang, C.S., Nagata, K., Yeh, J.Z., Narahashi, T., Differential action of riluzole on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels, en: J. Pharmacol. Exp. Ther. 282, 707-14, 1997). Este reduce el influjo de iones calcio e indirectamente impide la estimulación de los receptores de glutamato. Junto con el bloqueo directo de los receptores de glutamato, se reduce el efecto del neurotransmisor glutamato en las neuronas motoras.

El término "riluzol" se emplea en esta descripción para indicar el 2-amino-6-(trifluorometoxi)benzotiazol, 6-(trifluorometoxi)benzotiazol-2-amina o CAS-1744-22-5. En un sentido más amplio de esta forma de ejecución, el término "riluzol" abarca también a los ingredientes activos que tienen por lo menos una propiedad farmacológica también observada en el riluzol, elegida entre el efecto inhibitor sobre la liberación del glutamato, la inactivación de los canales de sodio dependientes del voltaje y la capacidad de interferir en los episodios intracelulares que son consecuencia de la unión del transmisor a los receptores de aminoácidos excitantes. El uso del riluzol para tratar la ELA se describe en US-5,527,814, el compuesto y su obtención se describen en EP-050 551. Otros compuestos neuroprotectores pueden obtenerse del modo descrito p.ej. en Yagupolskii y col., Zhurnal Obschei Khimii 33 (7), 2301-7, 1963.

#### Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1

Secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (aminoácidos 1-70 de la proteína precursora del IGF-I según SwissProt P01343).

SEQ ID NO: 2

Secuencia de aminoácidos de la muteína IGF-I humana que lleva los cambios de aminoácidos K65R y K68R.

SEQ ID NO: 3

Secuencia de aminoácidos de la muteína IGF-I humana que lleva los cambios de aminoácidos K27R y K68R.

SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de la muteína IGF-I humana que lleva los cambios de aminoácidos K27R y K65R.

#### Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa la detección en suero después de la inyección s.c. de 100 µg/kg de rhIGF-I o de PEG-IGF-I a ratones. Los niveles de PEG-IGF-I o de rhIGF-I en suero se detectan del modo indicado en los puntos temporales por técnicas ELISA.

En la figura 2 se representa la inmunorreactividad del IGF-I en neuronas CA1 del hipocampo después de la inyección s.c. del rhIGF-I o del PEG-IGF-I (100 µg/kg) a ratones. En los puntos temporales indicados se extraen los cerebros y se tiñen para detectar el hIGF-I. Se analizan las imágenes digitales de la región CA1 del hipocampo para determinar la intensidad de la tinción dentro de las neuronas.

En la figura 3 se representan los niveles de glucosa en plasma después de la inyección s.c. de PEG-IGF-I (200-5000 µg/kg) a perros de raza beagle. Los niveles de glucosa se estiman a partir de gotas de sangre en los puntos temporales correspondientes empleando un dispositivo AkkuCheck de Roche. La flecha indica la única aparición significativa de hipoglucemia severa en perros machos para una dosis de 5000 g/kg.

En la figura 4 se representa la supervivencia "in vitro" de neuronas motoras primarias de ratón después de un tratamiento de 5 días con rhIGF-I o PEG-IGF-I. Las neuronas motoras de ratones C57Bl/6 se cultivan en presencia o ausencia de PEG-IGF-I o rhIGF-I en diferentes concentraciones y se estima la supervivencia por microscopía de contraste de fases después de 5 días "in vitro".

En la figura 5 se representa la fuerza de agarre de ratones pmn tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días (q2d). Se comprueba la fuerza muscular de las extremidades anteriores de los animales cada semana, los números indican los animales analizados en cada punto temporal (\*\*, p<0,01).

En la figura 6 se representa el comportamiento de ratones pmn sometidos a la varilla rotatoria (rotarod), tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días. Se comprueba la coordinación motora de los animales cada semana, los números indican los animales analizados en cada punto temporal (\*, p<0,05).

5 En la figura 7 se representa la supervivencia de neuronas motoras del núcleo facial de ratones pmn tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días. Se sacrifican los animales a los 34 días de su nacimiento y se extrae tejido para el estudio histológico. El examen estereológico del número de neuronas motoras se realiza en imágenes veladas, los valores expresan los números totales por ratón (\*\*, p<0,01).

10 En la figura 8 se representa la supervivencia de neuronas motoras de la médula espinal lumbar de ratones pmn tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días. Se sacrifican los animales a los 34 días de su nacimiento y se extrae tejido para el examen histológico. El examen estereológico de los números de neuronas motoras se realiza en imágenes veladas, los valores expresan los números totales por ratón (\*\*\*, p<0,001).

15 En la figura 9 se representan los números de axones mielinizados del nervio frénico proximal de ratones pmn tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días. Se sacrifican los animales a los 34 días de su nacimiento y se extrae tejido para el examen histológico. El examen estereológico de los números de axones mielinizados se realiza con imágenes veladas, los valores expresan los números totales por nervio frénico (\*, p<0,05).

20 En la figura 10 se representan los números de axones mielinizados del nervio frénico distal de ratones pmn tratados con vehículo o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I administrado por vía s.c. cada 2 días. Se sacrifican los animales a los 34 días de su nacimiento y se extrae tejido para el examen histológico. El examen estereológico de los números de axones mielinizados se realiza con imágenes veladas, los valores expresan los números totales por nervio frénico (\*\*, p<0,01).

25 En la figura 11 se representa el análisis del peso corporal de ratones SOD1(G93A) tratados con vehículo o con PEG-IGF-I (150 µg/kg por vía s.c. cada 3,5 días). Se evalúa el peso corporal una vez por semana y los valores se normalizan con respecto al peso corporal en el momento del primer examen, que se iguala al 100 % (\*, p<0,05).

30 En la figura 12 se representa el inicio de la enfermedad en ratones SOD1(G93A) tratados con vehículo o con PEG-IGF-I (150 µg/kg por vía s.c. cada 3,5 días). Se examinan los animales cada semana y se define el inicio de la enfermedad como debilidad en las extremidades traseras, paso anómalo y dificultad de mantenerse en una malla de alambre invertida. La gráfica de Kaplan-Meier representa el inicio de la enfermedad en ratones individuales tratados a partir de la semana 34 después del nacimiento. En el gráfico de barras se representa la edad media del inicio de la enfermedad en los dos grupos (p<0,05).

35 En la figura 13 se representa la fuerza de agarre de ratones SOD1(G93A) tratados con vehículo o con PEG-IGF-I (150 µg/kg por vía s.c. cada 3,5 días). Se examinan los animales cada semana para determinar la fuerza muscular de sus extremidades anteriores. El análisis LOCF de los animales que mueren durante el transcurso del tiempo se realiza incluyendo los valores medidos en último lugar dentro de los datos posteriores (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

40 En la figura 14 se representa el comportamiento de ratones SOD1(G93A), sometidos a la varilla rotatoria (rotarod), tratados con vehículo o con PEG-IGF-I (150 µg/kg por vía s.c. cada 3,5 días). Se examinan los animales cada semana para determinar su coordinación motora. El análisis LOCF de los animales que mueren durante el transcurso del tiempo se realiza incluyendo los valores medidos en último lugar dentro de los datos posteriores (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01).

45 En la figura 15 se representan las acciones "in vivo" del PEG-IGF-I relativas a la unidad neuromuscular, demostradas en modelos de ratones con ELA. Se observa que el PEG-IGF-I mejora la función neuromuscular y además protege a los axones motores y a las neuronas motoras del tronco encefálico y de la médula espinal, esto sugiere por tanto que actúan sobre todas las partes que intervienen en mantener las inserciones neuromusculares.

