

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 454**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2007 E 07867451 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2086331**

54 Título: **Métodos de tratamiento de trastornos neuronales utilizando péptidos MNTF y análogos de los mismos**

30 Prioridad:

10.11.2006 US 858022 P

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

12.06.2013

73 Titular/es:

**GENERVON BIOPHARMACEUTICALS LLC
(100.0%)
830 NORTH WILCOX AVENUE
MONTEBELLO CA 90640, US**

72 Inventor/es:

**KO, PUI-YUK DOROTHY y
KINDY, MARK S.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 407 454 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

Métodos de tratamiento de trastornos neuronales utilizando péptidos MNTF y análogos de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN

[0001] La presente memoria se refiere, en general, a métodos para el tratamiento de trastornos neuronales en animales utilizando un péptido MNTF que consiste en la SEQ ID NO: 2, o sales del mismo, en los que el polipéptido se administra mediante liberación intravenosa y es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica.

10 [0002] Se ha observado que la supervivencia de motoneuronas embrionarias depende de sustancias tróficas específicas derivadas de los músculos esqueléticos en desarrollo asociados. Se ha descrito que ciertos músculos esqueléticos producen sustancias que son capaces de aumentar la supervivencia y el desarrollo de las motoneuronas evitando que las motoneuronas embrionarias se degeneren y, posteriormente, ocurra la muerte celular natural. Estas sustancias se han descrito ampliamente como factores neuronotróficos (NTF) que son un grupo especializado de proteínas que actúan para inducir las capacidades de supervivencia, crecimiento, mantenimiento y funcionales de poblaciones seleccionadas de neuronas (por ejemplo, Chau, R. M. W., et al., 6 Chin. J Neuroanatomy 129, 1990).

20 [0003] Un conjunto de enfermedades, trastornos o patologías neurodegenerativas, neuromusculares y neuronales que afectan a los sistemas nervioso central y/o periférico se pueden caracterizar globalmente o en parte por una pérdida aguda o progresiva de los tejidos neuronales funcionales. Éstas incluyen patologías, tales como, por ejemplo, lesión de la médula espinal (SCI), enfermedad neurodegenerativa, apoplejía o isquemia (por ejemplo, isquemia cerebral), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), Esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer (AD) y neuropatía diabética.

25 [0004] Los documentos US6309877, US7183373, US6841531, US6759389 y US20060052299 describen factores neuronotróficos específicos (NTF) denominados Factores Motoneuronotróficos (MNTF) que poseen la capacidad de ejercer efectos tróficos en las motoneuronas.

30 [0005] Los documentos US 2006/052299 y WO 2004/065410 describen péptidos de factores motoneuronotróficos (MNTF), composiciones y métodos de uso en la modulación de la viabilidad y crecimiento en células neuronales.

35 [0006] Yu J et al. (2008) Brain Research, vol: 1238, páginas: 143-153, describe la capacidad del análogo del factor motoneuronotrófico GM6 de reducir el volumen de la necrosis y los déficits de comportamiento después de la isquemia transitoria en ratones.

BREVE RESUMEN

40 [0007] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un polipéptido de factor motoneuronotrófico (MNTF), la secuencia de aminoácidos de la cual consiste en FSRYAR (SEQ ID NO: 2), o una sal de dicho polipéptido, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neuronal en un animal, en el que el polipéptido o sal se administran mediante liberación intravenosa y es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica, y en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en apoplejía, isquemia cerebral, lesiones de la médula espinal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Alzheimer (AD).

50 [0008] En una realización, el polipéptido del primer aspecto de la invención es para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno neuronal en un animal, en el que el polipéptido o sal se administran mediante liberación intravenosa y es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica, y en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en apoplejía, isquemia cerebral, lesiones de la médula espinal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Alzheimer (AD).

55 [0009] En realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención, el animal es un humano.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 [0010] Figura 1. Ilustra los niveles de un análogo de péptido de 6 unidades de MNTF de ejemplo (GM6; FSRYAR, SEQ ID NO: 2) en el cerebro de ratones de tipo salvaje. Ratones de tipo salvaje: vehículo control (solución salina), MNTF a 0,2 mg o MNTF a 2 mg/kg. Los artículos de prueba indicados se administraron en tiempo 0 y los cerebros se recogieron 4 horas después del análisis mediante ELISA.

65 [0011] Figura 2A. Ilustra los efectos de un péptido de 6 unidades de MNTF de ejemplo (FSRYAR, GM602 o SEQ ID NO: 2) en volúmenes de necrosis en el ratón después de isquemia transitoria. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg o 5 mg/kg intravenosamente al final de isquemia. Los animales se sacrificaron en el día 2 y se

procesaron para determinar el volumen de la necrosis.

[0012] Figura 2B. Imágenes de dos cerebros sometidos a lesión por isquemia/reperfusión seguido de inyección IV de una dosis de GM602 (4 secciones del cerebro tratado a la izquierda) que muestra muy poco daño (área blanca) o vehículo (4 secciones del cerebro de control a la derecha) que muestra daño extenso en el cerebro. Dibujos representativos de cerebros de ratones sometidos a isquemia por 1 hora y reperfusión por 24 horas. A los animales se inyectaron GM602 (5 mg/kg) o vehículo al final de la isquemia.

[0013] Figura 3. Ilustra los datos de la evaluación del flujo sangre cerebral de animales sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Para cada grupo de estudio, se midió el flujo de sangre antes de isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de artículos de prueba (tercera columna).

[0014] Figura 4. Medición de la presión sanguínea en ratones sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Para cada grupo de estudio, se midió la presión sanguínea antes de la isquemia (primera columna), durante la isquemia (segunda columna) y después de la inyección del artículo de prueba (tercera columna).

[0015] Figura 5. Mediciones del ritmo cardiaco en ratones sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Para cada grupo de estudio, se midió el ritmo cardiaco antes de la isquemia (primera columna), durante la isquemia (segunda columna) y después de la inyección del artículo de prueba (tercera columna).

[0016] Figura 6. Medición de gases en sangre en ratones sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Para cada grupo de estudio, se midieron los gases en sangre (pO_2 y pCO_2) antes de la isquemia (primera columna), durante la isquemia (segunda columna) y después de la inyección del artículo de prueba (tercera columna).

[0017] Figura 7. Medición del pH en ratones sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Para cada grupo de estudio, se midió el pH antes de la isquemia (primera columna), durante la isquemia (segunda columna) y después de la inyección del artículo de prueba (tercera columna).

[0018] Figura 8. Mediciones de déficits neurológicos en ratones sometidos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 24 horas de reperfusión. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 1 mg/kg ó 5 mg/kg intravenosamente al final de la isquemia. Los déficits neurológicos se midieron al final de la reperfusión.

[0019] Figura 9. Ilustra los efectos de un análogo de péptido MNTF de ejemplo GM603 (FSRYAR, SEQ ID NO: 2) en volúmenes de lesión en el ratón después de lesión de la médula espinal. Todos los ratones se sometieron a lesión de la médula espinal seguido de 14 días de recuperación. A los animales se inyectaron vehículo (control), GM603 intravenosamente después de la lesión y cada día hasta el sacrificio. Los animales se sacrificaron en el día 14 y se procesaron para determinar el volumen de la lesión.

[0020] Figura 10. Área dañada de la médula espinal después de la lesión de médula espinal (SCI). Todos los ratones se sometieron a lesión de médula espinal seguido de 14 días de recuperación. Se cortaron secciones de tejido y se procesaron para la evaluación del área dañada. A. Ratón con SCI tratado con vehículo. B. Ratón tratado con 5 mg/kg GM603. El área dañada se muestra en rojo y el área no dañada se muestra en azul. Tal como se puede observar en la figura, el área dañada en B es significativamente más pequeña en los animales tratados con GM603.

[0021] Figura 11. Ilustra los resultados de la prueba de cinta de correr-barra giratoria en animales sometidos a lesión de médula espinal. Todos los ratones se sometieron a lesión de médula espinal seguido del número de días indicados en la figura. El análisis de comportamiento se midió después de la lesión.

[0022] Figura 12. Mediciones de comportamiento de campo abierto en ratones sometidos a lesión de médula espinal. Todos los ratones se sometieron a lesión de médula espinal seguido del número de días indicados en la figura. El análisis de comportamiento se midió después de la lesión.

[0023] Figura 13. Efectos de un análogo de péptido MNTF de ejemplo GM604 (FSRYAR, SEQ ID NO: 2) en la edad de inicio de la enfermedad en el ratón ALS. Todos los ratones se inyectaron con vehículo (control) o GM604 intravenosamente en el día 80 y cada día hasta el sacrificio. Los animales se registraron desde el punto de inicio de

la enfermedad.

[0024] Figura 14. Efectos de un análogo de péptido MNTF de ejemplo GM604 en la edad de la muerte en el ratón ALS. Todos los ratones se inyectaron con vehículo (control) o GM604 intravenosamente en el día 80 y cada día hasta el sacrificio. Los animales se registraron desde el punto de la muerte en base a la parálisis de las patas traseras.

[0025] Figura 15. Prueba Cinta de correr-barra giratoria en animales ALS. Todos los ratones eran transgénicos para la mutación SOD de G93A y se trataron con solución salina o análogo de péptido MNTF de ejemplo GM604 tal como se indica. Se midió el análisis del comportamiento en los tiempos indicados.

[0026] Figura 16. Prueba de fuerza de agarre en animales ALS. Todos los ratones eran transgénicos para la mutación SOD de G93A y se trataron con solución salina o GM604 tal como se indica. Puntuación clínica en animales ALS. Todos los ratones eran transgénicos para la mutación SOD de G93A y se trataron con solución salina o GM604 tal como se indica. La puntuación clínica se midió en los tiempos indicados tal como tal como se indica en la sección de métodos. Sin señal de debilidad (0); temblores y pérdida de reflejos de separación (1); paresia en una pata trasera (2); paresia en ambas patas traseras (3); parálisis de una o ambas patas traseras (4) (Figura 16B).

[0027] Figura 17. Efectos de análogo de péptido MNTF de ejemplo (artículos de prueba GB) en la viabilidad celular en células neuronales SH-SY5Y después de tratamiento con salsolinol. Todos los cultivos se desarrollaron en medio tal como se indica en la sección de métodos. Los cultivos se incubaron con vehículo (control), análogo de péptido MNTF GM6 a varias concentraciones, +/- salsolinol (Sal). Además, se incubaron varios cultivos con Wortmannin (W) para determinar el mecanismo de acción. Los cultivos se incubaron durante 24 horas con compuestos y se analizó la viabilidad celular.

[0028] Figura 18. Inducción de la muerte celular en cultivos primarios de células neuronales mediante CSF. Se aplicó CSF de control y varios trastornos neurológicos a cultivos primarios de células neuronales de rata durante 2 días después de 12 días en cultivo. Los artículos de prueba indicados se administraron a tiempo 0 y los cultivos se examinaron mediante ensayo MTT para la viabilidad celular.

[0029] Figura 19. Efectos protectores de un péptido MNTF de ejemplo contra la pérdida de células neuronales en la muerte celular inducida por CSF. Se aplicó CSF de control y varios trastornos neurológicos a cultivos primarios de células neuronales de rata durante 2 días después de 12 días en cultivo. Se añadieron MNTF (+M) 2 horas antes de la adición de CSF. Los artículos de prueba indicados se administraron a tiempo 0 y los cultivos se examinaron mediante ensayo MTT para la viabilidad celular.

[0030] Figuras 20A y 20B. Determinaciones de comportamiento en ratones después de la inducción de PD y el tratamiento con GM6. Se inyectaron ratones macho C57BL/6 con MPTP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 5 días. Los animales se evaluaron por los cambios de comportamiento.

[0031] Figuras 21A, 21B, 21C. Ilustra los niveles de monoamina y metabolito después del tratamiento con MPTP. Se inyectaron ratones macho C57BL/6 con MPTP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 5 días. Los animales se evaluaron por los niveles de monoamina y metabolito al final del estudio.

[0032] Figura 22. Número de células en la pars compacta de la sustancia negra de ratones después de la inducción de PD y tratamiento con GM6. Se inyectaron ratones macho C57BL/6 con MPTP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 5 días. Los animales se evaluaron por el recuento de células al final del estudio.

[0033] Figura 23. Puntuaciones clínicas promedio en ratones después de la inducción de MS y tratamiento con GM6. Se inyectaron ratones hembra J/L con PLP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 7 días. Los animales se evaluaron por las puntuaciones clínicas cada dos días.

[0034] Figura 24A, 24B: 24A. Número de lesiones en los cerebros de ratones después de la inducción de MS y el tratamiento con GM6. Se inyectaron ratones hembra J/L con PLP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 7 días. Los animales se evaluaron por las lesiones cerebrales al final del estudio. 24B. Número de lesiones en la médula espinal de ratones después de la inducción de MS y el tratamiento con GM6. Se inyectaron ratones hembra J/L con PLP seguido de GM6 en las dosis indicadas durante 7 días. Los animales se evaluaron por las lesiones de la médula espinal al final del estudio

[0035] La figura 25, que consiste en las figuras 25A, 25B, 25C, 25D, 25E, 25F, y 25G, es un listado parcial de análogos de péptidos de MNTF de ejemplo. Las secuencias que corresponden a las SEC ID Nos respectivas están destacadas.

[0036] Figura 26. Ilustra datos del estudio de los efectos de GM602 en volúmenes de necrosis en el ratón después de isquemia transitoria. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de perfusión. Los animales fueron inyectados con vehículo (control), GM602 a 5 mg/kg intravenosamente en los

tiempos indicados (3, 6, 12, 24 horas) después de isquemia. Además, los animales se inyectaron diariamente durante 3 días después de la lesión. Los animales se sacrificaron en el día 14 y se procesaron para determinar el volumen de la necrosis.

- 5 [0037] Figura 27. Ilustra datos del estudio del flujo sanguíneo cerebral de animales sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. El flujo sanguíneo se midió antes, durante y después del fin de la reperfusión.
- 10 [0038] Figura 28. Medición de la presión sanguínea en ratones sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. La presión sanguínea se midió antes, durante y después del fin de la isquemia.
- 15 [0039] Figura 29. Medición del ritmo cardíaco en ratones sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. El ritmo cardíaco se midió antes, durante y después del fin de la isquemia.
- 20 [0040] Figuras 30A y 30B. Medición del gas en sangre en ratones sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. Se midieron los gases en sangre pO₂ (30A) y pCO₂ (30B) antes, durante y después del fin de la isquemia.
- 25 [0041] Figura 31. Medición del pH en ratones sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. El pH se midió antes, durante y después del fin de la isquemia.
- 30 [0042] Figura 32. Mediciones de déficits neurológicos en ratones sujetos a lesión por isquemia/reperfusión. Todos los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia cerebral seguido de 14 días de reperfusión. Los artículos de prueba se administraron a 3, 6, 12, y 24 horas después del inicio de la isquemia. Los déficits neurológicos se midieron antes, durante y después del fin de la reperfusión.
- 35 [0043] Figura 33. Efectos de GM602 en volúmenes de necrosis en la rata después de isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente durante 28 días. A los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 0, 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente a las 3 horas después del inicio de la isquemia. Los animales se sacrificaron en el día 28 y se procesaron para determinar el volumen de la necrosis.
- 40 [0044] Figura 34. Flujo sanguíneo cerebral de animales sometidos a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 0, 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midió el flujo sanguíneo antes de la isquemia (primera columna, CBF en la línea base de preisquemia), durante la isquemia (segunda columna, CBF 3 horas después de la isquemia permanente pero antes de la administración de artículos de prueba) y después de la inyección de artículos de prueba (tercera columna, CBF, 1 hora después de la administración de artículos de prueba).
- 45 [0045] Figura 35. Medición de la presión sanguínea en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midió la presión sanguínea antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).
- 50 [0046] Figura 36. Medición del ritmo cardíaco en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midió el ritmo cardíaco antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).
- 55 [0047] Figuras 37A y 37B. Medición del gas en sangre en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midieron los gases en sangre pO₂ (Figura 37A) y pCO₂ (Figura 37B) antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).
- 60 [0047] Figuras 37A y 37B. Medición del gas en sangre en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midieron los gases en sangre pO₂ (Figura 37A) y pCO₂ (Figura 37B) antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).
- 65 [0047] Figuras 37A y 37B. Medición del gas en sangre en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midieron los gases en sangre pO₂ (Figura 37A) y pCO₂ (Figura 37B) antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).

[0048] Figura 38. Medición del pH en ratas sometidas a isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control) o GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Para cada grupo de estudio, se midió el pH antes de la isquemia (primera columna), durante isquemia (segunda columna) y después de la inyección de los artículos de prueba (tercera columna).

[0049] Figura 39. Mediciones de déficits neurológicos en ratas sometidas a lesión por isquemia. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control), GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Figura 39A. Situación de las extremidades anteriores. Figura 39B. Situación de las patas traseras. Figura 39C. Barra de equilibrio. Figura 39D. Se midieron los déficits neurológicos (actividad locomotora espontánea) al final del estudio. En la figura 39D, la primera barra es la puntuación antes de la administración del artículo de prueba y la segunda barra es la puntuación a los 28 días después de la administración del artículo de prueba.

[0050] Figura 40. Mediciones de biomarcador en ratas sometidas a lesión isquémica. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control), GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Los animales se sacrificaron en el día 28 y se procesaron secciones del cerebro para análisis inmunohistoquímico de TNF.

[0051] Figura 41. Mediciones de biomarcador en ratas sometidas a lesión isquémica. Todas las ratas se sometieron a isquemia cerebral permanente seguido de 28 días de recuperación. A las 3 horas después del inicio de la isquemia, a los animales se inyectaron vehículo (control), GM602 a 2,5, 10 ó 20 mg/kg intravenosamente. Los animales se sacrificaron en el día 28 y se procesaron secciones del cerebro para análisis inmunohistoquímico de Fluoro-jade.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0052] Se ha observado que la supervivencia de las motoneuronas embrionarias depende de sustancias tróficas específicas derivadas de los músculos esqueléticos en desarrollo asociados. Se ha descrito que los músculos esqueléticos producen sustancias que son capaces de aumentar la supervivencia y el desarrollo de las motoneuronas evitando que las motoneuronas embrionarias se degeneren y, posteriormente, ocurra la muerte celular natural. (O'Brian, R. J. y Fischbach, G. D., 6 J. Neurosci. 3265 (1986); Hollyday, M. y Hamburger, V., 170 J. Comp. Neurol. 311 (1976). McManaman, J. L., et al., 263 J. Biol. Chem. 5890 (1988); Oppenheim, R. W., et al., 240 Science, 919 (1988); and Smith, R. G., et al., 6 J. Neurosci. 439 (1986).

[0053] El Factor Motoneuronotrófico Humano (MNTF) es un NTF específico derivado de tejido de músculo esquelético que se ha visto que reduce la inflamación en el punto de lesión motoneuronal, aumenta la regeneración de los nervios e induce la supervivencia de las motoneuronas. Se ha analizado el MNTF en varios sistemas nerviosos de rata, incluyendo el nervio ciático periférico (que controla los músculos de las extremidades inferiores), el nervio musculocutáneo periférico (que controla los músculos de las extremidades superiores), el nervio craneal facial (que controla los músculos faciales y de la cabeza), el nervio craneal hipogloso (que controla la lengua) y la parte de la médula espinal que controla músculos en el cuello, pecho y extremidades superiores. En el modelo de médula espinal, se aplicó MNTF en el injerto de nervios en una hemisección de la médula espinal en ratas; MNTF redujo la inflamación, limitó la degeneración y aumentó la regeneración de los nervios injertados. Un conjunto de estudios han demostrado la eficacia del MNTF sintetizado o análogos de péptidos del mismo en sistemas de modelos de nervios periféricos de rata para efectos tróficos y trópicos cuando el MNTF o el análogo de péptido del mismo se aplica directamente en el nervio. Además, se ha observado que el MNTF induce la regeneración y supervivencia de motoneuronas.

[0054] La muerte celular neuronal tiene lugar en los sistemas nerviosos de vertebrados durante ciertos periodos de crecimiento y desarrollo. De este modo, la adición de factores tróficos neuronales solubles de tejidos diana asociados pueden servir para mitigar este fenómeno de muerte celular.

[0055] Por consiguiente, aspectos y realizaciones del presente documento proporcionan métodos que comprenden un péptido MNTF que consiste en la SEQ ID NO:2 y sales del mismo para el tratamiento de trastornos neuronales tal como se definen en las reivindicaciones.

[0056] Los aspectos y realizaciones del documento están dirigidos a dominios de proteína funcionales asociados con las acciones de factores motoneuronotróficos, que se han identificado y localizado en subsecuencias solapantes cortas en la molécula de MNTF1. Esta proteína de la invención es "FSRYAR," (SEQ ID NO:2).

[0057] Definiciones

[0058] A continuación, se establecen ciertos términos utilizados en el contexto de la descripción de la tecnología a la que pertenece este documento. A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes

significados cuando se utilizan aquí y en las reivindicaciones adjuntas. Los términos que no se definen a continuación o en otro punto en la memoria tendrán su significado conocido en la técnica.

[0059] Tal como se utiliza en el presente documento, un factor "motoneuronotrófico o factor trófico de motoneurona" incluye aquellos factores implicados en la nutrición o mantenimiento de neuronas motoras. Los términos "factor motoneuronotrófico", "MNTF", "péptido MNTF", "análogo de factor motoneuronotrófico", y "análogo de MNTF" se pueden utilizar indistintamente siempre que tengan propiedades funcionales aquí definidas. Éstos pueden incluir homólogos de secuencia y funcionales de la secuencia MNTF de referencia. Los factores motoneuronotróficos pueden inducir además el desarrollo y la diferenciación de células progenitoras neurales comprometidas o pueden inducir o aumentar el crecimiento (por ejemplo, brotes de crecimiento de neuritas) y la supervivencia de células neurales diferenciadas. Los factores motoneuronotróficos del presente documento se proporcionan habitualmente en cantidades eficaces para producir una célula neural totalmente diferenciadas del SNC p SNP (por ejemplo, una neurona motora). Las directrices para la cantidad se proporcionan aquí, y se puede determinar fácilmente por el experto en la materia en base a los procedimientos conocidos y los métodos aquí descritos.

[0060] Los péptidos de MNTF de ejemplo y análogos de péptidos de los mismos pueden incluir los descritos en Chau, R. M. W., et al., Muscle Neuronotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord. en: Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pag. 89-94 (1992), así como los hallados, por ejemplo, en US6309877, US7183373, US6841531, US6759389 y US20060052299. Los polipéptidos de MNTF sintéticos y/o purificados de la presente invención consiste en una parte del dominio WMLSAFSRYAR FSRYAR establecido en la SEQ ID NO:2 y sales de los mismos tal como se define en las reivindicaciones.

[0061] Además, los péptidos de MNTF de ejemplo y análogos de péptidos de los mismos que no son parte de la presente invención se describen en 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); Chau, R. M. W., et al., Muscle Neuronotrophic 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); 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); Chau, R. M. W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrófico Factor 1 (NMNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (resumen) 19 Soc. for Neurosci. part 1, 252 (1993), Chau, R. M. W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrófico Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (resumen) 19 Soc. for Neurosci. part 1, 252 (1993). En ciertas realizaciones, el polipéptido MNTF tal como se define en las reivindicaciones es sintético o purificado.

[0062] "Análogos," tal como se utiliza en la presente solicitud, significa aquellos péptidos, en que uno o más de los aminoácidos en las secuencias de referencia se cambian sin afectar de manera sustancial a la actividad de MNTF. En ciertas realizaciones, los análogos según el presente documento incluyen sustituciones "conservativas". Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones de aminoácido con aminoácidos sinónimos en el mismo grupo, que presentan propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre miembros del grupo, conservarán la función biológica de la molécula, Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).

[0063] Los grupos de aminoácidos sinónimos incluyen los definidos en las Tablas I, II, y III.

TABLA I

Grupos más amplios de aminoácidos sinónimos

Aminoácido---Grupo sinónimo

Ser --- Ser, Thr, Gly, Asn

Arg --- Arg, Gln, Lys, Glu, His

Leu --- Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu

Pro --- Gly, Ala, Thr, Pro

Thr --- Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr

Ala --- Gly, Thr, Pro, Ala

Val --- Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val

Gly --- Ala, Thr, Pro, Ser, Gly

Ile --- Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He

Phe --- Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe

Tyr --- Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr

Cys --- Ser, Thr, Cys

His --- Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His

Gln --- Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln

Asn --- Gln, Asp, Ser, Asn

Lys --- Glu, Gln, His, Arg, Lys

Asp --- Glu, Asn, Asp

Glu --- Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu

Met --- Phe, Ile, Val, Leu, Met

Trp --- Trp

TABLA II

Grupos intermedio de aminoácidos sinónimos

Aminoácido --- Grupo sinónimo

Ser --- Ser

Arg --- His, Lys, Arg

Leu --- Ile, Phe, Met, Leu

Pro --- Ala, Pro

Thr --- Thr

Ala ---ro, Ala

Val ---Met, Ile, Val

Gly---Gly**

Ile --- Ile, Met, Phe, Val, Leu

Phe --- Met, Tyr, Ile, Leu, Phe

Tyr --- Phe, Tyr

Cys --- Ser, Cys

His --- Arg, Gln, His

Gln --- Glu, His, Gln

Asn --- Asp, Asn

Lys --- Arg, Lys

Asp --- Asn, Asp

Glu --- Gln, Glu

Met --- Phe, Ile, Val, Leu, Met

Trp --- Trp

TABLA III

Grupos más estrechos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido --- Grupo sinónimo

Ser --- Ser

Arg --- Arg

Leu --- Ile, Met, Leu

Pro --- Pro

Thr --- Thr

Ala --- Ala

Val --- Val

Gly --- Gly

Ile --- Ile, Met, Leu

Phe --- Phe

Tyr --- Tyr

Cys --- Ser, Cys

His --- His

Gln --- Gln

Asn --- Asn

Lys --- Lys

Asp --- Asp

Glu --- Glu

Met --- Ile, Leu, Met

Trp --- Trp

[0064] Los aminoácidos utilizados en los compuestos aquí proporcionados (por ejemplo, péptidos y proteínas) pueden ser aminoácidos codificados genéticamente, aminoácidos naturales no codificados genéticamente, o aminoácidos sintéticos. En los compuestos se pueden utilizar los L y D enantiómeros de cualquiera de los anteriores. Las siguientes abreviaturas se pueden utilizar aquí para los siguientes aminoácidos codificados genéticamente (y residuos de los mismos): alanina (Ala, A); arginina (Arg, R); asparagina (Asn, N); ácido aspártico (Asp, D); cisteína (Cys, C); glicina (Gly, G); ácido glutámico (Glu, E); glutamina (Gln, Q); histidina (His, H); isoleucina (Ile, I); leucina (Leu, L); lisina (Lys, K); metionina (Met, M); fenilalanina (Phe, F); prolina (Pro, P); serina (Ser, S); treonina (Thr, T); triptófano (Trp, W); tirosina (Tyr, Y); y valina (Val, V).

[0065] Ciertos aminoácidos hallados habitualmente que no están genéticamente codificados y que están presentes en los compuestos descritos aquí incluyen, pero sin limitación, p-alanina(b-Ala) y otros omega-aminoácidos, tales como ácido 3- aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr, Z), ácido 4-aminobutírico y así sucesivamente; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava); metilglicina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle, J); 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F));

- penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); beta.-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH₂)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys); 3-benzotiazol-2-il-alanina (BztAla, B); y homoserina (hSer). Los análogos de aminoácidos adicionales contemplados incluyen fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, ácido hipúrico, ácido octahidroindol-2-carboxílico, estatina, α-metil-alanina, para-benzoil-fenilalanina, propargilglicina, y sarcosina. Los péptidos aquí descritos pueden tener cualquiera de los aminoácidos anteriores en la configuración L o D, o cualquier otro aminoácido aquí descrito o conocido en la técnica, ya sea actual o futuro.
- [0066] Los aminoácidos que son sustituibles entre sí residen generalmente en clases o subclases similares. Tal como se conoce en la técnica, los aminoácidos se pueden colocar en diferentes clases dependiendo principalmente de las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, algunos aminoácidos se consideran, en general, que son aminoácidos hidrofílicos o polares y otros que se consideran que son aminoácidos hidrofóbicos o no polares. Los aminoácidos polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas, básicas o hidrofílicas y los aminoácidos no polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas o hidrofóbicas. Los aminoácidos no polares se pueden subdividir además para incluir, entre otros, aminoácidos alifáticos. Las definiciones de las clases de aminoácidos, tal como se utilizan en el presente documento, son las siguientes:
- [0067] "Aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que está no cargada a pH fisiológico, que no es polar y que es repelido generalmente por una solución acuosa. Ejemplos de aminoácidos hidrofóbicos codificados genéticamente incluyen Ala, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr y Val. Ejemplos de aminoácidos no polares no codificados genéticamente incluyen t-BuA, Cha y Nle.
- [0068] "Aminoácido aromático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena lateral que contiene por lo menos un anillo que tiene un sistema conjugado de electrones pi (grupo aromático). El grupo aromático se puede sustituir adicionalmente por grupos sustituyentes, tales como grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxilo, sulfonilo, nitro y amino, así como otros. Ejemplos de aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos aromáticos no codificados genéticamente hallados habitualmente incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, β-2-tienilalanina, 3-benzotiazol-2-il-alanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.
- [0069] "Aminoácido alifático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena lateral de hidrocarburo de cadena lateral, ramificada o cíclica saturada o insaturada. Ejemplos de aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen Ala, Leu, Val y Ile. Ejemplos de aminoácidos alifáticos no codificados incluyen Nle.
- [0070] "Aminoácido polar" se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene una cadena lateral que está cargada o no cargada a pH fisiológico y que tiene un enlace en que el par de electrones compartido en común por dos átomos se mantiene más próximo en uno de los átomos. Los aminoácidos polares son generalmente hidrofílicos, lo que significa que tienen un aminoácido que tiene una cadena lateral que es atraída por una solución acuosa. Ejemplos de aminoácidos polares codificados genéticamente incluyen asparagina, cisteína, glutamina, lisina y serina. Ejemplos de aminoácidos polares no codificados genéticamente incluyen citrulina, homocisteína, N-acetil lisina y sulfóxido de metionina.
- [0071] "Aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene un valor de pK de cadena lateral inferior a 7. Los aminoácidos ácidos tienen habitualmente cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Ejemplos de aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato).
- [0072] "Aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene un valor de pK de cadena lateral superior a 7. Los aminoácidos básicos tienen habitualmente cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con ion hidronio. Ejemplos de aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen arginina, lisina e histidina. Ejemplos de aminoácidos básicos no codificados genéticamente incluyen ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.
- [0073] "Aminoácido ionizable" se refiere a un aminoácido que puede estar cargado a un pH fisiológico. Dichos aminoácidos ionizables incluyen aminoácidos ácidos y básicos, por ejemplo, ácido D-aspártico, ácido D-glutámico, D-histidina, D-arginina, D-lisina, D-hidroxilisina, D-ornitina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-histidina, L-arginina, L-lisina, L-hidroxilisina o L-ornitina.
- [0074] Tal como se entiende por los expertos en la materia, las clasificaciones anteriores no son absolutas. Varios aminoácidos muestran más de una propiedad característica, y por tanto, se pueden incluir en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene un anillo aromático no polar y un grupo hidroxilo polar. De este modo, la tirosina tiene varias características que se podrían describir como no polar, aromática y polar. Sin embargo, el anillo no polar es dominante y por tanto la tirosina se considera en general como no polar. De manera similar, además de ser capaz de formar uniones disulfuro, la cisteína también tiene carácter no polar. De este modo, aunque no está clasificado

estrictamente como aminoácido hidrofóbico o no polar, en muchos casos, la cisteína se puede utilizar para conferir hidrofobicidad o no polaridad a un péptido.

5 [0075] En algunas realizaciones, los aminoácidos polares aquí contemplados pueden incluir, por ejemplo, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, homocisteína, lisina, hidroxilisina, ornitina, serina, treonina, y aminoácidos estructuralmente relacionados. En una realización, el aminoácido polar es un aminoácido ionizable, tal como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, hidroxilisina, lisina, o ornitina.

10 [0076] Ejemplos de residuos de aminoácidos polares o no polares que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, tirosina y similares.

15 [0077] El término "sales" del presente documento se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de los péptidos aquí descritos o análogos de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o zinc, y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Naturalmente, cualquiera de dichas sales deben tener una actividad sustancialmente similar a los péptidos descritos aquí o sus análogos.

20 [0078] La definición "derivados funcionales", tal como se utiliza aquí, se refiere a derivados que se pueden preparar a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los grupos de aminoácidos o en los grupos N o C terminales según los métodos conocidos y están comprendidos en la memoria cuando son farmacéuticamente aceptables, es decir, cuando no destruyen la actividad de la proteína o no imparten toxicidad a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Dichos derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados de N-acilo de grupos amino libres o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo, como por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo.

25 [0079] Los "precursores" son compuestos que se convierten en los péptidos aquí descritos en el cuerpo humano o animal.

30 [0080] Los péptidos de la presente memoria se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida. Como síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido a sintetizar se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos y mediante repetición alternativa de reacciones, uno en el que los aminoácidos con sus grupos α -amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores apropiados se condensan uno por uno en orden desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal y uno en el que los aminoácidos unidos a la resina o el grupo protector de los grupos α -amino de los péptidos se liberan, de este modo la cadena peptídica se extiende. Los métodos de síntesis en fase sólida están ampliamente clasificadas por el métodos tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado.

35 [0081] Los grupos protectores habitualmente utilizados incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenziloxycarbonilo), Br-Z (2-bromobenziloxycarbonilo), Bzl (benzilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrido), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritulo), Tos (tosilo), Z (benciloxycarbonilo) y Cl2 -Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO₂ (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo.

40 [0082] Después de la síntesis del péptido deseado, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Dicha reacción de corte del péptido se puede realizar con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometano sulfónico para el método de Boc y con TFA para el método de Fmoc.

45 [0083] El péptido crudo obtenido de este modo se somete a continuación a purificación. La purificación se lleva a cabo por uno de los métodos conocidos para este objetivo, es decir, cualquier procedimiento convencional que implica la extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o similares. Por ejemplo, se puede utilizar HPLC (cromatografía líquida de rendimiento elevado). La elución se puede realizar utilizando un disolvente de base agua-acetonitrilo utilizado habitualmente para la purificación de proteínas.

50 [0084] El péptido aquí descrito se puede proporcionar en forma sustancialmente purificada a efectos de ser adecuado para utilizar en composiciones farmacéuticas, como principio activo, en patologías que requieren actividad MNMF y/o la modulación por la misma.

55 [0085] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "péptido biológicamente activo" y "fragmento biológicamente activo" se refieren a un péptido o polipéptido según la descripción anterior de factores de diferenciación de motoneuronas (MNDF) y/o factores motoneuronotróficos (MNMF), donde el MNDF diferencia células madre en neuronas motoras y el MNMF donde el MNMF muestra funciones de protección, reparación neural y terapéuticas.

[0086] El término "complementaria" en general se refiere a la unión natural de polinucleótidos mediante el emparejamiento de bases, por ejemplo, bajo condiciones permisivas de sal y temperatura. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" se une a la secuencia complementaria "T-C-A". La complementariedad entre dos moléculas de cadena única puede ser "parcial", de manera que sólo se unen algunos ácidos nucleicos o puede ser "completa", de manera que existe la complementariedad total entre las moléculas de cadena única. El grado de complementariedad entre las moléculas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre ellos. "Hibridable" y "complementaria" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad, de manera que la unión, tal como la unión estable suficiente para llevar a cabo una acción deseada, por ejemplo, tiene lugar entre ácidos nucleicos. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser complementaria al 100% a su secuencia de ácido nucleico diana para ser hibridable.

[0087] El término "composición" pretende comprender un producto que comprende uno o más ingredientes.

[0088] El término "diferenciada" es un término relativo en que una "célula diferenciada" es una célula que ha progresado más adelante en el mecanismo de desarrollo que la célula con la que se compara. Tal como se utiliza posteriormente en el presente documento, una "célula neural diferenciada" se refiere en general a una célula parcialmente diferenciada o totalmente diferenciada del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP). Las células progenitoras son células parentales que, durante el desarrollo y la diferenciación, dan lugar a un linaje celular distinto mediante una serie de divisiones celulares. Las células progenitoras neurales, por ejemplo, están comprometidas a un linaje celular que se desarrollará, finalmente, en células neurales totalmente diferenciadas del SNC o SNP; sin embargo, dichas células progenitoras neurales pueden no estar dedicadas aún a un tipo particular, o subclase de célula neural. Las células progenitoras neurales se pueden comprometer a una línea celular que se diferenciará en un tipo específico de célula neural y, a continuación dan lugar a células neurales totalmente diferenciadas. Por consiguiente, la célula neural parcialmente diferenciada aquí descrita puede ser una célula, con una identidad neural, que ha adquirido un carácter direccional o posiciones o que se ha comprometido para desarrollarse en una clase particular de célula neural, pero no es una célula neural totalmente diferenciada. Por ejemplo, el tratamiento de células ES no humanas con un péptido MNTF, sólo o en combinación con un morfógeno, tal como RA, puede dar lugar a una célula neural parcialmente diferenciada o una célula progenitora neural tal como se describe aquí.

[0089] Un "trastorno" es cualquier patología que se beneficiaría del tratamiento con una molécula o composición aquí descrita. Esto incluye trastornos y enfermedades crónicos y agudas que incluyen aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

[0090] "Células alimentadoras" o "alimentadores" incluyen células de un tipo que se cocultivan con células de otro tipo, en general para proporcionar un medio en que crecen las células del segundo tipo. Por ejemplo, ciertos tipos de células pPS pueden estar soportadas por fibroblastos embrionarios de ratón primarios, fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados o células de tipo fibroblasto humanas.

[0091] Por "equivalente funcional" se entiende un péptido que posee una actividad biológica sustancialmente similar a la de, por ejemplo el dominio o dominios MLSAFSRYAR, así como dominios homólogos conservados de 6 unidades (por ejemplo, SEQ ID NO: 2), 7 unidades, 8 unidades, 9 unidades, o 10 unidades, y derivados de los mismos. Incluye "fragmentos", "variantes", "análogos", "homólogos", o "derivados químicos" que poseen dicha actividad o característica. Los equivalentes funcionales del dominio o dominios MLSAFSRYAR y otros descritos anteriormente, por tanto, pueden o no compartir una secuencia de aminoácidos idéntica, y son posibles sustituciones conservativas o no conservativas de aminoácidos de aminoácidos convencionales o inconvencionales.

[0092] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominios MLSAFSRYAR, WMLSAFS, y FSRYPAR" se refiere a un dominio polipeptídico demostrado aquí como suficiente para la diferenciación de células madre en neuronas motoras y a péptidos y/o moléculas capaces de mimetizar su estructura y/o función. Los dominios adicionales se ilustran en las SEQ ID NOs: 1-142.

[0093] En ciertos aspectos, se proporciona un péptido que comprende el aminoácido de cualquiera de la secuencia ID NOs: 2.

[0094] El término "producto génico" se refiere a una molécula de ARN transcrita de un gen, o un polipéptido codificado por el gen o traducido a partir del ARN.

[0095] Un "medio de crecimiento" es un medio en que las células de interés pueden proliferar, diferenciarse o madurar in vitro bajo condiciones apropiadas. Dichas condiciones pueden incluir, por ejemplo, el medio en que las células se cultivan, cualquier factor de crecimiento o factores que inducen la diferenciación que pueden estar presentes, y una superficie sólida o estructura de soporte.

[0096] Los términos "modulador" y "modulación", tal como se utilizan en el presente documento en sus varias formas, pretende comprender la regulación por aumento o la inhibición de forma total o en parte de la expresión o

acción o actividad de una diana particular.

[0097] Para los objetivos de este documento, los términos "célula progenitora neural" o "célula precursora neural" incluyen una célula que puede generar una progenie que son células neuronales (por ejemplo, precursores neuronales o neuronas maduras) o células gliales (por ejemplo, precursores gliales, astrocitos maduros o oligodendrocitos maduros). Las células expresan habitualmente algunos de los marcadores fenotípicos que son característicos del linaje neural y no producen, en general, progenie de otras capas germinales embrionarias cuando se cultivan solas in vitro.

[0098] Una "célula progenitora neuronal" o "célula precursora neuronal" incluyen una célula que puede generar progenie que son neuronas maduras y algunas veces también presentan la capacidad de generar células gliales.

[0099] Una "población de células progenitoras neurales multipotentes" incluye una población de células que presenta la capacidad de generar progenie que son células neuronales, progenie que son células gliales y, a veces, otros tipos de células. Este término no requiere que las células individuales en la población tengan la capacidad de formar ambos tipos de progenie, aunque pueden estar presentes células individuales que son progenitoras neurales multipotentes

[0100] Los términos "peptidomimético" y "mimético" incluyen compuestos químicos naturales y sintéticos que pueden tener sustancialmente las mismas características estructurales y funcionales de regiones proteicas que mimetizan.