## 55 Métodos

### Cultivos de neuronas motoras de ratones embrionarios

60 Se preparan los cultivos de neuronas motoras espinales de ratones embrionarios de 12,5 días por una técnica de lavado o extracción (panning) empleando un anticuerpo monoclonal de rata anti-p75 (Chemicon, Hofheim, Alemania). Se diseccionan las partes ventrolaterales de las médulas espinales lumbares individuales y se transfieren a HBSS que contiene 2-mercaptoetanol 10 µM. Después del tratamiento con tripsina (0,05%, 10 min), se generan las suspensiones de células individuales por trituración. Se extienden las células en cápsulas de cultivo recubiertas con anticuerpo de rata anti-p75 (Greiner, Nürtingen, Alemania) y se dejan a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavan los hoyos individuales sucesivamente con solución de sal equilibrada de Hank (HBSS; 3 veces) y después se aíslan las células fijadas en la placa con solución salina despolarizante (NaCl del 0,8 %, KCl 35 mM y 2-

mercaptoetanol 1 M). Se colocan las células en placas con una densidad de 3000 células/hoyo en placas de cultivo de hoyos (Greiner), recubiertos previamente con poli-oritina y laminina del modo descrito por Miller, T.M. y col. (J. Biol. Chem. 272, 9847-9853, 1997). Se cultivan las células en medio Neurobasal (Life Technologies, Karlsruhe, Alemania), suplemento B27, suero de caballo al 10%, Glutamax 500 µM y apotransferrina 50 µg/ml a 37°C en un atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>. Se reemplaza el cincuenta por ciento del medio por primera vez en el día uno y después cada dos días. El recuento inicial de las células depositadas en las placas se realiza cuando todas las células se han fijado sobre las cápsulas de cultivo, después de 4 horas. Además se cuentan las células brillantes de fase en el día cinco. Se cuentan diez campos (1,16 mm<sup>2</sup>/campo) de cada hoyo en el mismo punto temporal.

#### 10 Niveles de rhIGF-I o PEG-IGF-I en suero y tinción con IGF-I intraneuronal de neuronas CA1

Para la estimación de los niveles de rhIGF-I o PEG-IGF-I en suero se extraen muestras de sangre de ratones C57Bl/6 en diferentes puntos temporales (n = 4 ratones para cada momento temporal) después de una sola inyección s.c. de 100 µg/kg de rhIGF-I o de PEG-IGF-I. Se prepara el suero y se procesa mediante un ensayo ELISA. Para la detección del rhIGF-I se emplea un ensayo rhIGF-I comercial (DSL). Para la detección del PEG-IGF-I se recubren placas de ensayo de microvaloración recubiertas con estreptavidina con un anticuerpo de captura biotinilado anti-PEG (IgM). Se incuban las muestras de suero durante 15 h con IGFBP-4 digoxigenado para reemplazar cualquier IGF-I unido mediante IGFBP endógenos con el IGFBP-4. Después del lavado se incuban las placas con anti-Dig-POD (Fab) y se detectan mediante reacción de color con ABTS. Se cuantifican las señales de absorbancia con un lector del tipo SpectraMax M2<sup>e</sup> en 405 nm y 490 nm.

En diferentes momentos temporales después de una sola inyección s.c. de 100 µg/kg de rhIGF-I o de PEG-IGF-I se anestesian con isoflurano los ratones C57Bl/6, se decapitan y se les extraen los cerebros. Se congelan rápidamente los hemisferios con hielo seco y después se fijan con paraformaldehído (solución salina tamponada con fosfato del 4 %, PBS). A continuación se cortan con un vibrátomo (Zeiss) rebanadas sagitales de 40 µm. Para el análisis semicuantitativo de la inmunorreactividad se cortan 24 rebanadas a 2 mm del borde lateral. Para el recuento se emplea una de cada cuatro rebanadas, revelándose un total de 6 rebanadas por ratón. Se tiñen las rebanadas con una tinción de anticuerpo de cabra anti-rhIGF-I (R&D Systems) y se contratiñen con colorante nuclear. Se realiza la detección secundaria marcando con anticuerpo Cy3 de asno anti-cabra (Jackson). Se evalúan las imágenes digitales de neuronas CA1 totalmente veladas empleando una cámara PixelFly (Klughammer) con una intensidad idéntica y con una intensidad de tinción a través de la capa celular CA1 generadas automáticamente empleando el programa informático ImagePro 4.5 (Media Cybernetics). Se saca el promedio de los valores de intensidad de 6 rebanadas por ratón.

#### 35 Estimación de la glucosa en sangre

Se tratan perros de la raza beagle con PEG-IGF-I (200-5000 µg/kg por vía s.c.) y se extraen muestras de sangre después de varios intervalos de tiempo hasta 6 días (144 h). Se evalúa la glucosa en sangre a partir de gotas de sangre empleando el aparato AkkuCheck (Roche).

#### 40 Evaluación funcional

Se hace un seguimiento regular de los ratones para evaluar el inicio de la enfermedad que se define como el momento, en el que los ratones presentan debilidad en las patas traseras, paso anómalo y dificultad para mantenerse en una malla de alambre invertida. El inicio de la enfermedad en ratones transgénicos SOD1(G93A) es variable (Gurney y col., Science 264 (5166), 1772-1775, 1994), mientras que aparece en los ratones pmn durante la tercera semana después del nacimiento (Schmalbruch y col., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 50(3), 192-204, 1991). Con el fin de evaluar la debilidad que se desarrolla se someten los ratones mutantes a ensayos motores funcionales semanales, empezando en el día 24 postnatal (ratones mutantes pmn) o la semana 34 postnatal (ratones mutantes SOD G93A). La fuerza de agarre de las patas anteriores (en newtones) se registra promediando 5 ensayos en un medidor electrónico de fuerza de agarre (Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Se ensaya además la capacidad de los ratones para mantener el equilibrio en un aparato de varilla rotatoria (rotarod) (Hugo Basile Bio. Res. App.), cuando la varilla se acciona con una aceleración lineal de 4 a 40 rpm (revoluciones por minuto). El tiempo (segundos), en el que cada ratón se mantiene sobre la varilla (latencia), se registra 3 veces por sesión. Se toman como valor 100 % los valores medios del día 24 postnatal (ratones pmn) o de la semana 34 postnatal (ratones SOD1) y los resultados de los análisis posteriores se normalizan frente a este valor.

#### 55 Análisis histológico

En el día 34 postnatal se determina el número de cuerpos celulares de neuronas motoras del núcleo facial y de la médula espinal lumbar de ratones pmn tratados con PEG-IGF-I o con vehículo (es decir, el tampón correspondiente sin PEG-IGF-I). Además se cuenta el número de axones mielinizados en la parte proximal y distal de los nervios frénicos de estos ratones mutantes. Se someten los animales a perfusión transcardial con paraformaldehído del 4 % (PFA) en tampón fosfato 0,1 M, de pH 7,4, y se diseccionan el tronco encefálico y la médula espinal lumbar (L1-L6). Se cortan series de secciones de la región del tronco encefálico (7 µm) incluidos los núcleos faciales y de la médula espinal lumbar (12,5 µm). Después de la tinción se cuentan las neuronas motoras de cada 5<sup>a</sup> sección (núcleo facial) o de cada 10<sup>a</sup> sección (médula espinal) y se corrigen las cuentas con los núcleos escindidos (Masu y col., Nature 365, 27-32, 1993). Después se fijan los nervios frénicos durante una noche en tampón cacodilato 0,1 M que contiene paraformaldehído del 4 % y glutaraldehído del 2 %. Después de la ósmosis y la deshidratación se sumergen todas las muestras en medio de Spurr. Se cortan con cuchillo de vidrio secciones transversales semifinas (0,5 µm) para el

examen en microscopio de luz y se tiñen con azul metileno. Se determina el número de fibras mielinizadas intactas a partir de las fotografías tomadas de las secciones transversales de los nervios con un microscopio de luz Leica (Nussloch, Alemania) equipado con una cámara digital (ActionCam; Agfa, Mortsel, Bélgica).

## 5 Ejemplos

### Ejemplo 1

Para estimar la exposición sistémica del rhIGF-I y PEG-IGF-I, se evalúan los niveles de fármaco después de cada inyección s.c. de 100 µg/kg de rhIGF-I o PEG-IGF-I a ratones C57Bl/6 aplicando ensayos de detección específicos.

10 En ellos, el PEG-IGF-I presenta no solo una vida media muy prolongada, sino también una exposición más alta en suero, si se compara con el rhIGF-I (figura 1). Para seguir investigando si esta mayor exposición periférica se traslada al cerebro, se tiñen con tinción inmune las rebanadas de cerebro de estos ratones con un anticuerpo que reconoce al IGF-I humano y se evalúa la tinción intraneuronal en la región CA1. La tinción del IGF-I de las neuronas CA1 aumenta al cabo de 2 a 6 horas después de la inyección s.c. del rhIGF-I, pero después de 24 h retorna a los niveles de línea base (figura 2). A diferencia de ello, se observa una mayor tinción de IGF-I a las 24 y 48 h después de la inyección del PEG-IGF-I y que alcanza valores más altos a las 48 h (figura 2). Estos datos indican que la entrada en el cerebro tanto del rhIGF-I como del PEG-IGF-I presenta una cinética similar a la exposición periférica e indican que cuanto mayor es la exposición periférica del PEG-IGF-I comparado con el rhIGF-I, tanto mejor se traslada y tanto más sostenida es la entrada en el cerebro del PEG-IGF-I si se compara con la del rhIGF-I.

### Ejemplo 2

En los ensayos toxicológicos realizados con perros de raza beagle se observa que el rhIGF-I tiene un potencial grande de induce la hipoglucemia aguda, incluso en dosis relativamente bajas, de 150 µg/kg, administradas por vía s.c. (informe NDA 21-839). Para analizar el potencial hipoglucémico del PEG-IGF-I, se tratan perros beagle machos y hembras con una sola dosis de PEG-IGF-I, comprendida entre 200-5000 µg/kg por vía s.c. Tal como se desprende de la figura 3, hasta 2000 µg/kg no se observa hipoglucemia consistente. Sin embargo, en una dosis de 5000 µg/kg, uno de cada dos perros sufre una hipoglucemia severa (ver flecha en la figura 2) y tiene que recuperarse mediante infusión de glucosa; por lo tanto, el ensayo de glucosa se interrumpe en este punto temporal. En su conjunto, estos datos demuestran que hasta 2000 µg/kg de PEG-IGF-I administrados por vía s.c. no tienen un potencial hipoglucémico similar a la hipoglucemia observada con el rhIGF-I administrado en una dosis de 150 µg/kg (informe NDA 21-839).

### Ejemplo 3

Para investigar la actividad "in vitro" del PEG-IGF-I frente a la del rhIGF-I, se comparan las eficacias de ambos compuestos en la supervivencia de las neuronas motoras. Las neuronas motoras primarias de ratones embrionarios C57Bl/6 de una edad de 1,25 E se cultivan en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de rhIGF-I o PEG-IGF-I y se cuentan las neuronas motoras supervivientes después de 5 días mediante microscopía de contraste de fases. Tal como se representa en la figura 4, los dos compuestos presentan una eficacia idéntica en cuanto a protección de las neuronas motoras. Los datos indican que el rhIGF-I y el PEG-IGF-I tienen una actividad biológica idéntica.

### Ejemplo 4

En cuando al rhIGF-I, diversos regímenes de dosificación local o sostenida han demostrado ser eficaces en ratones SOD1(G93A), un modelo animal muy utilizado para el estudio de la ELA (Kaspar y col., *Science* **301**, 839, 2003; Dobrowolny y col., *J. Cell. Biol.* **168**, 193, 2005; Nagano y col., *J. Neurol. Sci.* **235**, 61, 2005; Narai y col., *J. Neurosci. Res.* **82**, 452, 2005). Hemos investigado además la eficacia "in vivo" del PEG-IGF-I, aplicado por vía s.c. en dosis de 150 µg/kg poco antes del inicio clínico de la enfermedad en dos modelos independientes de la ELA, en ratones pmn y en ratones SOD1(G93A).

50 Para ensayar el PEG-IGF-I en un modelo de ELA esporádica se emplean ratones pmn (Bommel y col., *J. Cell. Biol.* **159**, 563, 2002). Este modelo de ELA desarrolla los primeros síntomas de desequilibrio funcional al cabo de dos semanas del nacimiento, produciéndose la muerte a las 5-6 semanas después del nacimiento. Para ello se tratan los ratones pmn por vía s.c. una vez cada dos días (q2d) con el vehículo (n = 12) o con 150 µg/kg de PEG-IGF-I (n = 13) a partir del día 13 después del nacimiento, es decir, en el momento en el que acaba de aparecer la enfermedad.

55 Realizando una evaluación semanal de la fuerza muscular de las patas anteriores analizando la fuerza de agarre, se observa un claro efecto del PEG-IGF-I en el día 45 postnatal, en el que los ratones pmn supervivientes tratados con PEG-IGF-I presentan una potencia física significativamente superior a la de los animales tratados con el vehículo ( $p < 0,05$ , n = 4-5, figura 5). El análisis de la coordinación motora mediante la evaluación del tiempo pasado en la varilla giratoria (rotarod) indica que los ratones pmn tratados con PEG-IGF-I se comportan mejor que los ratones tratados con vehículo, de modo significativo en el día 38 después del nacimiento ( $p < 0,05$ , n = 8-12, figura 6). Se realiza además un análisis histológico de ratones pmn tratados a partir del día 13 postnatal con el vehículo o con el PEG-IGF-I (150 µg/kg por vía s.c.) y sometidos a perfusión en el día 34 postnatal. El recuento estereológico de las neuronas motoras faciales revela un número significativamente mayor de neuronas motoras supervivientes en el grupo tratado con PEG-IGF-I ( $p < 0,01$ , n = 6-12, figura 7). De manera similar, aumenta significativamente la supervivencia de las neuronas motoras de la médula espinal lumbar ( $p < 0,001$ , n = 5-6, figura 8). Finalmente, el análisis de los axones mielinizados de los nervios frénicos revela un número significativamente mayor de axones

mielinizados en el nervio frénico proximal ( $p < 0,05$ ,  $n = 4-5$ , figura 9) así como en el nervio frénico distal ( $p < 0,01$ ,  $n = 5-6$ , figura 10), cuando se comparan con ratones pmn tratados con vehículo frente a los tratados con PEG-IGF-I.