[0101] Los análogos de péptidos con propiedades análogas a las del péptido plantilla pueden ser fármacos no peptídicos. "Miméticos de péptido" o "peptidomiméticos", que incluyen compuestos basados en péptidos, también incluyen dichos compuestos no basados en péptidos (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber y Freidinger; TINS; 392 (1985); y Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987); Beeley N., Trends Biotechnol. Jun;12(6): 213-6 (1994); Kieber-Emmons T, et al.; Curr Opin Biotechnol. Aug; 8(4): 435-41 (1997). Los miméticos de péptido que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o aumentado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente idénticos o similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una función o actividad biológica o farmacológica), pero también pueden tener una o más uniones de péptido opcionalmente sustituidas por una unión seleccionada del grupo que consiste en, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$. El mimético pueden estar compuesto completamente de aminoácidos naturales o análogos no naturales de aminoácidos, o, es una molécula quimérica de aminoácidos de péptido parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético puede comprender también cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la actividad mimética.

[0102] Tal como se utiliza en el presente documento, "prevenir" significa prevenir, total o parcialmente, o mejorar o controlar.

[0103] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" se refiere a tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Los que tengan necesidad del tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno, así como los propensos a tener el trastorno o diagnosticados con el trastorno o aquellos en que el trastorno debe prevenirse.

[0104] Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad efectiva" en referencia a los compuestos o composiciones aquí descritos se refiere a la cantidad suficiente para inducir un resultado biológico, farmacéutico o terapéutico deseado. Ese resultado también puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o trastornos o patología o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico.

[0105] Tal como se utiliza en el presente documento, "simultáneamente" se utiliza para significar que la composición de MNTF se administrar junto con uno o más agentes terapéuticos, mientras que el término "en combinación" se utiliza para significar que se administran, si no simultáneamente o en combinación física, "secuencialmente" en un marco de tiempo en que ambos están disponibles para actuar terapéuticamente. De este modo, la administración "secuencial" puede permitir la administración de un agente en unos minutos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 minutos) o en cuestión de horas, días, semanas o meses después del otro, siempre que tanto el MNTF y el uno o más de los otros agentes terapéuticos están presentes simultáneamente en cantidades efectivas. El retraso de tiempo entre la administración de los componentes variará dependiendo de la naturaleza exacta de los componentes, la interacción entre ellos y sus respectivas semividas.

[0106] Tal como se utiliza aquí, el término "análogos de péptido" se refieren a los compuestos con propiedades análogas a las del péptido plantilla y pueden ser fármacos no peptídicos. "Miméticos de péptido" o "peptidomiméticos", que incluyen compuestos basados en péptidos, también incluyen compuestos no basados en péptidos, tales como análogos de péptido. Los miméticos de péptido que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o aumentado. En general, los peptidomiméticos son miméticos estructurales o funcionales (por ejemplo, idénticos o similares) a un

polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una función o actividad biológica o farmacológica), pero también pueden tener una o más uniones de péptido opcionalmente sustituidas por una unión seleccionada del grupo que consiste en, por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$. El mimético pueden estar compuesto completamente de aminoácidos naturales, compuestos químicos sintéticos, análogos no naturales de aminoácidos, o, es una molécula quimérica de aminoácidos de péptido parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético puede comprender también cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la actividad mimética.

[0107] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se refiere a cualquier polímero de dos más aminoácidos individuales (ya sean naturales o no) unidos mediante enlaces peptídicos, como ocurre cuando el átomo de carbono carboxilo del grupo ácido carboxílico unido al carbono alfa de un aminoácido (o residuo de aminoácido) se une covalentemente al átomo de nitrógeno amino del grupo amino unido al carbono alfa de un aminoácido adyacente. Estas uniones peptídicas y los átomos que los comprenden (es decir, los átomos de carbono alfa, átomos de carbono carboxilo (y sus átomos de oxígeno sustituyentes) y los átomos de nitrógeno amino (y sus átomos de hidrógeno sustituyentes)) forman el "esqueleto del polipéptido" de la proteína. Además, tal como se utiliza en el presente documento, el término "proteína" se entiende que incluye los términos "polipéptido" y "péptido" (que, a veces, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento). De manera similar, los fragmentos de proteína, análogos, derivados, y variantes se pueden referir aquí como "proteínas" y se estimarán que son una "proteína2 a menos que se indique lo contrario. El término "fragmento" de una proteína se refiere a un polipéptido que comprende menos de todos los residuos de aminoácidos de la proteína. Un "dominio" de una proteína es también un fragmento y comprende los residuos de aminoácidos de la proteína requeridos a menudo para conferir actividad o función.

[0108] La frase "porcentaje (%) de identidad" se refiere al porcentaje de similitud de secuencia hallada en una comparación de dos o más secuencias. El porcentaje de identidad se puede determinar electrónicamente utilizando cualquier software adecuado, por ejemplo. Asimismo, "similitud" entre dos secuencias (o uno o más partes de cualquiera de ellas o ambas) se determina comparando la secuencia de una secuencia con una segunda secuencia.

[0109] Compuestos "farmacéuticamente aceptable" y otros ingredientes de una composición o formulación, por ejemplo, un portador, diluyente o excipiente, son aquellos que son adecuados para la administración a un receptor del mismo.

[0110] El término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación entre polinucleótidos que codifican los péptidos de MNTF de interés. Las condiciones rigurosas se pueden definir mediante la concentración de sal, la concentración de disolvente orgánico (por ejemplo, formamida), temperatura y otras condiciones conocidas en la técnica. La rigurosidad se puede incrementar reduciendo la concentración de sal, incrementando la concentración de disolventes orgánicos (por ejemplo, formamida) o aumentando la temperatura de hibridación. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa será normalmente inferior a aproximadamente 750 mM de NaCl y 75 mM de citrato de trisodio, tal como inferior a aproximadamente 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato de trisodio y puede ser inferior a aproximadamente 250 mM de NaCl y 25 mm de citrato de trisodio. La hibridación de baja rigurosidad se puede obtener en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras la hibridación a alta rigurosidad se puede obtener en presencia de un disolvente orgánico (por ejemplo, formamida a por lo menos aproximadamente el 35%, tal como formamida a por lo menos aproximadamente el 50%). Las condiciones de temperatura rigurosas incluirán normalmente temperaturas de por lo menos aproximadamente 30°C, de por lo menos aproximadamente 37°C o de por lo menos aproximadamente 42°C. La variación de parámetros adicionales, por ejemplo, el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN portador, son conocidos en la técnica. Se realizan varios niveles de rigurosidad mediante la combinación de estas diversas condiciones según sea necesario y están dentro del alcance de la invención. Las condiciones de hibridación rigurosas también se pueden definir mediante las condiciones en un intervalo de aproximadamente 5°C a aproximadamente 20°C o 25°C por debajo de la temperatura de fusión (Tf) de la secuencia diana y una sonda con una complementariedad exacta o casi exacta con la diana. Tal como se utiliza en el presente documento, la temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se disocia por la mitad en cadenas individuales. Los métodos para calcular la Tf de los ácidos nucleicos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Berger y Kimmel, *Methods In Enzymology*, Vol. 152: *Guide To Molecular Cloning Techniques*, San Diego (1987): Academic Press, Inc. and Sambrook et al., *Molecular Cloning* (1989): *A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory). Tal como se indica en las referencias estándar, una estimación simple del valor de Tf se puede calcular mediante la ecuación: $T_f = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en una solución acuosa a 1M de NaCl (véase, por ejemplo, Anderson y Young, "Quantitative Filter Hybridization" en *Nucleic Acid Hybridization* (1985)). La temperatura de fusión de un híbrido (y, de este modo, las condiciones para la hibridación astringente) está afectada por diversos factores, tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de la base) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de la base, presente en solución o inmovilizado, y similar), y las concentraciones de sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol). Los efectos de estos factores son conocidos y se describen en referencias estándar en la técnica, véase, por ejemplo, Sambrook, supra, y Ausubel, supra. Habitualmente, las condiciones de hibridación rigurosas son concentraciones de sales inferior a aproximadamente 1,0 M de ion sodio, habitualmente de 0,01 a 1,0 M de ion sodio a pH 7,0 a 8,3, y

temperaturas por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, superior a 50 nucleótidos). Tal como se indica, las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida, en cuyo caso se pueden emplear temperaturas inferiores. Tal como se describe aquí, el polinucleótido puede ser un polinucleótidos que se hibrida a un ARNm diana bajo condiciones de rigurosidad media a elevada, tal como cloruro de sodio 0,03M y citrato de sodio 0,03 M de aproximadamente 50 a 60 grados centígrados.

[0111] Tal como se utiliza en el presente documento, "sujeto" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales de compañía y de granja, y animales de zoológico, eventos deportivos o domésticos, tales como perros, caballos, gatos, ovejas, cerdos, vacas, etc. El sujeto puede ser un humano.

[0112] El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad del compuesto en cuestión que obtendrá una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano que es buscada, por ejemplo, por un investigadores, veterinario, doctor u otros clínico.

[0113] "Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Entre los que necesitan el tratamiento se incluyen los que ya presentan el trastorno, así como aquellos en que debe prevenirse el trastorno.

[0114] El término "vector" se refiere a un vehículo de amplificación, replicación y/o expresión de una molécula de ácido nucleico en forma de un plásmido, fago, sistema viral u otro sistema (ya sea natural o sintético) para la liberación de ácidos nucleicos a las células, donde el plásmido, fago o virus puede ser funcional con células huésped bacterianas, de levadura, invertebrados y/o mamíferos. El vector puede permanecer independiente de ADN genómico de célula huésped o se puede integrar, total o parcialmente, con el ADN genómico. El vector generalmente contendrá, aunque no necesariamente, todos los elementos necesarios para ser funcional en cualquier célula huésped con la que es compatible. Un "vector de expresión" es un vector capaz de dirigir la expresión de un polinucleótido exógeno, por ejemplo, un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de dominio de unión, bajo condiciones apropiadas.

[0115] Tal como se describe en este documento, los términos "homología y homólogos" pueden ser péptidos que contienen homología de secuencia de aminoácido con la secuencia de proteína de interés. Dicho péptido tiene por lo menos aproximadamente el 70% de homología y puede tener por lo menos aproximadamente el 80%, 90%, 95%, 97% o 99% de homología con la secuencia pertinente, por ejemplo, sobre una región de por lo menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 100 o más de aminoácido/polipéptido contiguos de la secuencia homóloga.

[0116] La homología se puede calcular en base a cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la homología (por ejemplo, utilizado en sus parámetros por defecto) (Devereux et al., *Nucleic Acids Research* 12, p387-395 (1984)). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden utilizar para calcular secuencias de homología o alineado (habitualmente en sus parámetros por defecto), por ejemplo, tal como se describe en Altschul S. F. ; *J Mol Evol* 36: 290-300 (1993); Altschul, S. F. et al.; *J Mol Biol* 215: 403-10 (1990). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través de la National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar identificar parejas de secuencias de alta puntuación mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia en cuestión que se emparejan o satisfacen cierto valor umbral T evaluado positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral del valor de la palabra de proximidad (Altschul et al., supra). Estos emparejamientos de palabras de proximidad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSP que las contienen. Los emparejamientos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre que la puntuación de la alineación acumulada se pueda incrementar. Las extensiones para los emparejamientos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de la alineación acumulada disminuye en una cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulada va a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos que puntúan en negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919 (1992)) alineaciones (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

[0117] El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos tendría lugar por casualidad. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia es inferior a aproximadamente 1 y puede ser inferior a aproximadamente 0,1, 0,01, ó 0,001.

[0118] La secuencia homóloga difiere habitualmente de la secuencia pertinente en por lo menos (o en no más de)

aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones). Estas mutaciones se pueden medir a lo largo de las regiones mencionadas anteriormente en relación con la homología de cálculo. La secuencia homóloga se hibrida habitualmente selectivamente a la secuencia original en un nivel significativamente superior a la base. La hibridación selectiva se consigue habitualmente utilizando condiciones de media a alta rigurosidad (por ejemplo, cloruro de sodio 0,03 M y citrato de sodio 0,03 M de aproximadamente 50 grados C a aproximadamente 60 grados C). Sin embargo, dicha hibridación se puede llevar a cabo bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989)). Por ejemplo, si se requiere rigurosidad elevada, las condiciones adecuadas incluyen 0,2 x SSC a 60 grados C. Si se requiere rigurosidad inferior, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 grados C.

[0119] El término "recombinante" se refiere a un polinucleótido sintetizado o manipulado in vitro (por ejemplo, "polinucleótido recombinante"), a métodos de utilización de polinucleótidos recombinantes para producir productos génicos en células u otros sistemas biológicos, o a un polipéptido ("proteína recombinante") codificado por un polinucleótido recombinante. De este modo, un polinucleótido "recombinante" se define por su método de producción o su estructura. En referencia a su método de producción, el proceso se refiere a la utilización de técnicas recombinantes de ácido nucleico, por ejemplo, que implica la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, habitualmente selección o producción. Alternativamente, puede ser un polinucleótido realizado mediante la generación de una secuencia que comprende una fusión de dos o más fragmentos que no son contiguos de forma natural entre sí. De este modo, por ejemplo, se contemplan los productos fabricados mediante la transformación de células con cualquier vector no natural, como polinucleótidos que comprende la secuencia derivada utilizando cualquier proceso sintético de oligonucleótidos. De manera similar, un polipéptido "recombinante" es el que se expresa a partir de un polinucleótido recombinante.

[0120] Una "célula huésped recombinante" es una célula que contiene un vector, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión, o una célula que de otro modo ha sido manipulada mediante técnicas recombinante para expresar una proteína de interés.

[0121] Aspectos generales del tratamiento

[0122] Se proporcionan método de tratamiento de un sujeto con un trastorno neuronal que comprende administrar al sujeto un péptido de factor motoneuronotrófico (MNTF) tal como se define en las reivindicaciones.

[0123] Tal como se utiliza en el presente documento, el trastorno neuronal incluye enfermedades, trastornos o patologías asociadas con o caracterizadas, total o parcialmente, por una pérdida aguda, progresiva o gradual de tejido neural funcional, incluyendo apoplejía, lesión de la médula espinal, isquemia cerebral, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis múltiple (MS), ALS y enfermedad de Alzheimer.

[0124] Además, ejemplos adicionales de enfermedades neurodegenerativas no incluidas en la presente invención también incluyen la enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, Ataxia telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, demencia asociada a VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia de los cuerpos de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelar tipo 3), atrofia multisistémica, narcolepsia, neuroborreliosis, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades de priones, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Schilder, atrofia muscular espinal (SMA), y mielitis transversal.

[0125] Una "enfermedad neurodegenerativa" se refiere a una patología asociada con el sistema nervioso central o periférico caracterizado por una pérdida progresiva, gradual del tejido neural funcional.

[0126] "Esclerosis lateral amiotrófica" o "ALS" son términos entendidos en la técnica, tal como se utilizan en el presente documento, para indicar una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta a las neuronas motoras superiores (neuronas motoras en el cerebro) y/o neuronas motoras inferiores (neuronas motoras en la médula espinal) y da lugar a la muerte de neuronas motoras. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ALS" incluye todas las clasificaciones de ALS conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ALS clásica (que afecta habitualmente a las neuronas motoras inferiores y superiores), esclerosis lateral primaria (PLS, que afecta habitualmente sólo las neuronas motoras superiores), parálisis bulbar progresiva (PBP o aparición bulbar, una versión de ALS que empieza habitualmente con dificultades al tragar, masticar y hablar), atrofia muscular progresiva (PMA; que afecta habitualmente sólo las neuronas motoras inferiores) y ALS familiar (una versión genética de ALS).

[0127] Los síntomas clínicos de ejemplo de ALS incluyen debilidad muscular, pérdida de músculo, calambres musculares, tirones musculares, habla pastosa o lenta, dificultad al tragar y movimientos lentos descoordinados. Más ejemplos de síntomas clínicos de ALS incluyen aquellos detectables en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene o es sospechoso de tener ALS, por ejemplo, una proporción de células CD4:CD8 incrementada en comparación con lo normal, número disminuido de células CD 14+ en comparación con lo normal, expresión incrementada de HLA-DR en células CD 14+ en comparación con células CD14+ normales, niveles incrementados

de monocitos o macrófagos activados en comparación con los normales, la presencia de macrófagos proliferantes e IgG y/o IgM disminuidas en suero en comparación con lo normal, donde lo "normal", tal como se utiliza en el presente documento, significa un sujeto no afectado por ALS o células de dicho sujeto no afectado. "Tratamiento", por tanto, comprende conseguir una disminución en uno o más síntomas clínicos cuya disminución puede tener efectos concomitantes deseables, tales como paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar o retrasar la progresión de la enfermedad, retrasar y/o incluso evitar la aparición de la enfermedad.

[0128] "Esclerosis múltiple" o "MS" son términos entendidos en la técnica y, tal como se utiliza en el presente documento, para indicar una enfermedad neurodegenerativa progresiva que da lugar a la destrucción de la mielina que cubre las células nerviosas, particularmente del cerebro y médula espinal. Tal como se utiliza en el presente documento, "MS" incluye todas las clasificaciones de MS conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, de recaída-remisión (RRMS) (habitualmente caracterizada por una recuperación parcial o total después de los ataques (también denominados exacerbaciones, recidivas o hiperemias)), MS progresiva secundaria (SPMS) (generalmente caracterizada por menos recidivas con un aumento en la discapacidad y los síntomas), y MS progresiva primaria (PPMS) (caracterizada generalmente por una progresión de síntomas y discapacidad sin remisión).

[0129] Ejemplos de síntomas clínicos de MS incluyen fatiga (también referida como lasitud de MS), fatiga muscular, parestesias, dificultad al andar y/o problemas de equilibrio, sensaciones anormales, tales como insensibilidad, picores o "cosquilleo", dolor, disfunción de la vejiga, disfunción intestinal, cambios en la función cognitiva (incluyendo problemas con memoria, atención, concentración, juicio y de resolución de problemas), mareos y vértigo, problemas emocionales (por ejemplo, depresión), disfunción sexual y problemas de visión. Varios casos pueden implicar la parálisis parcial o completa (tal como visión nublada o doble, distorsión de color rojo-verde o ceguera en un ojo). Otros síntomas incluyen dolor de cabeza, pérdida de oído, picazón, ataques, espasticidad, trastornos del habla y al tragar y temblores. Más ejemplos de síntomas clínicos de MS incluyen aquellos detectables en una muestra biológica obtenida de un sujeto que tiene o es sospechoso de tener MS, por ejemplo, una proporción de células CD4:CD8 incrementada en comparación con lo normal, número disminuido de células CD 14+ en comparación con lo normal, expresión incrementada de HLA-DR en células CD 14+ en comparación con células CD14+ normales, niveles incrementados de monocitos o macrófagos activados en comparación con los normales, la presencia de macrófagos proliferantes e IgG y/o IgM disminuidas en suero en comparación con lo normal, donde lo "normal", tal como se utiliza en el presente documento, significa un sujeto no afectado por MS o células de dicho sujeto no afectado. "Tratamiento", por tanto, comprende conseguir una disminución en uno o más síntomas clínicos cuya disminución puede tener efectos concomitantes deseables, tales como paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar o retrasar la progresión de la enfermedad, retrasar y/o incluso evitar la aparición de la enfermedad.

[0130] "Enfermedad de Alzheimer" o "AD" son términos entendidos en la técnica y utilizados aquí para indicar una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por demencia y definida por la American Psychiatric Association (en DSM IV) como el desarrollo de múltiples déficits cognitivos que incluye deterioro de la memoria.

[0131] Los síntomas clínicos de ejemplo de AD incluyen falta de memoria leve, que incluye problemas para recordar eventos recientes, actividades o los nombres de familiares o cosas; dificultad en resolver problemas sencillos matemáticos; problemas para recordar cómo realizar tareas sencillas (por ejemplo, cepillarse los dientes o peinarse); incapacidad de pensar claramente; dificultar en el habla, entender, leer o escribir; y ansiedad o agresión, o tendencia a marcharse de casa.

[0132] Tal como se utiliza en el presente documento, un "sujeto" puede ser un vertebrado, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitarse, animales de animal, animales de eventos deportivos, roedores, primates y animales domésticos.

[0133] Tal como se utiliza en el presente documento, la enfermedad de Parkinson (también conocida como enfermedad Parkinson o PD) se caracteriza, total o parcialmente, por un estado degenerativo del sistema nervioso central que a menudo dificulta las habilidades motoras y el habla del paciente. La enfermedad de Parkinson pertenece a un grupo de patologías denominadas trastornos del movimiento. Se puede caracterizar, en parte, por rigidez muscular, temblores, una ralentización de movimiento físico (bradiquinesia) y, en casos extremos, una pérdida de movimiento físico (aquinesia). Los síntomas primarios son los resultados de una estimulación disminuida del córtex motor por los ganglios basales, causados normalmente por la formación y la acción insuficiente de dopamina, que se produce en las neuronas dopaminérgicas del cerebro. Los síntomas secundarios pueden incluir una disfunción cognitiva de nivel elevado y problemas de lenguaje imperceptibles. La PD es crónica y progresiva. La PD es la causa más común de parkinsonismo, un grupo de síntomas similares. La PD también se denomina "parkinsonismo primario" o "PD idiopática" (que no tiene una causa conocida). Aunque la mayoría de las formas de parkinsonismo son idiopáticas, existen casos en que los síntomas pueden resultar de la toxicidad, fármacos, mutación genética, traumatismo en la cabeza u otros trastornos médicos.

[0134] La enfermedad de Huntington (HD) se puede caracterizar por un trastorno neurodegenerativo dominante autosomal causado por una expansión de trinucleótidos CAG en el exón 1 del gen de Huntington (Htt) (por ejemplo, Perutz et al., Trends Biochem. Sci. 1999; 24:58-63; y Rubinsztein et al., J. Med. Genet. 1999;36:265-270). Los pacientes de HD se pueden caracterizar por la presencia de movimiento corporal anormal, demencia y

problemas psiquiátricos.

[0135] Resumen

5 [0136] El aislamiento y caracterización de dos factores motoneuronotróficos (MNTF1 y MNTF2) de tejidos de
 músculo de rata, así como la posterior clonación de un gen de MNT1-F6 recombinante derivado de una biblioteca de
 ADNc de retinoblastoma humano, se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 6,309,877, 6,759,389 y
 6,841,531 (así como las solicitudes de patente de Estados Unidos en trámite Ser. Nos. 10/858,144, 10/858,286,
 10 [0136] La secuencia del gen de MNTF1-F6 codifica una secuencia de 33 aminoácidos referida
 como SEQ ID NO:1. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos MNTF1 se hallaron que se
 situaban en el cromosoma 16q22 humano, tal como se describe en la solicitud internacional No.
 PCT/US2004/038651.

15 [0137] Se identificaron dos dominios solapantes en la molécula MNTF1-F6 que parecen ser suficientes para las
 actividades biológicas conocidas de MNTF1. Véase, la solicitud internacional No. PCT/U504/01 468 o la solicitud de
 patente de Estados Unidos Ser. No. 10/541,343, concedida como la patente de Estados Unidos No 7,183, 373. Cada
 uno de estos dominios, designados aquí como los dominios "WMLSAFS" y "FSRYAR", eran suficientes para
 estimular la proliferación de líneas celulares derivadas de neuronas motoras de una manera similar al péptido de 33
 20 unidades de MNTF1-F6. De manera similar, el dominio "FSRYAR" es suficiente para dirigir la renervación selectiva
 de dianas musculares por neuronas motoras in vivo de una manera similar a la del péptido de 33 unidades de
 MNTF1-F6. Además, el dominio "FSRYAR" proporciona un epítipo antigénico suficiente para desarrollar un
 anticuerpo que reconoce cualquier péptido MNTF que contiene la secuencia "FSRYAR", que incluye el péptido de 33
 unidades de MNTF1-F6.

25 [0138] Los picos de Factores Motoneuronotróficos (MNTF) en la expresión durante la semana 9 en el periodo de
 gestación de feto humano (Di, X. et al., Acta Anatomica Sinica 29:86-89, 1998). En base a la expresión de MNTF en
 el ser humano en desarrollo, se razonó que el MNTF puede inducir la diferenciación y/o supervivencia de
 motoneuronas. Para examinar esto, se definió si el MNTF no humano modula la diferenciación de células madre
 30 embrionarias no humanas pluripotentes en motoneuronas y aumenta la supervivencia de motoneuronas derivadas
 de células ES no humanas.

[0139] Tal como se describe en el presente documento, los inventores han determinado que la exposición de células
 ES no humanas a polipéptidos tal como se define en las reivindicaciones, RA y MNTF tal como se define en las
 35 reivindicaciones, dirige estas células para generar neuronas motoras.

[0140] Métodos de utilización

40 [0141] En el presente documento se demuestra que las moléculas de MNTF y MNTF truncado, que incluyen, pero
 sin limitación, las que comprenden el dominio MLSAFSRYAR referido aquí como factores de diferenciación de
 neuronas motoras (MDNF), inducen la diferenciación de células madre o células neuronales parcialmente
 diferenciadas en neuronas motoras. Algunas de éstas ilustran la invención tal como se define en las
 reivindicaciones, otros proporcionan una base útil. Dichos agentes proporcionan un nuevo método para generar Y/o
 aislar una población de neuronas motoras de cultivos de células madre.

45 [0142] El método aquí descrito comprende poner en contacto una célula neuronal parcialmente diferenciada con un
 factor de diferenciación de neuronas motoras. Los factores se proporcionan en cantidades efectivas para producir
 una célula neural diferenciada. Estas cantidades se pueden determinar fácilmente por el experto en la materia, en
 base a procedimientos conocidos y métodos aquí descritos.

50 [0143] MNTF1 y/o sus análogos de péptido también inducen la supervivencia de neuronas motoras de mamífero in
 vitro. Por consiguiente, la tecnología aquí descrita proporciona la utilización de un péptido MNTF tal como se define
 en las reivindicaciones.

55 [0144] Los presentes inventores también han descubierto que las neuronas cultivadas en presencia de factores
 neurotróficos sobreviven y elaboran procesos. Por consiguiente, en otra realización, el método aquí descrito
 comprende la etapa de poner en contacto las neuronas motoras derivadas de células madre con por lo menos un
 péptido MNTF, por ejemplo, tras el contacto con RA y un factor de diferenciación de neuronas motoras, tal como un
 péptido MNTF tal como se define en las reivindicaciones, o alternativamente, Sonic Hedgehog (Shh), que incluye un
 60 agonista de Shh.

[0145] Las neuronas motoras diferenciadas se pueden aislar o enriquecer, por ejemplo, mediante separación FACS.
 Por ejemplo, la utilización de un método de marcaje de neuronas motoras basadas en GFP permite la
 caracterización de poblaciones puras de neuronas motoras derivadas de células ES no humanas.

65 [0146] Por consiguiente, otro aspecto de la tecnología aquí descrita se dirige a un método para aislar y/o purificar
 una población de células neurales diferenciadas mediante: (a) obtener o generar de un no humano un cultivo de

células madre embrionarias no humanas que expresan proteína verde fluorescente aumentada (eGFP) bajo el control de un promotor específico de neuronas motoras; (b) poner en contacto de un no humano el cultivo de células madre embrionarias no humanas con una cantidad de un RA y MNTF efectiva para producir células neurales diferenciadas que expresan eGFP; (d) detectar la expresión de eGFP en las células neurales diferenciadas; y (f) aislar las células neurales diferenciadas que expresan eGFP.

[0147] Los inventores han descubierto que los polipéptidos de MNTF tal como se definen en las reivindicaciones, son útiles para tratar un trastorno neuronal por su capacidad de inducir la supervivencia, crecimiento, proliferación y/o mantenimiento de neuronas de mamífero. Los inventores han descubierto además que, según ciertas realizaciones, un péptido MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, modula un mecanismo de transducción de señales que es independiente del mecanismo de sonic hedgehog (por ejemplo, parcialmente o completamente independiente, dependiendo de la realización). Asimismo, los inventores han descubierto que los péptidos de MNTF, tal como se definen en las reivindicaciones, modulan mecanismos de ciertas proteína quinasas, incluyendo la expresión o actividad de ciertas tirosina quinasas y receptores de factores de crecimiento. La transducción de señales o mecanismos de proteína quinasas que se regulan incluyen, por ejemplo, mecanismos independientes de sonic hedgehog.

[0148] El Sonic Hedgehog (Shh) es un componente clave responsable para la ventralización de neuronas transformadas, que actúa a través de sus componentes de receptores transmembrana *patched-smoothened*. Los datos aquí presentados muestran que los péptidos de MNTF sustituyen de manera efectiva sonic hedgehog en la diferenciación de células ES murinas in vitro en neuronas motoras en presencia de ácido retinoico (ejemplo 5). La adición de MNTF a estos cultivos de ES da lugar a la expresión de factores de transcripción de neuronas motoras maduras (HB9 y Islet ©), la expresión del marcador de neuronas motoras maduras colinacetil transferasa (ChAT), y la generación de neuronas capaces de realizar potenciales acciones. Los datos también muestran que los péptidos de MNTF son capaces de generar neuronas motoras maduras postmitóticas en presencia de un inhibidor específico de la señalización del receptor *smoothened* (ciclopamina-KAAD). Aunque no se pretende unir a ninguna teoría o mecanismo particular, los inventores creen que los datos muestran que las señales de MNTF a través de un mecanismo diferente de Shh o abajo en la cascada de *smoothened*. En base a los datos presentados aquí, los inventores han determinado adicionalmente que los péptidos de MNTF actúan a través de los mecanismos de transducción de señales descritos aquí para inducir la supervivencia, crecimiento, proliferación y/o mantenimiento de neuronas de mamífero. De este modo, en otro aspecto de la tecnología aquí descrita, un polipéptido MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, se administra mediante liberación intravenosa para modular la expresión o actividad de ciertos componentes de la transducción de señales. Nuestros datos demuestran además que el tratamiento de MNTF de células ES no humanas daba lugar a la autofosforilación de Tyr972 y Tyr 1162/1163 del receptor de insulina (IR)(Ejemplo 5). Estos residuos son marcadores de la activación de IR. Además, los estudios de coinmunoprecipitación mostraron la asociación de dominios SH2 específicos con IR (subunidad no humana p85 para PI3quinasa) como resultado del tratamiento con MNTF en células ES no humanas. El ejemplo 5 también muestra que el bloqueo de IGF-1R no presentaba efecto en la capacidad de MNTF de generar neuronas motoras, sino que el bloqueo de IR anulaba esta capacidad.

[0149] En ciertas realizaciones, la expresión o actividad de la proteína sustrato del receptor de insulina se modula en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas sustrato del receptor de insulina (proteínas IRS) son los efectores de la insulina y la señalización iniciada por IGF. Comparten los dominios PH y PTB cerca de su extremo N-terminal y múltiples motivos de fosforilación de Tyr en sus regiones C-terminales. Las proteínas que se unen a proteínas IRS fosforiladas de tirosina incluyen PI3 Quinasa p85, GRB2, SHP2, Nck, Crk, y Fyn. La IRS-1 parece estar principalmente implicada en la señalización de IGF y el crecimiento citoesquelético. La IRS-2 parece ser un mediador importante de la señalización de insulina, ya que la ablación genética da lugar a una diabetes de tipo II. La IRS-3 se expresa principalmente en adipocitos y es un potente activador de PI3 quinasa. La IRS-4 carece de los residuos de tirosina que se utilizan por las otras proteínas IRS para unirse a SHP2.

[0150] En ciertas realizaciones, la expresión o actividad de proteína de un IGF-I, IGF-II, o receptor de cualquiera de ellos, se modula en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Los IGF-I y -II señalan a través del receptor de IGF-I que es homólogo al receptor de insulina. El receptor de IGF-II de afinidad elevada no juega un papel directo en la señalización, sino que regula la concentración de IGF-II libre. Los IGF están implicados en el crecimiento del esqueleto y son esenciales para la prevención de la apoptosis. Los niveles en suero de IGF libre se mantienen bajos por la acción de proteínas de unión a IGF (IGFBP), que secuestran los IGF. La sobreexpresión de IGFBP puede inducir apoptosis, presumiblemente mediante la reducción de IGF libre; los niveles de IGFBP también se alteran en algunos cánceres. El receptor de IGF-I no es tan mitogénico como algunos otros receptores de factores de crecimiento, sino que su capacidad para activar el mecanismo de PI3 quinasa, a través de las proteínas de sustrato de receptor de insulina (IRS), es muy importante para mediar en la supervivencia celular.

[0151] En ciertas realizaciones, la expresión o actividad de proteína fosfatidilinositol 3-quinasa se modula en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. La PI3 quinasa (fosfatidilinositol 3-quinasa) es responsable

de la fosforilación de la posición 3 del anillo de inositol de PI(4,5)P₂, para generar PI(3,4,5)P₃, un potente segundo mensajero requerido para la señalización de supervivencia y la acción de la insulina. La PI3 quinasa es un complejo heterodimérico compuesto de una subunidad reguladora de 85 kDa y una subunidad catalítica de 100 kDa. La fosforilación de tirosina de receptores de factores de crecimiento crea sitios de interacción para la unión de p85 (a través de sus dominios SH2) en los receptores; p85 lleva consigo p110, que está entonces proximal a su sustrato de fosfolípido en la membrana. La PI3 Quinasa también es activada por Ras y por las subunidades β:γ de proteínas G heterotriméricas. La PI3 Quinasa es inhibible por Wortmannin, una herramienta útil para el estudio del mecanismo de señalización de PI3 Quinasa.

[0152] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de una Akt quinasa en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Akt es el efector conocido principal del mecanismo de la PI3 quinasa. La generación de PIP₃ da lugar a la activación de PDK1, que fosforila Akt en Thr308, y otra quinasa (PDK2 anticipada) que fosforila Akt en Ser473. Estas fosforilaciones activan adicionalmente la actividad de Ser/Thr quinasa de Akt y la utilización de anticuerpos específicos del estado de fosforilación dirigidos contra cualquiera de estos sitios puede implicar la activación de Akt. La activación de Akt se puede medir directamente mediante inmunoprecipitación seguido de fosforilación de un sustrato conocido con ATP radiomarcado. La Akt fosforila Bad en Ser136, dando lugar a la protección de la apoptosis. Otros sustratos de Akt incluyen GLUT4, PFK2 cardiaca, y GSK3, que es desactivada por esta fosforilación.

[0153] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de una Bad quinasa en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Bad o "antagonista Bcl-2 de la muerte celular" es un miembro de la familia de Bcl-2 y un regulador importante de la vida frente a la muerte. La Bad no fosforilada se dimeriza con Bcl-2 y Bcl-XL, neutralizando su actividad antiapoptótica. La activación del mecanismo de PI3-quinasa conduce a la activación de Akt que fosforila Bad en Ser-136. Los mecanismos de MAP quinasa fosforilan BAD en Ser-112 y recientemente, se ha observado que PKA fosforila BAD en Ser-155. La BAd fosforilada se une a proteínas 14-3-3 y quizás otros factores, que secuestran Bad de su papel proapoptótico. Los ensayos con anticuerpos específicos de estados de fosforilación específicos para estos sitios sirven como las lecturas de la activación del mecanismo de supervivencia celular.

[0154] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de una quinasa dependiente de PI(3,4,5)P₃ en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. La quinasa 1 dependiente de PI(3,4,5)P₃ (PDK1) es una Ser/Thr quinasa que tiene dominio PH y está fuertemente estimulada por PIP₃. El sustrato mejor caracterizado de PDK1 es Akt que es fosforilada por PDK1 en Thr308, lo que contribuye a la activación de Akt. Se han identificado dos isoformas de PDK1. También se cree que la PDK1 juega un papel en la activación de p70 S6 quinasa, y es importante para la señalización del receptor de células T a NFκB durante la activación de células T.

[0155] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de una proteína Bax en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. La proteína Bax, que comparte dominios altamente conservados con Bcl-2, puede formar canales conductores de iones en las bicapas lipídicas de las mitocondrias, que juegan un papel esencial en el mecanismo apoptótico de muchas células mediante la liberación de proteínas apoptogénicas en el citosol. Bax presenta una diana terapéutica interesante para muchas enfermedades que implican apoptosis, tales como cáncer o trastornos neurodegenerativos.

[0156] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad del producto génico p53 en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. El gen p53 está mutado en aproximadamente la mitad de los cánceres humanos. Su producto génico está implicado en la respuesta celular a estreses citotóxicos, y junto con p19ARF, induce la expresión de p21Cip1, para provocar la detención del ciclo celular. Además, p53 es capaz de inducir la apoptosis, mediante mecanismos transcripcionales y no transcripcionales. Los 83 aminoácidos del extremo amino de p53 contienen el dominio de transactivación, así como la región implicada en la supresión del crecimiento independiente de la transcripción. La región carboxi-terminal contiene el dominio de unión a ADN que está regulado por tres puntos de fosforilación y potencialmente también por la acetilación.

[0157] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de las proteínas óxido nítrico sintasas en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Las óxido nítrico sintasas (NOS) son enzimas diméricas que contienen un grupo hemo que produce óxido nítrico y contienen un dominio C-terminal reductasa y N-terminal oxigenasa. Las tres categorías de NOS incluyen nNOS/NOS1/NOS1, expresadas principalmente en tejido neuronal, iNOS/NOS II/NOS2, inducibles en macrófagos y ciertas otras células mediante estímulos inflamatorios, y eNOS/NOS III/NOS3, una forma epitelial de NOS expresadas constitutivamente. nNOS y eNOS, que se expresan de forma constitutiva, requieren Ca²⁺ para la actividad, y son reguladas por el influjo de Ca²⁺. iNOS no es dependiente de Ca²⁺. La fosforilación de las isoformas diferentes en un número de sitios presenta efectos variados en la actividad

de la proteína; algunos son inhibidores y algunos son activadores.

[0158] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de la proteína Glicógeno Sintasa Quinasa 3 en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. La Glicógeno Sintasa Quinasa 3 difiere de la mayoría de serina/treonina quinasas en que es activa en ausencia de la acción de mecanismos de señalización. Existen dos isoformas, GSK3 α y GSK3 β . La función de GSK3 es fosforilar la Glicógeno Sintasa y de este modo desactivarla. La acción de la insulina estimula el mecanismo de la PI3 quinasa, dando lugar a la activación de Akt, que fosforila y desactiva la GSK3. A continuación, la glicógeno sintasa se desfosforila rápidamente y se activa. Otros sustratos de GSK3 incluyen Jun (en sitios inhibidores), y el F2B. La fosforilación de Tau por GSK3 puede estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos específicos de estados de fosforilación dirigidos contra el sitio de Akt (Ser21) en GSK3 son adecuados para ensayos sustitutos del estado de activación del mecanismo.

[0159] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad de la proteína Caspasa en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Las cisteína aspartil proteasas relacionadas con la proteína de la muerte CED-3 de *C. Elegans* comprenden la familia de caspasas. Todas se expresan como proenzimas que son activadas por proteólisis. Con respecto a sus papeles en apoptosis, las Caspasas se pueden subdividir en caspasas iniciadoras (caspasas 8, 9, 10) y efectoras (caspasas 3, 6, 7), dependiendo de si son activadas por la agrupación de receptores (iniciadora) o mediante la transición de la permeabilidad mitocondrial (efectora). Las caspasas efectoras, la más destacada Caspasa 3, separa numerosos sustratos para realizar los cambios morfológicos asociados con la apoptosis. Entre los sustratos de caspasa 3 está la DFF45/ICAD, que libera la subunidad de ADNasa de DFF para causar la degradación de cromatina, así como gelsolina, PAK2, D4GDI, todos ellos implicados en la organización citoesquelética, laminas nucleares y PARP. La significancia de la separación de PARP no es clara, pero es un marcador excelente para la activación de caspasa y la presunción de apoptosis en desarrollo.

[0160] En ciertas realizaciones, se modula la expresión o actividad del producto génico RAS en respuesta a la administración de un polipéptido motoneuronotrófico (MNTF) a un paciente o a un órgano, tejido, o célula diana, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas Ras son proteínas de unión a GTP pequeñas que a diferencia de las proteínas G heterotriméricas contienen todas las GTPasa y funciones efectoras en un único polipéptido. Existen como mínimo tres isoformas de Ras, Ki-Ras, Ha-Ras, y N-Ras, con diferentes patrones de expresión, pero con similar actividad de señalización. Ras está palmitoilada y farnesilada en el extremo carboxilo, anclándolo en la membrana. En las células restantes, la Ras se carga con GDP y se activa posteriormente a la estimulación de receptores por factores de crecimiento, que recluta los Factores de Intercambio de nucleótido Guanina de Ras al plano de la membrana. La proximidad de los factores de intercambio a las proteínas Ras causa la liberación de GDP y su sustitución por GTP. En su forma unida a GTP, la Ras se une a varias proteínas, incluyendo Raf, RaIGDS, y PI3 Quinasa. La desactivación de Ras tiene lugar mediante la hidrólisis de GTP, lo cual se acelera ampliamente por la RasGAP o NF-1, dos proteínas conocidas activadoras de la RAS GTPasa. Es posible ensayar la activación de Ras mediante la incubación de lisados con el dominio de unión a Ras de Raf-1, que se une selectivamente a Ras: GTP.