5 Para evaluar el PEG-IGF-I en el modelo más utilizado de ELA familiar se emplean ratones SOD1(G93A) (bajo número de copias). Estos ratones desarrollan los primeros síntomas de la enfermedad en la semana 34-35 postnatal y la muerte al cabo de 4-5 semanas después. Para ello se tratan los ratones SOD1(G93A) por vía s.c. dos veces por semana (q3,5d) con el vehículo ( $n = 6$ ) o con 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de PEG-IGF-I ( $n = 7$ ) a partir de la semana 34 postnatal, es decir, en el momento en el que se acaba de manifestar la enfermedad. Para asegurar la validez estadística a lo largo del ensayo se realiza un análisis LOCF (last observation carried forward). Este método (también utilizado para ensayos clínicos) mantiene la última medición de un animal antes de la muerte para todos los puntos temporales posteriores. El análisis de los cambios del peso corporal revela que la caída del peso corporal en una fase temprana de la enfermedad (aprox. la semana 37) se retrasa de modo significativo en los ratones tratados con PEG-IGF-I ( $p < 0,05$  para las semanas 37, 38 y 39,  $n = 6-7$  LOCF, figura 11). El inicio de la enfermedad propiamente dicho se mide con los primeros síntomas de debilidad de las patas posteriores, el paso anómalo y la dificultad de mantenerse sobre una malla de alambre invertida se retrasan en promedio 4 semanas de la semana postnatal 38,5 a la semana 42,5 ( $p < 0,05$ ,  $n = 6-7$ , figura 12). Realizando una evaluación semanal de la fuerza muscular de las patas anteriores analizando la fuerza de agarre se observa un efecto protector significativo del PEG-IGF-I a partir de la semana postnatal 35, de modo constante, hasta la muerte de todos los animales ( $p < 0,05$  para las semanas 35, 38, 42 y 43,  $p < 0,01$  para las semanas 36, 39, 40 y 41,  $n = 6-7$  LOCF, figura 13). El análisis de coordinación motora ensayando el tiempo pasado en la varilla giratoria (rotarod) indica que los ratones SOD1(G93A) tratados con PEG-IGF-I se comportan significativamente mejor que los ratones tratados con el vehículo ( $p < 0,05$  para las semanas 37, 38, 39 y 41,  $p < 0,01$  para las semanas 40, 42 y 43,  $n = 6-7$  LOCF, figura 14).

25 Reuniendo todos los valores de los ratones pmn y SOD1(G93A) obtenidos "in vivo", los estudios demuestran que el PEG-IGF-I interfiere en la función neuromuscular de los modelos de ELA en todos los objetivos relevantes y tiene el potencial de actuar en cada estadio de la enfermedad. Se demuestra que el PEG-IGF-I preserva la fuerza y la función muscular, lo cual sugiere un efecto anabólico en el músculo, muy probablemente protegiendo la inserción neuromuscular y la conectividad. Además de esto, se pone de manifiesto que el PEG-IGF-I rescata los axones motores y los cuerpos celulares de neuronas motoras de la médula espinal y del núcleo facial, lo cual sugiere un efecto protector directo en las neuronas motoras (figura 15). Dado que estas degeneraciones surgen en un estadio posterior de la ELA, el PEG-IGF-I probablemente puede afectar el curso de la enfermedad tanto en los estadios tempranos como en los tardíos.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Uso de variantes de IGF-I PEGiladas para el tratamiento de trastornos neuromusculares

40 <130> 24831

<160> 4

45 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

55 1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

60 20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35 40 45

65 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

ES 2 388 827 T3

50            55            60

5    Lys Pro Ala Lys Ser Ala  
65            70

<210> 2  
<211> 70  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
15 <221> MUTAGEN  
<222> (65)..(65)  
<223> K65R

<220>  
20 <221> MUTAGEN  
<222> (68)..(68)  
<223> K68R

<400> 2  
25 Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
1            5            10            15

30 Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly  
          20            25            30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
35            35            40            45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
40            50            55            60

Arg Pro Ala Arg Ser Ala  
65            70

45 <210> 3  
<211> 70  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <220>  
<221> MUTAGEN  
<222> (27)..(27)  
55 <223> K27R

<220>  
60 <221> MUTAGEN  
<222> (68)..(68)  
<223> K68R

<400> 3  
65 Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
1            5            10            15

ES 2 388 827 T3

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr Gly  
20 25 30

5  
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
35 40 45

10 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
50 55 60

15 Lys Pro Ala Arg Ser Ala  
65 70

<210> 4  
<211> 70  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
25 <221> MUTAGEN  
<222> (27)..(27)  
<223> K27R

<220>  
30 <221> MUTAGEN  
<222> (68)..(68)  
<223> K68R

<400> 4  
35 Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
1 5 10 15

40 Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Arg Pro Thr Gly Tyr Gly  
20 25 30

45 Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys  
35 40 45

50 Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu  
50 55 60

55 Arg Pro Ala Lys Ser Ala  
65 70

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una variante de IGF-I modificada con polietilenglicol (= PEGilada) para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento, prevención y/o demora de un trastorno neuromuscular, elegida del grupo de neuropatía, distrofias musculares y enfermedades de neuronas motoras (MND), en el que dicha variante PEGilada del IGF-I se caracteriza porque se deriva de la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) y lleva una o dos alteraciones de aminoácido en las posiciones 27, 65 y 68, de modo que uno o dos aminoácidos de las posiciones 27, 65 y 68 es o son un aminoácido polar, pero no la lisina, y el PEG está unido por lo menos a un resto lisina.
2. Uso reivindicado en la reivindicación 1, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada se caracteriza por las siguientes alteraciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1):
- (a) K65R y K68R (SEQ ID NO: 2)
  - (b) K27R y K68R (SEQ ID NO: 3), o
  - (c) K27R y K65R (SEQ ID NO: 4).
3. Uso reivindicado en la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada es mono-PEGilada en K68 y se caracteriza por las siguientes alteraciones de la secuencia de aminoácidos del IGF-I humano de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1):
- K27R y K65R (SEQ ID NO: 4).
4. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, en el que dicho PEG tiene un peso molecular total de 20 a 100 kDa.
5. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada está PEGilada además en el aminoácido del extremo N.
6. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada está monoPEGilada en K65 o en K68, o está diPEGilada en K65 y en K68.
7. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada está caracterizada porque hasta tres aminoácidos del extremo N están truncados.
8. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, en el que dicha variante de IGF-I PEGilada se caracteriza porque el o los grupos polietilenglicol es o son grupos polietilenglicol ramificados.
9. Uso reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, en el que dicho trastorno neuromuscular es una enfermedad de neuronas motoras (MND).
10. Uso reivindicado en la reivindicación 9, en el que dicha MND es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
11. Uso reivindicado en la reivindicación 10, en el que la variante de IGF-I PEGilada se utiliza de modo separado, sucesivo o simultáneo, combinada con un segundo compuesto farmacológicamente activo.
12. Uso reivindicado en la reivindicación 11, en el que el segundo compuesto farmacológicamente activo de la combinación es por lo menos un neuroprotector que tiene efecto inhibidor de la liberación de glutamato o efecto de inactivación de los canales de sodio dependientes de voltaje o la capacidad de interferir en los episodios intracelulares que siguen a la unión del transmisor con los receptores de aminoácidos excitantes.
13. Uso reivindicado en la reivindicación 12, en el que el segundo compuesto farmacológicamente activo es el riluzol.
14. Composición farmacéutica que contiene una variante de IGF-I PEGilada según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8 en una forma farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento, prevención y/o demora de la progresión de un trastorno neuromuscular elegido del grupo de neuropatía, distrofias musculares y enfermedades de neuronas motoras (MND).
15. Composición farmacéutica para uso según la reivindicación 14, en la que dicho trastorno neuromuscular es una MND, con preferencia la ELA.

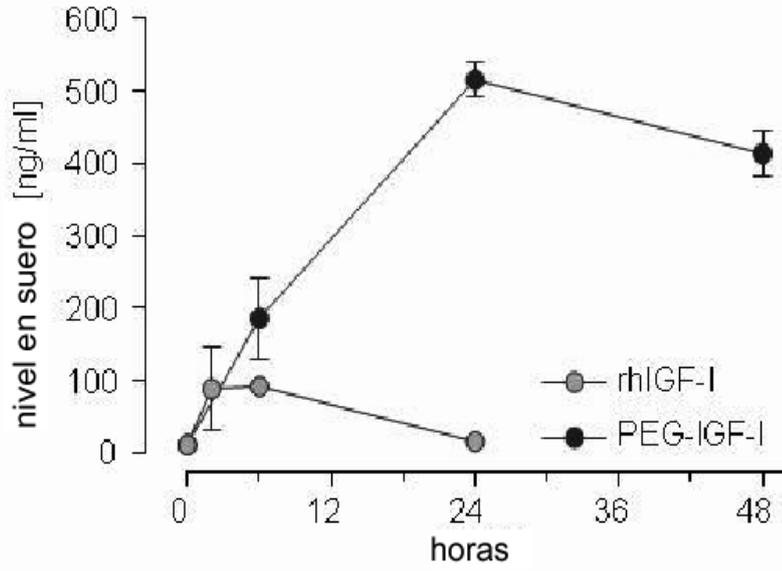


Fig. 1

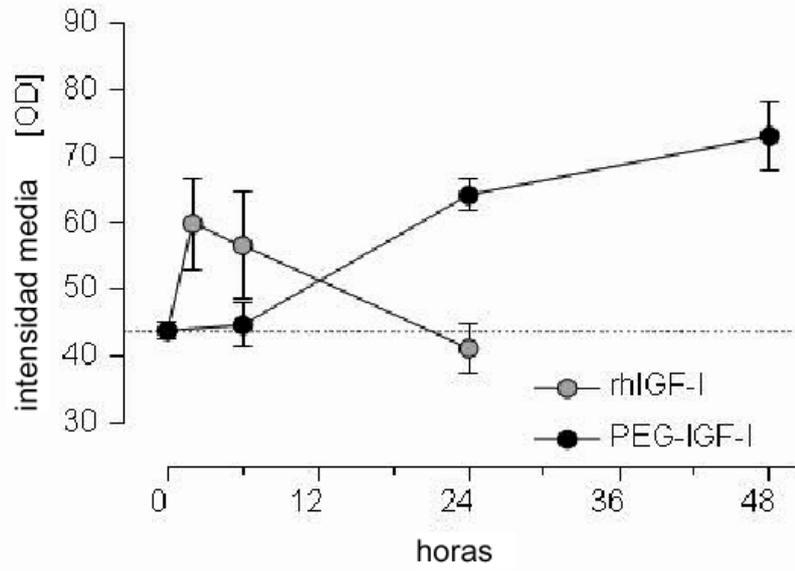


Fig. 2

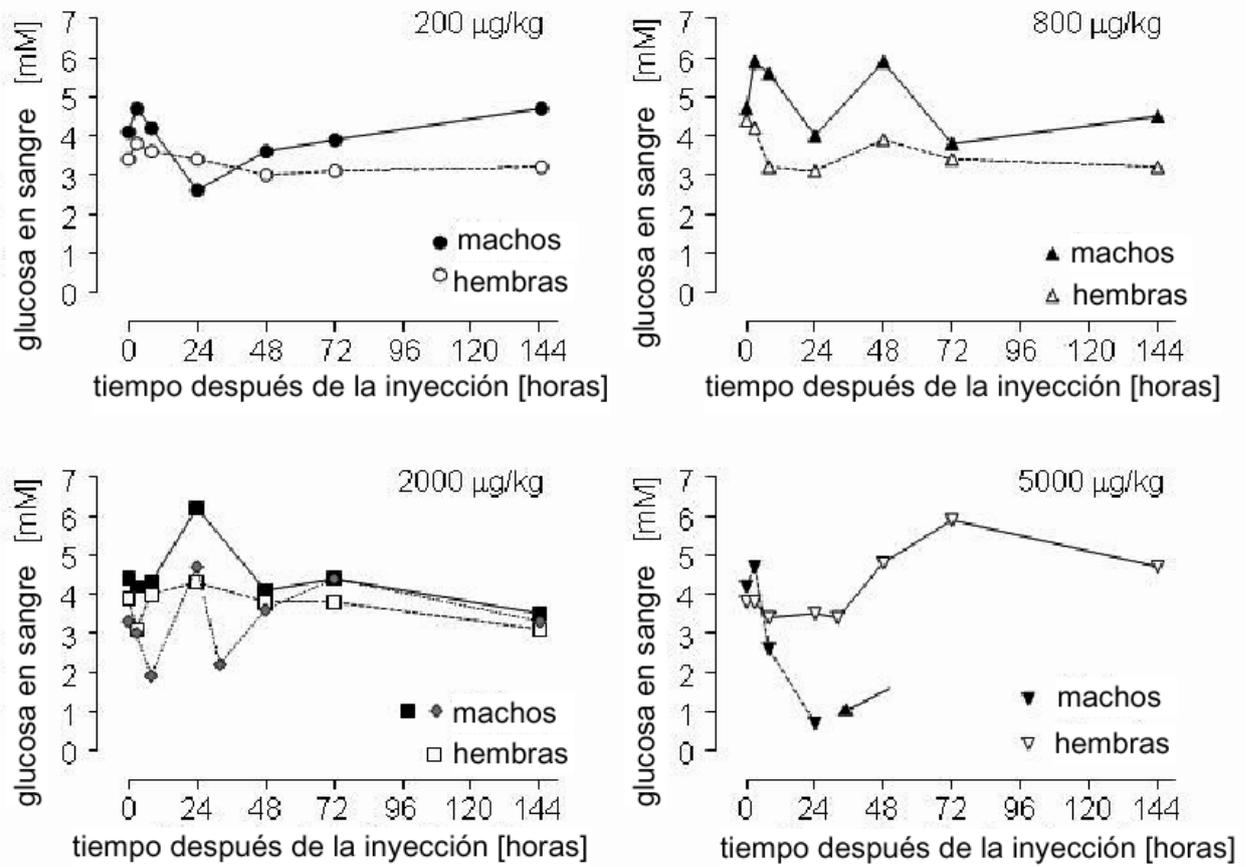
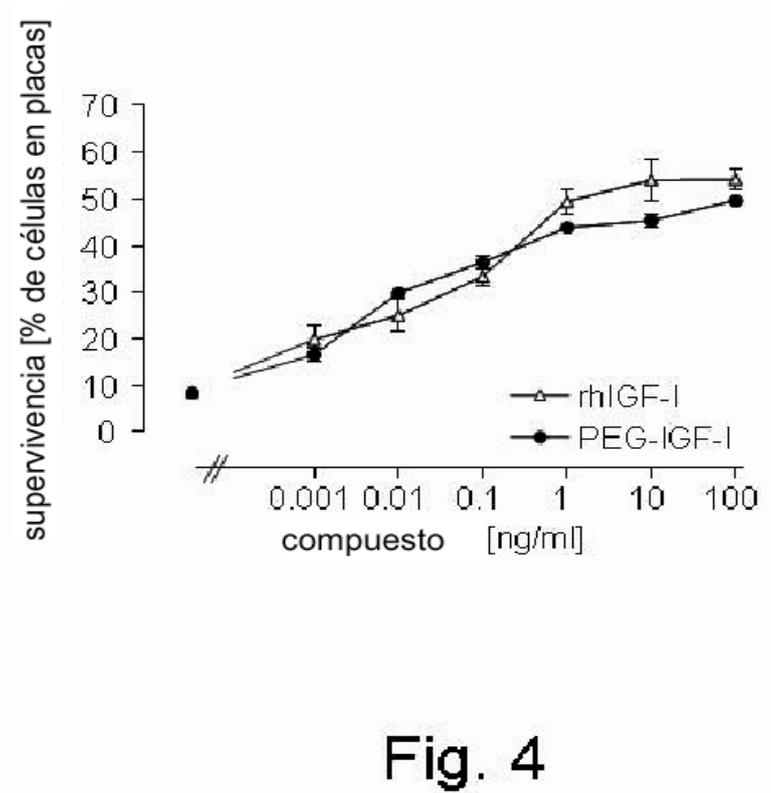