[0161] Cultivos de células madre

[0162] Las células madre embrionarias (ES) son células cultivadas, derivadas de la masa celular interna pluripotente de embriones en fase blastocito que son capaces de replicarse indefinidamente. En general, las células ES tienen el potencial de diferenciarse en otras células (es decir, son pluripotentes); de este modo; pueden servir como una fuente continua de células nuevas. Las células madre embrionarias se pueden obtener de cualquier animal no humano, tal como de un mamífero no humano (por ejemplo, animal doméstico, o animal comercial). En una realización, la célula madre embrionaria es una célula madre embrionaria murina.

[0163] Los métodos adecuados para cultivar células madre de mamífero no humano se conocen en la técnica, por ejemplo, tal como se indica en la solicitud de patente de Estados Unidos de Números 10/362,437, 10/789,266, 10/789,308, 10/928,805 y la patente de Estados Unidos No. 6,833,269. A menos que se especifique lo contrario, la tecnología aquí descrita se puede realizar utilizando células madre no humanas de cualquier especie vertebrada no humana (por ejemplo, células madre de primates no humanos, animales domésticos, ganado y otros mamíferos no humanos). Incluidas entre las células madre adecuadas para utilizar tal como se describe aquí están las células madre pluripotentes de primate (pPS) no humanas derivadas de tejido formado después de la gestación, tal como un blastocito, o tejido fetal o embrionario extraído en cualquier momento durante la gestación. Ejemplos no limitantes son cultivos primarios o líneas establecidas de células madre embrionarias no humanas o células germinales embrionarias no humanas.

[0164] En ciertas realizaciones, se utiliza el prototipo de "células madre pluripotentes de primates" no humanos (células pPS). Las células pPS incluyen células pluripotentes derivadas de tejido preembrionario, embrionario o fetal no humano en cualquier momento después de la fecundación. Bajo condiciones apropiadas, son capaces de producir una progenie de varios tipos de células diferentes que deriva de las tres capas germinales (endoderma, mesoderma y ectoderma). Las células pPS comprenden células embrionarias de varios tipos, incluyendo células madre embrionarias de primates no humanos, tales como células madre de Rhesus (Thomson et al., Proc. Natl.

Acid. Sci. USA 92:7844, (1995)) y células madre de tití (Thomson et al., Biol. Reprod. 55:254 (1996), así como otros tipos de células pluripotentes conocidas en la técnica. Se incluye cualquier célula de origen primate no humano que es capaz de producir progenie que deriva de las tres capas germinales, independientemente de si derivaba de tejido embrionario, tejido fetal o u otros orígenes. Las células pPS en general no derivan de un origen maligno y pueden ser cariotípicamente normales.

[0165] Los cultivos de células pPS se describen como "no diferenciadas" cuando una proporción sustancial de células madre y sus derivadas en la población muestran características morfológicas de células no diferenciadas que son fácilmente evidentes cuando se comparan con células diferenciadas de origen embrionario o adulto. Las células pPS no diferenciadas se reconocen fácilmente por los expertos en la materia, y habitualmente aparecen en las dos dimensiones de una vista microscópica en colonias de células con proporciones elevadas nuclear/citoplasmática y nucleolos prominentes. Es común para las colonias de células no diferenciadas en la población que a menudo estén rodeadas por células próximas que están diferenciadas.

[0166] Células neurales diferenciadas

[0167] Los métodos adecuados para cultivar células neurales progenitoras parcialmente diferenciadas y totalmente diferenciadas son conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se establece en la solicitud de patente de Estados Unidos de números 10/362,437, 10/789,266, 10/789,308, 10/928,805 y la patente de Estados Unidos No. 6,833,269.

[0168] Adicionalmente, tal como se utiliza en el presente documento, una "célula neuronal", o "neurona", es una célula conductora o nerviosa del sistema nervioso que consiste habitualmente en un cuerpo celular (pericarion) que contiene el núcleo y el citoplasma circundante; varios procesos cortos de extensión (dendritas); y un proceso largo (el axón), que termina en ramificaciones de tipo ramita (telodendrones), y que pueden tener ramificaciones (colaterales) que se proyectan a lo largo de su longitud. Ejemplos de neuronas incluyen neuronas motoras.

[0169] Caracterización de células neurales diferenciadas

[0170] La diferenciación de células ES no humanas en células neurales parcial o totalmente diferenciadas se puede detectar mediante procedimientos celulares o moleculares conocidos y ensayos y métodos aquí descritos. Por ejemplo, los cultivos celulares se pueden sondar para un marcador neuronal, tal como NeuN (marcador neuronal) y/o marcadores de neuronas motoras específicos como HB9 o ChAT.

[0171] En otra realización, la célula neural diferenciada está marcada genéticamente dado que expresa la proteína verde fluorescente aumentada (eGFP), tal como se describe aquí. El marcador genético de eGFP puede ser particularmente útil en un método para aislar y/o purificar una población de células neurales diferenciadas o en un método para monitorizar la repoblación de una médula espinal.

[0172] Ácido retinoico

[0173] RA, o vitamina A, es una molécula de aldehído que se cree que es un morfógeno. RA está fácilmente disponible; se puede obtener, por ejemplo, de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). El tratamiento con RA a una concentración final de aproximadamente 0,0001-1 μ M da lugar a una diferenciación eficiente de células madre en progenitores neurales.

[0174] Péptidos MNTF

[0175] Como entenderán los expertos en la materia y se entenderá por la memoria, las secuencias que comprenden el dominio activo de MNTF y análogos de péptido de los mismos pueden transmitir protección neural, reparación de polipéptidos y funciones terapéuticas en motoneuronas in vitro e in vivo. Los polipéptidos de MNTF definidos en las reivindicaciones se pueden producir sintéticamente o recombinantemente o aislarse de células nativas.

[0176] La secuencia de residuos de aminoácidos en una proteína o péptido que comprende el péptido MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, se designan aquí a través de la utilización de sus designaciones de tres letras empleadas habitualmente o por sus designaciones de una letra. En libros de texto, tales como Biochemistry, Second Edition, Lehninger, A., Worth Publishers, New York, N.Y. (1975), se puede encontrar una lista de estas designaciones de tres letras y una letra. Cuando la secuencia de aminoácidos se indica horizontalmente, el extremo amino supuestamente está en el extremo izquierdo, mientras que el extremo carboxilo supuestamente está en el extremo derecho.

[0177] Se entenderá por los expertos en la materia que la estructura química precisa de péptidos que comprenden los diversos polipéptidos de MNTF, tal como se definen en las reivindicaciones, variará dependiendo de una serie de factores. Por ejemplo, se puede obtener un polipéptido determinado como una sal ácida o básica, o en forma neutra, ya que en la molécula se encuentran grupos carboxilo y amino ionizables.

[0178] La figura 25 ilustra ciertas realizaciones de ejemplo de péptidos de MNTF según el presente documento.

Algunos de estas ilustran la invención, tal como se define en las reivindicaciones, otras proporcionan una base útil.

[0179] Péptido de 33 unidades de MNTF1-F6

5 [0180] En la patente de Estados Unidos No. 6,309,877, se proporciona un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos : LGTFWGDTLN CWMLSAFSRY ARCLAEGHDG PTQ (SEQ ID NO: 1). El polipéptido que tiene esta secuencia se refiere aquí como péptido de 33 unidades de MNTF1.

10 [0181] La proteína recombinante que contiene esta secuencia reaccionaba con anticuerpo monoclonal para MNTF-1, mantenía la viabilidad de las motoneuronas, aumentaba el crecimiento externo de neuritas, reducía la muerte celular/apoptosis de motoneuronas y soportaba el crecimiento y "expansión" motoneuronas en neuronas activas gigantes con axones que contienen conos de crecimiento extendido.

15 [0182] El péptido de 33 unidades de MNTF1 se sintetizó mediante síntesis en fase sólida para utilizar en los ejemplos siguientes. Esta molécula de MNTF-1 se referirá a continuación como "péptido de 33 unidades". Cuando se utiliza conjuntamente con una concentración baja de RA, el péptido de 33 unidades lineal inducía la diferenciación de células ES no humanas en neuronas motoras. Además, la diferenciación inducida por MNTF1 de células ES no humanas no fue bloqueada por un inhibidor del mecanismo de transducción de señales Sonic Hedgehog. El tratamiento de los cuerpos embrioides con un péptido de 33 unidades de MNTF1 se asoció con la autofosforilación del receptor de insulina (IR) y/o el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-R), indicando así que el MNTF opera a través de un mecanismo de transducción de señales mediado por IR/IGF-R.

20 [0183] La presente memoria incluye la utilización de péptidos de MNTF1, tal como se define en las reivindicaciones, que mantienen la capacidad de MNTF1 de ejercer neuroprotección, inducir la supervivencia, mantenimiento y/o reparación de neuronas motoras; o en ciertos casos, para diferencia células neuronas en neuronas motoras. Un MNTF que consiste en un péptido para utilizar tal como se describe aquí tiene 6 aminoácidos de longitud y consiste en el dominio FSRYAR (SEQ ID NO: 2) que corresponde a los residuos de aminoácidos 17 a 22 de SEQ ID NO: 1.

25 [0184] Para comparar una secuencia de polipéptido con el correspondiente fragmento de SEQ ID NO: 1, se puede realizar una alineación global de las secuencias utilizando los programas BLAST disponibles públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov). Antes de realizar la alineación global, la SEQ ID NO: 1 se puede someter a Envanic. Para una alineación global se pueden utilizar los parámetros por defecto proporcionados por la National Center for Biotechnology Information.

30 [0185] Péptido de 6 unidades

35 [0186] Se describe aquí un péptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: FSRYAR (SEQ ID NO: 2) correspondiente a los residuos de aminoácidos 17-22 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones. Este fragmento y variantes del mismo mantienen la capacidad de MNTF1 para ejercer neuroprotección, inducir la supervivencia, mantener y/o reparar neuronas motoras (incluyendo neuronas motoras derivadas de células madre). Esta parte de la molécula de MNTF-1 se referirá aquí como "péptido de 6 unidades".

40 [0187] En realizaciones de la presente invención, los polipéptido MNTF incluyen la secuencia del péptido de 6 unidades tal como se define en las reivindicaciones.

45 [0188] Los peptidomiméticos de péptido o péptidos de MNTF están en el alcance de la tecnología aquí descrita, y pueden actuar como fármacos para la modulación de la viabilidad de células neuronales y el crecimiento mediante, por ejemplo, el bloqueo de la función de proteínas que comprenden FSRYAR. Los peptidomiméticos se entienden habitualmente en la industria farmacéutica para incluir fármacos no peptídicos que presentan propiedades análogas a las del péptido mimetizado. Los principios y prácticas del diseño peptidomimético se conocen en 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).

50 [0189] Los peptidomiméticos que transportan una similitud estructural con péptidos terapéuticamente útiles se pueden utilizar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Habitualmente, dichos peptidomiméticos tienen uno o más uniones peptídicas, opcionalmente sustituidas por una unión, que pueden convertir propiedades deseables, tales como la resistencia a la rotura química in vivo. Dichas uniones pueden incluir , -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH-, -COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-. Los peptidomiméticos pueden mostrar propiedades farmacológicas aumentadas (semivida biológica, velocidades de absorción, etc.), especificidad diferente, estabilidad incrementada, economía de producción, antigenicidad disminuida y similares, que puede hacer particularmente deseable su uso como agentes terapéuticos.

55 [0190] El diseño racional de FSRYAR, miméticos o moléculas de unión, en base a la estructura peptídica modelada (o determinada experimentalmente), se puede llevar a cabo por los expertos en la materia utilizando métodos de diseño racional de fármacos. El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos o compuestos diana. Mediante la creación de dichos análogos, es posible caracterizar fármacos, que son más activos o estables que las moléculas naturales, que tienen una susceptibilidad

diferentes a la alteración o que pueden afectar a la función de diversas otras moléculas. En una estrategia, se generaría un estructura tridimensional para una molécula diana, o un fragmento de la misma. Esto se podría realizar mediante cristalografía de rayos X, modelación por ordenador o mediante una combinación de ambas estrategias.

5 [0191] Métodos de producción

[0192] Se entiende que un péptido MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, se puede fabricar por un método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la síntesis química mediante síntesis en fase sólida y purificación con respecto a otros productos de las reacciones químicas mediante HPLC, o producción mediante la expresión de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN) que codifica un péptido o polipéptido que comprende un péptido MNTF descrito aquí en un sistema de traducción in vitro o en una célula viva. El péptido MNTF de la composición se puede aislar y dializar de manera extensa para eliminar una o más moléculas de peso molecular pequeño no deseadas y/o liofilizar para una formulación más sencilla en un vehículo deseado. Se entiende además que aminoácidos, mutaciones y modificaciones químicas adicionales, y similares, si los hay, que se realizan en un componente del péptido MNTF no deben interferir con el reconocimiento del receptor de la secuencia de interacción con MNTF.

[0193] Se puede sintetizar una secuencia de péptido mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, la síntesis de péptidos utilizando máquinas de síntesis de péptidos automatizadas, tales como las disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA). La tecnología aquí descrita incluye la síntesis y la utilización de péptidos cíclicos derivados de las SEQ ID NOS:1-142.

[0194] Las modificaciones covalentes se pueden introducir en un péptido mediante la reacción de residuos de aminoácidos marcados con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. La modificación covalente de polipéptidos utilizando agentes derivatizantes orgánicos es conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, los residuos de cisteinilo pueden reaccionar con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de histidilo se pueden derivatizar mediante la reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0, o con bromuro de para-bromofenacilo a pH 6 en cacodilato de sodio 1 M. Los residuos de lisinilo y amino terminales pueden reaccionar con anhídrido de ácido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. Los residuos arginilos se pueden modificar mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. Las etiquetas espectrales se pueden introducir en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano; más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se pueden modificar selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas (R'-N-C-N-R'), tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3 (4 azonia 4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se pueden desamidar en los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Otras modificaciones incluyen la hidroxilación prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las 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, la amidación de los grupos carboxilo C-terminales.

[0195] El péptido MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, se puede utilizar en ensayos y kits para el ensayo, ya sea en forma libre o unido a una molécula portadora, tal como una proteína o una partícula sólida, así como péptidos modificados unidos a un marcador o rastreador, por ejemplo, biotina o isotiocianato de fluoresceína.

[0196] La reticulación del fragmento del péptido MNTF1, tal como se define en las reivindicaciones, a una matriz de soporte insoluble en agua se puede realizar con agentes bifuncionales conocidos en la técnica, que incluyen 1,1 bis(diazoacetil) 2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes bifuncionales, tales como 3-[(p-azidofenil)ditio] propioimidato de metilo producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar retículas en presencia de luz. Alternativamente, para la inmovilización de proteínas se pueden emplear matrices insolubles en agua reactivas, tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno.

[0197] La reticulación de un fragmento de péptido MNTF-1, tal como se define en las reivindicaciones, a una segunda proteína, que incluye un segundo fragmento de péptido MNTF-1, se puede realizar utilizando los reactivos bifuncionales aquí descritos. En otra alternativa, se inserta un espaciador, por ejemplo, un grupo tiol o un grupo diamino o múltiples residuos de aminoácidos, por ejemplo, glicina. El espaciador también puede ser un reticulador homobifuncional o heterobifuncional, por ejemplo, el reticulador heterobifuncional N-(4-carboxi-ciclohexil-metil)-maleimida.

[0198] Se pueden producir péptidos o polipéptidos más largos, por ejemplo, una proteína de fusión, mediante

técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, se puede clonar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de péptido MNTF1 en un vector de expresión disponible comercialmente que ya contiene una proteína heteróloga, siendo el resultado un fragmento de péptido MNTF1 fusionado en el marco a la proteína heteróloga.

5 [0199] En ciertas realizaciones, se puede utilizar un ácido nucleico que codifica un péptido MNTF1 y/o un componente tal como se define en las reivindicaciones, por ejemplo, para producir un péptido *in vitro* o *in vivo* para los diversos métodos definidos en las reivindicaciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un péptido MNTF1 es un componente de, por ejemplo, un vector en una célula recombinante. El ácido nucleico se puede expresar para producir un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de péptido MNTF1. El péptido o polipéptido se puede secretar de la célula o como parte de o en la célula.

[0200] Cribado de compuestos

15 [0201] En otra realización, se identifican los compuestos que alteran el nivel de expresión de un péptido MNTF o una proteína implicada en el mecanismo de transducción de señales intracelulares de un péptido MNTF. En ciertas realizaciones, estos compuestos están dirigidos al tratamiento de varios trastornos neurales tal como se definen en las reivindicaciones.

20 [0202] Se pueden diferenciar agonistas y antagonistas de la neuroprotección y se puede evaluar la eficacia del compuesto mediante en análisis posterior con células neuronales aquí descritas y conocidas en la técnica.

[0203] Los compuestos identificados por los procedimientos de cribado aquí descritos se pueden diferenciar adicionalmente y se pueda evaluar la eficacia del compuesto en base a su capacidad de tratar trastornos neuronales en sistemas modelo de enfermedades y trastornos de cultivos celulares animales aceptados en la técnica.

25 [0204] En muchos ensayos de cribado de fármacos que analizan bibliotecas de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento a efectos de maximizar el número de compuestos evaluados en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como derivados con proteínas purificadas o parcialmente purificadas, se usan a menudo como cribados "primarios" en que se pueden generar para permitir el desarrollo rápido y la detección relativamente sencilla de una alteración en una diana molecular que está mediada por un compuesto de análisis. Además, los efectos de la toxicidad celular y/o biodisponibilidad del compuesto de prueba se pueden ignorar en general en el sistema *in vitro*, centrándose el ensayo en cambio principalmente en el efecto del fármaco en la diana molecular tal como se puede manifestar en una alteración de la afinidad de unión con proteínas receptoras.

35 [0205] De este modo, en otro aspecto, se da a conocer un método de identificación de un compuesto útil para inducir el crecimiento o supervivencia de motoneuronas. En una realización, el método comprende las etapas de i) preparar una muestra que comprende un compuesto candidato, ii) poner en contacto una célula con dicha muestra, iii) determinar si se modula la expresión o actividad de un compuesto implicado en el mecanismo de transducción de señal, y iv) determinar si la muestra es capaz de inducir el crecimiento o supervivencia de motoneuronas. En ciertas realizaciones, el método comprende además determinar si una muestra que contiene un compuesto candidato estimular la autofosforilación de Tyr972 y Tyr1162/1163 del receptor de insulina *in vitro* o *in vivo*. En otras realizaciones, el método comprende además determinar si una muestra que contiene un compuesto candidato regula un mecanismo de transducción de señales de MNTF. En otras realizaciones, el método comprende además determinar si una muestra que contiene un compuesto candidato modula la expresión o actividad de una o más proteínas seleccionadas entre un receptor de insulina, receptor de IGF-1, receptor de IGF-2, Shh, Akt, Bad (antagonista bcl-2 de muerte celular), quinasa 1 dependiente de PI(3,4,5)P3 (PDK1), Bax, producto génico p53, pp60-Src, JAK2, óxido nítrico sintasas (NOS), glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK), caspasa, PI3 quinasa (fosfatidilinositol 3-quinasa), y Ras. En otro aspecto, la tecnología en el presente documento incluye métodos de inducir el crecimiento o supervivencia de una motoneurona o para el tratamiento de un trastorno neuronal mediante la administración de un compuesto identificado por los procedimientos de cribado tal como se define en las reivindicaciones.

55 [0206] En un ensayo de cribado de ejemplo, el compuesto de interés se pone en contacto con una mezcla que incluye una proteína de unión a MNTF (por ejemplo, una célula que expresa un receptor de péptido MNTF) y un péptido MNTF bajo condiciones en que normalmente es capaz de unirse a un péptido MNTF. A continuación, a la mezcla se añade una composición que contiene un compuesto de prueba. La detección y cuantificación de los complejos de receptor/péptido MNTF proporciona un medio para determinar la eficacia del compuesto de prueba en la inhibición (o potenciación) de la formación de complejos entre la proteína receptora y el péptido MNTF. También se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea base para la comparación, en que el péptido MNTF aislado y purificado se añade a la proteína receptora y se cuantifica la formación del complejo de receptor/péptido MNTF en ausencia del compuesto de prueba.

65 [0207] La formación de complejos entre el péptido MNTF y un péptido MNTF se puede detectar mediante una serie de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable, tales como péptidos de MNTF radiomarcados, marcados

fluorescentemente o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica. Para los ensayos libres de células, será habitualmente deseable inmovilizar el péptido MNTF o la proteína de unión al péptido MNTF para facilitar la separación de los complejos de receptor/péptido MNTF de formas no complejas de una de las proteínas, sí como para acomodar la automatización del ensayo. Por ejemplo, se puede proporcionar una

5 proteína de fusión que añade un dominio que permita que la proteína se una a la matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa/receptor (GST/receptor) se pueden adsorber sobre partículas de glutatión Sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que a continuación se combinan con el péptido MNTF, por ejemplo, un péptido MNTF marcado con 35S y el compuesto de prueba y se incuban bajo condiciones que conducen a la formación de complejo, por ejemplo, a condiciones

10 fisiológicas para sal y pH, aunque se pueden desear condiciones ligeramente más rigurosas. Después de la incubación, las partículas se lavan para eliminar cualquier péptido MNTF no unido y el radiomarcador unido a partículas de matriz se determina directamente (por ejemplo, partículas colocadas en centelleante) o en el sobrenadante después de la disociación de los complejos de receptor/hedgehog. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la partícula, se separan mediante gel SDS-PAGE, y se cuantifica el nivel de péptido MNTF

15 hallado en la fracción de partícula a partir del gel utilizando técnicas electroforéticas estándar.

[0208] Otras técnicas para inmovilizar proteínas en matrices también están disponibles para utilizar en el ensayo en cuestión. Por ejemplo, las partes solubles de la proteína del péptido MNTF se pueden inmovilizar utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Por ejemplo, las moléculas de receptores biotiniladas se pueden preparar a

20 partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas conocidas en el sector (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), y se inmovilizan en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reactivos con el péptido MNTF, pero que no interfieren con la unión a hedgehog, se pueden derivatizar a los pocillos de la placa y el receptor atrapado en los pocillos mediante conjugación con anticuerpo. Al igual que antes, las preparaciones de un péptido MNTF y un

25 compuesto de prueba se incuban en los pocillos de la placa que presentan receptor y se puede cuantificar la cantidad de complejo receptor/hedgehog atrapado en el pocillo. Entre los métodos de ejemplo para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, se incluyen la inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con el péptido MNTF, o que son reactivos con la proteína receptora y compiten por la unión con el péptido MNTF; así como ensayos de unión a enzima que dependen de una actividad enzimática asociada con el péptido MNTF. En este último caso, la enzima se puede

30 conjugar químicamente o disponerse como una proteína de fusión con el péptido MNTF. Para ilustrarlo, el péptido MNTF se puede reticular químicamente o fusionarse genéticamente con fosfatasa alcalina y se puede valorar la cantidad de péptido MNTF atrapado en el complejo con un sustrato cromogénico de la enzima, por ejemplo, paranitrofenilfosfato. Asimismo, se puede disponer una proteína de fusión que comprende el péptido MNTF y

35 glutatión-S-transferasa y se puede cuantificar la formación de complejo mediante la detección de la actividad de GST utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (Habig et al., J Biol Chem, 249:7130 (1974)). Para la inmunodetección para cuantificar una de las proteínas atrapadas en el complejo, se pueden utilizar anticuerpos contra la proteína, tal como los anticuerpos anti-péptido MNTF. Alternativamente, la proteína a detectar en el complejo puede estar "etiquetada con epítipo" en forma de una proteína de fusión que incluye, además del péptido MNTF o la secuencia del péptido

40 MNTF, un segundo polipéptido para el que están fácilmente disponibles anticuerpos (por ejemplo, de fuentes comerciales). Por ejemplo, las proteínas de fusión de GST descritas anteriormente también se pueden utilizar para la cuantificación de la unión utilizando anticuerpos contra el grupo de GST. Otros epítipos etiquetas útiles incluyen epítipos myc (por ejemplo, véase, Ellison et al., J Biol Chem 266:21150-21157 (1991)) que incluye una secuencia de 10 residuos de c-myc, así como el sistema pFLAG (International Biotechnologies, Inc.) o el sistema pEZZ-proteína A (Pharmacia, N.J.).

45

[0209] Composiciones

[0210] Las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o más de los polipéptidos de MNTF, tal como se define en las reivindicaciones, junto con un diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores/diluyentes adecuados son conocidos en la técnica e incluyen solución salina u otros medios acuosos estériles, que incluyen

50 opcionalmente componentes adicionales, tales como sales tampón y conservantes, o azúcares, almidones, sales o mezclas de los mismos.

[0211] Las composiciones que contienen péptidos de MNTF se pueden disponer para la utilización en cualquier forma adecuada apropiada para el protocolo de administración mediante liberación intravenosa.

55

[0212] La tecnología descrita en el presente documento incluye medios de cultivo que son útiles para establecer y propagar células madre, células progenitoras neurales, células neurales diferenciadas y neuronas motoras derivadas de células madre. Los medios son particularmente adecuados para la diferenciación de células madre y el cultivo a

60 largo plazo de neuronas motoras derivadas de células madre.

[0213] Los medios de cultivo celular se complementan de manera deseable con morfógenos y/o factores de crecimiento y se optimizan según el tipo de célula individual deseado para el cultivo. Dicha complementación y optimización están en la rutina habitual de un técnico. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular se puede complementar con cualquiera o todos los siguientes morfógenos y/o factores de crecimiento en los siguientes niveles

65

aproximados (o en un dígito significativo): RA a 0,001-1 mM, Shh o agonista de Shh, a 0,001-1 mM, y/o uno o más análogos del péptido MNTF a 0,01- 250 mg/ml.

5 [0214] Las formulaciones farmacéuticas aquí descritas pueden incluir, como ingredientes opcionales, portadores, diluyentes agentes solubilizantes o emulsionantes farmacéuticamente aceptables, y sales del tipo que están disponibles en la técnica. Entre los ejemplos de dichas sustancias se incluyen soluciones salinas normales, tales como soluciones salinas tamponadas fisiológicamente y agua. Entre los ejemplos no limitantes específicos de los portadores y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas se incluyen agua y soluciones salinas tamponadas fisiológicamente aceptables, tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato de pH 7,0-8,0. Los portadores farmacéuticos adecuados incluyen, pero sin limitación, agua estéril, soluciones salinas (tales como solución de Ringer), alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos, tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Los preparados farmacéuticos se pueden esterilizar y de forma deseada, mezclados con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de manera adversa con los compuestos activos. También se pueden combinar, cuando se desee, con otras sustancias activas, por ejemplo, inhibidores de enzimas, para reducir la degradación metabólica.

20 [0215] Los compuestos dispuestos en el presente documento se pueden formular en una composición farmacéutica, que puede incluir portadores, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes activos de superficie, lípidos neutros o catiónicos, complejos de lípidos, liposomas, potenciadores de la penetración, compuestos portados farmacéuticamente aceptables y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, además del péptido.

25 [0216] Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente para administrar con un fin terapéutico. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos, tales como interferones, agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares. Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, liposomas, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos proporcionados en este documento pueden incluir potenciadores de penetración a efectos de aumentar la liberación alimentaria de los péptidos. Los potenciadores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes de una a cinco categorías amplias, es decir, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, tensoactivos y no tensoactivos (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 8, 91.-1.92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990)). Se pueden incluir uno o más potenciadores de penetración de una o más de estas categorías amplias.

35 [0217] Entre los diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de penetración se incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, recinleato, monooleína (también conocida como 1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono- y di-glicéridos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.). Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1 (1990); El-Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 651-654 (1992)).

45 [0218] Las funciones fisiológicas de la bilis incluyen facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (Brunton, Chapter 38 In: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. McGraw-Hill, New York, N.Y., páginas 934-935 (1996)). Varias sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. De este modo, el término "sal biliar" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis, así como cualquiera de sus derivados sintéticos.

50 [0219] También se pueden utilizar formulaciones complejas que comprenden uno o más potenciadores de penetración. Por ejemplo, se pueden utilizar sales biliares en combinación con ácidos grasos para formar formulaciones complejas. Los agentes quelantes incluyen, pero sin limitación, etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados lauret-9 y N-amino acil de beta-dicetonas (enaminas) [Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990); Buur et al., *J. Control Rel.* 14, 43-51 (1990)]. Los agentes quelantes presentan la ventaja adicional de servir también como inhibidores de ADNasa.

60 [0220] Los tensoactivos incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991)); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 252-257 (1988)). Los no tensoactivos incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkuil- y 1-alkenilazaclo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* página 92 (1991)); y agentes antiinflamatorios no esteroidales, tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 621-626 (1987)).

- 5 [0221] Los portadores farmacéuticamente aceptables habituales incluyen, pero sin limitación, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etil celulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato de almidón de sodio, etc.); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio, etc.).
- 10 [0222] Las composiciones proporcionadas aquí pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos hallados habitualmente en composiciones farmacéuticas en los niveles de utilización establecidos en la técnica. De este modo, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales, tales como antipruríticos, astringentes, agentes de anestesia local o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de la composición
- 15 aquí descrita, tales como, colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deben interferir excesivamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones aquí proporcionadas.
- 20 [0223] Los sistemas de dispersión coloidal se pueden utilizar como vehículos de liberación para aumentar la estabilidad in vivo de los péptidos y/o para dirigir los péptidos a un órgano, tejido o tipo de célula particular. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, pero sin limitación, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, partículas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y complejos de lípido:péptido de estructura no caracterizada. Un ejemplo de un sistema de dispersión coloidal es una pluralidad de sistemas. Los liposomas son esferas microscópicas que tienen un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas fabricadas de lípidos dispuestos en una configuración de bicapa
- 25 (véase, en general, Chonn et al., Current Op. Biotech. 6, 698-708 (1995)).
- 30 [0224] En ciertas realizaciones, los polipéptidos de MNTF tal como se definen en las reivindicaciones, se pueden incorporar o utilizar conjuntamente con un grupo que dirige la biodistribución, incluyendo uno o más polímeros, para dirigir la biodistribución del péptido MNTF proporcionado aquí a la proximidad de una diana deseada para permitir la liberación continua del mismo. Los agentes activos incluyen, por ejemplo, compuestos útiles para incrementar la eficacia terapéutica, para optimizar la biodistribución y la biodisponibilidad, para reducir el daño en el tejido, para inducir la curación o para incrementar la comodidad del paciente; entre los agentes activos de ejemplos se incluyen agentes vasoactivos, agentes anestésicos, agentes terapéuticos para isquemia, factores de crecimiento y citoquinas.
- 35 Alternativamente, se pueden utilizar formas de dosificación en partículas poliméricas microparticuladas o nanoparticuladas en una composición proporcionada aquí. Los compuestos proporcionados aquí se pueden utilizar en combinación con un agente activo y encapsularse en una forma de dosificación particulada con un número de moléculas de ligando o anti-ligando unidas a los mismos.
- 40 [0225] De esta manera, los polipéptidos, tal como se definen en las reivindicaciones, y otros compuestos proporcionados aquí, solos o en combinación con otros agentes activos, se liberan en el sitio con el tiempo para proporcionar un beneficio terapéutico prolongado. Las formas de dosificación de liberación prolongadas también son útiles con respecto a otros agentes activos útiles en los métodos descritos aquí, tales como factores de crecimiento, citoquinas y similares. La liberación del agente activo de las formas de dosificación particuladas pueden tener lugar
- 45 como resultado de la difusión y la erosión de la matriz particulada. La velocidad de biodegradación impacta directamente en la cinética de liberación del agente activo.
- 50 [0226] En ciertas realizaciones, las formulaciones parenterales de liberación controlada de péptidos de MNTF, MNTF y compuestos aquí descritos se pueden realizar como implantes, inyecciones oleosas o como sistemas particulados. Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa a través de la partícula. Los liposomas se pueden utilizar para la liberación controlada, así como el direccionamiento de fármacos de fármacos atrapados.
- 55 [0227] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica aquí descrita incluye polipéptidos de MNTF de la presente invención.
- 60 [0228] Se pueden utilizar una variedad de catéteres y rutas de administración para conseguir una liberación intracoronaria, tal como se conoce en la técnica. Por ejemplo, están disponible en proveedores comerciales, tales como Advanced Cardiovascular Systems (ACS), Target Therapeutics y Cordis, una variedad de catéteres generales, así como catéteres modificados, adecuados para utilizar tal como se describe en la presente invención. Además, cuando la liberación al miocardio se consigue mediante inyección directamente en la arteria coronaria, se pueden utilizar una serie de estrategias para introducir un catéter en la arteria coronaria, tal como se conoce en la técnica. A modo de ilustración, un catéter se puede introducir de manera conveniente en una arteria femoral y enlazarse de
- 65 manera retrógrada a través de la arteria iliaca y la aorta abdominal y en una arteria coronaria. Alternativamente, se puede introducir primero un catéter en una arteria branquial o carótida y enlazarse de manera retrógrada a una

arteria coronaria. Descripciones detalladas de éstas y otras técnicas se pueden hallar en la técnica (véase, por ejemplo, Topol, E J (ed.), *The Textbook of Interventional Cardiology*, 2nd Ed. (W.B. Saunders Co. 1994); Rutherford, R B, *Vascular Surgery*, 3rd Ed. (W.B. Saunders Co. 1989); Wyngaarden J B et al. (eds.), *The Cecil Textbook of Medicine*, 19th Ed. (W. B. Saunders, 1992); y Sabiston, D, *The Textbook of Surgery*, 14th Ed. (W.B. Saunders Co. 1991)).

[0229] Se combinan ciertos compuestos con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición se puede formular para administración intravenosa. La formulación que se administra puede contener dichos agentes. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo, fosfato de calcio y dextrano DEAE) y lipofectantes (por ejemplo, lipofectam TM y transfectam TM).

[0230] En algunos casos, puede ser más eficaz tratar un paciente con un péptido conjuntamente con otras modalidades tradicionales a efectos de incrementar la eficacia de una pauta de tratamiento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pauta de tratamiento" pretende comprender modalidades terapéuticas, paliativas y profilácticas.

[0231] La dosificación puede depender de una serie de factores, que incluyen la gravedad y la sensibilidad del estado patológico a tratar, y la evolución del tratamiento que dura desde varios días a varios meses, o hasta que se realiza la cura o se consigue una disminución del estado patológico. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos aquí proporcionados se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. Por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción LD₅₀/ED₅₀. Los compuestos que muestran índices terapéuticos elevados son útiles. Aunque se pueden utilizar compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de liberación que reconozca dichos compuestos al sitio de los tejidos afectados a efectos de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de este modo, reducir los efectos secundarios.

[0232] Los datos obtenidos de los ensayos de los cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosis para utilizar en humanos. La dosis de dichos compuestos debe estar en el intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca toxicidad o ninguna. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosis empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado tal como se describe en este documento, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos de animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que consigue una inhibición semimáxima de síntomas) determinada en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar de manera más precisa dosis útiles en humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Las pautas de dosificación se pueden calcular a partir de las mediciones de la acumulación de fármacos en el cuerpo del paciente. Las dosis pueden variar dependiendo de la potencia relativa de compuestos individuales, que incluyen los péptidos de MNTF y análogos de MNTF, y se pueden estimar, en general, en base a la EC50 hallada como eficaz in vitro y en modelos de animales in vivo. Un experto en la materia reconocerá que las dosis variarán dependiendo de cómo y dónde se administra un péptido MNTF (por ejemplo, in vitro, in vivo, tópicamente, sistémicamente, etc.)

[0233] Por ejemplo, en un aspecto, los péptidos de MNTF se pueden administrar de aproximadamente 0,01 microgramos por ml (µg/mL) a aproximadamente 1 mg por ml, de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 50 µg/mL, de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 150 µg/mL, de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 200 µg/mL, y de aproximadamente 0,1 µg/mL a aproximadamente 500 µg/mL, incluyendo cualquier intervalo dentro de estos intervalos, para conseguir concentraciones finales en un sitio diana (por ejemplo, en un cultivo celular de células madre ES).

[0234] Las cantidades de las dosis adecuadas alternativas pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg hasta una dosis total de aproximadamente 1 gramo, dependiendo de la ruta de administración. En la literatura se proporcionan directrices sobre dosis particulares y métodos de liberación y en general están disponibles para los profesionales en la técnica. Los expertos en la materia utilizarán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. De manera similar, la liberación de polinucleótidos, polipéptidos y compuestos aquí proporcionados será específica para células, patologías y localizaciones particulares. En general, la dosis varía en general de 0,01 mg/kg a 1000 mg por kg de peso corporal, y de manera más habitual, por ejemplo, de 0,1 mg/kg a 300 mg por kg de peso corporal, y se puede administrar una vez o más veces de manera diaria, semanal, mensual o anual, o incluso una vez o más veces durante un intervalo de tiempo de 2 a 20 años. En ciertas realizaciones, la dosis se puede administrar desde inmediatamente después de la intervención quirúrgica hasta 24 horas, en otra realización; la dosis se administra de 2 horas hasta 24 horas. Las composiciones de larga duración se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o bisemanalmente dependiendo de la semivida y la velocidad de depuración de la formulación particular. Las personas expertas en la materia pueden estimar fácilmente las

5 velocidades de repetición para la dosificación en base a los tiempos de residencia medidos y las concentraciones del fármaco en fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento satisfactorio, puede ser deseable que el paciente se someta a un tratamiento de mantenimiento para evitar la reaparición del estado patológico, en el que un compuesto seleccionado se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 mg/kg a 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años. En el tratamiento o prevención de ciertas patologías, un nivel de dosificación apropiado será en general de aproximadamente 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en una dosis única o múltiples dosis. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg por día. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados aquí, que incluyen péptidos de MNTF, se administran en una cantidad para conseguir concentraciones in vivo de aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 1 milimolar, de aproximadamente 10 micromolar a aproximadamente 500 micromolar, o de aproximadamente 30 micromolar a aproximadamente 300 micromolar, y de aproximadamente 25 micromolar a aproximadamente 300 micromolar de concentración final sobre el sitio dañado, y que incluye, aproximadamente 25 micromolar, o aproximadamente 160 micromolar, o aproximadamente 300 micromolar de concentración final sobre el sitio dañado, y aún más habitualmente entre 15 aproximadamente 1 micromolar a aproximadamente 100 micromolar.

[0235] En ciertas realizaciones, se puede administrar una dosis de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, ó 200 mg/kg.

20 [0236] Los compuestos aquí descritos se pueden utilizar en diagnóstico, terapia, profilaxis y como reactivos de investigación y en kits. La disposición de medios para detectar compuestos de interés (por ejemplo, péptidos MNTF tal como se define en las reivindicaciones) se puede realizar de manera rutinaria. Dicha disposición puede incluir la conjugación de enzimas, radiomarcadores o cualquier otro sistema de detección adecuado. También se pueden preparar kits para detectar la presencia o ausencia de compuestos de interés

25 [0237] Tal como se utiliza en el presente documento, las lesiones de la médula espinal pueden incluir lesiones resultantes de un tumor, traumatismo mecánico y traumatismo químico. El mismo método o similares se contemplan para restaurar la función motora en un sujeto que tiene esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple o lesión de la médula espinal.

30 [0238] En ciertas realizaciones, la administración de uno de los polipéptidos de MNTF de la presente invención también proporciona una función profiláctica. Dicha administración tiene el efecto de conservar la función motora en un sujeto, o con el riesgo de tener, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple o lesión de la espina dorsal.

35 [0239] En ciertas realizaciones, la administración de polipéptidos de la presente invención conserva la integridad del mecanismo de MNTF.

40 [0240] Específicamente, los métodos para tratar (pre o postsintómicamente) una lesión de la médula espinal, una isquemia cerebral, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, ALS y la enfermedad de Alzheimer, comprenden administrar una polipéptido MNTF tal como se define en las reivindicaciones,

45 [0241] En ciertos aspectos, se dan a conocer composiciones y métodos de tratamiento terapéutico que comprende administrar mediante liberación intravenosa a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de MNTF tal como se define en las reivindicaciones, tras la lesión a un mecanismo neural o como anticipación a dicha lesión, durante un tiempo y a una concentración suficiente para mantener el mecanismo neural, que incluye la reparación de mecanismos dañados o la inhibición del daño adicional a los mismos

[0242] Los aspectos y realizaciones aquí descritos dan a conocer métodos para proteger las neuronas de los efectos destructivos de tejidos asociados con la respuesta inmunitaria e inflamatoria del cuerpo a la lesión nerviosa.

50 [0243] En ciertas realizaciones, se dan a conocer métodos, composiciones y dispositivos para estimular la reparación celular de neuronas y mecanismos neurales dañados, que incluyen la regeneración de dendritas o axones dañados.

55 [0244] En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención son útiles en la reparación de mecanismos neurales dañados del sistema nervioso periférico. En particular, los MNTF son útiles para reparar mecanismos neurales dañados, que incluyen fibras nerviosas transectadas o en cualquier caso dañadas. Específicamente, los MNTF aquí descritos son capaces de estimular la regeneración completa de nervios axonales, que incluyen la vascularización y la reformación de la vaina de mielina. El MNTF se puede disponer en el sitio de la lesión en un portador biocompatible bioreabsorbible capaz de mantener el MNTF en el sitio y, cuando es necesario, medios para dirigir el crecimiento azonal desde los extremos proximales a los distales de una neurona dañada. Por ejemplo, pueden ser necesarios medios para dirigir el crecimiento axonal cuando la regeneración nerviosa se induce sobre una gran distancia, tal como superior a 10 mm. Se prevén muchos portadores capaces de proporcionar estas funciones. Por ejemplo, los portadores útiles incluyen materiales sustancialmente insolubles o soluciones viscosas preparadas tal como se describe aquí que comprenden laminina, ácido hialurónico o colágeno, u otros materiales poliméricos biocompatibles sintéticos adecuados, tales como ácidos poliláctico, poliglicólico o polibutírico y/o copolímeros de los 65 mismos.

[0245] En ciertas realizaciones, el polipéptido de la presente invención se dispone en un canal de guía nerviosa que abarca la distancia del mecanismo dañado. El canal actúa como cubierta protectora y un medio físico para guiar el crecimiento de una neurita. Los canales útiles comprenden una membrana biocompatible, que puede ser tubular en la estructura, que tiene una dimensión suficiente para abarcar el espacio en el nervio a reparar y que tiene aberturas adaptadas para recibir extremos nerviosos dañados. La membrana puede estar formada de cualquier material biocompatible no irritable, tal como silicona o un polímero biocompatible, que incluye, por ejemplo, colágeno, ácido hialurónico, ácidos polilácticos, polibutíricos y poliglicólicos. En una realización, la superficie externa del canal es sustancialmente impermeable.

[0246] En otro aspecto, los polipéptidos definidos en las reivindicaciones son útiles para proteger contra el daño asociado con la respuesta inmunitaria/inflamatoria del cuerpo a una lesión inicial al tejido nervioso. Dicha respuesta puede seguir al traumatismo en el tejido nervioso, por ejemplo, mediante una disfunción autoinmune, lesión neoplásica, infección, traumatismo químico o mecánico, enfermedad, mediante la interrupción del flujo sanguíneo a las neuronas o células gliales, o mediante otro traumatismo a los nervios o material circundante. Por ejemplo, el daño primario resultante de hipoxia o reperfusión isquémica después de la oclusión de un suministro de sangre neural, como en una apoplejía embólica, se cree que está asociado inmunológicamente. Además, por lo menos parte del daño asociado con un conjunto de tumores cerebrales primarios también parece estar relacionado inmunológicamente. La aplicación de un polipéptido de la presente invención sistémicamente mediante la liberación intravenosa alivia y/o inhibe la respuesta relacionada inmunológicamente a una lesión neural.

[0247] En otra realización, la tecnología aquí descrita comprende la utilización de variantes de especies biológicamente activas (filogenéticas) de cualquiera de las proteínas de MNTF descritas aquí que incluyen variantes de secuencias conservativas de aminoácidos, proteínas codificadas por variantes de secuencias de nucleótidos degeneradas y proteínas MNTF que comparten los dominios conservados de MNTF y codificadas por un ADN competente para hibridarse bajo condiciones de rigurosidad estándar a un ADN que codifica una proteína de MNTF aquí descrita, que incluyen, sin limitación.

[0248] Los compuestos aquí descritos también se pueden utilizar para fines de investigación. De este modo, la hibridación específica mostrada por los péptidos se puede utilizar para ensayos, purificaciones, preparaciones de productos celulares y en otras metodologías que se pueden conocer por los expertos en la materia.

[0249] Los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen significados entendidos normalmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente memoria, a menos que se defina lo contrario. En el presente documento se hace referencia a varias metodologías conocidas por los expertos en la materia. Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de tecnología de ADN recombinante incluyen Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989) y *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), conjuntamente e individualmente referidos aquí como "Sambrook"; 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. y Westwood, O. M. R., *Protein Targeting and Secretion*, IRL Press, Oxford (1991); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *The Immunoassay Handbook* (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); *Bioconjugate Techniques* (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); *Methods of Immunological Analysis* (R. Masseyeff, W. H. Albert, y N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, y Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (colectivamente e individualmente referidos como Harlow y Lane), Beaucage et al. eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); y Agrawal, ed., *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties Humana Press Inc., New Jersey, 1993*; *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. (1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press (1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro* (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900 (1993); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P.D. Rathjen et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:31 (1998)); *CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances*, M. H. Tuszynski & J. H. Kordower, eds., Academic Press, (1999).

[0250] Ciertas técnicas que pueden ser útiles en la práctica de la tecnología aquí descrita se describen en varias patentes y solicitudes de patente, que incluyen, la patente de Estados Unidos No. 5,851,832, que describe células madre neurales multipotentes obtenidas de tejido cerebral, la patente de Estados Unidos No. 5,766,948 que describe la producción de neuroblastos de los hemisferios cerebrales de recién nacidos, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,654,183 y 5,849,553 que describen la utilización de células madre de crestas neurales de mamífero, la patente de Estados Unidos No. 6,040,180 que describe la generación in vitro de neuronas diferenciadas de cultivos de células madre del SNC multipotenciales de mamífero, WO 98/50526 y WO 99/01159 que describen la generación y el

aislamiento de células madre neuroepiteliales, precursores de oligodendrocitos-astrocitos, y precursores neuronales limitados al linaje, y la patente de Estados Unidos No. 5,968,829 que describe células madre neurales obtenidas de prosencéfalo embrionario y cultivadas con un medio que comprende glucosa, transferrina, insulina, selenio, progesterona y otros diversos factores de crecimiento.

5 [0251] Se puede utilizar cualquier material y/o métodos adecuados conocidos por los expertos en la materia para llevar a cabo la tecnología aquí descrita; sin embargo, en el presente documento se describen ejemplos no limitantes de materiales y/o métodos.

10 [0252] La tecnología aquí descrita se puede apreciar en ciertos aspectos con referencia a los siguientes ejemplos, ofrecidos a modo de ilustración, no a modo de limitación. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en los siguientes ejemplos se pueden obtener de fuentes comerciales, a menos que se indique lo contrario.

15 [0253] Ciertos ejemplos descritos a continuación contenían referencias de citas que se proporcionan en el presente documento:

[0254] Chau RMW, Ren F, Huang W, Jen LS. Muscle neurotrophic factors specific for anterior horn motoneurons of rat spinal cord. *Recent Advances in Cell. And Mol. Biol.* 1992, 5:89-94.

20 [0255] Copeland RL Jr, Leggett YA, Kanaan YM, Taylor RE, Tizabi Y. Neuroprotective effects of nicotine against salsolinol-induced cytotoxicity: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2005 Nov;8(3-4):289-93.

[0256] KM Biotech. Published PCT Patent Application: WO 98/13492, 1998.

25 [0257] Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Shimazu S, Ohde H, Yoneda F, Iwasa K, Naoi M. Neuroprotective function of R-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane, [R-(-)-BPAP], against apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous dopaminergic neurotoxin, in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Life Sci.* 21 mayo 2004;75(1):107-17.

30 [0258] Nussbaum D, Ash D, Jabs E, Brushart T. Mononeuron trophic factor (MNTF) From Gene to Function. *Soc. For Neuroscience, New Orleans, LA, 2003.*

35 [0259] Shavali S, Ren J, Ebadi M. Insulin-like growth factor-1 protects human dopaminergic SH-SY5Y cells from salsolinol-induced toxicity. *Neurosci Lett.* 2003 Apr 10;340(2):79-82.

[0260] Wang AM, Chau RMW, Chow SP, Zhang ZY, Li ZM. Effects of myogenic 22 and 35kD neurotrophic factors on axonal regeneration in free peripheral autografts into rat spinal cord. 1995, 5(6):248-252.

40 [0261] Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98:1952-1957.

45 [0262] Ellsworth JL, Garcia R, Yu J, Kindy MS. Time window of fibroblast growth factor-18-mediated neuroprotection after occlusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004;24:114-123.

[0263] Ellsworth JL, Garcia R, Yu J, Kindy MS. Fibroblast growth factor-18 reduced infarct volumes and behavioral deficits after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke.* 2003, 34:1507-1512.

50 [0264] Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998, 18:1283-1287.

[0265] KM Biotech. International Patent WO 98/13492, 1998.

55 [0266] Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci.* 2000, 20:1358-1364.

60 [0267] Di X, Huang W. Localization and morphometric study on motoneuronotrophic factor 1 and its receptor in developing chorionic villi of human placenta. *Acta Anatomica Sinica,* 1998, 29:86-89.

[0268] Xinyu D, Weiquan H. Localization and morphometric study on motoneuronotrophic factor 1 and its receptor in developing chorionic villi of human placenta. *Acta Anatomica Sinica,* 1998, 29:86-89.

65 [0269] Tal como se utiliza en el presente documento, se contempla que la eficacia de los péptidos de MNTF y los análogos de secuencia y/o funcionales de los mismos se puede determinar mediante protocolos sustancialmente

similares y/o idénticos tal como se describe en los siguientes ejemplos. Además, se contempla que la eficacia de cualquiera de los análogos de los péptidos de MNTF establecidos en las secuencias SEQ ID NOs: 1-142, y las variantes de los mismos, se puede determinar según las condiciones experimentales establecidas aquí.

- 5 [0270] Tal como se utiliza en el presente documento, los análogos de péptidos de MNTF de ejemplo GM6, GM602, GM603, GM604, péptido de 6 unidades de MNTF se refieren todos al péptido de 6 unidades de MNTF que contiene la secuencia FSRYAR (SEQ ID NO: 2).
- 10 [0271] Ejemplo 1
- [0272] Prueba de la penetración de la barrera hematoencefálica de MNTF
- [0273] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.
- 15 [0274] "MNTF" significa factor trófico de motoneuronas o factor motoneuronotrófico, o análogos peptídicos de los mismos.
- [0275] "GM6" y "péptido de 6 unidades" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF de ejemplo; es decir, FSRYAR (SEQ ID NO: 2).
- 20 [0276] "BBB" significa barrera hematoencefálica.
- [0277] "Genervon" y "GB" significan Genervon Biopharmaceuticals, LLC.
- 25 [0278] "I.V." significa intravenosa.
- [0279] "Anticuerpo anti-péptido de 6 unidades" significa un anticuerpo anti-GM6.
- [0280] "NTS" significa Neurological Testing Service que es una organización de investigación contratada.
- 30 [0281] Analizar la capacidad del análogo de 6 aminoácidos sintético (GM6; FSRYAR) del factor Motoneuronotrófico (MNTF) para cruzar la barrera hematoencefálica y conseguir the blood brain barrier and gain access to the brain.
- [0282] GM6 es un análogo del péptido de 6 aminoácidos de MNTF sintetizado. GM6 se proporcionó como un sólido y NTS preparó una formulación (solución guardada a 4°C).
- 35 [0283] Se ha analizado el MNTF en varios sistemas nerviosos de ratas, incluyendo el nervio ciático periférico, el nervio musculocutáneo periférico, el nervio facial craneal, el nervio hipogloso craneal y la parte de la médula espinal que controla los músculos del cuello, tórax y extremidades superiores. En el modelo de médula espinal, se aplicó el MNTF en el injerto de nervio en una semisección de la médula espinal en rata. El MNTF reducía la inflamación, limitaba la degeneración y aumentaba la regeneración de los nervios injertados. Una serie de estudios han demostrado la eficacia del MNTF sintetizado o GM6 en los sistemas de modelos nerviosos periféricos de rata bien establecidos para efectos tróficos y trópicos cuando se aplica directamente MNTF o GM6 en el nervio. Además, se ha observado que el MNTF induce la regeneración y supervivencia de motoneuronas.
- 40 [0284] Adicionalmente, se eligió el modelo de ratón wobbler con genes dobles recesivos como una representación para investigar la capacidad de MNTF de rescatar las motoneuronas del defecto genético que conduce a la enfermedad degenerativa de motoneuronas en esta cepa. En experimentos preliminares, una dosis de MNTF administrada intramuscularmente a la edad de seis semanas disminuyó el desarrollo de la enfermedad de las motoneuronas. Aumentó significativamente la supervivencia de ratones wobbler no tratados de 9 a 12 semanas a 28 a 63 semanas en los ratones wobbler tratados.
- 45 [0285] Se valoró el efecto de MNTF y GM6 en varios sistemas de animales. No se identificaron problemas de seguridad en los estudios sobre 1000 ratas Sprague Dawley y 15 de ratones wobbler y su camada normal. Debido a la potencial función que juega el MNTF en la protección neuronal, inflamación y neurodegeneración, se evaluaron las composiciones farmacéuticas que comprenden MNTF y análogos peptídicos de los mismos para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Un obstáculo principal para tratar las enfermedades y trastornos del sistema nervioso central es la dificultad de liberar el fármaco al sistema nervioso central. La determinación de la biodisponibilidad del fármaco y el efecto en varios trastornos neurológicos se realizó para valorar el potencial terapéutico del fármaco.
- 50 [0286] Valoración de disponibilidad de gm6 para el cerebro a través de una inyección intravenosa.
- 55 [0287] Métodos y materiales
- 60 [0288] Diseño de estudio
- 65

[0289] Se inyectaron ratones C57BL6 con GM6 en las dosis indicadas y se examinó el GM6 en el cerebro. Se extrajo la mitad del cerebro para el análisis inmunocitoquímico de GM6, la otra mitad (cerebro) se congeló para análisis ELISA.

5 [0290] Métodos in vitro

[0291] A ratones macho C57BL/6 (Jackson Laboratory) que pesaban aproximadamente 25 gramos cada uno se les dio libre acceso a la comida y agua antes y durante el experimento. Los animales se aclimataron durante 1 semana antes de la experimentación. Los animales se dosificaron i.v. con bolo a través de vena con vehículo o GM6 a 0,2 ó 2 mg/kg. La formulación de GM6 se realizó como una solución madre mediante la reconstitución de GM6 con solución salina al 100% que se guardó a 4°C. El vehículo control recibió solución salina.

[0292] Análisis inmunohistoquímico

15 [0293] Las secciones de tejido se desparafinaron y lavaron en solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7,4 y se bloquearon en el suero apropiado (cabra). Las secciones se bloquearon durante la noche a 4°C y a continuación se sometieron a anticuerpo primario (anticuerpo anti-péptido de 6 unidades) durante la noche a 4°C. Las secciones se lavaron en TBS y se añadió anticuerpo secundario y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las secciones se incubaron tal como se instruye en el kit Vector ABC Elite y se tiñeron con ácido diaminobenzoico (DAB). Las mezclas de reacción se detuvieron en agua y pusieron en un portaobjetos después del tratamiento con xileno. Se determinó el área teñida inmunocitoquímica en cada sección con un sistema de análisis de imágenes asistida por ordenador, que consistía en un ordenador Power Macintosh equipado con una tarjeta capturadora Quick Capture, cámara Hitachi CCD montada en un microscopio Olympus y trípode de cámara. Las imágenes se capturaron y se determinó el área total del péptido GM6 sobre las diez secciones. Un único operador que no conocía el estado del tratamiento realizó todas las mediciones.

[0294] Análisis ELISA

30 [0295] Para medir los niveles de GM6 en muestras utilizando el kit ELISA competitivo, se recubrió una placa ELISA con anticuerpo anti-péptido de 6 unidades de conejo purificado por afinidad a 10 ug/ml en tampón de recubrimiento. Se utilizó péptido de 6 unidades-biotina a 1 uM (dilución final) en el ensayo. Las concentraciones conocidas de GM6 (competidor) se utilizaron como patrones de referencia empezando desde 80 uM y valorando disminuyendo dos veces hasta 0,625 uM en el ensayo para establecer la curva estándar. La concentración de las muestras analizadas se estimó a partir de su observación de DO450 en base a la curva estándar.

35 [0296] Se preparó tejido de cerebro en tampón de lisis celular que contenía 100 mM de Tris HCl pH 7,0, que contenía BSA al 2%, NaCl 1M, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 2%, azida sódica al 0,1% e inhibidores de proteasa (Complete TM, Mini, Boehringer Mannheim). Los homogenatos se prepararon en 10 volúmenes de tampón con respecto a tejido en peso húmedo. Los homogenatos se centrifugaron durante 30 minutos a 14.000 xg. El sobrenadante resultante se utilizó para ELISA con el ajuste de volumen apropiado.

40 [0297] Para el análisis, el pAb anti-péptido de 6 unidades se diluyó hasta 10 ug/ml en tampón de recubrimiento ELISA. Las placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron con 100 ul/pocillo del pAb diluido. Las placas se cubrieron y se mantuvieron refrigeradas toda la noche. El día siguiente, las placas se bloquearon con 200 ul/pocillo de TBS con BSA al 3%, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 min. Las placas se lavaron 3 veces con TBST (TBS + Tween 20 al 0,05%). Para cada placa, con 10 ml péptido de 6 unidades-biotina 1uM se preparó una mezcla estándar de 1 ml: péptido de 6 unidades-biotina 1 uM con péptidos de 6 unidades 80 uM. Para cada placa, se utilizaron los carriles 1 y 2 para la curva estándar. Se añadieron péptidos de 6 unidades-biotina 1 uM (100 ml) a todos los pocillos a excepción de A1 y A2 y se añadieron 200 ul/pocillo de mezcla estándar a A1 y A2. Se realizó una dilución en serie de 2 veces desde los pocillos A1 y A2 a los pocillos H1 y H2 mediante la extracción de una muestra de 100 ul de cada pocillo y se mezcló con el pipeteo del siguiente pocillo arriba y abajo como mínimo 8 veces. Se descartaron los 100 ul extra en los pocillos finales (H1 y H2). Las muestras de prueba (homogenato de cerebro) se diluyeron en tampón de dilución de Ab y se mezclaron a 1:50 con el péptido de 6 unidades-biotina 1 uM. La placa se mezcló en un agitador a 400 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 6 veces con TBST. Se preparó una solución de estreptavidina-HRP (10 ml por placa) mediante la dilución de estreptavidina-HRP a 1:2000 en tampón de dilución de Ab. La placa se mezcló en el agitador durante otra hora a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 8 veces con TBST. Se añadió sustrato 50 ul/pocillo (TMBS, Genetel) y se reveló durante 5 minutos. La mezcla de reacción se detuvo con 50 ul HCl 1M y se leyó DO450 inmediatamente.

60 [0298] Análisis estadístico

[0299] Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos de ELISA e inmunohistológicos se analizó utilizando un test t.

65 [0300] Exclusión de animales del estudio

[0301] Los animales se excluirán del estudio en base a varios criterios:

[0302] Los animales que murieron antes de completar el estudio (en cualquier punto).

5 [0303] Los animales que desarrollaron complicaciones graves después de la administración de artículos de prueba.

[0304] Grupos de tratamiento

10 [0305] Todos los grupos se sometieron a GM6 o eran controles. Los animales (30 animales) se sometieron a dosificación i.v. con bolo por vena de cola de vehículo o MNTF en las dosis indicadas.

Tabla –Modelo BBB de ratón

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
ratones C57BL/6			
1 (n = 10 ratones)	Vehículo	0	IV
2 (n = 10 ratones)	GM6	0,2 mg/kg	IV
3 (n = 10 ratones)	GM6	2 mg/kg	IV

15 [0306] Puntos finales

[0307] GM6 en el cerebro.

20 [0308] Se han proporcionado todos los grupos de análisis a NTS; se proporcionó GM6 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de análisis fueron dosificados como se indica anteriormente.

[0309] Al final del estudio, se tomó la mitad del cerebro para análisis inmunocitoquímico de GM6. La otra mitad se tomó para el análisis ELISA de GM6.

25 [0310] Resultados

[0311] MNTF en ratones. Estudio de la barrera hematoencefálica

30 [0312] Se evaluó la disponibilidad relativa de GM6 en el cerebro. Datos de ratones (tipo natural) que se administraron i.v. con vehículo o GM6.

[0313] Análisis inmunocitoquímico:

35 [0314] GM6: Después de la administración de MNTF, se tomaron los cerebros y se examinaron para el análisis inmunocitoquímico de GM6 utilizando anticuerpo anti-péptidos de 6 unidades. No se detectó inmunoreactividad en el tejido de cualquiera de los animales en comparación con los animales de control.

[0315] Análisis ELISA:

40 [0316] Para medir los niveles de GM6 en las muestras de cerebro utilizando el kit de ELISA competitivo, se prepararon muestras tal como se describe anteriormente y se sometieron a ELISA. Tal como se muestra en la figura 1 y la tabla 4, se detectó GM6 de MNTF en el cerebro utilizando el ensayo ELISA. El ELISA detectó el nivel basal de GM6 endógeno en el cerebro (0,4 mM). En los animales inyectados con 0,2 mg/kg de GM6 se detectó un incremento del 400% en GM6 (1,760 mM), mientras que la inyección de 2 mg/kg de GM6 produjo un incremento del 3000% en GM6 en el cerebro después de 4 horas (12,92 mM). Estos datos sugieren que la inyección intravenosa de GM6 permitirá la distribución del péptido en el cerebro.

TABLA 4. MNTF en el cerebro (inyecciones I.V). (mostrado en la figura 1)

Compuesto	Cepa de ratón	MNTF ELISA (µM)	valor P (incremento)
Vehículo	tipo natural	0,4050 ± 0,3027	0
MNTF 0,2 mg/kg	tipo natural	1,760 ± 0,9834	0,0001 (434%)
MNTF 2 mg/kg	tipo natural	12,92 ± 4,635	0,0001 (3190%)

Mortalidad: no hubo muertes en este estudio

50 [0317] En base a esos datos, el MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de la lesión o injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad del análogo de 6 aminoácidos de MNTF (GM6) de cruzar la barrera hematoencefálica de una manera efectiva y eficaz. La administración intravenosa de GM6 en dosis únicas en bolos de 0,2 y 2 mg/kg demostró un incremento dependiente de la dosis en los niveles de GM6 en el cerebro. Esto indicó que el GM6 tiene acceso al cerebro a través de la administración intravenosa y se puede utilizar en varios modelos de enfermedad

55

para determinar los efectos beneficiosos.

[0318] Cuando se administró intravenosamente, se halló que el GM6 estaba presente en el cerebro después de 4 horas. El nivel de GM6 en el cerebro era dependiente de la dosis e indica que el GM6 tiene acceso al cerebro a través de la administración intravenosa.

[0319] Ejemplo 2

[0320] Apoplejía: El tratamiento con MNTF en el modelo de MCAO

[0321] Se analizó el análogo del péptido MNTF GM602 (SEQ ID NO: 2, FSRYAR) por la eficacia en el modelo de ratón de la oclusión de arterias cerebrales medias (MCAO). A efectos de determinar la eficacia de GM602 en el modelo de ratón MCAO, los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia y 24 horas de reperfusión. Los ratones se inyectaron intravenosamente con bolo por vena de cola con GM602 a varias dosis inmediatamente después del inicio de la reperfusión y se examinaron los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (CBF), ritmo cardíaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de la necrosis (IFV). Se examinó la administración intravenosa (IV) de dosis únicas de GM602 (1 ó 5 mg/kg). La administración de GM602 demostró que no hubo cambios en HR, BP, pO₂, pCO₂, o pH. Se observó un incremento significativo sobre el grupo de control en CBF después de la reperfusión con la administración de GM602, que ayuda a mitigar el efecto isquémico causado por el bloqueo del flujo sanguíneo. Se detectaron cambios dependientes de la dosis en ND e IFV después de la inyección con GM602. El GM602 a 1 y 5 mg/kg mostró una protección significativa de daño por necrosis, que se tradujo en la conservación de déficits neurológicos. Estos datos sugieren que el GM602 es neuroprotector al cerebro después de la inyección IV en el modelo de ratón de MCAO.

[0322] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.

[0323] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.

[0324] "péptido de 6 unidades de MNTF" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF, por ejemplo, FSRYAR.

[0325] "GM602" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF para apoplejía.

[0326] "GM602 (1)" significa dosis de GM602 de 1 mg/kg.

[0327] "GM602 (5)" significa dosis de GM602 de 5 mg/kg.

[0328] "MCAO" significa la oclusión de la arteria cerebral media.

[0329] "GB" significa Genervon Biopharmaceuticals LLC.

[0330] "IV" significa intravenoso.

[0331] "CBF" significa flujo sanguíneo cerebral.

[0332] "HR" significa ritmo cardíaco.

[0333] "BP" significa presión sanguínea.

[0334] "ND" significa déficits neurológicos.

[0335] "IFV" significa volumen de necrosis.

[0336] El MNTF es una neurotrofina endógena con una localización específica en cromosoma humano descubierto por una función. El MNTF es altamente específico para el sistema nervioso humano y se expresa rápidamente durante el primer trimestre del desarrollo del feto humano del sistema nervioso completo, con un máximo en la semana nueve (Di y Huang, 1998). El MNTF es una molécula de neuroseñalización que se une perfectamente en receptores específicos. Las funciones específicas del MNTF, tal como se demuestra en estudios en animales e invitro, son la diferenciación de células madre embrionarias en motoneuronas, el mantenimiento y supervivencia de motoneuronas, regeneración y guía de los axones motores, y reneuvación de músculos y órganos diana (Chau et al., 1992; Nussbaum et al., 2003). Cuando el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP) están bajo el ataque provocado por enfermedades, trastornos o lesiones, el MNTF crea un medio protector y permisivo para la regeneración y reparación nervioso que es neuroprotector, antiapoptosis, antioxidación, antiinflamación y anticicatrices.

[0337] Un conjunto de estudios han demostrado que la eficacia del MNTF en varios sistemas nerviosos de ratas,

incluyendo el nervio ciático periférico, el nervio musculocutáneo periférico, el nervio facial craneal, el nervio hipogloso craneal y la parte de la médula espinal que controla músculos en el cuello, tórax y extremidades superiores (Wang et al., 1995). En el modelo de médula espinal de rata semiseccionada, el MNTF reducía la inflamación, limitaba la degeneración y aumentaba la regeneración de los nervios injertados (KM Biotech PCT, 1998). Una serie de estudios han demostrado la eficacia trófica y trópica del MNTF sintetizado o péptido de 6 unidades de MNTF (FSRYAR; SEQ ID NO: 2) en un sistema de modelo nervioso periférico de rata bien establecido (Nussbaum et al, 2003). Además, se ha observado que el MNTF induce la regeneración y supervivencia de motoneuronas (KM Biotech PCT, 1998). Además, los ratones wobbler (NIH) con genes dobles recesivos administrados con una dosis de 35 ng de MNTF a la edad de seis semanas ralentizó la enfermedad genética neurodegenerativa en esta cepa. (KM Biotech PCT, 1998).

[0338] Se investigó un análogo de secuencia de 6 aminoácidos (FSRYAR) con una de los sitios activos de MNTF como un fármaco candidato con actividad de MNTF. Grupos de investigación independientes utilizando sus propios ensayos y protocolos establecidos realizaron los siguientes experimentos con SNC y SNP: 1. Se ha observado que el análogo peptídico de 6 unidades de MNTF es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y entrar en el cerebro mediante inyección IV. 2. El ácido L-2-hidroxiglutarico (LGA) induce estrés oxidativo y apoptosis en el sistema nervioso. En el bioensayo con pez cebra, el péptido de 6 unidades de MNTF protegió la apoptosis inducida por LGA en el SNC y redujo la apoptosis en un 85% en el cerebro medio. 3. En una transección de nervio ciático de rata con un estudio de espacio de 8 mm, los animales tratados con MNTF presentan una mejora significativa de la regeneración de motoneuronas de una manera sensible a la dosis ($p < 0,0002$ en la dosis óptima) y se indujo la regeneración de neuronas de DRG. 4. En un modelo de rata de nervio femoral transeccionado, el número de motoneuronas se proyectó correctamente en el músculo en los animales tratados con el péptido de 6 unidades de MNTF de una manera sensible a la dosis. En la dosis óptima, el número de neuronas proyectadas correctamente en el músculo es tres veces el número de motoneuronas proyectadas incorrectamente en la piel ($p < 0,0001$). 5. En un bioensayo de pez cebra, el péptido de 6 unidades de MNTF protegió la apoptosis inducida por LGA en el SNP y redujo la apoptosis en un 49% en las uniones neuromusculares periféricas.

[0339] Se valora la capacidad del péptido MNTF de ejemplo GM602 (FSRYAR; SEQ ID NO: 2), un análogo peptídico de 6 aminoácidos del factor motoneuronotrófico (péptido de 6 unidades de MNTF) para proteger el cerebro de isquemia aguda y la lesión por reperfusión. El GM602 se sintetiza químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811). Este estudio se realizó bajo contrato con el Neurological Testing Service, Inc. (NTS, Charleston, SC). Se proporcionó GM602 a NTS como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).

[0340] Métodos y materiales

[0341] A animales ratones C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), que pesaban 22-25 gramos cada uno se les dio libre acceso a comida y agua antes del experimento. Los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). La monitorización de la presión sanguínea arterial promedio (MABP) se realizó a través del aparato con manguito en la cola, y se recogieron muestras de sangre para determinar los niveles de pH arterial y PaCO₂ y PaO₂. La MABP y el ritmo cardiaco se registraron utilizando un monitor de presión sanguínea Visitech System.

[0342] Se monitorizó la temperatura del cerebro utilizando un termómetro rectal y una sonda termistor insertada en el músculo temporal. La temperatura del cuerpo de los animales se mantuvo a 37°C utilizando una almohadilla de calentamiento con una camisa de agua. La temperatura del cerebro se monitorizó durante 1 hora antes de isquemia hasta 6 horas después de isquemia y se registró en intervalos de 30 minutos.

[0343] Grupos experimentales

[0344] Todos los animales se sometieron a una isquemia de 1,0 h seguido de reperfusión de 24 horas. Los animales se asignaron al azar a un grupo vehículo (n=10) o grupos (n=10) tratados con una inyección intravenosa de GM602 en una dosis de 1 ó 5 mg/kg. La formulación de GM602 (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811) se realizó por NTS como una solución madre mediante la reconstitución de GM602 con una solución salina normal que se almacenó a 4°C. El vehículo control recibió la solución salina. Las inyecciones IV en bolo a través de la cola se administraron inmediatamente después de la aparición de la reperfusión. Los investigadores desconocían los grupos de tratamiento.

[0345] Inducción de isquemia

[0346] Este estudio implicó un modelo transitorio de isquemia. Cada ratón se anestesió y se aislaron la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida común (CCA). Se insertaron sondas termistoras en el recto y el músculo temporal para monitorizar la temperatura del cuerpo y el cerebro, que se mantuvo a 36-37 grados C mediante calentamiento externo. La arteria carótida común (CCA) izquierda se expuso a través de una incisión en la línea central en el cuello. Las arterias occipitales y de tiroides superior se electrocoagularon y se dividieron. Se colocó un clip microquirúrgico alrededor del origen de la arteria carótida externa (ECA). El extremo distal de la ECA se unió

con seda 6-0 y se transeccionó. Se ató de manera ligera la seda 6-0 alrededor del extremo de la ECA. Se extrajo el clip y se insertó suavemente la punta pulida con fuego de una sutura de nylon 5-0 (recubierta de silicona) en el extremo de la ECA. El lazo de seda 6-0 se ajustó alrededor del extremo de la arteria y se avanzó la sutura de nylon aproximadamente 13 mm (ajustada para el peso corporal) en la arteria de carótida interna (ICA) y a través de la misma hasta que descansa en la arteria cerebral anterior (ACA), ocluyendo de este modo las arterias cerebrales comunicantes anteriores y cerebrales medias. Después de la sutura de nylon estuvo en el lugar durante 1 hora, se tiró hacia atrás en la ECA y se cerró la incisión.

[0347] Examen histológico

[0348] Para el examen histológico, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) 24 horas después de inducir la isquemia. Los cerebros se perfusionaron transcárdialmente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C. Se extrajeron los cerebros y se congelaron durante 15 minutos a -20 grados C antes de colocarse en una matriz para cerebros de roedores. Se prepararon secciones coronales (1 mm de grosor) y se sometieron a tinción con cloruro de trifeniltetrazolio al 2% (TTC) a 37 grados C. Se obtuvieron siete secciones coronales en serie de un mm de grosor desde la extensión rostral a caudal de la necrosis de cada cerebro, empezando en 2 mm desde el polo frontal. Las secciones teñidas con TTC se colocaron en formalina tamponada neutra al 10% y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C durante por lo menos 24 horas. El área de la necrosis en cada sección se determinó con un sistema de análisis de imágenes asistida por ordenador, que consistía en un ordenador Power Macintosh equipado con una tarjeta de captura Quick Capture, cámara Hitachi CCD montada en un microscopio Olympus y trípode. Se utilizó el NIH Image Analysis Software, v. 1.55. Las imágenes se capturaron y se determinó el área total de daño sobre las siete secciones. Un único operador sin conocimiento del estado del tratamiento realizó todas las mediciones. El volumen de la necrosis se calculó mediante la suma de los volúmenes de la necrosis de las secciones. El tamaño de la necrosis (%) se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(\text{volumen contralateral} - \text{volumen no dañado ipsilateral}) \times 100 / \text{volumen contralateral}$ para eliminar los efectos del edema.

[0349] Medición del flujo sanguíneo cerebral

[0350] El flujo sanguíneo cerebral (CBF) se monitorizó mediante la utilización de un medidor de flujo Doppler láser. Los valores de CBF se determinaron como un porcentaje porque los valores mostrados por el medidor de flujo Doppler láser no eran absolutos. Tal como se ha descrito anteriormente, los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). En el hemisferio ipsilateral hasta la oclusión de las MCA, las coordenadas fueron las siguientes: punto A, 0,5 mm posterior a la bregma y 2 mm lateral a la línea central; punto B, 1 mm posterior a la bregma y 1,2 mm lateral a la línea central; punto D, 1 mm anterior a la bregma y 1,7 mm lateral a la línea central; y punto C en el hemisferio contralateral, 1 mm posterior a la bregma y 2 mm desde la línea central. El CBF se comparó a 15 minutos antes del inicio de la isquemia, durante la isquemia (15 minutos después del inicio de la isquemia) antes de la inyección de los artículos de prueba y a 30 minutos después de la inyección (se tomaron mediciones continuas desde 15 minutos antes de la isquemia hasta 30 minutos después del final de la inyección del compuesto y se registraron cada 30 minutos). Los valores promedio antes de la oclusión de las MCA se tomaron como la línea base y los datos posteriores se expresaron como porcentajes del valor de la línea base.

[0351] Evaluación del comportamiento

[0352] El análisis de comportamiento (déficit neurológico) se determinó en los ratones antes y después de la lesión isquémica. Las valoraciones neurológicas fueron las siguientes: 0, función motora normal; 1, flexión del torso y las patas delanteras contralaterales cuando el animal se elevó por la cola; 2, rodeo a la cara contralateral cuando se sostiene por la cola en una superficie plana, pero una postura normal en descanso; 3, inclinación a la cara contralateral en descanso; 4, sin actividad motora espontánea.

[0353] Exclusión de animales del estudio

[0354] Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

[0355] Los animales mueren antes de completar el estudio (en cualquier punto). Los datos recogidos hasta el tiempo de la muerte se proporcionaron a GB.

[0356] El flujo sanguíneo cerebral no disminuyó hasta $20 \pm 5\%$ del valor de la línea base después de la oclusión (es decir, se consideró no isquémico) o el flujo sanguíneo no vuelve hasta el $90 \pm 15\%$ del valor de la línea base después de la reperusión.

[0357] Los animales desarrollaron una actividad de tipo apoplejía después de la lesión isquémica.

[0358] Se detectó un sangrado excesivo durante o inmediatamente después de la isquemia.

[0359] Análisis estadístico

5 [0360] Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos fisiológicos e histológicos se analizó utilizando un análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido de test post hoc de Fisher. Se computaron medidas repetidas de ANOVA en los datos monitorizados y se evaluó la significancia de la diferencia entre grupos mediante el test post hoc de Fisher.

[0361] Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM602 o eran controles. Los animales (30 animales) se sometieron a dosificación IV de vehículo o GM602 en las dosis indicadas.

10 [0362] Modelo de apoplejía de ratón:

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
ratones C57BL/6			
1 (n=10 ratones)	Vehículo	0	IV
2 (n=10 ratones)	GM602	1 mg/kg	IV
3 (n=10 ratones)	GM602	5 mg/kg	IV

15 [0363] Efectos de GM602 en la neuroprotección de la lesión por isquemia y la reperfusión. Los animales se evaluarán para el flujo sanguíneo cerebral (CBF), el ritmo cardiaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de necrosis (IFV).

[0364] Se han proporcionado todos los grupos de prueba a NTS; se proporcionó GM602 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se ha indicado anteriormente.

20 [0365] Resultados

[0366] Isquemia en ratones (estudio de isquemia). Se evaluó la gravedad relativa de la isquemia en estos estudios. Los datos eran de ratones con lesión isquémica que se inyectaron intravenosamente con vehículo o GM602.

25 [0367] Volumen de necrosis: comparado con el grupo inyectado con vehículo, el volumen de necrosis en los cerebros disminuyó significativamente en los grupos tratados con GM602 (a 1 y 5 mg/kg). El GM602 mostró una reducción dependiente de la dosis en el volumen de necrosis (tabla 5). Los volúmenes de necrosis frente a la dosis de GM6 se representan en la figura 2A. El porcentaje de disminución en el volumen de necrosis en los cerebros se presenta en la tabla 5. Tal como se muestra en la tabla, la administración IV de GM602 después de isquemia a 0, 1, ó 5 mg/kg mostró un tamaño de necrosis del 57, 39 y 12%. El volumen de necrosis es 73,37 mm³ para el grupo de vehículo, 45,93 mm³ y 20,29 mm³ para los grupos tratados con GM602 a 1 ó 5 mg/kg respectivamente. De este modo, la administración IV de GM602 después de isquemia a 1 ó 5 mg/kg dio lugar a una reducción del 38% y 73% en el volumen de necrosis respectivamente en comparación con el vehículo.

35 Tabla 5. Porcentaje de reducción en la necrosis en el cerebro

Grupo	Dosis	Compuesto GB ID	Tamaño de necrosis (%)	Porcentaje de reducción en el tamaño de necrosis	Compuesto volumen de necrosis (mm ³)	Porcentaje de reducción en el volumen de necrosis	Valor P
1	0	Vehículo	57%	0	73,37 \pm 4,43	0	
2	1 mg	GM602	39%	31,6%	45,93 \pm 3,99	38%	0,0004*
3	5 mg	GM602	12%	79%	20,29 \pm 2,87	73%	0,0001*

Los porcentajes de reducción se comparan con los respectivos animales de control con vehículo. p<0,0001 para todos los grupos comparados con el control. *Mortalidad*: No hubo muertes en este estudio.

[0368] Parámetros fisiológicos

40 [0369] No hubo diferencias significativas en los parámetros fisiológicos (presión arterial promedio, pO₂, pCO₂ y pH en sangre) entre los ratones con vehículo y tratados en la línea base, durante la isquemia o después de la reperfusión (figuras 3-7), a excepción de que se observó un incremento significativo sobre el grupo de vehículo en el flujo sanguíneo cerebral después de la reperfusión en el grupo tratado con 5 mg/kg de GM602, que ayuda a mitigar el efecto isquémico causado por el bloqueo del flujo sanguíneo.

45

Compuesto	CBF después de reperfusión	Valor P comparado con el vehículo
-----------	----------------------------	-----------------------------------

Vehículo	84,9	
GM602(1)	89,6	P<0,07
GM602(2)	91,2	P<0,003

[0370] Mediciones del comportamiento

5 [0371] Se evaluaron los animales por los déficits neurológicos en base a una escala de 0 a 4. Los animales tratados con GM602 mostraron una reducción dependiente de la dosis en los déficits neurológicos (datos también mostrados en la figura 8).

Compuesto	Déficits neurológicos	Valor P comparado con el vehículo
Vehículo	2,7 ± 0,30	
GM602(1)	1,8 ± 0,249	P<0,04
GM602(2)	1,3 ± 0,153	P<0,0006

10 [0372] La apoplejía es la tercera causa más común de muerte y la principal causa de discapacidad en los Estados Unidos. El resultado y el tamaño de necrosis después de la isquemia cerebral focal se determina mediante la muerte celular "necrótica" (paraptosis) y mediante la pérdida retrasada de células neuronales en la zona límite de la isquemia (muerte celular programada o apoptosis). Han aparecido terapias recientes para tratar la apoplejía isquémica. Sin embargo, estos tratamientos trataban mayoritariamente con la disolución de coágulos sanguíneos, pero no se dirigían a la neuroprotección, la reducción de déficit de comportamiento o volumen de necrosis cerebral. Entender los mecanismos básicos que influyen en la pérdida de células ayudará en el diseño de fármacos y aplicaciones para reducir la muerte celular asociada con la lesión isquémica.