Fig. 3



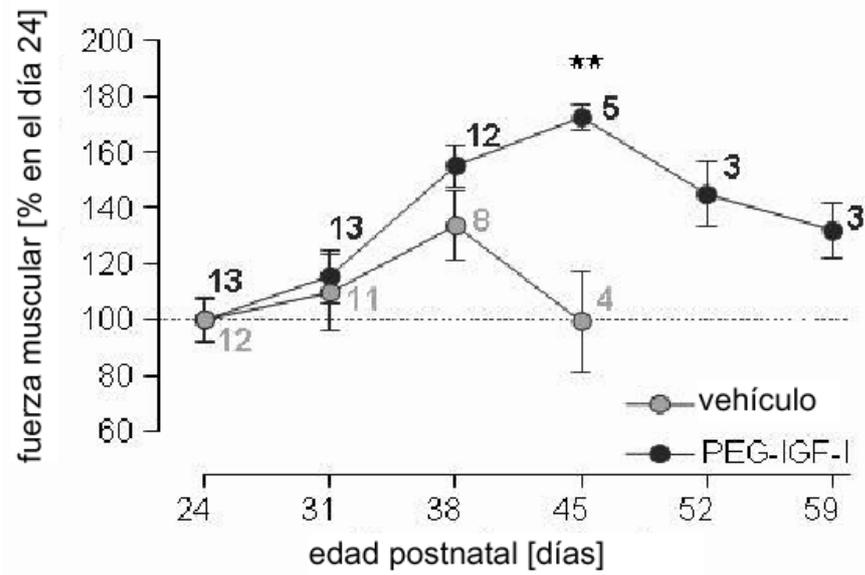


Fig. 5

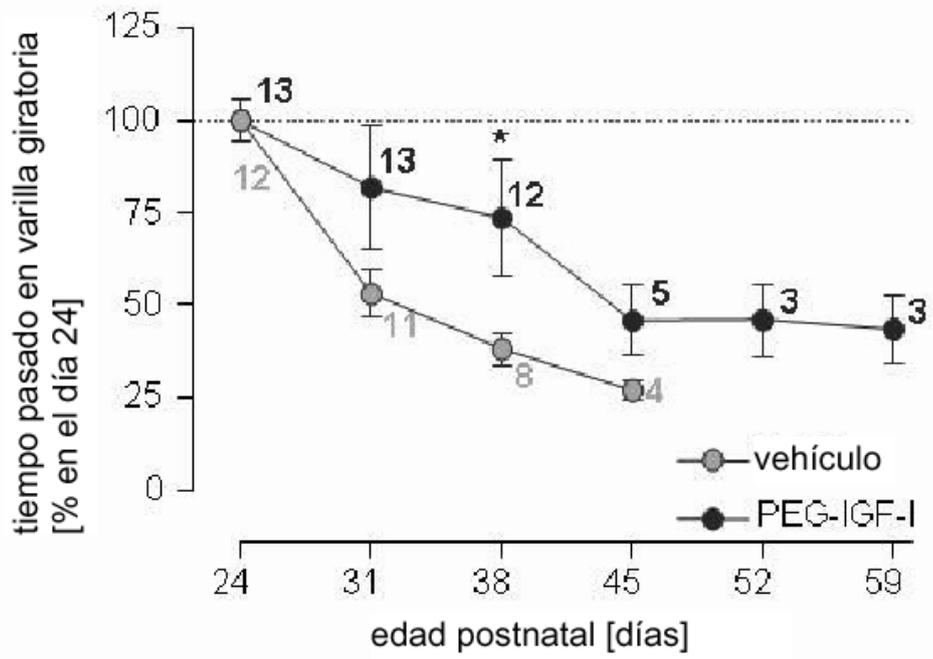
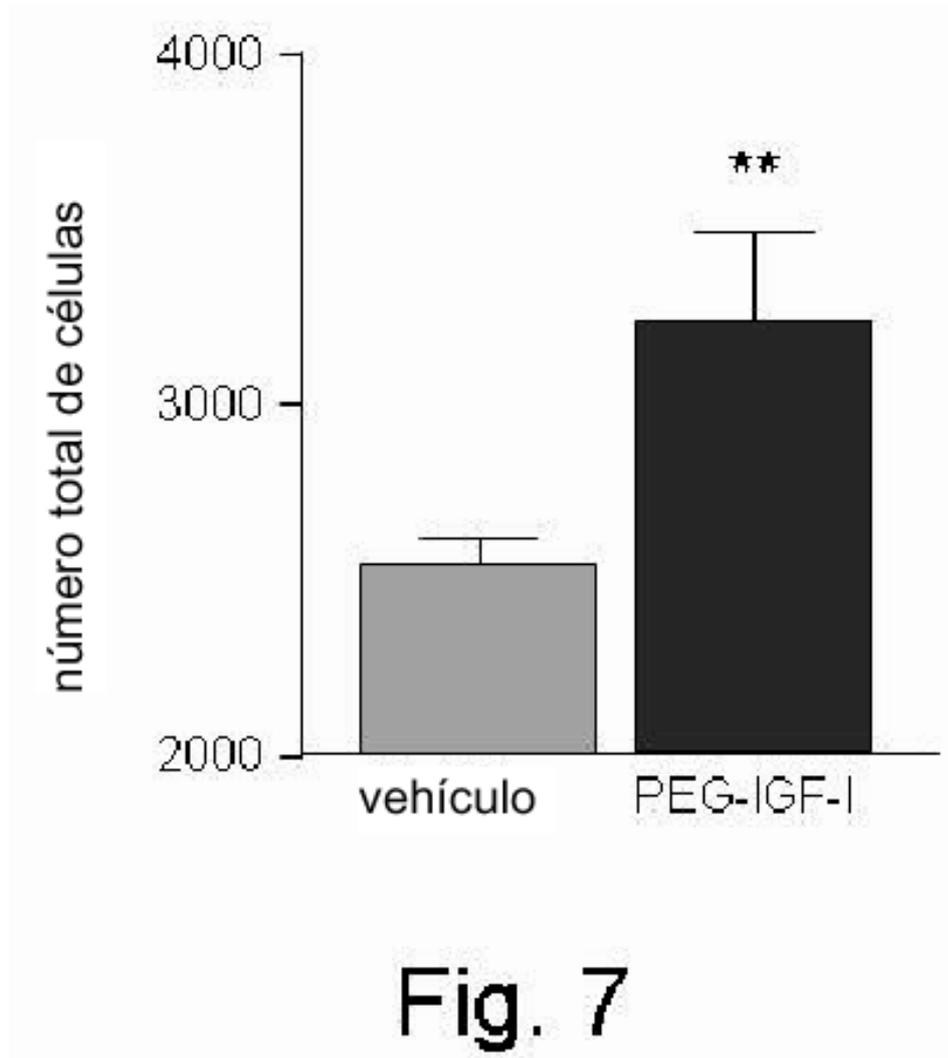