20 [0373] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o apoplejía isquémica. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad de GM602, el análogo de 6 aminoácidos (FSRYAR) de MNTF, de proteger el cerebro de los efectos perjudiciales de la isquemia cerebral y de la lesión por reperfusión de una manera efectiva y eficiente. La administración intravenosa de GM602 en dosis de bolo únicas de 1 y 5 mg/kg demostraron un efecto protector dependiente de la dosis en el cerebro frente a la lesión por isquemia/reperfusión mediante un descenso en el volumen de necrosis, características de comportamiento mejoradas y un incremento en el flujo sanguíneo cerebral. Estos estudios sugieren que el GM602 puede tener un efecto beneficioso en la apoplejía.

30 [0374] Cuando se administra intravenosamente, se halló que el GM602 era neuroprotector contra la lesión por isquemia/reperfusión en el ratón. Estos estudios establecen el trabajo base para futuros estudios para determinar los efectos beneficiosos de GM602 en la apoplejía y otros trastornos neurodegenerativos.

[0375] Ejemplo 3

35 [0376] Lesión de la médula espinal: Prueba de GM603 (péptido de 6 unidades de MNTF de ejemplo FSRYPAR) en el modelo de lesión de médula espinal en ratón

40 [0377] Se ensayó el análogo de MNTF GM603 (SEQ ID NO: 2; FSRYPAR) por su eficacia en el modelo ratón con lesión de médula espinal (SCI). A efectos de determinar la eficacia de GM603 en el modelo de ratón de SCI, los ratones se sometieron a un impacto en la médula espinal y 14 días de recuperación. Los ratones fueron inyectados intravenosamente con GM603 en varias dosis inmediatamente después de la lesión y cada día durante 14 días. Se examinaron en los animales los cambios en el volumen de la lesión (LV) y la recuperación del comportamiento (BR). Se examinó la administración intravenosa (i.v.) de GM603 (1 ó 5 mg/kg) con múltiples dosis. La administración de GM603 demostró cambios tanto en LV como BR, que mostró un efecto dependiente de la dosis. El GM603 a 1 y 5 mg/kg mostró una reducción significativa en el volumen de la lesión, que se tradujo en una conservación de los déficits neurológicos. Estos datos demostraron que GM603 es neuroprotector en la médula espinal después de una inyección i.v. en el modelo de ratón con SCI.

[0378] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.

50 [0379] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.

[0380] "péptido de 6 unidades de MNTF" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF.

55 [0381] "GM603" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos (FSRYAR) de MNTF para SCI.

[0382] "GM603-1" significa GM603 1 mg/kg; SEQ ID NO: 2, FSRYPAR.

[0383] "GM603-5" significa GM603 5 mg/kg.

[0384] "SCI" significa lesión de la médula espinal.

[0385] "GB" significa Genervon Biopharmaceuticals, LLC.

[0386] "I.V." significa intravenosa.

[0387] "BR" significa recuperación del comportamiento.

[0388] El péptido de 6 unidades de MNTF es relativamente pequeño que no presenta las desventajas de péptidos grandes en términos de estabilidad, solubilidad, mutagenicidad, inmunogenicidad o el coste elevado de fabricación a través de métodos transgénicos o recombinantes. El coste de la síntesis en fase sólida de 6 aminoácidos es relativamente bajo.

[0389] En el modelo de apoplejía de ratón con oclusión de la arteria cerebral media (MOAC), el tratamiento posterior con el péptido de 6 unidades de MNTF mediante inyección IV redujo el volumen de la necrosis en el cerebro y redujo el déficit neurológico de una manera sensible a la dosis. Una dosis elevada de péptido de 6 unidades de MNTF redujo el volumen de necrosis cerebral en un 74% en comparación con vehículo y redujo los déficits neurológicos de manera significativa, $p < 0,0001$, sugiriendo que el péptido de 6 unidades de MNTF6 puede tener un efecto beneficioso en la apoplejía.

[0390] El ácido L-2-hidroxiglutarico (LGA) induce el estrés oxidativo y la apoptosis en el sistema nervioso. En un bioensayo con pez cebra el péptido de 6 unidades de MNTF protegía la apoptosis inducida por LGA en el SNC y reducía la apoptosis en un 85% en el cerebro medio (Parnig et al, 2004).

[0391] En una transección de nervio ciático de rata con un estudio de espacio de 8 mm, los animales tratados con péptido de 6 unidades de MNTF presentan una mejora significativa de la regeneración de motoneuronas de una manera sensible a la dosis ($p < 0,0002$ en la dosis óptima) y se indujo la regeneración de neuronas de DRG. (Nussbaum et al, 2003).

[0392] En un modelo de rata de nervio femoral transeccionado, el número de motoneuronas se proyectó correctamente en el músculo en los animales tratados con el péptido de 6 unidades de MNTF de una manera sensible a la dosis. En la dosis óptima, el número de neuronas proyectadas correctamente en el músculo es tres veces el número de motoneuronas proyectadas incorrectamente en la piel ($p < 0,0001$). (Nussbaum et al, 2003).

[0393] En un bioensayo de pez cebra, el péptido de 6 unidades protegía la apoptosis inducida por LGA en el SNP y reducía la apoptosis en un 49% en las uniones neuromusculares periféricas. (Parnig et al, 2004).

[0394] Se determinó la capacidad de GM603 de GB, un análogo peptídico de 6 aminoácidos (FSRYAR; SEQ ID NO: 2) del factor motoneuronotrófico (péptido de 6 unidades de MNTF) de proteger la médula espinal del daño o lesión a través de una inyección intravenosa por bolo (Tyor et al., 2002; Engesser-Cesar et al., 2005). El GM603 se sintetizó químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811). Este estudio se realizó bajo contrato con el Neurological Testing Service, Inc. (NTS, Charleston, SC). Se proporcionó GM603 a NTS como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).

[0395] Métodos y materiales

[0396] Animales

[0397] A ratones C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), que pesaban 22-25 gramos cada uno, se les dio libre acceso a comida y agua antes del experimento. Los ratones hembra adultos jóvenes (25 g) recibieron una contusión en la médula espinal utilizando el dispositivo de impacto neumático bien caracterizado.

[0398] Grupos experimentales

[0399] Antes de la manipulación quirúrgica, los ratones se asignaron a diferentes grupos de tratamiento en base a un diseño en bloque aleatorio, de manera que se incluían en cualquier día de cirugía determinado todos los tratamientos. Los investigadores no conocían los grupos de tratamiento. La formulación de GM603 (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811) se realizó por NTS como una solución madre mediante la reconstitución de GM603 con % de solución salina que estaba guardada a 4°C. El control de vehículo recibió la solución salina. Se administraron inyecciones IV en bolo a través de vena de cola inmediatamente después del inicio de la reperfusión.

[0400] Inducción de la lesión de médula espinal

[0401] Los ratones se anestesiaron con quetamina (80 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) antes de realizar una laminectomía en la décima vértebra torácica (T10). La columna vertebral se estabilizó con abrazaderas anguladas

en los niveles superiores torácicos (T8) y lumbares (T11) y se dirigió una punta de latón de diámetro de 2 mm sobre la dura intacta expuesta que recubre la médula espinal dorsal. El dispositivo de impacto se extrajo inmediatamente, la herida se irrigó con solución salina y las aberturas del músculo y la piel se suturaron juntas.

5 [0402] Tratamiento

[0403] Para la aplicación de los compuestos, se inyectó i.v. GM603 diariamente durante dos semanas. Inmediatamente después de la lesión, se aplicó GM603 en 2 dosis diferentes (1 mg/kg y 5 mg/kg). Se utilizaron animales hembra debido a la parálisis asociada con la lesión y la facilidad de vaciar la vejiga.

10

[0404] Análisis de comportamiento: prueba de barra giratoria y de campo abierto

15

[0405] Para el análisis de comportamiento, los animales se analizaron antes de la intervención quirúrgica y 1, 3, 5, 7 y 14 días después de la intervención quirúrgica. Los animales se colocaron en una cámara de campo abierto (120 cm de diámetro, 25 cm de altura de pared) durante 4 minutos para asegurar que todos los sujetos obtenían una puntuación máxima de 21 utilizando la escala de función locomotora de Basso, Beattie, y Bresnahan (BBB). Los ratones se colocaron en el campo abierto durante 4 minutos y se grabaron para la puntuación. Además, se analizó en los ratones su capacidad de permanecer en la barra giratoria. Para la prueba de la barra giratoria los ratones se sometieron a un periodo de aprendizaje de 1 semana, después de la cual eran capaces de actuar en una barra giratoria acelerante. La prueba se realizó en los días 1, 3, 5, 7, y 14 y los ratones se analizaron hasta que no eran capaces de permanecer en la barra giratoria más de 10 segundos en tres intentos consecutivos que se definió como error en la barra giratoria. El tiempo máximo se fijó en 90 segundos. El grupo de tratamiento suma las puntuaciones y se representan los valores centrales en función del tiempo después de la lesión.

20

25 [0406] Histología

[0407] Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se fijó la médula espinal en paraformaldehído al 4%. Para el análisis, se tiñeron criosecciones de 20 mm con eriocromo cianina (EC) para diferenciar entre la materia blanca y los cuerpos celulares para calcular la cantidad de tejido repuesto en el punto de la lesión. Se realizó un análisis inmunocitoquímico en el tejido. La reposición de tejido se determinó mediante análisis de imagen computerizada de 10 secciones espaciadas uniformemente a lo largo del segmento T10 dañado. El volumen de tejido necrótico dividido por el volumen de sección transversal total se convierte en un porcentaje y se resta de 100%.

30

[0408] Exclusión de animales del estudio

35

[0409] Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

[0410] Animales que mueren antes de completar el estudio (en cualquier punto). Los datos recogidos del tiempo de la muerte se proporcionaron a GB.

40

[0411] Los animales desarrollaron actividad de tipo apoplejía después de la lesión.

[0412] Se detectó un sangrado excesivo durante o inmediatamente después de la lesión.

45

[0413] Análisis estadístico

[0414] Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). La significancia de la diferencia en el volumen de la lesión y la recuperación del comportamiento se analizaron utilizando un test t.

50

Modelo de ratón de lesión de la médula espinal

[0415]

Grupo	No. De ratones	Compuesto	Dosis	Aplicación	Dosis/volumen
1	10	Vehículo	0	IV	0
2	10	GM603	1 mg/kg	IV	0,100 ml
3	10	GM603	5 mg/kg	IV	0,100 ml

55

[0416] Puntos finales

[0417] Déficits de comportamiento

[0418] Análisis histológico

60

[0419] Efectos de GM603 de la protección de la lesión de la médula espinal. Los animales se evaluaron por la lesión

en la médula espinal.

[0420] Todos los grupos de prueba se proporcionaron a NTS; GM603 se proporcionó como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se ha indicado anteriormente.

[0421] Resultados

[0422] Lesión de la médula espinal en ratones. Estudio de SCI. Se evaluó la gravedad relativa de SCI en estos estudios. Los datos eran de ratones con SCI que se inyectaron intravenosamente con vehículo o GM603.

[0423] Volumen de la lesión: en comparación con el grupo inyectado con vehículo, el volumen de la lesión en la médula espinal disminuyó significativamente con los grupos GM603 (tanto en 1 y 5 mg/kg). GM603 mostró una reducción dependiente con la dosis en el volumen de la lesión de 1 a 5 mg/kg (Tabla 6). Los volúmenes de la lesión se representan en la figura 9. La disminución en el porcentaje en el volumen de la lesión presente en las médulas espinales se representa en la tabla 6. Tal como se muestra en la tabla, GM603 a 1 ó 5 mg/kg mostró una disminución del 28 ó 53% en el volumen de la lesión en comparación con el vehículo, respectivamente. La figura 10 muestra dibujos representativos de las médulas espinales de los animales dañados. La figura 10 muestra que en los animales tratados con vehículo el volumen de la lesión (teñido de rojo) es muy amplio, mientras que en los animales tratados con GM603 (5 mg/kg) el volumen de la lesión (teñido de rojo) es considerablemente menor.

Tabla 6

Grupo	Dosis	Compuesto	Volumen de lesión	Porcentaje de reducción en el volumen de lesión	Valor P
1	0	Vehículo	2,696 ± 0,2902	0	
2	1 mg	GM603	1,912 ± 0,3139	28%	0,05*
3	5 mg	GM603	1,274 ± 0,2680	53%	0,002*

Las disminuciones en porcentaje se comparan con los animales con vehículo de control respectivos
 *comparación con el grupo 1(vehículo)
 Mortalidad: No hubo muertes en este estudio

[0424] Mediciones del comportamiento

[0425] Los ratones se sometieron a una prueba de barra giratoria. Los animales se analizaron por su capacidad de mantener la presencia en la barra giratoria durante un tiempo máximo de 90 segundos. Se analizaron los ratones en la prueba de barra giratoria que se utilizó para medir la función motora. El aparato (modelo DS 37) consistía en una barra con un diámetro de 2,5 cm subdividida en seis compartimentos en discos de 25 cm de diámetro. La barra giraba a una velocidad de constante de 22 rpm. Los animales se analizaron en los días 1,3,5,7 y 14. Se registró el tiempo que permanecían en la barra giratoria (máximo de 90 s). Tal como se observa en la figura 11, todos los animales demostraron una incapacidad inicial de permanecer en la barra giratoria. Sin embargo, después de 3 días hubo una delineación entre los grupos. En los días 3 y 5 la diferencia fue significativa (P<0,05) y en el día 7 la significancia fue incluso superior (P<0,01).

[0426] Los animales se evaluaron en una cámara de campo abierto (120 cm de diámetro, 25 cm de altura de pared) durante 4 minutos para asegurar que todos los sujetos podían obtener una puntuación máxima de 21 utilizando la escala de función locomotora de Basso, Beattie, y Bresnahan (BBB). Los ratones se colocaron en el campo abierto durante 4 minutos y se grabaron para la puntuación. Tal como se observa en la figura 12, en el día 1 todos los animales mostraron el mismo déficit en el movimiento debido a la lesión. Sin embargo, en el día 3, los animales tratados con GM603 mostraron una mejora significativa en comparación con los animales tratados con vehículo. En el día 5m la significancia fue de P<0,01.

[0427] Discusión

[0428] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de enfermedades neurológicas y permite la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad del análogo peptídico de 6 unidades de MNTF GM603 para proteger la médula espinal de los efectos perjudiciales de SCI de una manera efectiva y eficaz. La administración intravenosa de GM603 en inyecciones diarias de 1 y 5 mg/kg durante 14 días demostró un efecto protector dependiente de la dosis de la médula espinal frente a la disminución en el volumen de la lesión y las características de comportamiento. Estos estudios sugieren que el GM603 puede tener un efecto ventajoso en la SCI.

[0429] Cuando se administra intravenosamente, se halló que el GM603 era protector contra la lesión de la médula espinal en el ratón.

[0430] Ejemplo 4

[0431] ALS: Análisis de GM604 en el modelo de ratón de esclerosis lateral amiotrófica

[0432] Se analizó el análogo peptídico de MNTF GM604 (FSRYAR; SEQ ID NO: 2) por su eficacia en el modelo de ratón con esclerosis lateral amiotrófica (ALS). A efectos de determinar la eficacia de GM604 en el modelo de ratón con ALS, se inyectaron los ratones intravenosamente con GM604 en dos dosis a los 80 días de edad y se continuó hasta su muerte. Los animales se examinaron por los cambios en la edad de inicio de la enfermedad, edad de la muerte, y expresión de comportamiento de la enfermedad. Se examinó la administración intravenosa (i.v.) de GM604 (1 ó 5 mg/kg) con múltiples dosis. La administración de GM604 mostró cambios en la edad de inicio de la enfermedad, edad de la muerte, y manifestaciones de comportamiento de la enfermedad, que mostró un efecto dependiente con la dosis. El GM604 a 1 y 5 mg/kg mostró una extensión significativa de la esperanza de vida en los animales que se tradujo en la conservación de los déficits neurológicos. Estos datos demostraron que GM604 puede ser un neuroprotector en el modelo de ratón de ALS.

[0433] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.

[0434] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.

[0435] "péptido de 6 unidades de MNTF" significa un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF.

[0436] "GM604" significa análogo peptídico de 6 aminoácidos (FSRYAR) de MNTF para ALS.

[0437] "GM604-1" significa GM604 1 mg/kg.

[0438] "GM604-5" significa GM604 5 mg/kg.

[0439] "ALS" significa esclerosis lateral amiotrófica.

[0440] "GB" significa Genervon Biopharmaceuticals, LLC.

[0441] "i.v." significa intravenosa.

[0442] Valoración de la capacidad del artículo de prueba GM604 de GB, un análogo peptídico de 6 aminoácidos (FSRYAR; SEQ ID NO: 2) del factor motoneuronotrófico (péptido de 6 unidades de MNTF) para retrasar o modular la aparición de señales clínicas de la enfermedad de ALS, mejora de las señales clínicas y fase final de la enfermedad en el modelo de ratón con ALS. Los animales se sometieron a inyección intravenosa de GM604 que se sintetiza químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811). Se proporcionó GM604 como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).

[0443] Métodos y materiales

[0444] Animales

[0445] Se alimentaron ratones con ALS (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos (SPF). A cada uno de los animales que pesaba 22-25 gramos se les dio libre acceso a comida y agua antes del experimento. Se sometieron ratones adultos jóvenes (25 g) a inyecciones intravenosas de GM604.

[0446] Grupos experimentales

[0447] Antes de la manipulación quirúrgica, los ratones se asignaron a diferentes grupos de tratamiento en base a un diseño en bloque aleatorio, de manera que se incluían todos los tratamientos en cualquier día de intervención determinado. Los investigadores no conocían los grupos de tratamiento. La formulación de GM604 se realizó como una solución madre mediante la reconstitución de GM604 con solución salina que se almacenó a 4°C. El vehículo de control recibió solución salina. Las inyecciones IV en bolo fueron a través de la vena de la cola.

[0448] Tratamiento

[0449] Para la aplicación de los compuestos, se inyectó GM604 i.v. de manera diaria hasta la muerte de los animales. Se aplicó GM604 en 2 dosis diferentes (1 mg/kg y 5 mg/kg). Se utilizaron ratones macho y hembra debido al número de animales requerido para el estudio.

[0450] Análisis de comportamiento:

[0451] Barra giratoria

5 [0452] Para el análisis de comportamiento, se analizaron los animales antes del inicio de la enfermedad (día 80) y cada tres días hasta la muerte del animal. Los ratones se analizaron por su capacidad de permanecer en la barra giratorias. Para la prueba de barra giratoria, los ratones se sometieron a un periodo de aprendizaje de 1 semana después de lo cual eran capaces de actuar en una barra giratoria acelerante. La prueba se realizó cada tres días y se analizaron los ratones hasta que no eran capaces de permanecer en la barra giratoria por más de 10 segundos en tres intentos consecutivos que se definió como error en la barra giratoria. El tiempo máximo se fijó en 180 segundos. El grupo de tratamiento suma las puntuaciones y se representan los valores centrales en función de la edad.

[0453] Fuerza de agarre

15 [0454] Se utilizó un medidor de la fuerza de agarre (San Diego Instruments) para medir la resistencia de la pata delantera de los ratones en Newtons dos veces por semana. Se midió la cantidad máxima de fuerza de un ratón aplicado a una barra con sus patas delanteras cuando se separaba del sensor en una línea recta por su cola. Después de cuatro intentos, se utilizó el resultado más elevado para el análisis.

[0455] Prueba de la cola

20 [0456] Se levantó el ratón en el aire por su cola y se examinó la extensión de las patas traseras. La falta de extensión de las patas traseras se definió como el error en la prueba de la cola.

[0457] Evaluación clínica

25 [0458] A los ratones se les proporcionó una puntuación clínica de 0 a 4 en base a los siguientes criterios: sin señal de debilidad (0); temblores y pérdida de reflejos de separación (1); paresia en una pata trasera (2); paresia en ambas patas traseras (3); parálisis de una o ambas patas traseras (4). Los animales se sacrificaron en el nivel 4 por razones humanitarias.

[0459] Histología

35 [0460] Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se fijó la médula espinal en paraformaldehído al 4% para el análisis.

[0461] Exclusión de animales del estudio

[0462] Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

40 [0463] No se excluyeron animales del estudio.

[0464] Análisis estadístico.

45 [0465] Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). La significancia de la diferencia en la edad de aparición, la edad de la muerte y las manifestaciones de comportamiento se analizaron utilizando un test t.

Modelo de ratón con ALS

50 [0466]

Grupo	No. De ratones	Compuesto	Dosis	Aplicación	Dosis/volumen
1	10	Vehículo	0	IV	0
2	10	GM604	1 mg/kg	IV	0,100 ml
3	10	GM604	5 mg/kg	IV	0,100 ml

[0467] Puntos finales

55 [0468] Edad de inicio de la enfermedad

[0469] Edad de la muerte

60 [0470] Déficits de comportamiento

[0471] Análisis histológico

[0472] Todos los grupos de prueba se proporcionaron a NTS; GM604 se proporcionó como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se ha indicado anteriormente.

5 [0473] Resultados

[0474] Estudio de ALS. Se evaluó la gravedad relativa de ALS en estos estudios. Los datos fueron de ratones con ALS que se inyectaron intravenosamente con vehículo o GM604.

10 [0475] Edad en el inicio de la enfermedad: en comparación con el grupo inyectado con vehículo, la edad de aparición de la enfermedad se extendió significativamente en los ratones con ALS tratados con GM604 (a 1 y 5 mg/kg). El GM604 mostró un retraso dependiente de la dosis en la edad de aparición de la enfermedad de 1 a 5 mg/kg (Tabla 7). El inicio de los perfiles de la enfermedad se representan en la figura 13. El porcentaje del incremento en la edad de aparición de la enfermedad se presenta en la tabla 7. Tal como se muestra en la tabla, el GM604 a 1 ó 5 mg/kg
15 mostró un incremento del 12 ó 27% en la edad de aparición de la enfermedad en comparación con el vehículo, respectivamente.

Tabla 7. Edad del inicio de la enfermedad en los ratones con ALS

Grupo	Dosis	Compuesto	Edad de inicio de la enfermedad (promedio)	Porcentaje de incremento en la edad de inicio	Valor P
1	0	Vehículo	114,5	0	
2	1 mg	GM604	128	12%	0,001*
3	5 mg	GM604	145,5	27%	0,001*

El porcentaje de los incrementos se compara con los animales de control con vehículo respectivos
*Comparado con el grupo 1 (vehículo)

20 [0476] Edad de la muerte

[0477] En comparación con el grupo inyectado con vehículo, la edad de la muerte se extendió significativamente en los ratones con ALS tratados con GM604 (a 1 y 5 mg/kg). El GM604 mostró un retraso dependiente de la dosis en la edad a la muerte de 1 a 5 mg/kg (Tabla 8). La edad a la muerte se representa en la figura 14. El porcentaje en el incremento en la edad a la muerte se presenta en la Tabla 8. Tal como se muestra en la tabla, el GM604 a 1 ó 5 mg/kg mostró un incremento del 16 ó 30% en la edad a la muerte en comparación con el vehículo, respectivamente.

Tabla 8. Edad a la muerte en los ratones con ALS

Grupo	Dosis	Compuesto	Edad a la muerte (promedio)	Porcentaje de incremento en la edad a la muerte	Valor P
1	0	Vehículo	126	0	
2	1 mg	GM604	146,5	16%	0,001*
3	5 mg	GM604	163,5	30%	0,001*

El porcentaje de los incrementos se compara con los animales de control con vehículo respectivos
*Comparado con el grupo 1 (vehículo)

[0478] Mortalidad

[0479] No hubo muertes no relacionadas con la enfermedad en este estudio.

35 [0480] Mediciones del comportamiento.

[0481] Barra giratoria:

40 [0482] Los ratones se sometieron a una prueba de barra giratoria. Se analizaron los animales por su capacidad de mantener la presencia en la barra giratoria durante un tiempo máximo de 180 segundos. Los ratones fueron analizados en la prueba de barra giratoria, que se utilizó para medir la función motora. El aparato (modelo DS 37) consistía en una barra con un diámetro de 2,5 cm subdividida en seis compartimentos en discos de 25 cm de diámetro. La barra giraba a una velocidad de constante de 22 rpm. Los animales se analizaron dos días por semana
45 empezando en el día 80. Se registró el tiempo que permanecían en la barra giratoria (máximo de 180 s). Tal como se observa en la figura 15, todos los animales demostraron una capacidad de moverse de manera eficiente hasta el inicio de la enfermedad (véase la figura 15).

Tabla 9. Análisis en la barra giratoria en los ratones con ALS

Grupo	Dosis	Compuesto	Edad (promedio)	Porcentaje de incremento en la acción en la barra giratoria	Valor P
1	0	Vehículo	124	0	
2	1 mg	GM604	141	14%	0,001*
3	5 mg	GM604	174,5	41%	0,001*
El porcentaje de los incrementos se compara con los animales de control con vehículo respectivos *Comparado con el grupo 1 (vehículo)					

5 [0483] Fuerza de agarre

[0484] Los ratones se examinaron por su fuerza de agarre durante la progresión de la enfermedad y en presencia de GM604. Los ratones con ALS tratados con GM604 mostraron un retraso significativo en la disminución de la fuerza de agarre cuando se compararon con los ratones de control (figura 16A y tabla 10). En general, los ratones tratados con 1 ó 5 mg/kg de GM604 dieron mejor rendimiento que los animales de control.

Tabla 10. Fuerza de agarre en los ratones con ALS

Grupo	Dosis	Compuesto	Edad (promedio)	Porcentaje de incremento en la fuerza de agarre	Valor P
1	0	Vehículo	120	0	
2	1 mg	GM604	137	14%	0,001*
3	5 mg	GM604	169	41%	0,001*
El porcentaje de los incrementos se compara con los animales de control con vehículo respectivos *Comparado con el grupo 1 (vehículo)					

15 [0485] Evaluación clínica

[0486] Los ratones se examinaron por su puntuación clínica durante la progresión de la enfermedad y en presencia de GM604. Los ratones con ALS tratados con GM604 mostraron un retraso significativo en la puntuación clínica cuando se compararon con los ratones de control (figura 16B y tabla 11). En general, los ratones tratados con 1 ó 5 mg/kg de GM604 dieron mejor rendimiento que los animales de control.

Tabla 11. Puntuación clínica en los ratones con ALS

Grupo	Dosis	Compuesto	Edad (promedio)	Porcentaje de incremento en la fuerza de agarre	Valor P
1	0	Vehículo	113	0	
2	1 mg	GM604	139	23%	0,001*
3	5 mg	GM604	173	53%	0,001*
El porcentaje de los incrementos se compara con los animales de control con vehículo respectivos *Comparado con el grupo 1 (vehículo)					

25 [0487] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permiten la regeneración de tejido neuronal después de la lesión o injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad del análogo de 6 aminoácidos de MNTF (GM604) de proteger la médula espinal de los efectos perjudiciales de ALS de una manera efectiva y eficaz. La administración intravenosa de GM604 en inyecciones diarias de 1 y 5 mg/kg demostró un efecto protector dependiente de la dosis en el modelo de ratón de ALS mediante el incremento de la edad de inicio de la enfermedad, edad a la muerte y parámetros de comportamiento. Estos estudios demostraron que GM604 puede tener un efecto beneficioso en ALS.

[0488] Cuando se administró intravenosamente, se halló que el GM604 era protector frente a ALS en el ratón.

35 [0489] Ejemplo 5A

[0490] Modelo de ratón con enfermedad de Parkinson

[0491] Se analizó el GM6 (FSRYAR, SEQ ID NO: 2) (CS Bio Co., Menlo Park, CA) por la eficacia en un modelo de ratón con enfermedad de Parkinson (PD).

[0492] A efectos de determinar la eficacia de GM6 en PD, se inyectaron los ratones con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) para inducir la PD y a continuación intravenosamente con GM6 a varias dosis diferentes para determinar la influencia en la atenuación de la PD. Se examinó la administración intravenosa (i.v.) de GM6 (1, 5, 10 ó 20 mg/kg) durante 5 días (dos veces por día). La administración de GM6 demostró una atenuación dependiente de la dosis de PD en ratones, mostrando 20 mg/kg la mayor eficacia. El análisis de comportamiento, bioquímico e histológico demostró la atenuación ilustrando un único efecto para GM6 en PD. Estos datos sugieren que el GM6 es eficaz en el modelo de ratón de PD después de la inyección i.v. y puede ser un tratamiento potencial para pacientes con PD.

[0493] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.

[0494] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.

[0495] "GM6" y "péptido de 6 unidades" significan un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF.

[0496] "PD" significa enfermedad de Parkinson.

[0497] "MPTP" significa 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

[0498] "DOPAC" significa ácido dihidroxifenilacético.

[0499] "HVA" significa ácido homovanílico.

[0500] "DA" significa dopamina.

[0501] "Genervon" y "GB" significan Genervon Biopharmaceuticals, LLC.

[0502] "I.V." significa intravenosa.

[0503] Determinación de la capacidad del análogo de 6 aminoácidos (GM6) del factor Motoneuronotrófico (MNTF) para determinar la eficacia de GM6 en un modelo de ratón con enfermedad de Parkinson (PD).

[0504] GM6 es un péptido de 6 aminoácidos sintetizado (MNTF). El GM6 se proporcionó a NTS como un sólido y se preparó la formulación por (solución almacenada a 4°C).

[0505] El principal obstáculo para tratar las enfermedades y trastornos del sistema nervioso central es la dificultad de liberar el fármaco al sistema nervioso central. La determinación de la biocompatibilidad del fármaco y el efecto en varios trastornos neurológicos es importante para la potencial intervención terapéutica.

[0506] Valoración de la eficacia de GM6 en un modelo de ratón con PD a través de inyección intravenosa.

[0507] Métodos y materiales

[0508] Diseño de estudio. Se inyectaron ratones macho C57BL/6 con MPTP tal como se ha descrito a continuación y se examinó la protección frente a PD por GM6 en las dosis indicadas. Se examinaron en los animales las manifestaciones de comportamiento, los cambios bioquímicos e histológicos.

[0509] Tratamiento con MPTP. Se inyectaron ratones C57BL/6 (i.p., 20 mg/kg en 0,1 ml de agua a intervalos de 2 horas durante 4 dosis de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, MPTP, Sigma M-0896) y a continuación se examinaron una semana después de las inyecciones. Los ratones de control en cada grupo recibieron cuatro inyecciones i.p. de solución salina. Los ratones se mantuvieron en mantas calefactoras durante 24 horas después de las inyecciones.

[0510] En la administración de MNTF para el tratamiento con MNTF (GM6), los ratones recibieron dos veces diarias (12 horas de diferencia) inyecciones intravenosas de dosis variantes de MNTF de 1, 5, 10 ó 20 mg/kg en solución salina empezando 30 min después de la primera inyección con MPTP y continuando durante 4 días adicionales después de la última inyección de MPTP; los ratones de control recibieron solución salina sola. N = 10 por grupo.

[0511] Pruebas de comportamiento. Se utilizaron ratones macho en la prueba de comportamiento. Todos los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad (lucos encendidas de 7 a 19 h) y se dejaron que tuviera libre acceso a comida y agua. Para evaluar la actividad motora espontánea, se utilizó un monitor de actividad que consistía en 4 cilindros Plexiglas (23 cmx30 cm, diámetro x altura) cada uno equipado con tres haces de infrarrojo y un sistema de recuento automático. La prueba de actividad espontánea se inició mediante la colocación

del ratón en el cilindro. Después de 3 minutos de adaptación ambiental, se evaluó la actividad mediante el recuento del número de cruces de haces de infrarrojo en el aparato de fotocélulas durante 5 minutos. Para evaluar la coordinación sensorimotriz, se evaluaron los ratones en una barra giratoria. La unidad de barra giratoria consistía en un huso giratorio (diámetro de 7,3 cm) y cinco compartimentos individuales para analizar cinco ratones a la vez. Después de un entrenamiento diario de dos veces para dos días sucesivos (velocidad de 12 rpm en el primer día y 18 rpm en el segundo día), la velocidad de rotación de la prueba se incrementó hasta 25 rpm en el tercer día en una sesión de prueba. El tiempo que cada ratón permaneció en la barra giratoria se registró para las tres pruebas para cada ratón, con un intervalo de 5 minutos y una longitud máxima de prueba de 60 s por prueba. Los datos se presentan como el tiempo promedio en la barra giratoria sobre las tres pruebas.

[0512] Cuantificación de monoaminas de cerebro.

[0513] Se sonicaron secciones de cerebro diseccionadas en ácido perclórico 0,1 M y EDTA 0,1 mM (10 mg/100 ml). A continuación los extractos se centrifugaron durante 15 min y el sobrenadante se recogió y almacenó a -20°C. Se midieron la monoamina (dopamina, [DA]) y metabolitos (ácido dihidroxifenilacético [DOPAC], ácido homovanílico [HVA]) con cromatografía líquida a presión elevada (HPLC) utilizando detección electroquímica.

[0514] Inmunohistoquímica. Se fijaron todos los ratones (medio cerebro) con gotas de PFA al 4%. Los cerebros se fijaron en PFA al 4% durante 12 h a 4°C, y a continuación se almacenaron en sacarosa al 30% en PBS. Se cortaron secciones de cincuenta micrómetros y se procesaron para la inmunohistoquímica utilizando una dilución de 1:1000 de un anticuerpo de TH (Sigma T-1299). Se visualizó la inmunoreactividad de la tirosina hidroxilasa (TH) utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TH. La cuantificación preliminar de células inmunopositivas en TH en la sustancia negra y las áreas tegmentales ventrales se realizaron utilizando un análisis de imagen. Las secciones se secaron y montaron en Depex. El recuento celular se realizó utilizando una herramienta estereológica asistida por ordenador. Todos los recuentos celulares se realizaron sin conocer los tratamientos con fármacos y se realizaron a 100 aumentos.

[0515] Análisis estadístico. Los resultados se expresaron como el promedio \pm desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos se analizó utilizando un test t.

[0516] Exclusión de animales del estudio.

[0517] Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

[0518] Los animales que murieron antes de completar el estudio (en cualquier punto).

[0519] Los animales desarrollaron complicaciones graves después de la administración de los artículos de prueba.

[0520] Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM6 o eran controles. Los animales (60 animales) se sometieron a dosificación con bolo i.v. mediante la vena en la cola de vehículo o MNTF en la dosis indicada. Los animales se inyectaron 2 veces por día durante 5 días.

[0521] Modelo de ratón con PD utilizando GM6: un péptido de 6 unidades de MNTF de ejemplo FSRYAR SEQ ID NO: 2):

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
Ratones macho C57BL/6			
1 (n=10 ratones)	Vehículo	0	IV
2 (n=10 ratones)	GM6 de MNTF de ejemplo: FSRYAR	1 mg/kg/día	IV
3 (n=10 ratones)	GM6 de MNTF de ejemplo: FSRYAR	5 mg/kg/día	IV
4 (n=10 ratones)	GM6 de MNTF de ejemplo: FSRYAR	10 mg/kg/día	IV
5 (n=10 ratones)	GM6 de MNTF de ejemplo: FSRYAR	20 mg/kg/día	IV
6 (n=10 ratones)	Control	Control	NA

[0522] Puntos finales

[0523] Modulación de PD en el ratón

[0524] Se han proporcionado todos los grupos de prueba a NTS; se proporcionó GM6 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se ha indicado anteriormente.

[0525] Pruebas de comportamiento. Se evaluó la eficacia de GM6 en un modelo de ratón de MS. Los datos fueron de ratones que fueron administrados i.v. con vehículo o GM6 (en las dosis indicadas).

5 [0526] Análisis de comportamiento: después de la inducción de PD con MPTP, a los ratones se administraron GM6 en las dosis indicadas anteriores. Los animales se examinaron en el día 2 y cada día para determinar el comportamiento de los animales después de MPTP y GM6. Los ratones se inyectaron con GM6 cada día durante cinco días empezando en el día de la administración de MPTP. El GM6 se empezó 30 min después de la última inyección de MPTP y se continuó durante cuatro días adicionales. Tal como se observa en las tablas 12 y 13, los ratones tratados con vehículo mostraron un incremento significativo en valoraciones del comportamiento (figura de la actividad espontánea y barra giratoria) en comparación con los animales de control o tratados. El tratamiento con GM6 mostró una mejora significativa (atenuación) en el comportamiento. El GM6 a 5, 10 y 20 mg/kg mostró un beneficio significativo, mientras que 1 mg/kg no mostró ninguna mejora.

15 [0527] Actividad locomotora espontánea

TABLA 12. Actividad Espontánea

Tratamiento	Número de movimientos/5 min
Vehículo	67,60 ± 13,28 (NA)
GM6 (1 mg/kg)	74,50 ± 19,12 (0,3610)
GM6 (5 mg/kg)	121,6 ± 21,69 (<0,0001)
GM6 (10 mg/kg)	161,5 ± 24,95 (<0,0001)
GM6 (20 mg/kg)	254,9 ± 26,69 (<0,0001)
Control	292,0 ± 33,75 (<0,0001)

20 [0528] Prueba de la barra giratoria

TABLA 13. Prueba de la barra giratoria

Tratamiento	Número de movimientos/5 min
Vehículo	41,40 ± 3,645 (NA)
GM6 (1 mg/kg)	42,70 ± 4,237 (0,4741)
GM6 (5 mg/kg)	38,00 ± 2,331 (<0,947)
GM6 (10 mg/kg)	33,90 ± 3,091 (<0,0006)
GM6 (20 mg/kg)	23,80 ± 1,003 (<0,0001)
Control	20,29 ± 5,254 (<0,0001)
<i>Mortalidad: No hubo muertes en este estudio</i>	

25 [0529] Niveles de monoamina y metabolitos en los cerebros de animales tratados con MPTP. Se determinó la eficacia de GM6 en los niveles de monoamina y metabolitos en el cerebro que cambian durante el tratamiento con MPTP y son marcadores de PD. Tal como se muestra en la tabla 14 y las figuras 21A-21C, los niveles de dopamina, DOPAc y HVA fueron más elevados en los animales tratados con GM6 en comparación con los animales tratados con vehículo. 20 mg/kg/día mostró la mayor producción después del tratamiento con MPTP.

30 TABLA 14: Niveles de monoamina y metabolitos

Región	Dosis (mg/kg)	Niveles promedio +/- SD	Valor P	% diferencia
Dopamina	0	0,8830 ± 0,3168	NA	NA
	1	1,202 ± 0,3910	0,0074	+136
	5	2,497 ± 0,6475	<0,0001	+283
	10	3,908 ± 0,9202	<0,0001	+443
	20	8,386 ± 1,344	<0,0001	+950
	Control	12,02 ± 1,943	<0,0001	+1361
DOPAC	0	0,2145 ± 0,08036	NA	NA
	1	0,3030 ± 0,09937	0,0037	+141
	5	0,5915 ± 0,1579	<0,0001	+276
	10	0,9740 ± 0,2344	<0,0001	+454
	20	2,109 ± 0,3608	<0,0001	+983
	Control	3,354 ± 0,7365	<0,0001	+1564
HVA	0	0,08685 ± 0,03286	NA	NA
	1	0,1205 ± 0,03791	0,0048	+139
	5	0,2495 ± 0,06460	<0,0001	+287
	10	0,3970 ± 0,09381	<0,0001	+457

20	0,8440 ± 0,1399	<0,0001	+972
Control	1,210 ± 0,2017	<0,0001	+1393

[0530] Recuento celular. Después de los estudios de comportamiento, los animales se sacrificaron a los 7 días y se recogió la mitad del cerebro y se tiñó para las neuronas positivas en tirosina hidroxilasa (TH) en la pars compacta de la sustancia negra (SNpc). La MPTP mata selectivamente estas neuronas y éste es un excelente marcador para determinar el efecto del GM6 en la atenuación de la enfermedad. El número de células en la SNpc se determinó mediante el recuento de las neuronas positivas en TH y se muestran en la tabla 15 y la figura 22. Tal como se observa en la tabla y la figura, a medida que se incrementa la dosis de GM6, el número de células crece (evitaban la pérdida celular) en el cerebro. Esto sugiere que el GM6 protege el cerebro de los efectos perjudiciales de la inducción de PD.

TABLA 15. Recuento celular

Región SNpc	Dosis (mg/kg)	Recuento celular promedio +/- SD	Valor P	% Diferencia
	0	2698 ± 510,6	NA	NA
	1	2988 ± 763,3	0,3314	+111
	5	4820 ± 823,2	<0,0001	+179
	10	6494 ± 944,1	<0,0001	+241
	20	9993 ± 1025	<0,0001	+370
	Control	11797 ± 1339	<0,0001	+437

[0531] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de enfermedades neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de la lesión o el injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad del análogo de 6 aminoácidos de MNTF (GM6) para atenuar la PD en un modelo de ratón. La administración intravenosa de GM6 en dosis en bolos de 1, 5, 10 y 20 mg/kg durante un periodo de cinco días demostró un descenso dependiente de la dosis en el comportamiento, bioquímica e histología del PD. Esto demostró que el GM6 es eficaz en la limitación del grado de PD en el ratón a través de la administración intravenosa y puede ser beneficioso para el tratamiento de esta enfermedad.

[0532] Cuando se administra intravenosamente, se halló que el GM6 era eficaz en un modelo de ratón de PD. La eficacia de GM6 era dependiente de la dosis e indica que el GM6 puede ser beneficioso en la PD.

[0533] Ejemplo 5B

[0534] Análisis de MNTF en un modelo de cultivo celular de la enfermedad de Parkinson

[0535] El MNTF se analizó por la eficacia en un modelo de cultivo celular de la enfermedad de Parkinson (PD). A efectos de determinar la eficacia del MNTF en el modelo de cultivo celular, se sometieron células SH-SY5Y a una exposición de salsolinol (100 mM) durante 24 horas. Las células se trataron con y sin MNTF a diferentes concentraciones y se examinó la viabilidad celular. El salsolinol indujo la muerte celular en células SH-SY5Y después de 24 horas de exposición. La adición de MNTF a los cultivos mostró una protección dependiente de la dosis de la exposición a salsolinol. Además, el tratamiento con wortmannin (inhibidor de PI3K) anula los efectos del MNTF. Estos datos demostraron que el MNTF es neuroprotector en un modelo de cultivo celular de PD y después de la administración de salsolinol y puede funcionar a través del mecanismo de la PI3K.

[0536] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.

[0537] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.

[0538] "PD" significa enfermedad de Parkinson.

[0539] "GB" significa Genervon Biopharmaceuticals, LLC.

[0540] "CV" significa viabilidad celular.

[0541] "GM" significa MNTF.

[0542] "WRT" significa wortmannin.

[0543] "Sal" significa salsolinol.

[0544] Una serie de estudios han demostrado la eficacia del MNTF en varios sistemas nerviosos de ratas, que incluyen el nervio ciático periférico, el nervio musculocutáneo periférico, el nervio craneal facial, el nervio craneal

hipogloso y la parte de la médula espinal que controla los músculos en el cuello, pecho y extremidades superiores (Wang et al., 1995). Adicionalmente, los ratones wobbler (NIH) con genes dobles recesivos administrados con una dosis de 35 ng de MNTF a la edad de seis semanas detuvo la enfermedad genética neurodegenerativa en esta cepa.

5 [0545] Grupos de investigación independientes utilizando sus propios ensayos y protocolos establecidos realizaron los siguientes experimentos sobre el SNC y el SNP: 1. En un estudio de penetración de la barrera hematoencefálica por GM6, la administración intravenosa de GM6 en dosis únicas de bolo de 0,2 y 2 mg/kg demostraron un incremento dependiente de la dosis en los niveles de GM6 en el cerebro después de 4 horas. 2. En un modelo de apoplejía de ratón con oclusión de la arteria cerebral media (MOAC), el tratamiento posterior con GM6 mediante inyección IV redujo el volumen de la necrosis en el cerebro y redujo el déficit neurológico de una manera sensible a la dosis. Dosis elevadas de GM6 redujeron el volumen de necrosis cerebral en un 74% en comparación con el vehículo y redujeron los déficits neurológicos significativamente, $p < 0,0001$. 3. El ácido L-2-hidroxi-glutámico (LGA) induce el estrés oxidativo y la apoptosis en el sistema nervioso. En un bioensayo con pez cebra, el GM6 protegió la apoptosis inducida por LGA en el SNC y redujo la apoptosis en un 85% en el mesencéfalo. 4. En una transección de nervio ciático de rata con un estudio de espacio de 8 mm, los animales tratados con GM6 presentan una mejora significativa de la regeneración de motoneuronas de una manera sensible con la dosis ($p < 0,0002$ en la dosis óptima) y se indujo la regeneración de neuronas de DRG. 5. En un modelo de rata con nervio femoral transeccionado, El número de motoneuronas se proyectó correctamente al músculo en los animales tratados con GM6 de una manera sensible a la dosis. En la dosis óptima, el número de motoneuronas proyectadas correctamente al músculo es tres veces el número de motoneuronas proyectadas incorrectamente a la piel ($p < 0,0001$). 6. En un bioensayo con pez cebra, el GM6 protegió la apoptosis inducida por LGA en el SNP y redujo la apoptosis en un 49% en las uniones neuromusculares periféricas. 7. El fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con trastornos del SNC contiene factores solubles que inducen la rotura de neuritas y la muerte neuronal. El GM6 aumentó significativamente la supervivencia celular en el CSF de pacientes con la enfermedad de Huntington (271 %), MS (246%), apoplejía (205%), Parkinson (198%), Alzheimer (191%) y ALS (175%). Estos datos sugieren que el MNTF es capaz de proteger las células neuronales contra la muerte celular estimulada por CSF de pacientes con trastornos neurológicos, una confirmación firme de los descubrimientos en nuestros animales.

30 [0546] La eficacia de GM6 grado GMP (referido en este documento como MNTF) en un modelo de cultivo celular de la enfermedad de Parkinson (Shavali et al., 2003). Este estudio se realizó para analizar la capacidad de MNTF de proteger las células SH-SY5Y del daño. El MNTF se proporcionó como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).

35 [0547] Métodos y materiales

[0548] Células

40 [0549] Las células SH-SY5Y se adquirieron de American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivaron en un medio completo que contenía medio mínimo esencial, medio F-12 de Ham y solución de sal equilibrada de Hank Gibco-BRL en una proporción de 2:1:1. El medio también contenía suero bovino fetal al 10% junto con penicilina (50 U/ml) y estreptomycin (50 mg/ml). Las células se cultivaron en matraces y se mantuvieron en una incubador humidificado que contenía CO₂ al 5% en aire al 37°C. El medio se cambió cada 2-3 días.

45 [0550] Grupos experimentales

[0551] Antes de la manipulación, los cultivos se asignaron a diferentes grupos de tratamiento en base a un diseño en bloque aleatorio. Los investigadores no conocían los grupos de tratamiento.

50 [0552] Inducción del modelo celular de enfermedad de Parkinson.

55 [0553] Para los experimentos de viabilidad celular, se cultivaron células SH-SY5Y ($0,5 \times 10^5$ /pocillo) en una placa de cultivo celular de 96 pocillos y se trataron con (6) SAL (Sigma, St. Louis, MO) solo o junto con diferentes concentraciones de (GM6) (Genervon), con o sin Wortmannin (WRT) (Sigma, St. Louis, MO), un inhibidor de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3 quinasa) durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo con azul de tiazolilo (MTT).

[0554] Análisis estadístico

60 [0555] Los resultados se expresaron como la media \pm SD y la significancia estadística se calculó mediante el test t de Student utilizando el software Sigma-stat, donde $P < 0,05$ se consideró un valor significativo.

[0556] Modelo de cultivo celular de PD:

Grupo	No. de cultivos	Compuesto	Dosis
1	10	Vehículo	0

2	10	GM6GM6	0.1 mg/ml
3	10	Gm6	1 mg/ml
4	10	GM6/WRT	10 mg/ml
5	10	Sal	10 mg/ml + WRT (10 µM)
6	10	Sal/GM6	100 µM
7	10	Sal/GM6	100 µM/0.1 mg/ml
8	10	Sal/GM6	100 µM/1 mg/ml
9	10	Sal/GM6	100 µM/10 mg/ml
10	10	Sal/GM6/WRT	100 µM/10 mg/ml + WRT (10 µM)

[0557] Puntos finales

[0558] Número de células

5 [0559] Se proporcionaron todos los grupos de prueba a NTS; se proporcionó MNTF como un material sólido a NTS. Todos los cultivos en los grupos de prueba se dosificaron tal como se indica anteriormente. El Salsolinol y Wortmannin se adquirieron de Sigma. GM6 = FSRYAR SEQ ID NO: 2. de MNTF de ejemplo.

10 [0560] Resultados

[0561] Modelo de cultivo celular de PD. Estudio de PD. Los cambios relativos en la viabilidad celular se valoraron en células SH-SY5Y cuando se cultivaron con GM6 ± salsolinol (Sal). Los datos eran de cultivos celulares que se trataron con vehículo o MNTF (GM6).

15 [0562] Viabilidad celular. Los cultivos celulares se incubaron con varias concentraciones de GM6 (0,1 a 10 mg/ml) ± salsolinol (100 µM) y Wortmannin (WRT, 10 µM) y se determinó el número de células. En base a los datos obtenidos, el GM6 mostró un incremento dependiente con la dosis en el número de células en comparación con las células tratadas con control. A 10 mg/ml, hubo un incremento del 19,2% en el número de células en comparación con las células tratadas con control. El tratamiento de las células con Wortmannin a 10 mM evitó el incremento en el número de células sugiriendo una función para la PI3K en las acciones de GM6.

20 [0563] El tratamiento de las células con salsolinol a 100 µM demostró una menor viabilidad celular en células SH-SY5Y dopaminérgicas. Hubo una disminución del 63,7% en el número de células después de un tratamiento de 24 horas con salsolinol. La adición de GM6 a las células evitó una muerte celular inducida por Sal y aumento significativamente la supervivencia celular, tal como se valoró mediante un ensayo de MTT. El Sal, a una concentración de 100 µM, disminuyó la viabilidad celular hasta 36,5% y el cotratamiento con GM6 a 0,1, 1,0 y 10,0 mg/ml, incrementó la viabilidad celular hasta el 66%, 85% y 95%, respectivamente (Figura 17). WRT (10 µM) bloqueó los efectos neuroprotectores de GM6 (Figura 17).

30 TABLA 16. Porcentaje en el cambio en la viabilidad celular después del tratamiento con GM6 y salsolinol

Grupo	Dosis	Tratamiento	Compuesto	Viabilidad (% de células) Media ± SD	Porcentaje del cambio en el número de células	Valor P
1	0 mg/ml	Vehículo	Vehículo	1100,6 ± 5,187	NA	NA
2	0,1 mg/ml	GM6	Vehículo	101,2 ± 7,260	+0,6%**	0,8394**
3	1 mg/ml	GM6	Vehículo	108,0 ± 8,249	+7,4%**	0,0283**
4	10 mg/ml	GM6	Vehículo	119,9 ± 14,01	+19,2%**	0,0007**
5	10 mg/ml	GM6	WRT	93,81 ± 9,246	-6,7%**	0,0576**
6	0 mg/ml	Salsolinol	Vehículo	36,48 ± 12,78	NA	NA
7	0,1 mg/ml	GM6/Sal	Vehículo	65,85 ± 10,80	+80,5%*	<0,0001*
8	1 mg/ml	GM6/Sal	Vehículo	85,19 ± 10,18	+133,5%*	<0,0001*
9	10 mg/ml	GM6/Sal	Vehículo	95,57 ± 8,328	+162%*	<0,0001*
10	10 mg/ml	GM6/Sal	WRT	41,35 ± 10,79	+13,4%*	0,3689*

*Porcentaje del cambio en el número de células para los grupos 7-10 se compara con las células tratadas con Salsolinol (grupo 6)
 ** Porcentaje del cambio en el número de células para los grupos 2-5 se compara con las células tratadas con vehículo (grupo 1)

[0564] Se añadió salsolinol (Sal) a 100 µM, se añadió Wortmannin (WRT) a 10 µM.

35

- 5 [0565] El MNTF (GF) es un factor trófico que puede proporcionar protección frente a enfermedad neurológicas y permite la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o injerto. Los estudios realizados aquí demuestran la capacidad de MNTF de proteger las neuronas dopaminérgicas (células SH-SY5Y) de efector perjudiciales de PD (salsolinol) de una manera efectiva y eficiente. La administración de MNTF a 0,1, 1 y 10 mg/ml durante 24 horas demostró un efecto protector dependiente de la dosis en las células SH-SY5Y contra la muerte celular por salsolinol mediante un incremento en el número de células. Estos estudios demostraron que el MNTF puede tener un efecto beneficioso en PD.
- 10 [0566] Cuando se administró MNTF (GM6), se observó que era protector contra un modelo de muerte celular de cultivo celular de PD (apoptosis inducida por salsolinol).
- [0567] Ejemplo 6
- 15 [0568] Análisis de MNTF en la protección contra la lesión por CSF
- [0569] Se analizó el GM6 por la eficacia en un modelo de lesión neuronal. Se analizaron en células neuronales primarias muestras de fluido cerebroespinal (CSF) de cinco pacientes humanos específicos de enfermedad del grupo de control y cada uno de los ocho grupos de trastornos neurológicos para determinar los efectos en la muerte celular neuronal. Además, se examinaron los efectos de GM6 para la protección contra la lesión inducida por el CSF. 20 El CSF de humanos específicos de enfermedad de ocho enfermedades neurológicas diferentes indujo la muerte celular neuronal cuando se aplicó como una solución al 10%. El GM6 proporcionó protección frente a esta lesión. Estos estudios demuestran que el CSF de humano con trastornos neurológicos contiene ciertos factores que inducen la muerte celular y que el GM6 puede proteger frente a estos efectos. Estos estudios demuestran además la eficacia de GM6 en modelos de enfermedades neurológicas.
- 25 [0570] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.
- [0571] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.
- 30 [0572] GM6" y "péptido de 6 unidades" cada uno significan un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF de ejemplo: FSRYAR (SEQ ID NO: 2).
- [0573] "CSF" significa fluido cerebroespinal.
- 35 [0574] "Genervon" y "GB" significan cada uno Genervon Biopharmaceuticals, LLC.
- [0575] "NCC" significa cultivos de células neuronales.
- 40 [0576] Análisis de MNTF en la protección frente a la lesión por CSF.
- [0577] Utilizando muestras de CSF después de la muerte de cinco pacientes/donantes específicos de enfermedad de cada uno de los nueve grupos de estudio junto con documentos de identificación y diagnóstico clínico y diagnóstico neuropatológico suministrados por el UCLA Human Brain and Spinal Fluid Resource Center (Los Angeles, CA), se realizó un estudio para valorar la capacidad del péptido MNTF en la protección de la lesión por CSF. Las muestras de CSF se analizaron en células neuronales primarias para determinar los efectos en la muerte celular neuronal. Además, se examinaron los efectos de péptido de 6 unidades de MNTF/GM6 por la protección 45 contra la lesión inducida por el CSF. El GM6 se sintetiza químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811). Este estudio se realizó bajo contrato con el Neurological Testing Service, Inc. (NTS, Charleston, SC). Se proporcionó GM6 a NTS como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).
- 50 [0578] Métodos y materiales
- [0579] Diseño del estudio
- 55 [0580] Se aislaron células neuronales corticales de ratas Sprague Dawley de fetos embrionarios de 18 días y se desarrollaron en un cultivo durante 12 días. Se aplicó el CSF post mortem de control y donantes de varios trastornos neurológicos a los cultivos y se examinó la viabilidad neuronal. Además, se añadió MNTF a los cultivos para proteger las células de la lesión.
- 60 [0581] Métodos in vitro
- [0582] Se prepararon cultivos neuronales de fetos de ratas de Sprague-Dawley de 18 días. Se diseccionaron los mesencéfalos de ratas fetales y se incubaron durante 15 min en una solución de 2 mg/mL de tripsina en solución salina equilibra de Hank libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (HBSS) tamponada con 10 mM HEPES (GIBCO Life Technologies, Paisley, Scotland). A continuación, el tejido se expuso durante 2 min a inhibidor de tripsina de soja (1 mg/mL en 65

5 HBSS) y se enjuagó tres veces en HBSS. Las células se disociaron mediante triturado y se distribuyeron en placas de cultivo de plástico de 96 pocillos o 24 pocillos recubiertas de poli-L-lisina (Costar, Cambridge, MA). Las densidades de emplacado iniciales fueron de aproximadamente 160-180 células/mm². En el momento del emplacado, cada pocillo contenía 0,2 ml de medio DMEM/F12 (GIBCO Life Technologies, NY) complementado con 100 mL/L de suero bovino fetal (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Después de un periodo de 24 horas, se sustituyó el medio DMEM/F12 por 0,15 mL de medio neurobasal B-27 al 2% v/v complementado con 2 mM de GlutaMAX y D-(+) glucosa al 0,5% p/v (GIBCO Life Technologies). Dos veces por semana, se sustituyeron dos tercios del medio neurobasal por medio recién preparado de la misma composición. Se utilizaron cultivos para experimentos de neurotoxicidad después de 12 días de cultivo. Los investigadores de la investigación en NTS no eran conscientes del material antes o durante el estudio y cuando se presentaron los datos preliminares al Sponsor (GB).

15 [0583] El UCLA Human Brain and Spinal Fluid Resource Center (Los Angeles, CA) suministró las muestras de CSF post mortem de cinco donantes de cada uno de los nueve grupos de estudio junto con los documentos de identificación y diagnóstico clínico y diagnóstico neuropatológico. Las muestras se almacenaron a -170°C antes del envío y se enviaron con hielo seco. Los grupos de estudio fueron el control (sin trastorno neurológico), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), neuropatía (NP), esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Batten (BD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), e isquemia cerebral (apoplejía).

20 [0584] Para analizar los efectos del CSF en la supervivencia de células neuronales, se añadió CSF a los cultivos en medio neurobasal que contenía CSF al 10%. Se añadió CSF a los cultivos y se examinaron después de 48 horas. Se tomaron imágenes de cultivos y a continuación se sometieron los cultivos a ensayo MTT (ver a continuación) para determinar el % de muerte celular. Se incubaron cultivos adicionales con MNTF (100 nM) añadido a los cultivos 2 horas antes de la adición de CSF.

25 [0585] Ensayo de MTT. Se determinó la viabilidad de neuronas primarias tal como se ha descrito. Se determinó el número relativo de células supervivientes por triplicado utilizando el valor para células estimuladas con vehículos como el 100%. La supervivencia celular se valoró en el segundo día de tratamiento a través de un ensayo de MTT. Se diluyó el MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) en 200 mM en una solución de Hank (Biochrom) y se añadió a cultivos durante 2 horas a 37°C. Se liberó el producto de MTT formazán de las células mediante la adición de dimetilsulfóxido y se midió a 570 nm en un espectrofotómetro Ultrospect III (Pharmacia). A continuación, se pudo determinar la supervivencia relativa en comparación con controles no tratados.

35 [0586] Análisis estadístico. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos se analizó utilizando un test t.

[0587] Grupos de tratamiento.

[0588] Modelo de lesión neuronal

Grupo	Compuesto	Dosis	Ruta
1 Control	CSF	10%	In vitro
2 ALS	CSF	10%	In vitro
3 NP	CSF	10%	In vitro
4 MS	CSF	10%	In vitro
5 AD	CSF	10%	In vitro
6 BD	CSF	10%	In vitro
7 HD	CSF	10%	In vitro
8 PD	CSF	10%	In vitro
9 Apoplejía	CSF	10%	In vitro

40 [0589] Efectos de MNTF

Grupo	Compuesto	Dosis	Ruta
1 Control + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
2 ALS + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
3 NP + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
4 MS + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
5 AD + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
6 BD + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
7 HD + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
8 PD + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
9 Apoplejía + MNTF	CSF	10% (100 nM)	In vitro
*El paréntesis indica la dosis de MNTF			

[0590] Código

[0591] "ALS" significa esclerosis lateral amiotrófica.

[0592] "NP" significa dolor neuropático.

[0593] "MS" significa esclerosis múltiple.

[0594] "AD" significa enfermedad de Alzheimer.

[0595] "BD" significa enfermedad de Batten.

[0596] "HD" significa enfermedad de Huntington.

[0597] "PD" significa enfermedad de Parkinson.

[0598] "Apoplejía" significa isquemia cerebral.

[0599] Resultados

[0600] CSF en cultivos de células neuronales - Estudio. Los efectos del CSF en la muerte de células neuronales se valoró en un modelo in vitro de lesión de células neuronales. Se añadió CSF a cultivos de células neuronales primarias de rata a 10% del volumen total. Las células se examinaron mediante análisis microscópico y mediante ensayo de MTT para la muerte celular.

[0601] Análisis microscópico

[0602] Se trataron cultivos de células neuronales con CSF al 10% de control o de varios donantes con trastornos neurológicos durante 48 horas y a continuación se valoró la pérdida celular. El CSF de control no presentó un efecto significativo en la supervivencia celular, mientras que el tratamiento de células con CSF de trastornos neurológicos indujo la muerte celular.

[0603] Ensayo de MTT

[0604] Para medir el porcentaje de pérdida celular inducida por CSF en cultivos de células neuronales primarias de rata, se analizaron los cultivos mediante un ensayo de MTT. Tal como se observa en la figura 18, el CSF de pacientes de control no indujo ninguna muerte celular apreciable cuando se comparó con las muestras de control. Sin embargo, el CSF de la muerte celular inducida por diversos trastornos neurológicos dio lugar a varios grados de pérdida celular (tabla 17 y figura 18). Tal como se observa en la figura y la tabla, el MS indujo la mayor pérdida celular (70%) , mientras que el NP indujo la menor cantidad de muerte celular (32%). Estos datos sugieren que los trastornos neurológicos estimulan o dan lugar a la liberación de compuestos que inducen o exacerban la pérdida de células neuronales.

Tabla 17. Pérdida de células neuronales inducida por CSF

CSF	Dosis	%Células supervivientes (Media ± SD)	Valor P (% disminución)
Control	10%	92,00 ± 9,181	0(0)
ALS	10%	41,33 ± 13,76	<0,0001 (55)
NP	10%	62,73 ± 13,42	<0,0001 (32)
MS	10%	27,40 ± 7,149	<0,0001 (70)
AD	10%	37,53 ± 12,45	<0,0001 (59)
BD	10%	57,00 ± 8,443	<0,0001 (38)
HD	10%	29,40 ± 10,35	<0,0001 (68)
PD	10%	39,67 ± 11,45	<0,0001 (57)
Apoplejía	10%	39,07 ± 11,13	<0,0001 (57,5)

[0605] Efectos de MNTF en CSF en cultivos de células neuronales. Los efectos de MNTF en CSF en la muerte de células neuronales se valoró en un modelo in vitro de lesión de células neuronales. Se añadió MNTF a 100 nM a los cultivos celulares 2 horas antes de la adición de CSF. Se añadió CSF a cultivos de células neuronales primarios de rata al 10% del volumen total. Las células se examinaron mediante análisis microscópico y mediante ensayo de MTT para la muerte celular.

[0606] Análisis microscópico

5 [0607] Se trataron cultivos de células neuronales con 100 nM de MNTF durante 2 horas, a continuación se añadió CSF al 10% de control o varios trastornos neurológicos durante 48 horas y a continuación se valoró la pérdida celular. El MNTF no presentó un efecto significativo en la supervivencia celular con el tratamiento previo de las células con CSF.

[0608] Ensayo de MTT

10 [0609] Para medir el porcentaje de protección celular inducida por MNTF en cultivos de células neuronales primarias de rata tratadas con CSF, se analizaron cultivos mediante ensayo de MTT. Tal como se observa en la figura 2, el MNTF proporcionó un nivel de protección a los cultivos de células neuronales en la muerte celular inducida por CSF de pacientes de control con trastornos neurológicos (tabla 18 y figura 19). Tal como se observa en la figura 19 y la tabla 18, el MNTF aumentó la supervivencia celular, el máximo en CSF de HD (271 %), significativamente en el CSF de MS (246%), apoplejía (205%), Parkinson (198%), Alzheimer (191%) y ALS (175%), mientras que el MNTF aumentó la supervivencia celular, el mínimo en CSF de BD (114%). Estos datos sugieren que el MNTF es capaz de proteger las células neuronales frente a la muerte celular estimulada por CSF de pacientes con trastornos neurológicos.

20 TABLA 18. Protección de células neuronales obtenida mediante MNTF

CSF	Dosis	% Supervivencia celular (media ± SD)	Valor P (% disminución (↓) o <0.0001 (55↓) aumento (↑))
Control	10%	92,00 ± 9,181	0(0)
ALS	10%	41,33 ± 13,76	<0,0001 (55↓)
ALS + MNTF	10% + 100 nM	72,33 ± 10,83	<0,0001 (175↑)
NP	10%	62,73 ± 13,42	<0,0001 (32↓)
NP +MNTF	10% + 100 nM	75,47 ± 13,22	<0,014 (120↑)
MS	10%	27,40 ± 7,149	<0,0001 (70↓)
MS + MNTF	10% + 100 nM	67,33 ± 11,65	<0,0001 (246↑)
AD	10%	37,53 ± 12,45	<0,0001 (59↓)
AD + MNTF	10% + 100 nM	71,53 ± 10,81	<0,0001 (191↑)
BD	10%	57,00 ± 8,443	<0,0001 (38↓)
BD + MNTF	10% + 100 nM	65,20 ± 11,04	<0,03 (114↑)
HD	10%	29,40 ± 10,35	<0,0001 (68↓)
HD +MNTF	10% + 100 nM	79,80 ± 8,768	<0,0001 (271↑)
PD	10%	39,67 ± 11,45	<0,0001 (57↓)
PD + MNTF	10% + 100 nM	78,53 ± 8,806	<0,0001 (198↑)
Apoplejía	10%	39,07 ± 11,13	<0,0001 (57.5↓)
Apoplejía + MNTF	10% + 100 nM	80,07 ± 8,548	<0,0001 (205↑)

25 [0610] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permitir la regeneración del tejido neuronal después de una lesión o injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad del análogo de 6 aminoácidos de MNTF (GM6) para proteger contra los efectos perjudiciales del CSF de trastornos neurológicos en la lesión neuronal. La aplicación in vitro de GM6 a una dosis de 100 nM demostró la protección de células neuronales en la mayoría de casos. Esto demostró que el GM6 tiene un efecto positivo contra una variedad de enfermedades neurológicas.

30 [0611] Cuando se administra in vitro a células neuronales, se halló que el GM6 era protector contra el CSF de enfermedades neurológicas.

[0612] Ejemplo 7

35 [0613] Modelo de MS

40 [0614] Se analizó el GM6 (CS Bio Co., Menlo Park, CA) por la eficacia en un modelo de esclerosis múltiple (MS) de ratón. A efectos de determinar la eficacia de GM6 en MS, se inyectaron los ratones con proteína proteolípídica de mielina (PLP) para inducir la MS y a continuación intravenosamente con GM6 a varias dosis para determinar la influencia en la atenuación de MS. Se examinó la administración intravenosa (i.v.) de GM6 (1, 5, 10 ó 20 mg/kg) en siete dosis (una por día). La administración de GM6 demostró una atenuación dependiente de la dosis de MS en ratones con 20 mg/kg mostrando la mayor eficacia. Los análisis clínico e histológico demostraron la atenuación ilustrando un único efecto para GM6 en MS. Estos datos sugieren que el GM6 es efectivo en el modelo de ratón de MS después de la inyección i.v. y puede ser un potencial tratamiento para pacientes con MS.

- [0615] Abreviaturas/terminología para este ejemplo.
- 5 [0616] "MNTF" significa factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas.
- [0617] GM6" y "péptido de 6 unidades" cada uno significan un análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF.
- [0618] "MS" significa esclerosis múltiple.
- 10 [0619] "EAE" significa encefalomiелitis autoinmune experimental.
- [0620] "PLP" significa proteína proteolípídica de mielina.
- 15 [0621] "Genervon" y "GB" significan cada uno Genervon Biopharmaceuticals, LLC.
- [0622] "I.V." significa intravenosa.
- [0623] Este diseño experimental es para valorar la capacidad del análogo de 6 aminoácidos (GM6) de factor motoneuronotrófico (MNTF) (CS Bio Co., Menlo Park, CA).
- 20 [0624] La valoración de la eficacia de GM6 en un modelo de ratón de MS a través de la inyección intravenosa.
- [0625] Métodos y materiales
- 25 [0626] Diseño del estudio. Se inyectaron ratones hembra SJL/J con PLP tal como se describe a continuación y se examinó la protección de MS inducida por EAE mediante GM6 en las dosis indicadas. Los animales se examinaron por las manifestaciones clínicas y los cambios histológicos.
- 30 [0627] Inducción de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). En los experimentos se utilizaron ratones hembra SJL/J (8-10 semanas de vida, el Jackson Laboratory). Para la inmunización se utilizó la inducción de EAE y el tratamiento con proteína proteolípídica de mielina (PLP) (pág 139-151, HSLGKWLGHDPKF, SynPep Corporation). La EAE se indujo en los ratones hembra SJL/J mediante inyección subcutánea con 25 µg de PLP disuelta en adyuvante de Freund (CFA, Difco Laboratories). En el día de la inmunización y 48 horas después, se inyectaron 200 ng de la toxina pertussis (PT, List Biological laboratories, Inc) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en la vena de la cola del ratón.
- 35 [0628] Administración de MNTF. Los ratones se dividieron aleatoriamente en: grupos de tratamiento con MNTF (n = 10/grupo): se administró intravenosamente MNTF durante 7 días consecutivos empezando en el día de la aparición de los síntomas clínicos (puntuación ≥1), que hace que es protocolo de tratamiento sea clínicamente relevante. La dosis de MNTF fue de 1, 5, 10 ó 20 mg/kg en base a los estudios preliminares. Grupo de control de EAE (n = 10): los ratones con EAE se trataron con el mismo volumen de solución salina utilizado en los grupos experimentales.
- 40 [0629] Observaciones clínicas. Se observaron los ratones por los signos clínicos de EAE diariamente y se pesaron cada dos días. La puntuación clínica se designó de la siguiente manera: 0, no signos detectables de EAE; 1, tono de la cola afectado; 2, parálisis de la cola; 3, parálisis parcial suave de las patas traseras; 4, parálisis parcial severa de las patas traseras; 5, parálisis de una pata trasera; parálisis completa de las patas traseras; 7, parálisis completa de las patas traseras y parálisis parcial de las patas delanteras; y 8, muerte.
- 45 [0630] Para la evaluación de la EAE, se utilizaron los siguientes parámetros; el día de inicio se definió para cada animal como el día de la primera aparición de los síntomas de EAE. La duración de EAE se calculó como el número de días que cada día se puntuó como enfermo dividido por el número total de días puntuados y se expresó como un porcentaje. La incidencia acumulada se definió como el porcentaje de animales que desarrollaron EAE durante el periodo experimental. La puntuación promedio sobre el periodo experimental se calculó para cada animal como la suma de todas las puntuaciones individuales dividido por el número de mediciones. La puntuación máxima se definió como la puntuación clínica más elevada para cada animal durante el periodo experimental. Si los ratones morían de EAE a lo largo del transcurso del experimento, estos ratones se asignaron con una puntuación de 8 en los siguientes puntos de tiempo. Si los ratones morían antes de la aparición clara de los síntomas de EAE, estos ratones se excluyeron del experimento. Todos los animales, incluyendo los animales gravemente afectados con EAE, tenían acceso a comida y agua a lo largo del experimento.
- 50 [0631] Histología. Se extrajeron los cerebros y las médulas espinales 20 días después y se fijaron con formalina tamponada al 10% (Sigma). Las secciones bañadas en parafina (grosor de 6 mm) se tiñeron con H & E para evaluar el número de lesiones en el cerebro y la médula espinal. Se puntuaron y registraron.
- 55 [0632] Análisis estadístico. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos se analizó utilizando un test t.
- 60
- 65

[0633] Exclusión de animales del estudio. Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

[0634] Animales que murieron antes de completar el estudio (en cualquier punto).

[0635] Animales que desarrollaron varias complicaciones después de la administración de artículos de prueba.

[0636] Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM6 o eran controles. Los animales (50 animales) se sometieron a dosificación con bolo i.v. por la vena de la cola de vehículo o MNTF en las dosis indicadas.

[0637] Modelo de MS de ratón:

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
Ratones hembra SJL			
1 (n = 10 ratones)	Vehículo	0	IV
2 (n = 10 ratones)	MNTF	1 mg/kg/día	IV
3 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg/día	IV
4 (n = 10 ratones)	MNTF	10 mg/kg/día	IV
5 (n = 10 ratones)	MNTF	20 mg/kg/día	IV

[0638] Puntos finales

[0639] Modulación de MS en el ratón

[0640] Todos los grupos de prueba se han proporcionado a NTS; se proporcionó GM6 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron como se ha indicado anteriormente.

[0641] Resultados

[0642] Puntuación clínica. Se valoró la eficacia de GM6 en un modelo de ratón de MS. Datos de ratones que se administraron i.v. con vehículo o GM6 (en las dosis indicadas).

[0643] Análisis clínico

[0644] GM6: Después de la inducción de MS con PLP, los ratones se administraron con GM6 en las dosis indicadas (figura 2-). Los animales se examinaron en días alternados empezando desde el día 0 para determinar la puntuación clínica de los animales. Los ratones se inyectaron con GM6 cada día durante siete días empezando en el día de la inyección de PLP- Tal como se observa en la figura 23, los ratones tratados con vehículo mostraron un incremento significativo en la puntuación clínica. El tratamiento con GM6 mostró una mejora significativa (atenuación) de la enfermedad (figura 23). El GM6 a 5, 10 y 20 mg/kg mostró una ventaja significativa, mientras que 1 mg/kg no mostró ningún restablecimiento. La tabla 20 muestra el número de ratones que desarrollaron una enfermedad aguda después del tratamiento con GM6. Tal como se observa en la tabla, 10 y 20 mg/kg mostraron una reducción en el número total de ratones en el estado de enfermedad aguda, pero no en el estado crónico.

Tabla 19. Significancia de la administración de GM6 en comparación con animales tratados con vehículo

Tratamiento	Valor P
Vehículo	NA
GM6 (1 mg/kg)	NA
GM6 (5 mg/kg)	<0,01
GM6 (10 mg/kg)	<0,001
GM6 (20 mg/kg)	<0,001

Tabla 20. Ratones con signos clínicos/número total de ratones (%) – enfermedad aguda

Tratamiento	Valor P
Vehículo	10/10 (100%)
GM6 (1 mg/kg)	10/10 (100%)
GM6 (5 mg/kg)	10/10 (100%)
GM6 (10 mg/kg)	7/10 (70%)
GM6 (20 mg/kg)	0/10 (0%)

Tabla 21. Ratones con signos clínicos/número total de ratones (%) – enfermedad crónica

Tratamiento	Valor P
-------------	---------

Vehículo	10/10 (100%)
GM6 (1 mg/kg)	10/10 (100%)
GM6 (5 mg/kg)	10/10 (100%)
GM6 (10 mg/kg)	10/10 (100%)
GM6 (20 mg/kg)	10/10 (100%)
<i>Mortalidad:</i> No hubo muertes en este estudio	

5 [0645] Número de lesiones. El número de lesiones en el cerebro y la médula espinal se determinó mediante recuento y se muestra en las figuras 24A y 24B. A medida que se incrementó la dosis de GM6, disminuyó el número de lesiones en el cerebro y la médula espinal. Esto sugiere que el GM6 protege el cerebro y la médula espinal de los efectos perjudiciales de la inducción de MS.

Tabla 22

Región	Dosis (mg/kg)	Lesión # Media +/- SD	Valor P	% Diferencia
Cerebro	0	69,20 ± 10,99	NA	NA
	1	62,30 ± 9,202	0,1454	-10
	5	45,00 ± 8,367	<0,0001	-35
	10	24,90 ± 6,871	<0,0001	-64
	20	22,40 ± 6,687	<0,0001	-68
Médula espinal	0	59,90 ± 9,098	NA	NA
	1	55,20 ± 8,817	0,2560	-8
	5	36,90 ± 7,385	<0,0001	-38
	10	24,50 ± 6,671	<0,0001	-59
	20	19,90 ± 8,517	<0,0001	-67

10 [0646] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedad neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o injerto. Los estudios aquí realizados demuestran la eficacia del análogo de 6 aminoácidos de MNTF (GM6) para atenuar MS en un modelo de ratón. La administración intravenosa de GM6 en dosis en bolo de 1, 5, 10 y 20 mg/kg durante un periodo de siete días demostró una disminución dependiente con la dosis en las puntuaciones clínicas de MS y la histología. Esto demuestra que el
 15 GM6 es eficaz en la limitación del grado de MS en el ratón a través de la administración intravenosa y puede ser beneficioso para el tratamiento de esta enfermedad.

20 [0647] cuando se administrar de forma intravenosa, se halló que el GM6 era eficaz en un modelo de ratón de MS. La eficacia de GM6 era dependiente de la dosis lo que indica que el GM6 puede ser beneficioso en el tratamiento de MS.

[0648] Ejemplo 8

25 [0649] Análisis de GM602 (péptido de 6 unidades de MNTF) en el modelo de ratón de la oclusión de la arteria cerebral media.

30 [0650] Se analizó el artículo de prueba GM602 de Genervon Biopharmaceuticals, LLC por la eficacia en el modelo de ratón de la oclusión de arterias cerebrales medias (MCAO). A efectos de determinar la eficacia de GM602 en el modelo de ratón de MCAO, los ratones se sometieron a 1 hora de isquemia y 14 días de reperusión. Los ratones se inyectaron intravenosamente con bolo por vena de la cola con GM602 a 0, 3, 6, 12 y 24 horas después del inicio de la reperusión y se examinaron los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (CBF), ritmo cardiaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de la necrosis (IFV). Se examinó para la neuroprotección la administración intravenosa (IV) de GM602 (5 mg/kg) en los tiempos indicados después de la isquemia y cada día durante 3 días. La administración de GM602 demostró que no hubo cambios en CBF, HR, BP, pO₂, pCO₂, o pH. Se detectaron cambios en ND e IFV, que era dependiente del tiempo. El GM602 a 5 mg/kg mostró
 35 una protección significativa de daño por necrosis a 0, 3, 6 y 12 horas, que se tradujo en la conservación de déficits neurológicos. Estos datos sugieren que el GM602 es neuroprotector al cerebro después de la inyección IV en el modelo de ratón de MCAO.

40 [0651] Abreviaturas/Terminología

Abreviaturas/Terminología	Definición
MNTF	Factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas
péptido de 6 unidades de MNTF	Análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF
GM602	Análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF para apoplejía
MCAO	Oclusión arterial cerebral media

GB	Genervon Biopharmaceuticals LLC
I.V.	Intravenosa
CBF	Flujo sanguíneo cerebral
HR	Ritmo cardiaco
BP	Presión sanguínea
ND	Déficits neurológicos
IFV	Volumen de necrosis

5 [0652] Prueba de la capacidad del artículo de prueba de GB GM602, un análogo peptídico de 6 aminoácidos de factor motoneuronotrófico (péptido de 6 unidades de MNTF; FSRYAR) de proteger el cerebro de la isquemia aguda y la lesión por reperfusión. El GM602 se sintetiza químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811). Se proporcionó GM602 como un sólido y se preparó la formulación (solución almacenada a 4°C).

[0653] MÉTODOS Y MATERIALES

10 [0654] Animales

15 [0655] A ratones C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), que pesaban 22-25 gramos cada uno se les dio libre acceso a comida y agua antes del experimento. Los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). La monitorización de la presión sanguínea arterial promedio (MABP) se realizó a través del aparato con manguito en la cola, y se recogieron muestras de sangre para determinar los niveles de pH arterial y PaCO₂ y PaO₂. La MABP y el ritmo cardiaco se registraron utilizando un monitor de presión sanguínea Visitech System.

20 [0656] Se monitorizó la temperatura del cerebro utilizando un termómetro rectal y una sonda termistor insertada en el músculo temporal. La temperatura del cuerpo de los animales se mantuvo a 37°C utilizando una almohadilla de calentamiento con una camisa de agua. La temperatura del cerebro se monitorizó durante 1 hora antes de isquemia hasta 6 horas después de isquemia y se registró en intervalos de 30 minutos.

25 [0657] Grupos experimentales

30 [0658] Los animales se sometieron a una isquemia de 1,0 h y reperfusión de 24 horas y se dividieron en un grupo de vehículo (n = 10) o grupos (n= 10) tratados con una inyección intravenosa de GM602 a una dosis de 5 mg/kg. La formulación de GM602 (CS Bio Co., Menlo Park, CA, GMP013, lote C811) se realizó por NTS como una solución madre mediante la reconstitución de GM602 con una solución salina (100%) que se almacenó a 4°C. El vehículo control recibió la solución salina. Las inyecciones IV en bolo a través de la cola con GM602 se iniciaron a los tiempos de 0, 3, 6, 12 y 24 horas después del inicio de la reperfusión y posteriormente cada día durante 3 días después de la lesión. Los investigadores desconocían los grupos de tratamiento.