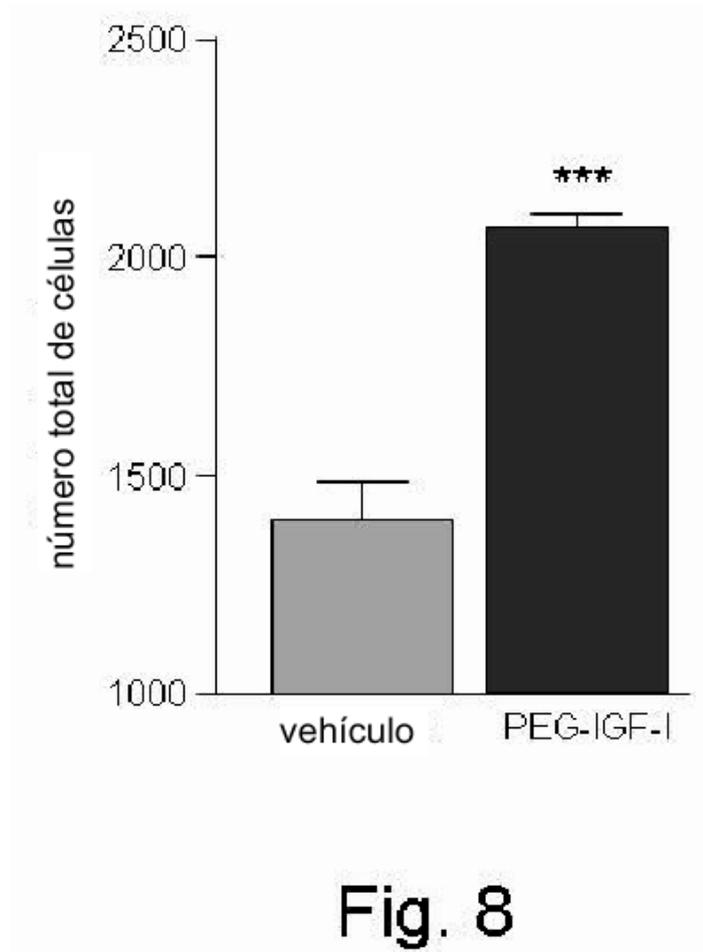
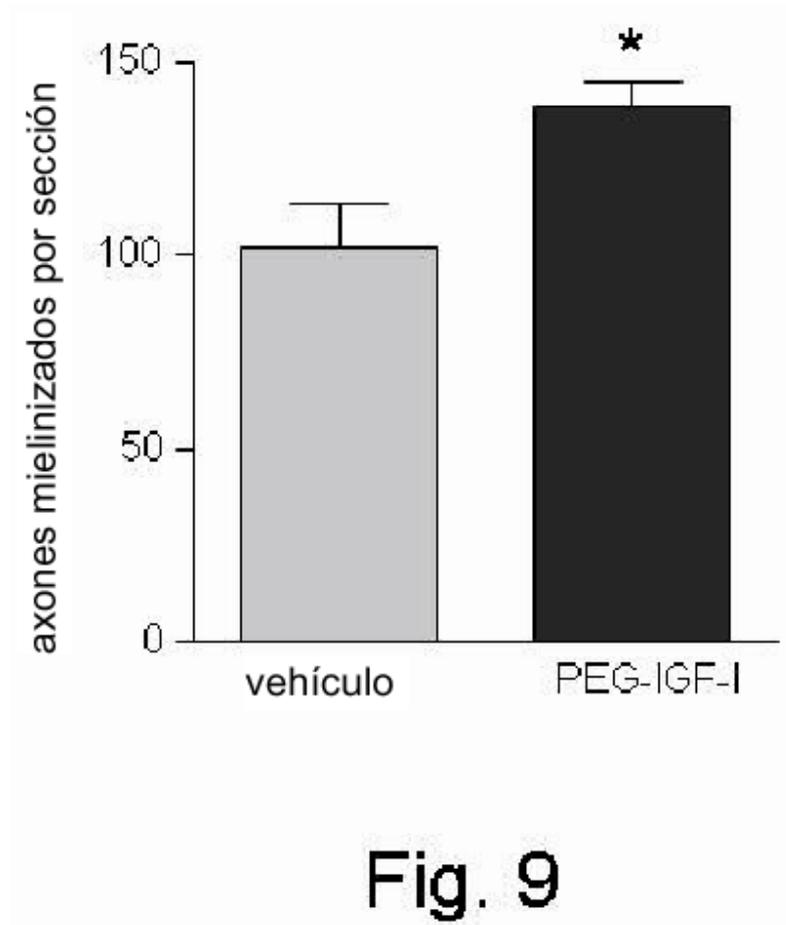
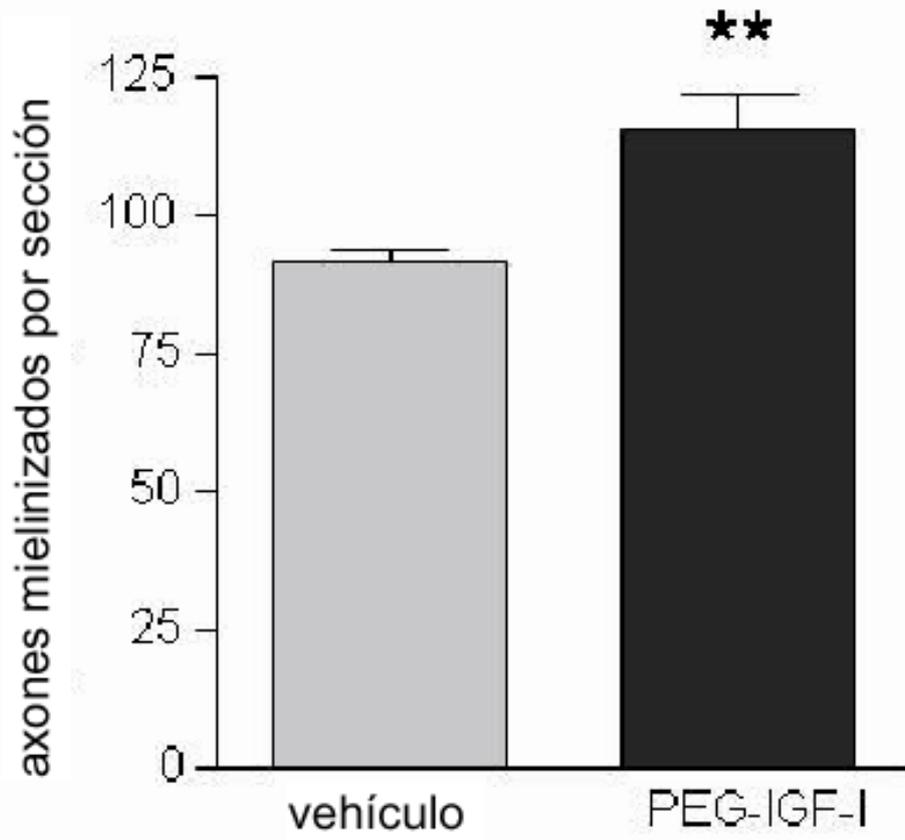


Fig. 6









**Fig. 10**

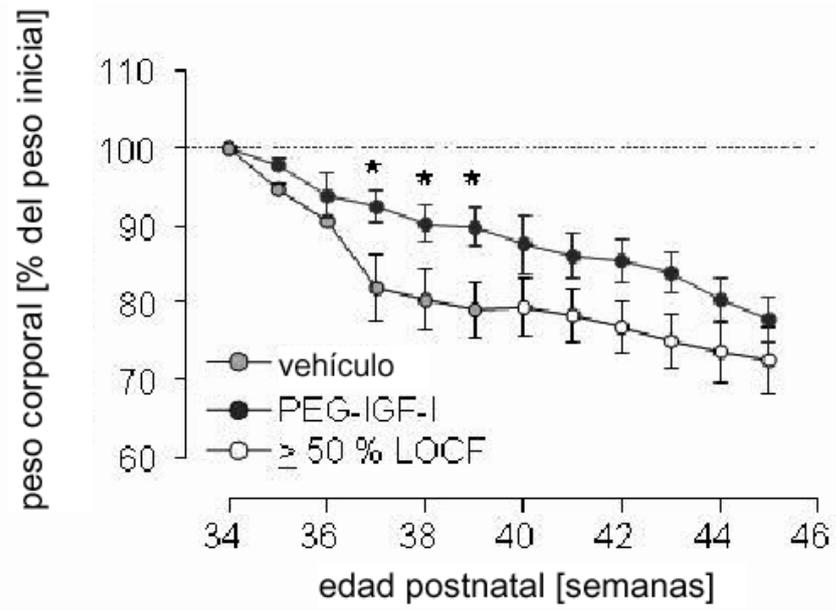


Fig. 11

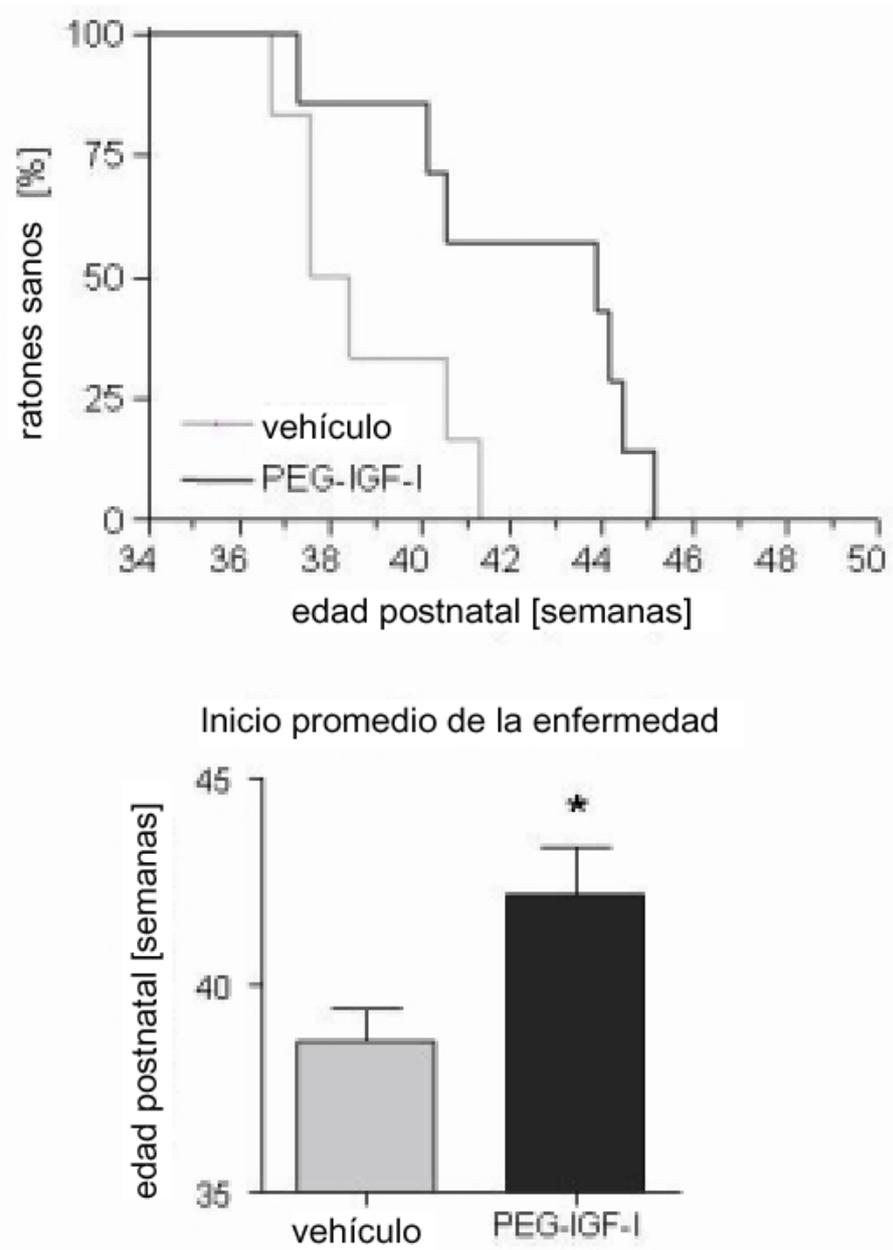


Fig. 12

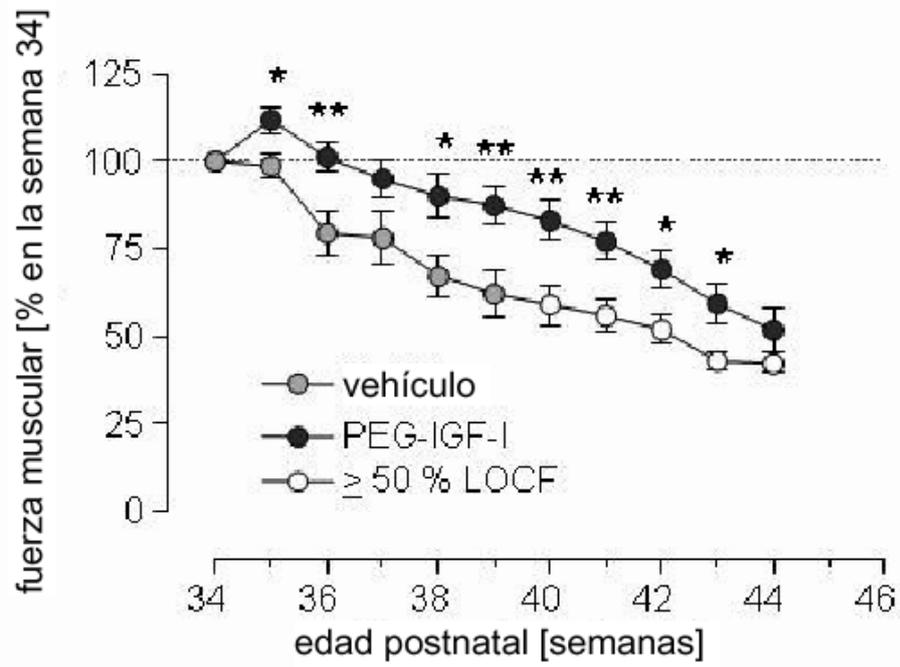


Fig. 13