35 [0659] Inducción de la isquemia

40 [0660] Este estudio implicó un modelo transitorio de isquemia. Cada ratón se anestesió y se aislaron la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida común (CCA). Se insertaron sondas termistoras en el recto y el músculo temporal para monitorizar la temperatura del cuerpo y el cerebro, que se mantuvo a 36-37 grados C mediante calentamiento externo. La arteria carótida común (CCA) izquierda se expuso a través de una incisión en la línea central en el cuello. Las arterias occipitales y de tiroides superior se electrocoagularon y se dividieron. Se colocó un clip microquirúrgico alrededor del origen de la arteria carótida externa (ECA). El extremo distal de la ECA se unió con seda 6-0 y se transeccionó. Se ató de manera ligera la seda 6-0 alrededor del extremo de la ECA. Se extrajo el clip y se insertó suavemente la punta pulida con fuego de una sutura de nylon 5-0 (recubierta de silicona) en el extremo de la ECA. El lazo de seda 6-0 se ajustó alrededor del extremo de la arteria y se avanzó la sutura de nylon aproximadamente 13 mm (ajustada para el peso corporal) en la arteria de carótida interna (ICA) y a través de la misma hasta que descansa en la arteria cerebral anterior (ACA), ocluyendo de este modo las arterias cerebrales comunicantes anteriores y cerebrales media. Después de la sutura de nylon estuvo en el lugar durante 1 hora, se tiró hacia atrás en la ECA y se cerró la incisión.

50 [0661] Examen histológico

55 [0662] Para el examen histológico, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) 14 días después de inducir la isquemia. Los cerebros se perfusionaron transcárdialmente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 10% a 4°C. Se extrajeron los cerebros y se congelaron durante 15 minutos a -20 grados C antes de colocarse en una matriz para cerebros de roedores. Se prepararon secciones coronales (1 mm de grosor) y se sometieron a tinción con cloruro de trifeníltetrazolio al 2% (TTC) a 37 grados C. Se obtuvieron siete secciones coronales en serie de un mm de grosor desde la extensión rostral a caudal de la necrosis de cada cerebro, empezando en 2 mm desde el polo frontal. Las secciones teñidas con TTC se colocaron en

formalina tamponada neutra al 10% y se mantuvieron en la oscuridad a 4°C durante por lo menos 24 horas. El área de la necrosis en cada sección se determinó con un sistema de análisis de imágenes asistida por ordenador, que consistía en un ordenador Power Macintosh equipado con una tarjeta de captura Quick Capture, cámara Hitachi CCD montada en un microscopio Olympus y trípode. Se utilizó el NIH Image Analysis Software, v. 1.55. Las imágenes se capturaron y se determinó el área total de daño sobre las siete secciones. Un único operador sin conocimiento del estado del tratamiento realizó todas las mediciones. El volumen de la necrosis se calculó mediante la suma de los volúmenes de la necrosis de las secciones. El tamaño de la necrosis (%) se calculó utilizando la siguiente fórmula: (volumen contralateral – volumen no dañado ipsilateral) x 100/volumen contralateral para eliminar los efectos del edema.

[0663] Medición del flujo sanguíneo cerebral

[0664] El flujo sanguíneo cerebral (CBF) se monitorizó mediante la utilización de un medidor de flujo Doppler láser. Los valores de CBF se determinaron como un porcentaje porque los valores mostrados por el medidor de flujo Doppler láser no eran absolutos. Tal como se ha descrito anteriormente, los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). En el hemisferio ipsilateral hasta la oclusión de las MCA, las coordenadas fueron las siguientes: punto A, 0,5 mm posterior a la bregma y 2 mm lateral a la línea central; punto B, 1 mm posterior a la bregma y 1,2 mm lateral a la línea central; punto D, 1 mm anterior a la bregma y 1,7 mm lateral a la línea central; y punto C en el hemisferio contralateral, 1 mm posterior a la bregma y 2 mm desde la línea central. El CBF se midió antes del inicio de la isquemia y continuó durante 2 horas después del final de la infusión. Las mediciones se realizaron antes de la inyección de compuestos y después de la inyección (se tomaron mediciones continuas desde 15 minutos antes de la isquemia hasta 30 minutos después del final de la inyección del compuesto y se registraron cada 30 minutos). Los valores promedio después de la oclusión de las MCA y antes de la administración se tomaron como la línea base y los datos posteriores se expresaron como porcentajes del valor de la línea base.

[0665] Valoración del comportamiento

[0666] El análisis de comportamiento (déficit neurológico) se determinó en los ratones antes y después de la lesión isquémica. Las valoraciones neurológicas fueron las siguientes: 0, función motora normal; 1, flexión del torso y las patas delanteras contralaterales cuando el animal se elevó por la cola; 2, rodeo a la cara contralateral cuando se sostiene por la cola en una superficie plana, pero una postura normal en descanso; 3, inclinación a la cara contralateral en descanso; 4, sin actividad motora espontánea.

[0667] Exclusión de animales del estudio

[0668] Los animales se excluyeron del estudio en base a varios criterios:

[0669] Los animales mueren antes de completar el estudio (en cualquier punto). Los datos recogidos hasta el tiempo de la muerte se proporcionaron a GB.

[0670] El flujo sanguíneo cerebral no disminuyó hasta $20 \pm 5\%$ del valor de la línea base (es decir, se consideró no isquémico) o el flujo sanguíneo no vuelve hasta el $90 \pm 10\%$ del valor de la línea base.

[0671] Los animales desarrollaron una actividad de tipo apoplejía después de la lesión isquémica.

[0672] Se detectó un sangrado excesivo durante o inmediatamente después de la isquemia.

[0673] Análisis estadístico

[0674] Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos fisiológicos e histológicos se analizó utilizando un análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido de test post hoc de Fisher. Se computaron medidas repetidas de ANOVA en los datos monitorizados y se evaluó la significancia de la diferencia entre grupos mediante el test post hoc de Fisher.

[0675] Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM602 o eran controles. Los animales (30 animales) se sometieron a dosificación IV de vehículo o GM602 en las dosis indicadas.

[0676] Modelo de apoplejía de ratón:

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
1 (n = 10 ratones)	Vehículo	0	IV
2 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg 0 min después de isquemia	IV
3 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg 3 horas después	IV

		de isquemia	
4 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg 6 horas después de isquemia	IV
5 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg 12 horas después de isquemia	IV
6 (n = 10 ratones)	MNTF	5 mg/kg 24 horas después de isquemia	IV

[0677] Puntos finales

5 [0678] Efectos de MNTF en la neuroprotección de la lesión por isquemia y la reperfusión. Los animales se evaluarán para el flujo sanguíneo cerebral (CBF), el ritmo cardíaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de necrosis (IFV).

[0679] Se han proporcionado todos los grupos de prueba a NTS; se proporcionó GM602 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se ha indicado anteriormente.

10

[0680] Resultados

[0681] Isquemia en estudio con ratones. Se evaluó la gravedad relativa de la isquemia en estos estudios. Los datos eran de ratones con lesión isquémica que se inyectaron intravenosamente con vehículo o GM602.

15

[0682] Volumen de necrosis: comparado con el grupo inyectado con vehículo, el volumen de necrosis en los cerebros disminuyó significativamente con los grupos tratados con GM602 (0, 3, 6 y 12 horas). El GM602 mostró una reducción dependiente del tiempo en el volumen de necrosis de 0 a 12 horas después de la isquemia (tabla 1). Los volúmenes de necrosis se representan en la figura 26. El porcentaje de disminución en el volumen de necrosis en los cerebros se presenta en la tabla 23. Tal como se muestra en la tabla, el GM602 a 0, 3, 6 y 12 horas mostró una reducción del 70, 68, 58 y 36% en el tamaño de la necrosis. El volumen de necrosis a las 24 horas, aunque disminuyó no mostró una diferencia significativa con respecto a los animales tratados con vehículo.

20

TABLA 23. Porcentaje de disminución en la necrosis en el cerebro

25

Grupo	Dosis mg/kg	Volumen de necrosis (mm ³)	Porcentaje de reducción en el volumen de necrosis*	Valor P*
1	0	74,26 ± 12,09	0	NA
2	5	22,05 ± 7,292	70,3%	0,001
3	5	24,15 ± 8,110	67,5%	0,001
4	5	31,03 ± 9,255	58,2%	0,001
5	5	47,72 ± 9,118	35,7%	0,001
6	5	64,13 ± 12,51	13,4%	0,0821

Los porcentajes de reducción se comparan con los respectivos animales de control con vehículo.
 *Comparado con el grupo 1 (vehículo)
Mortalidad: No hubo muertes en este estudio.

[0683] Parámetros fisiológicos. No hubo diferencias significativas en los parámetros fisiológicos (flujo sanguíneo cerebral, presión arterial promedio, pO₂, pCO₂ y pH en sangre) entre los ratones con vehículo y tratados en la línea base, durante la isquemia o después de la reperfusión (figuras 27-31).

30

[0684] Mediciones del comportamiento. Se evaluaron los animales por los déficits neurológicos en base a una escala de 0 a 4. Los animales tratados con GM602 mostraron una reducción dependiente con el tiempo en los déficits neurológicos (datos también mostrados en la figura 32).

35

Tabla 24

Compuesto	Déficits neurológicos	Valor P comparado con el vehículo
1-Vehículo	3,600 ± 0,163	NA
2-GM602	1,200 ± 0,200	P=0,001
3-GM602	1,667 ± 0,167	P=0,001
4-GM602	1,800 ± 0,133	P=0,001
5-GM602	2,500 ± 0,167	P=0,002
6-GM602	3,200 ± 0,200	P=0,1387

[0685] La apoplejía es la tercera causa más común de muerte y la principal causa de discapacidad en los Estados Unidos. El resultado y el tamaño de necrosis después de la isquemia cerebral focal se determina mediante la muerte celular “necrótica” (paraptosis) y mediante la pérdida retrasada de células neuronales en la zona límite de la isquemia (muerte celular programada o apoptosis). Han aparecido terapias recientes para tratar la apoplejía isquémica, sin embargo, estos tratamientos trataban mayoritariamente con la disolución de coágulos sanguíneos, pero no se dirigían a la neuroprotección o la reducción de déficit de comportamiento o volumen de necrosis cerebral una vez se ha desencadenado el ciclo de muerte de células neuronales. Entender los mecanismos básicos que influyen en la pérdida de células ayudará en el diseño de fármacos y aplicaciones para reducir la muerte celular asociada con la lesión isquémica.

[0686] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o apoplejía isquémica. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad de GM602, el análogo de 6 aminoácidos de MNTF, de proteger el cerebro de los efectos perjudiciales de la isquemia cerebral y de la lesión por reperfusión de una manera efectiva y eficiente. La administración intravenosa de GM602 a 5 mg/kg a varios tiempos después de la lesión isquémica demostró un efecto protector dependiente de la dosis en el cerebro frente a la lesión por isquemia/reperfusión mediante un descenso en el volumen de necrosis y características de comportamiento. Estos estudios sugieren que el GM602 puede tener un efecto beneficioso en la apoplejía.

[0687] Cuando se administra intravenosamente, se halló que el GM602 era neuroprotector contra la lesión por isquemia/reperfusión en el ratón.

[0688] Ejemplo 9

[0689] Análisis de GM602 (péptido de 6 unidades de MNTF) en el modelo de rata de oclusión arterial cerebral media permanente.

[0690] Se analizó el artículo de prueba GM602 de Genervon Biopharmaceuticals por la eficacia en el modelo de rata con oclusión arterial cerebral media permanente (MCAO) (Kindy, Estudio #2C apoplejía). A efectos de determinar la eficacia de GM602 en el modelo de rata con MCAO permanente, las ratas se sometieron a isquemia permanente seguido de 28 días. Las ratas se inyectaron intravenosamente con bolo por vena de cola con GM602 a las 3 horas después de inicio de la isquemia. Se examinaron en las ratas los cambios en el flujo sanguíneo cerebral (CBF), ritmo cardíaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de la necrosis (IFV). Aunque la administración de GM602 demostró que no hubo cambios en HR, BP, pO₂, pCO₂, o pH, el GM602 demostró un incremento en CBF cuando se administró a las 3 horas después de la isquemia. De manera más importante, se observó una disminución significativa en ND, IFV, TNF (biomarcador de inflamación) y Fluoro-Jade (biomarcador de degeneración de neuronas), de una manera dependiente con la dosis después de la administración de GM602. La inyección IV de GM602 a 2.5, 10 ó 20 mg/kg mostró una protección significativa del daño de necrosis cuando se administró, lo que se traducía en la conservación de los déficits neurológicos. Estos datos sugieren que la inyección IV de GM602 durante la isquemia es neuroprotectora para el cerebro en el modelo de rata permanente de MCAO. El tratamiento con GM602 a 3 horas después de la aparición de la isquemia demostró un efecto protector y puede ser viable para pruebas clínicas.

[0691] Abreviaturas/Terminología

Abreviaturas/Terminología	Definición
MNTF	Factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas
péptido de 6 unidades de MNTF	Análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF
GM602	Análogo peptídico de 6 aminoácidos de MNTF para apoplejía
MCAO	Oclusión arterial cerebral media
GB	Genervon Biopharmaceuticals LLC
I.V.	Intravenosa
CBF	Flujo sanguíneo cerebral
HR	Ritmo cardíaco
BP	Presión sanguínea
ND	Déficits neurológicos
IFV	Volumen de necrosis
NS	Estadísticamente no significativo

[0692] Con estos datos en la mano, se tomó la decisión de analizar la capacidad del artículo de prueba GM602 de GB, un análogo peptídico de 6 aminoácidos de factor motoneuronotrófico (péptido de 6 unidades de MNTF) de proteger el cerebro de la lesión isquémica crónica en el modelo de rata con oclusión arterial cerebral media permanente (MCAO). El GM602 se sintetiza químicamente bajo la complicidad del GMP (CS Bio Co., Menlo Park, CA, lote D294).

[0693] MÉTODOS Y MATERIALES

[0694] Animales

5 [0695] A ratas Sprague-Dawley (Harlan), que pesaban 225-250 gramos cada una se les dio libre acceso a comida y agua antes del experimento. Los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). Se recogieron muestras de sangre para determinar los niveles de pH arterial y PaCO₂ y PaO₂. La MABP y el ritmo cardíaco se registraron utilizando un monitor de presión sanguínea Visitech System.

10 [0696] Se monitorizó la temperatura del cerebro utilizando un termómetro rectal y una sonda termistor insertada en el músculo temporal. La temperatura del cuerpo de los animales se mantuvo a 37°C utilizando una almohadilla de calentamiento con una camisa de agua. La temperatura del cerebro se monitorizó durante 1 hora antes de isquemia hasta 6 horas después de isquemia y se registró en intervalos de 30 minutos.

15 [0697] Grupos experimentales

[0698] Todas las ratas se sometieron a una isquemia permanente. Los animales se asignaron al azar a un grupo vehículo (n=10) o uno de los tres grupos (n=10) tratados con una inyección intravenosa de GM602 en una dosis de 2,5, 10 ó 20 mg/kg. Las inyecciones IV en bolo a través de la cola se administraron a las 3 horas después de la aparición de la isquemia. Los investigadores desconocían los grupos de tratamiento. La formulación de GM602 se realizó por NTS y se reconstituyó GM6 como una solución madre con una solución salina normal que se almacenó a 4°C. El vehículo control recibió la solución salina.

25 [0699] Inducción de isquemia

[0700] Este estudio implicó un modelo permanente de isquemia. Cada rata se anestesió, se aislaron la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida común (CCA). Se insertaron sondas termistoras en el recto y el músculo temporal para monitorizar la temperatura del cuerpo y el cerebro, la rata se mantuvo a 36-37 grados C mediante calentamiento externo. La arteria carótida común (CCA) izquierda se expuso a través de una incisión en la línea central en el cuello. Las arterias occipitales y de tiroides superior se electrocoagularon y se dividieron. Se colocó un clip microquirúrgico alrededor del origen de la arteria carótida externa (ECA). El extremo distal de la ECA se unió con seda 6-0 y se transeccionó. Se ató de manera ligera la seda 6-0 alrededor del extremo de la ECA. Se extrajo el clip y se insertó suavemente la punta pulida con fuego de una sutura de nylon 5-0 (recubierta de silicona) en el extremo de la ECA. El lazo de seda 6-0 se ajustó alrededor del extremo de la arteria y se avanzó la sutura de nylon aproximadamente 17 mm (ajustada para el peso corporal) en la arteria de carótida interna (ICA) y a través de la misma hasta que descansa en la arteria cerebral anterior (ACA), ocluyendo de este modo las arterias cerebrales comunicantes anteriores y cerebrales medias. La herida se cerró inmediatamente después de la inserción de la sutura de nylon utilizando grapas quirúrgicas. Las suturas se mantuvieron en el lugar durante 28 días.

40 [0701] Examen histológico

[0702] Para el examen histológico, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) 28 días después de inducir la isquemia. Los cerebros se perfusionaron transcárdialmente con solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 10% a 4°C, seguido de paraformaldehído al 4% (4°C). Se extrajeron los cerebros y se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% seguido de sacarosa al 30% durante 24 horas a 4°C. El tejido se bañó en medio OCT y se congeló en hielo seco (almacenado a -80°C). Se utilizó para análisis histológico e inmunocitoquímico. Los cerebros se recogieron 28 días después del inicio de la isquemia, se congelaron y se seccionaron en secciones de 16 µm. Las secciones coronales se tiñeron con hematoxilina y eosina para delinear claramente la extensión de la lesión isquémica. El volumen de necrosis se calculó mediante la integración del área de lesión en las secciones coronales teñidas de 16 µm recogidas de los puntos de bregma +2,46, +1,66, +0,86, +0,06, 0,74, 1,54, 2,34, y 3,14 mm de cada cerebro. Los volúmenes de necrosis total, cortical, estriatal y de hipocampo se cuantificaron con un sistema de imágenes asistido por ordenador (NIH IMAGE, Version 1.6). Un único operador sin conocimiento del estado del tratamiento realizó todas las mediciones. El volumen de la necrosis se calculó mediante la suma de los volúmenes de la necrosis de las secciones. El tamaño de la necrosis (%) se calculó utilizando la siguiente fórmula: (volumen contralateral – volumen no dañado ipsilateral) x 100/volumen contralateral para eliminar los efectos del edema.

[0703] Medición del flujo sanguíneo cerebral

60 [0704] El flujo sanguíneo cerebral (CBF) se monitorizó mediante la utilización de un medidor de flujo Doppler láser. Los valores de CBF se determinaron como un porcentaje porque los valores mostrados por el medidor de flujo Doppler láser no eran absolutos. Tal como se ha descrito anteriormente, los animales se anestesiaron con halotano (1% en 70%/30% NO₂/O₂ mediante máscara). En el hemisferio ipsilateral hasta la oclusión de las MCA, las coordenadas fueron las siguientes: punto A, 0,5 mm posterior a la bregma y 2 mm lateral a la línea central; punto B, 1 mm posterior a la bregma y 1,2 mm lateral a la línea central; punto D, 1 mm anterior a la bregma y 1,7 mm lateral a la línea central; y punto C en el hemisferio contralateral, 1 mm posterior a la bregma y 2 mm desde la línea central.

El CBF se midió antes del inicio de la isquemia, tres horas después de la inducción de la isquemia pero antes de la administración de los artículos de prueba y 1 hora después de la administración de los artículos de prueba. Los valores promedio antes de la oclusión de las MCA se tomaron como la línea base y los datos posteriores se expresaron como porcentajes del valor de la línea base.

- 5 [0705] Evaluación del comportamiento
- 10 [0706] Los animales se manipularon durante 10 min cada día durante 3 días antes de la lesión isquémica. El día antes de la lesión, los animales se examinaron por sus cambios de comportamiento.
- 15 [0707] Se administraron todas las pruebas de comportamientos justo antes de la cirugía de la apoplejía y a continuación 28 días después de la administración de los artículos de prueba. En cada sesión, se dejó que los animales se adaptaran a la habitación de prueba durante 30 minutos antes del inicio de la prueba.
- 20 [0708] Prueba de colocación de las patas delanteras – Se obtuvieron puntuaciones separadas para cada una de las patas delanteras. Para la subprueba de colocación visual, el animal se mantuvo vertical por el examinador y se llevó cerca de la parte superior de una mesa. La colocación normal de la extremidad en la mesa se puntuó como 0, la colocación retardada (<2 s) se puntuó como 1 y la no colocación o la colocación muy retrasada (>2 s) se puntuaron como 2. Se obtuvieron puntuaciones separadas primero a medida que el animal se llevaba hacia delante y a continuación de nuevo el animal se llevó de forma lateral a la mesa (puntuación máxima por extremidad, 4; en cada caso, los números más elevados indicó déficits mayores). Para la subprueba de colocación táctil, el animal se mantuvo de manera que no podía ver o tocar la parte superior de la mesa con sus bigotes. La base de la pata trasera dorsal se tocó ligeramente a la parte superior del animal a medida que el animal se llevaba primero hacia delante y a continuación se llevaba de forma lateral a la mesa. La colocación en cada vez se puntuó como antes (máxima puntuación por extremidad, 4). Para la subprueba de colocación propioceptiva, el animal se llevó únicamente hacia delante y se aplicó mayor presión a la base de la pata trasera dorsal; la colocación se puntuó como antes (puntuación máxima por extremidad, 2). Estas subpuntuaciones se sumaron para obtener la puntuación total de colocación de las patas delanteras por extremidad (intervalo, 0-10).
- 25 [0709] Prueba de colocación de las patas traseras – La prueba de colocación de las patas traseras se realizará de la misma manera que antes para las patas delanteras, pero implicará sólo las subpruebas táctiles y propioceptivas (puntuaciones máximas de 4 y 2, respectivamente: intervalo de puntuación total, 0-6).
- 30 [0710] Prueba de barra de equilibrio modificada – La prueba de equilibrio en barra modificada examinó la actividad refleja vestibulomotor a medida que el animal mantenía el equilibrio en una barra delgada (30 x 1,3 cm) durante 60 s. La capacidad del equilibrio en la barra se puntuó de la siguiente manera: el animal mantiene el equilibrio con las cuatro patas en la parte superior de la barra, 1; el animal pone las patas en los laterales de la barra o se balancea en la barra, 2; una o dos extremidades se resbalan de la barra, 3; tres extremidades se resbalan de la barra, 4; el animal intenta mantener el equilibrio con las patas en la barra pero cae, 5; el animal cubre la barra, a continuación cae; 6; el animal cae de la barra sin intentar mantener el equilibrio, 7. Los animales recibieron tres pruebas de entrenamiento antes de la intervención quirúrgica; la puntuación de la última de éstas se tomó como la puntuación de la línea base.
- 35 [0711] Actividad motora espontánea – Los animales se colocaron en un cilindro de vidrio estrecho (16,5 X 25 cm) y se registraron en video durante 10 min en el día antes de la intervención quirúrgica y una semana después. Los animales se puntuaron por los movimientos espontáneos. La puntuación fue la siguiente: 0, sin movimiento; poco o sin exploración (movimiento limitado); 2, algo de exploración (movimiento algo limitado); 3 movimiento no limitado (control, exploración normal).
- 40 [0712] Análisis de biomarcadores
- 45 [0713] Se montaron secciones coronales de 16 µm de grosor, a continuación se secaron en los portaobjetos del microscopio. Los portaobjetos se sumergieron en una solución que contenía hidróxido de sodio al 1% en alcohol al 80% (20 mL de NaOH al 5% añadido a 80 mL de alcohol absoluto) durante 5 minutos. A continuación, seguido de 2 minutos en alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada. Los portaobjetos se transfirieron a una solución de permanganato de potasio al 0,06% durante 10 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron en agua destilada durante 2 minutos. La solución de tinción se preparó a partir de una solución madre al 0,01% para Fluoro-Jade® B. Después de 20 minutos en la solución de tinción, los portaobjetos se enjuagaron durante un minuto en cada uno de los tres lavados con agua destilada. Se eliminó el exceso de agua mediante drenaje breve (aproximadamente 15 segundos) de los portaobjetos verticalmente en una toallita de papel. A continuación, los portaobjetos se colocaron en un calentador de portaobjetos, se fijó a aproximadamente 50°C hasta que estaban completamente secos (por ejemplo, 5-10 minutos). Los portaobjetos secos se purificaron mediante la inmersión en xileno durante por lo menos un minuto antes de cubrir el portaobjetos con DPX (Fluka, Milwaukee WI, o Sigma Chem. Co., St. Louis, MO), un medio de cubrimiento plástico no acuoso no fluorescente. Para el análisis de citoquinas, se lavaron secciones de tejido de 60 (TNF) en solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7,4 y se bloquearon en el suero apropiado (cabra). Las secciones se bloquearon durante la noche a 4°C y a continuación se sometieron a anticuerpo primario durante la
- 65

noche a 4°C. Las secciones se lavaron en TBS y se añadió un anticuerpo secundario y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavado, las secciones se incubaron tal como se indica en el kit Vector ABC Elite y se tiñeron con ácido diaminobenzoico (DAB). Las reacciones se detuvieron en agua y se recubrieron los portaobjetos después del tratamiento con xileno.

- 5 [0714] Exclusión de los animales del estudio
- [0715] Los animales se excluyeron en base a varios criterios:
- 10 [0716] Los animales que mueren antes de completar el estudio (en cualquier punto). Los datos recogidos hasta el momento de la muerte se proporcionó a GB.
- [0717] El flujo sanguíneo cerebral no se incrementó hasta $20 \pm 5\%$ del valor de la línea base después de la oclusión (es decir, se considera no isquémico).
- 15 [0718] Los animales que desarrollaron actividad de tipo apoplejía después de la lesión isquémica.
- [0719] Se detectó un sangrado excesivo durante o inmediatamente después de la isquemia.
- 20 [0720] Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM602 o eran controles. Los animales recibieron dosificación IV de vehículo o GM602 a las 3 horas después de la inducción de isquemia.
- [0721] Modelo de apoplejía de rata:

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Ruta
1 (n =10 ratas)	Vehículo	0	IV
2 (n =10 ratas)	GM602	2,5 mg/kg	IV
3 (n =10 ratas)	GM602	10 mg/kg	IV
4 (n =10 ratas)	GM602	20 mg/kg	IV

- 25 [0722] Puntos finales
- [0723] Efectos de GM602 en la neuroprotección de la lesión de isquemia y reperfundión. Los animales se evaluarán para el flujo sanguíneo cerebral (CBF), el ritmo cardiaco (HR), presión sanguínea (BP), pO₂, pCO₂, pH, déficits neurológicos (ND) y volumen de necrosis (IFV), biomarcador de la inflamación y biomarcadores de la degeneración neuronal.
- 30 [0724] Todos los grupos de prueba se proporcionaron a NTS; se proporcionó GM602 como un material sólido a NTS. Todos los animales en los grupos de prueba se dosificaron tal como se indica anteriormente.
- 35 [0725] Análisis estadístico
- [0726] Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (SD). La significancia de la diferencia en los datos fisiológicos e histológicos se analizó utilizando un análisis de varianza de una cola (ANOVA) seguido de test post hoc de Fisher. Se computaron medidas repetidas de ANOVA en los datos monitorizados y se evaluó la significancia de la diferencia entre grupos mediante el test post hoc de Fisher.

- [0727] Resultados
- 45 [0728] Estudio de isquemia en ratas. Se evaluó la gravedad relativa de la isquemia en estos estudios. Los datos eran de ratas con lesión isquémica que se inyectaron intravenosamente con vehículo o GM602.
- [0729] Volumen de necrosis: Los volúmenes de necrosis para todos los grupos de estudio se representan en la figura 33. La administración IV de GM602 3 horas después de la isquemia permanente redujo el volumen de necrosis en los cerebros de los animales. El porcentaje de disminución en el volumen de necrosis se presenta en la
- 50 tabla 25.

TABLA 25. Porcentaje de disminución en la necrosis en el cerebro

Grupo	Dosis mg/kg	Volumen de necrosis (mm ³)	% reducción en el volumen de necrosis*	Valor P *
1	0	283,7 \pm 42,66	0	NA
2	2,5	217,5 \pm 48,44	23,3%	p<0,045
3	10	159,6 \pm 44,84	43,6%	p<0,0001

4	20	124,3 ± 33,82	56,2%	p<0,0001
El porcentaje de las disminuciones se compara con los animales de control con vehículo. *Comparado con el grupo 1 (vehículo) <i>Mortalidad:</i> No hubo muertes en este estudio.				

5 [0730] Parámetros fisiológicos. No hubo diferencias significativas en los parámetros fisiológicos (presión arterial promedio, pO₂, pCO₂ y pH en sangre) entre los ratones con vehículo y tratados en la línea base, durante la isquemia o después de la administración del fármaco de prueba (figuras 35-38). Sin embargo, se observó un incremento significativo mediado por GM602 en el flujo sanguíneo cerebral en los grupos tratados con GM602 (figura 34).

TABLA 26 – Incremento en CBF después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	CBF durante isquemia	CBF después de la administración de fármaco	Post isquemia pre vs post administración de fármaco	GM602 gp frente a vehículo
1 – Vehículo (administración salina)	16,80 ± 2,53	17,90 ± 2,767	p=0,37	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	16,50 ± 2,99	24,10 ± 2,424	p<0,0001	p<0,0001
3 – GM602 (10 mg/kg)	14,40 ± 3,20	25,40 ± 2,459	p<0,0001	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	16,20 ± 2,49	29,50 ± 3,923	p<0,0001	p<0,0001

10 [0731] Mediciones del comportamiento. Se evaluaron los animales por los déficits neurológicos en base a varios parámetros diferentes, que se indican a continuación. Los animales tratados con GM602 mostraron una disminución dependiente de la dosis en déficits neurológicos (los datos también se muestran en la figura 39).

15 TABLA 27 – Prueba de colocación de las patas delanteras después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	14,40 ± 2,119	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	11,10 ± 2,514	p<0
3 – GM602 (10 mg/kg)	7,800 ± 2,466	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	6,300 ± 2,003	p<0,0001

TABLA 28 – Prueba de colocación de las patas traseras después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	5,1 ± 0,74	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	3,9 ± 1,20	p<0,02
3 – GM602 (10 mg/kg)	2,7 ± 0,95	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	2,0 ± 0,82	p<0,0001

20

TABLA 29 – Prueba de equilibrio en barra después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	5,300 ± 1,059	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	4,100 ± 0,9944	p<0,0177
3 – GM602 (10 mg/kg)	3,200 ± 0,7888	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	2,700 ± 0,4930	p<0,0001

25

TABLA 30 – Actividad espontánea después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	0,2 ± 0,42	NA

2 – GM602 (2,5 mg/kg)	0,9 ± 0,74	p<0,02
3 – GM602 (10 mg/kg)	1,6 ± 0,52	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	1,9 ± 0,74	p<0,0001

[0732] Análisis de biomarcadores. Las secciones de tejido se recogieron para el análisis de biomarcadores (Fluoro-Jade y TNF).

5 [0733] Hubo una reducción significativa en la tinción de TNF observada en las secciones de tejido a los 28 días en grupos administrados con GM602 de una manera dependiente con la dosis. (tabal 31 y figura 8). Hubo una reducción significativa en la tinción para Fluoro-Jade observada a los 28 días después de la administración de GM602 después de lesión isquémica permanente (tabla 32 y la figura 41).

10 TABLA 31 – Disminución en los niveles de TNF después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	89,07 ± 17,96	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	64,24 ± 16,18	p<0,005
3 – GM602 (10 mg/kg)	49,03 ± 12,60	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	32,72 ± 11,15	p<0,0001

TABLA 32 – Disminución en los niveles de Fluoro-jade después de la administración de GM602

Compuesto (grupo)	Puntuación de la prueba	Valor de P en comparación con vehículo
1 – Vehículo	7007 ± 1054	NA
2 – GM602 (2,5 mg/kg)	4899 ± 1248	p=0,0007
3 – GM602 (10 mg/kg)	3504 ± 959,4	p<0,0001
4 – GM602 (20 mg/kg)	2889 ± 719,6	p<0,0001

15 [0734] La apoplejía es la tercera causa más común de muerte y la principal causa de discapacidad en los Estados Unidos. El resultado y el tamaño de necrosis después de la isquemia cerebral focal se determina mediante la muerte celular “necrótica” (paraptosis) y mediante la pérdida retrasada de células neuronales en la zona límite de la isquemia (muerte celular programada o apoptosis). Han aparecido terapias recientes para tratar la apoplejía isquémica. Sin embargo, estos tratamientos trataban mayoritariamente con la disolución de coágulos sanguíneos, pero no se dirigían a la neuroprotección, la reducción de déficit de comportamiento o volumen de necrosis cerebral una vez se ha desencadenado el ciclo de muerte de células neuronales. Entender los mecanismos básicos que influyen en la pérdida de células ayudará en el diseño de fármacos y aplicaciones para reducir la muerte celular asociada con la lesión isquémica.

25 [0735] El MNTF es un factor trófico que puede proporcionar protección de las enfermedades neurológicas y permitir la regeneración de tejido neuronal después de una lesión o apoplejía isquémica. Los estudios aquí realizados demuestran la capacidad de GM602, el análogo de 6 aminoácidos de MNTF, de proteger el cerebro de los efectos perjudiciales de la lesión isquémica cerebral permanente en la rata de una manera efectiva y eficiente. La administración intravenosa de GM602 en 2,5, 10 y 20 mg/kg a las 3 horas después de la lesión isquémica demostró un efecto protector dependiente de la dosis en el cerebro frente a la lesión isquémica mediante un descenso en el volumen de necrosis, características de comportamiento mejoradas, un incremento en el flujo sanguíneo cerebral y una disminución en la inflamación y la degeneración de neuronas. Estos estudios sugieren que el GM602 puede tener un efecto beneficioso en la apoplejía permanente.

35 [0736] Cuando se administra intravenosamente, se halló que el GM602 era neuroprotector contra la lesión isquémica en la rata.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un polipéptido, la secuencia de aminoácidos del cual consiste en la SEQ ID NO: 2, o una sal de dicho polipéptido, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neuronal en un animal, en la que el polipéptido o sal se administran mediante liberación intravenosa y son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica, y en la que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en apoplejía, isquemia cerebral, lesiones de la médula espinal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Alzheimer.
- 10 2. Polipéptido, la secuencia de aminoácidos del cual consiste en la SEQ ID NO: 2, o una sal de dicho polipéptido, para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno neuronal en un animal, en el que el polipéptido o sal se administran mediante liberación intravenosa y son capaces de penetrar la barrera hematoencefálica, y en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en apoplejía, isquemia cerebral, lesiones de la médula espinal, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Alzheimer.
- 15 3. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es la apoplejía.
- 20 4. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es una isquemia cerebral.
- 25 5. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es una lesión de la médula espinal.
- 30 6. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es la enfermedad de Huntington.
- 35 7. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es la enfermedad de Parkinson.
- 40 8. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es MS.
9. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es ALS.
10. Utilización de la reivindicación 1 o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según la reivindicación 2, en los que el trastorno es la enfermedad de Alzheimer.
11. Utilización o el polipéptido para utilizar en un método de tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el animal es un humano.

Figura 1

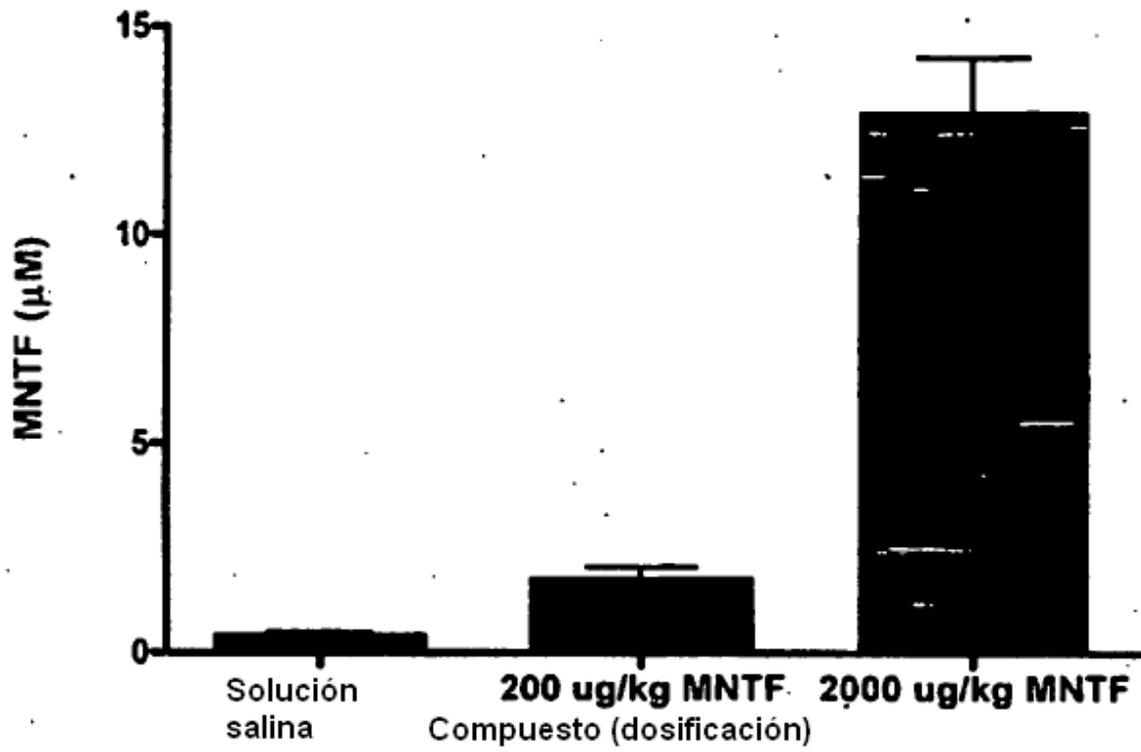


Figura 2A

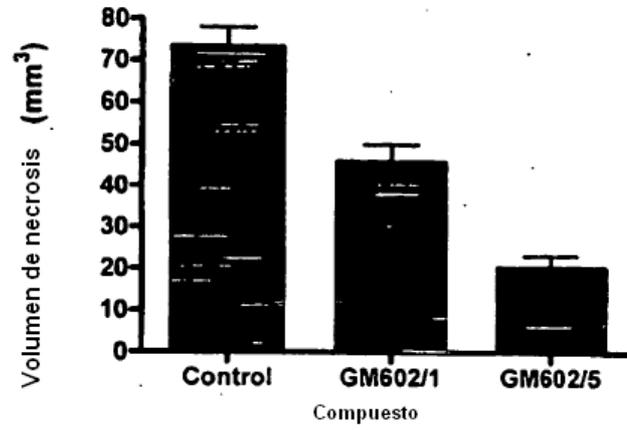


Figura 2B

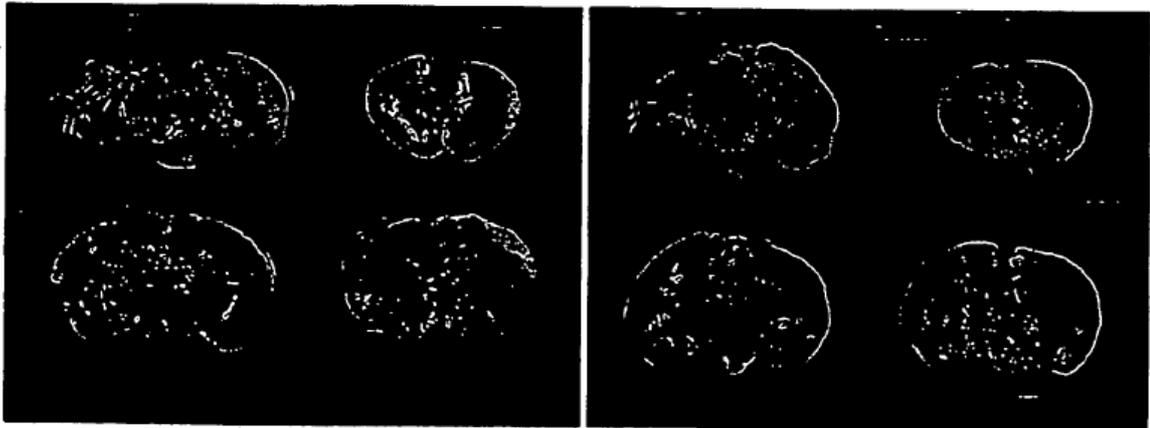


Figura 3

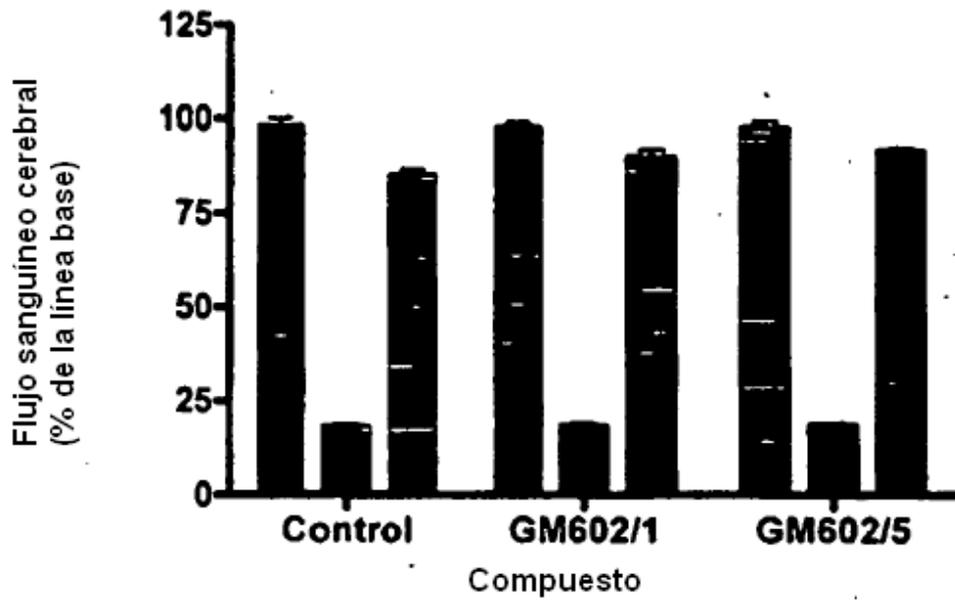


Figura 4

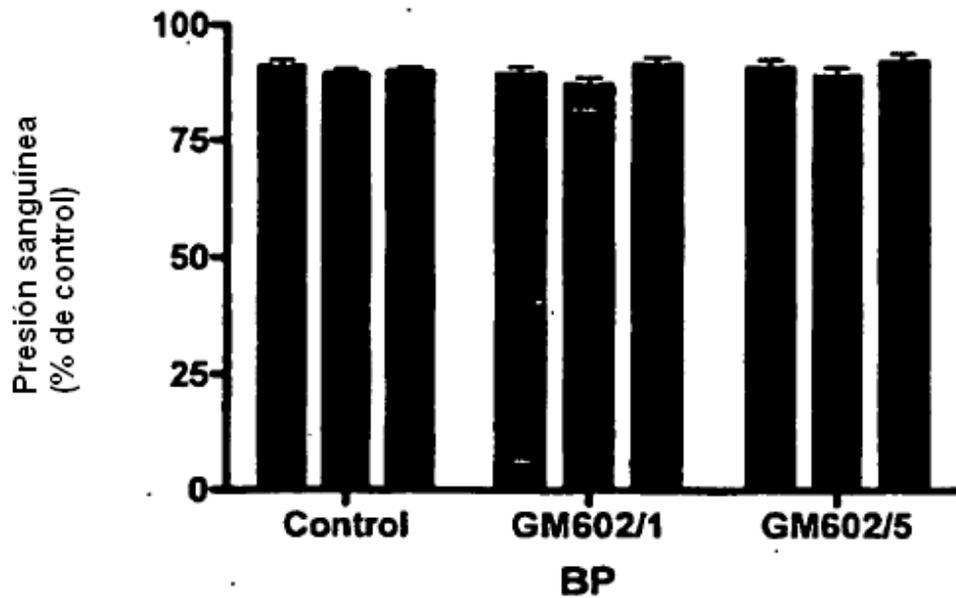


Figura 5

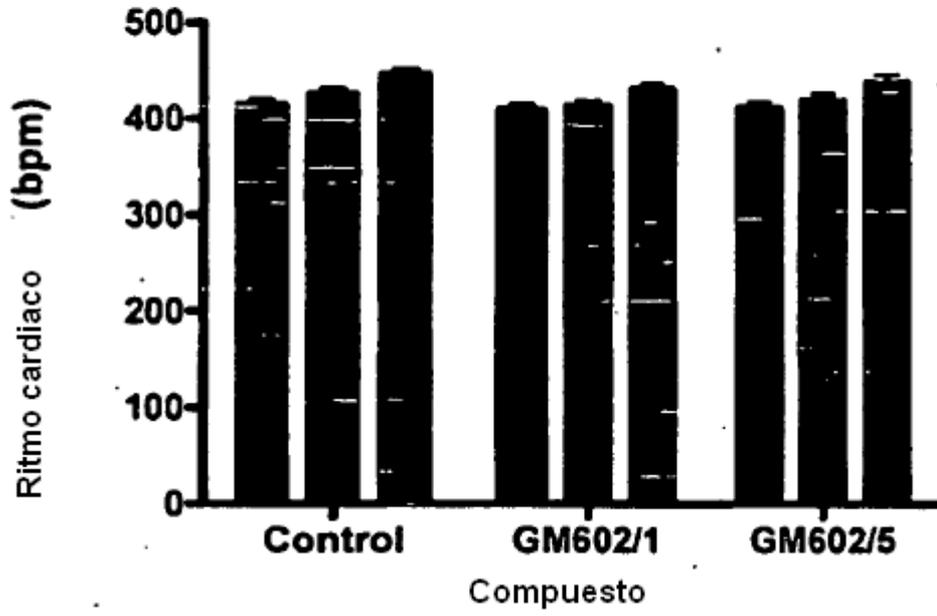


Figura 6

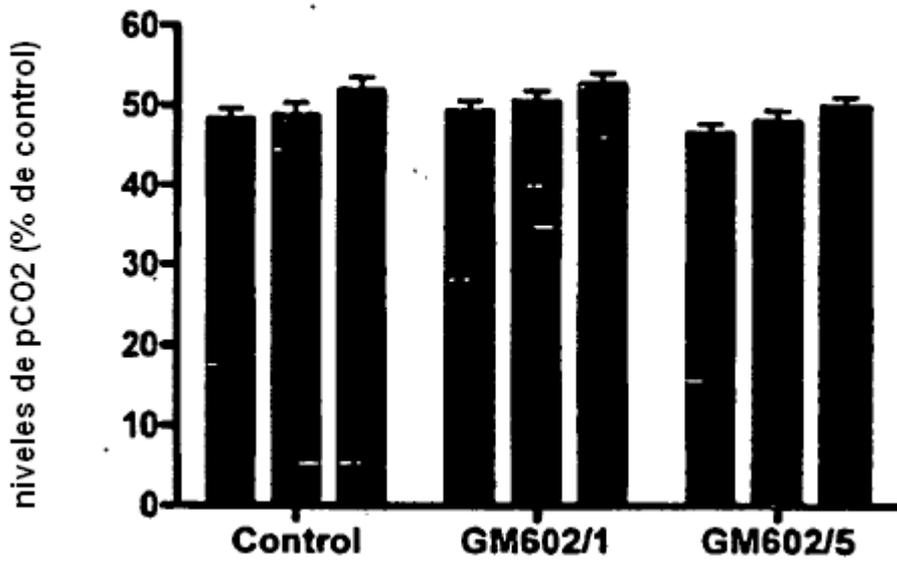
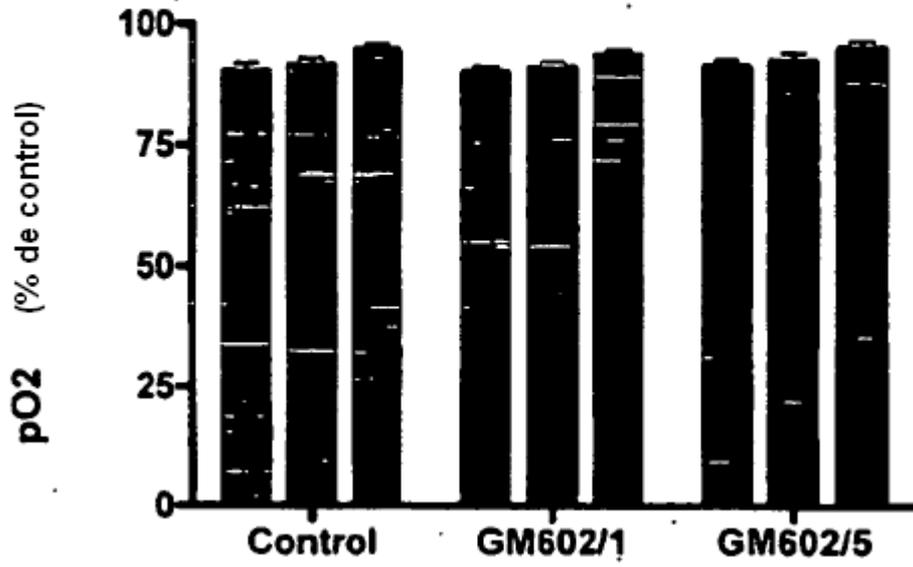


Figura 7

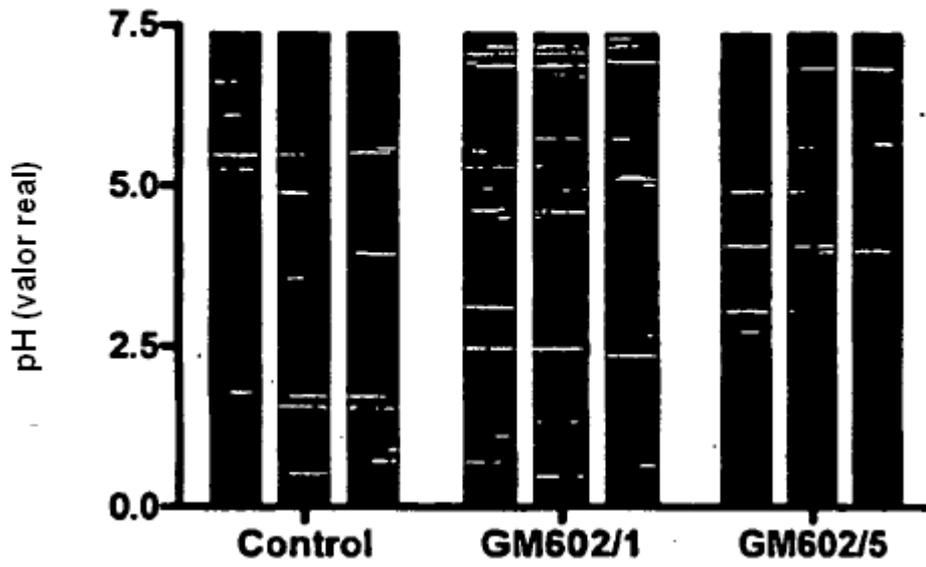


Figura 8

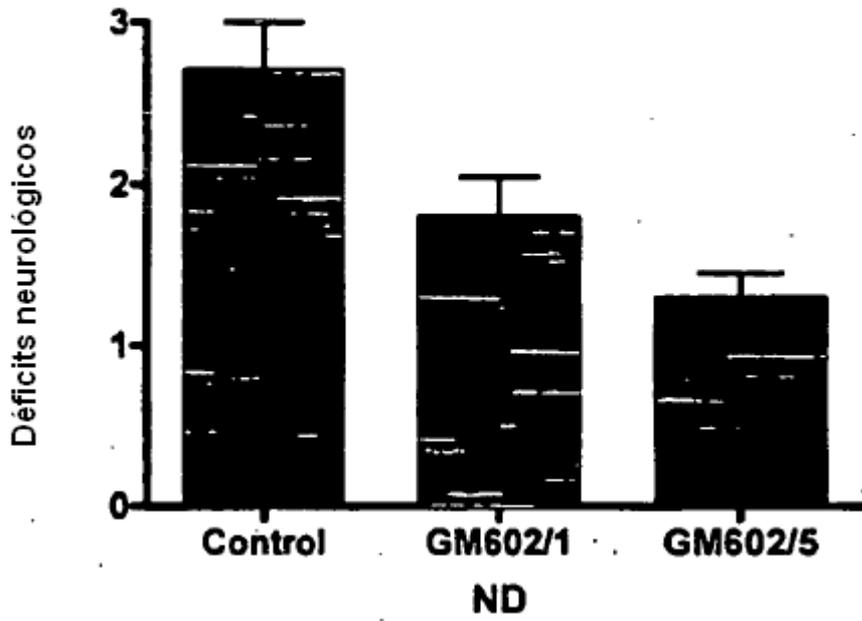


Figura 9

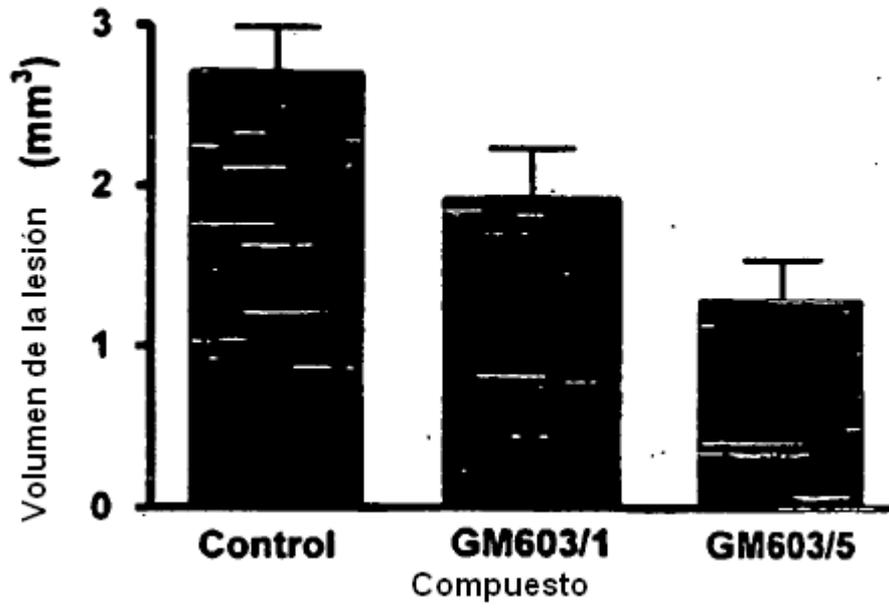


Figura 10

A.



Figura 11

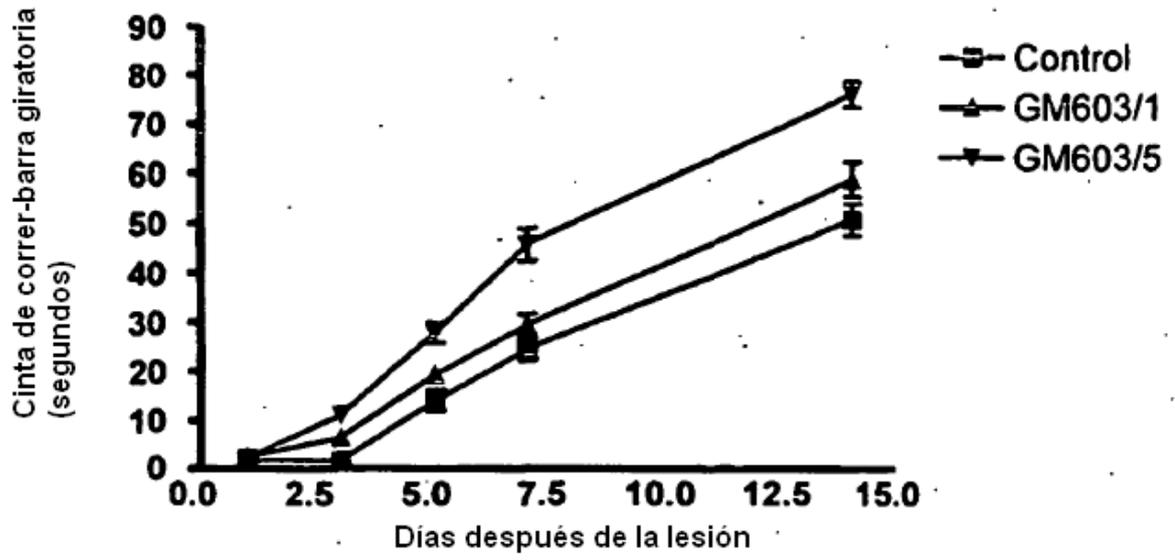


Figura 12

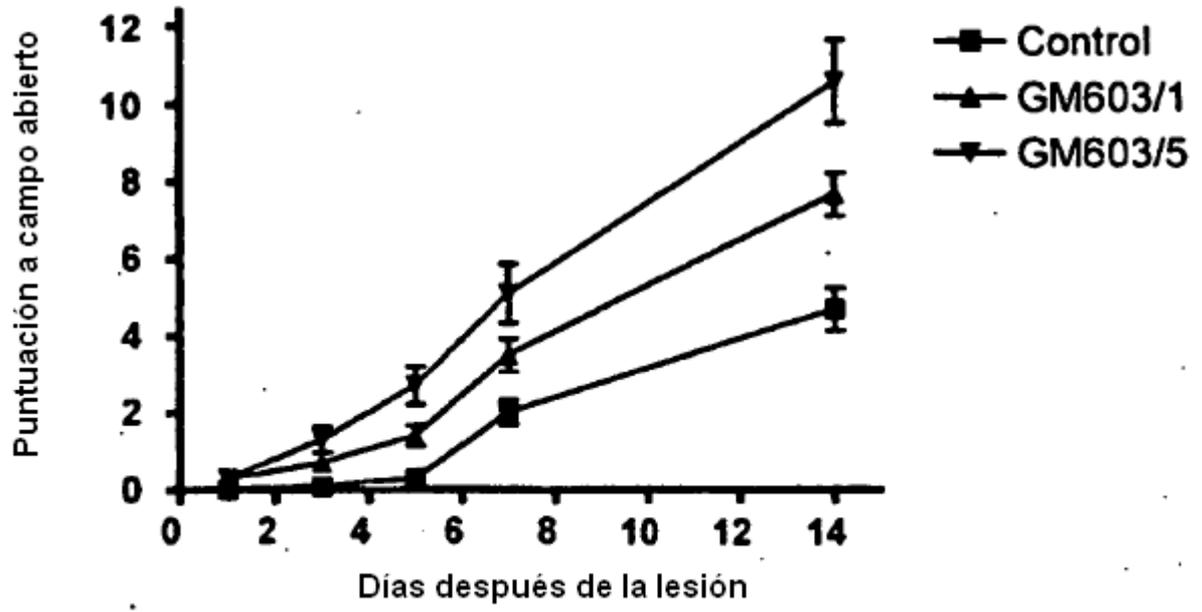


Figura 13

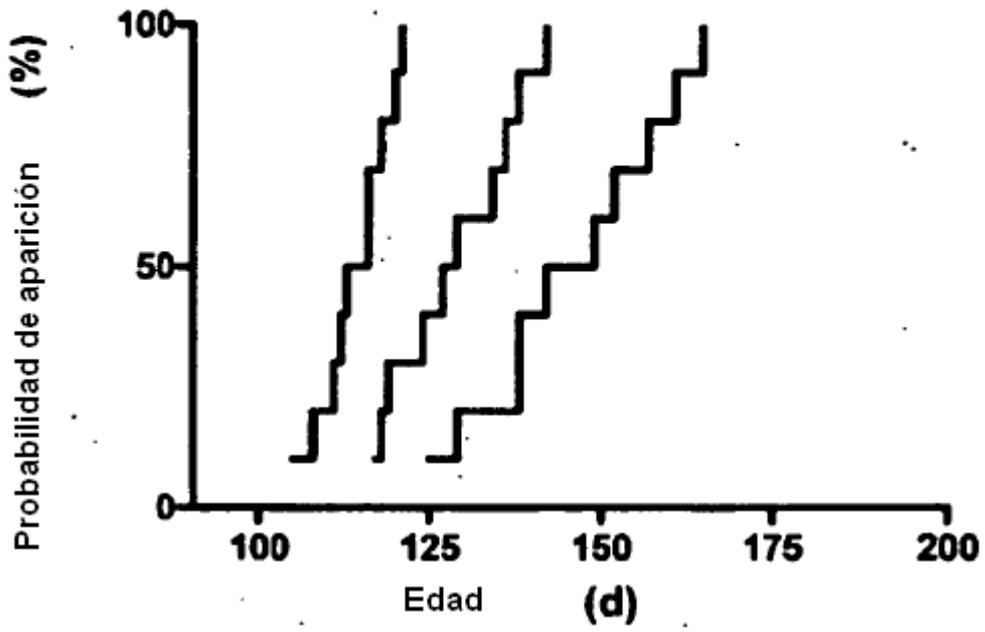


Figura 14

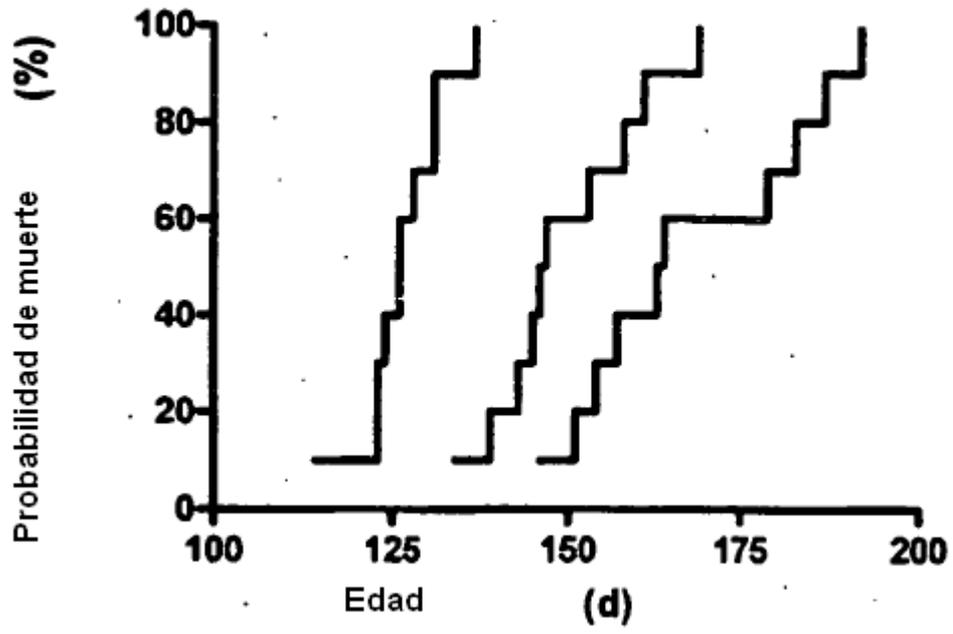


Figura 15

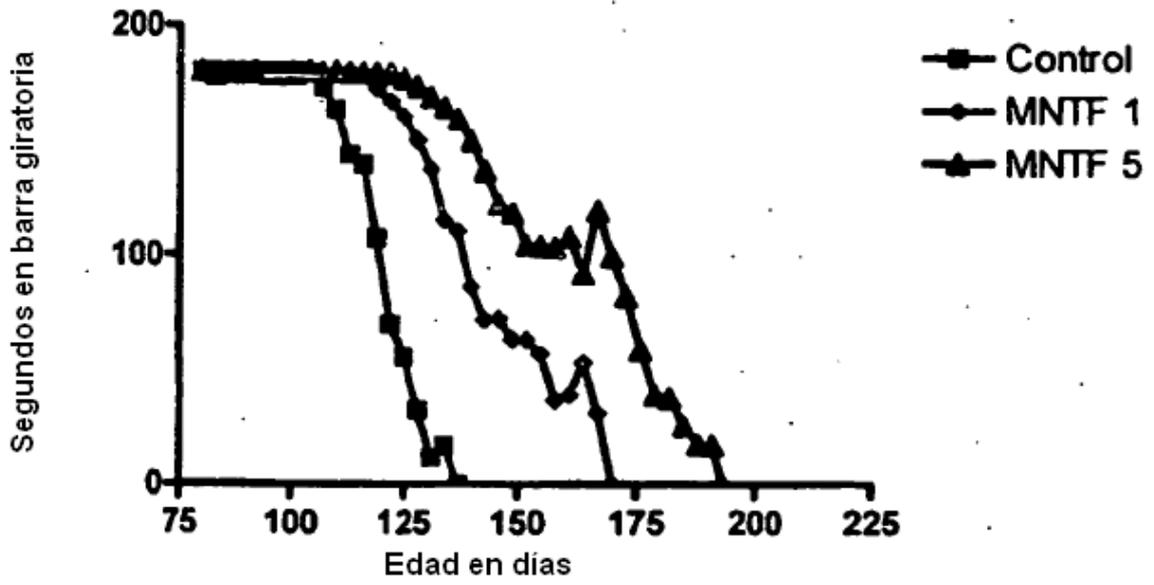


Figura 16A

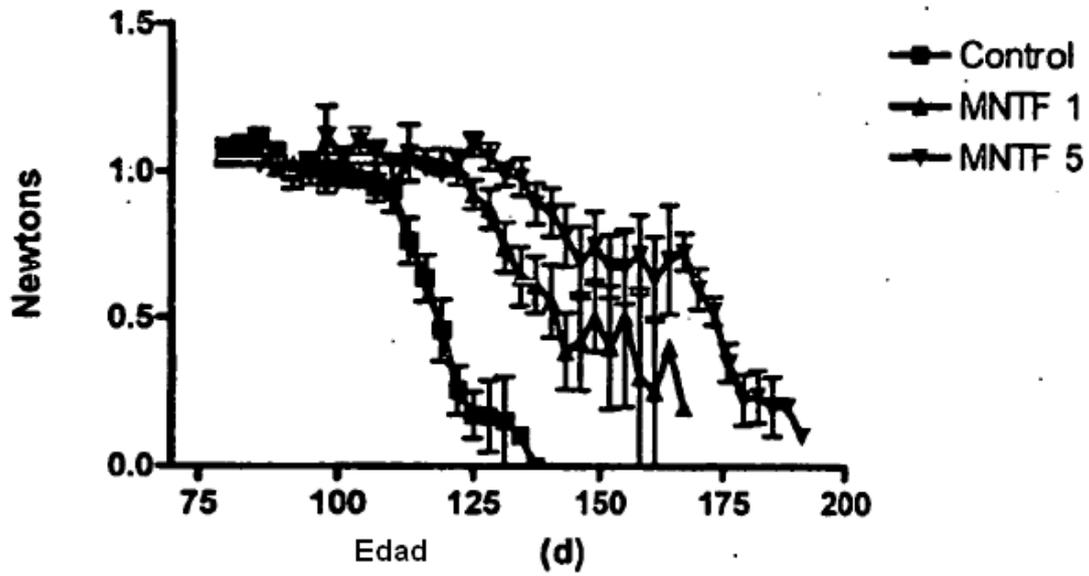


Figura 16B

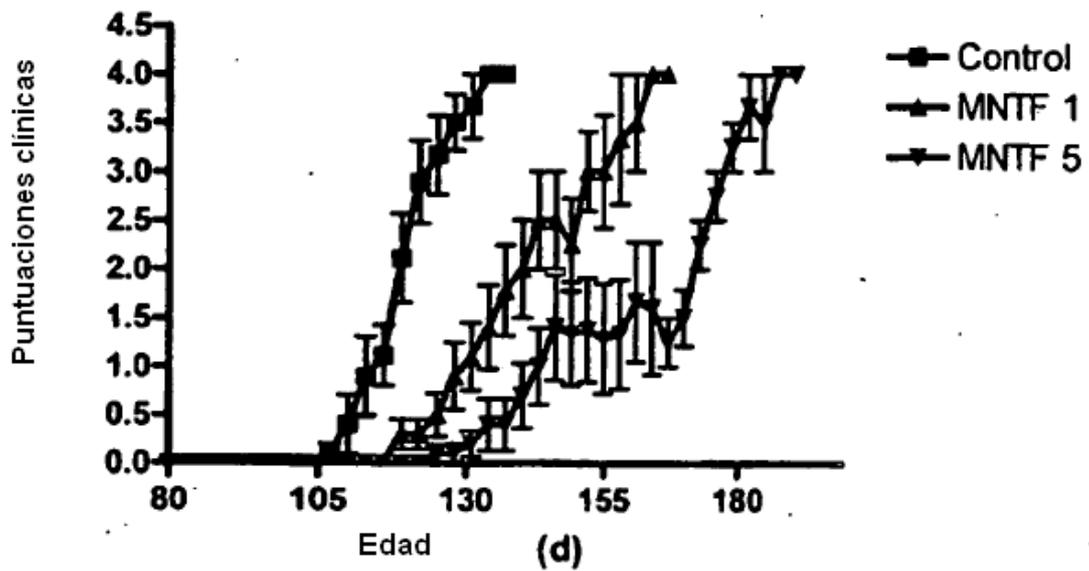


Figura 17

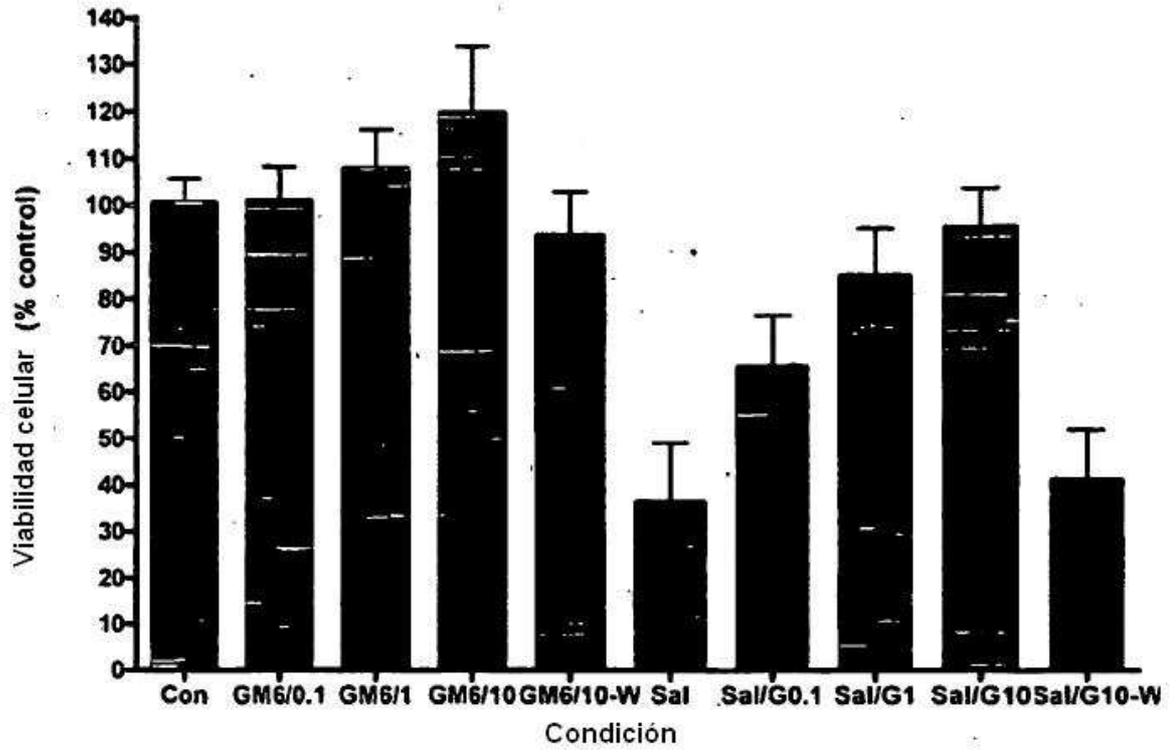


Figura 18

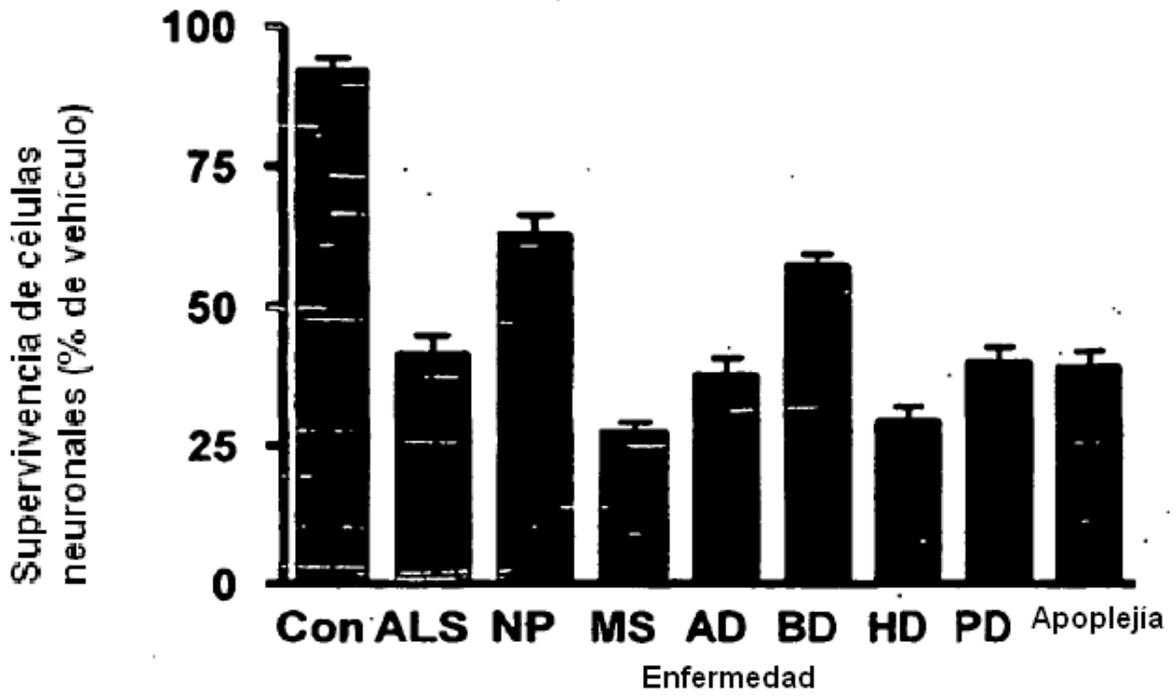
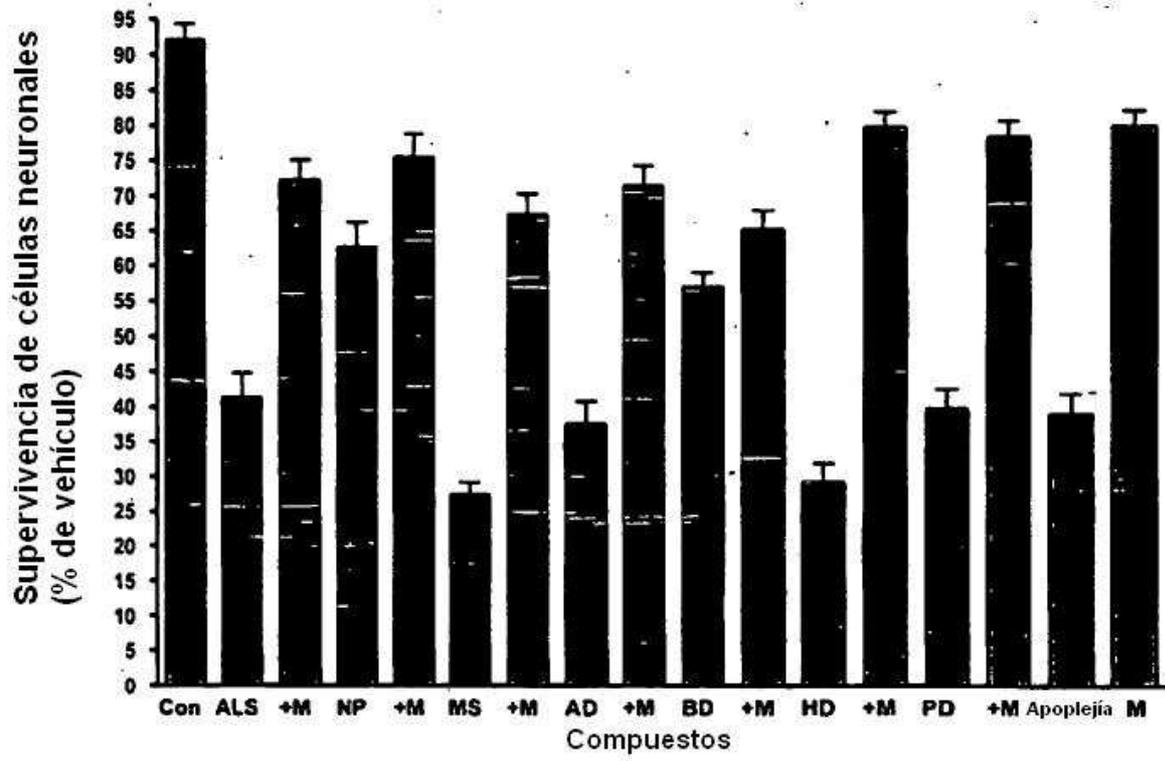
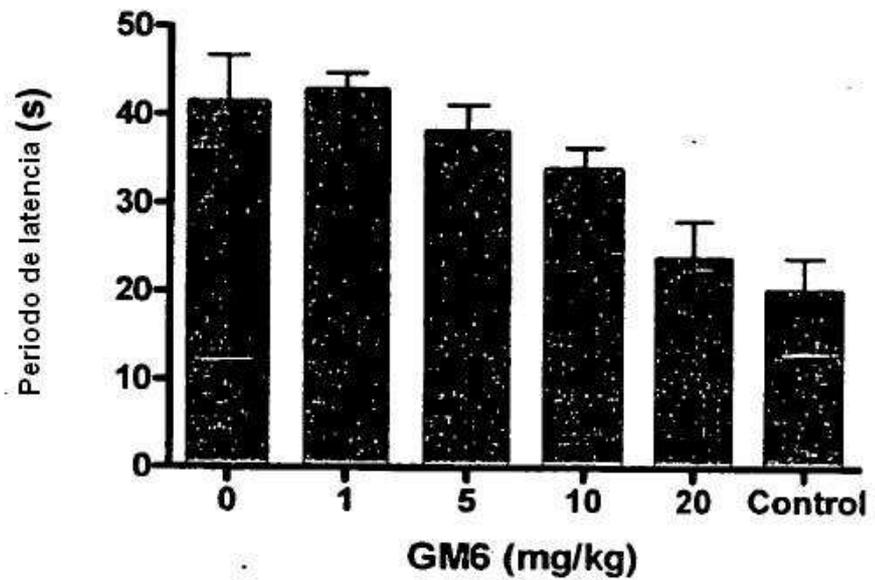
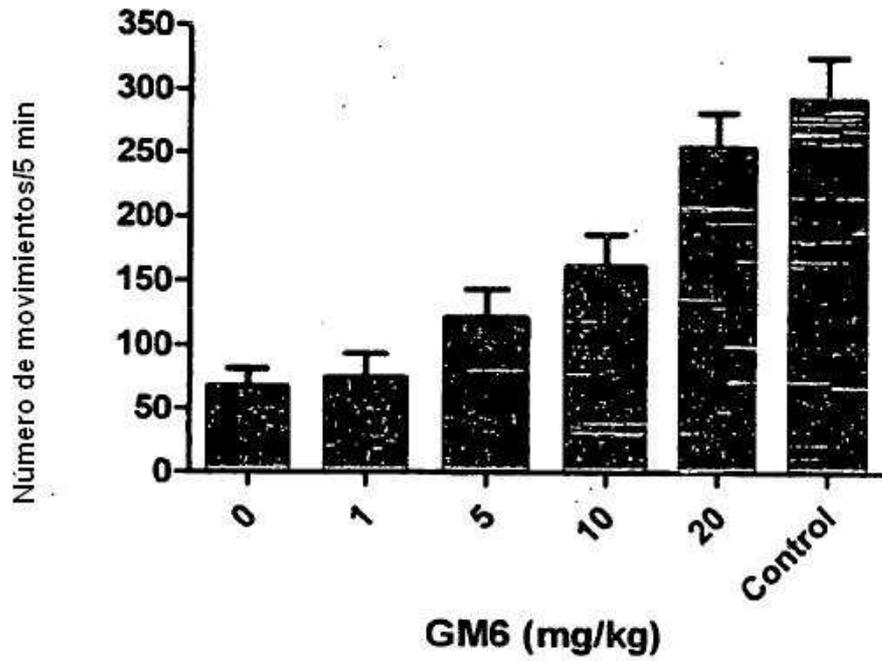


Figura 19



Figuras 20A y 20B



Figuras 21A, 21B y 21C

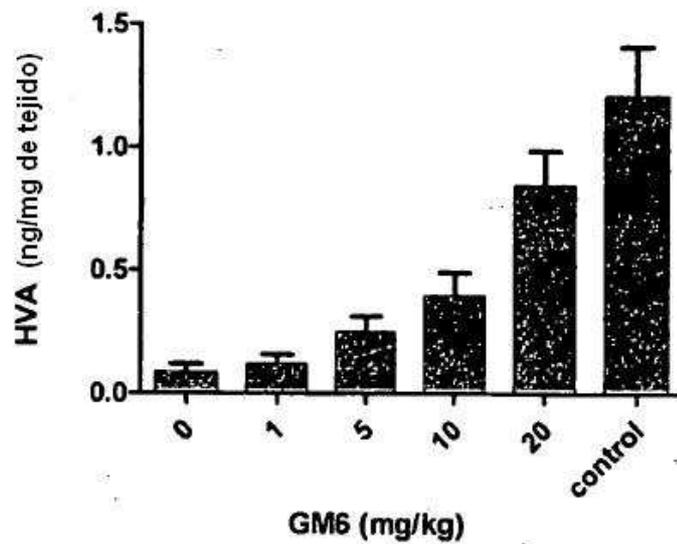
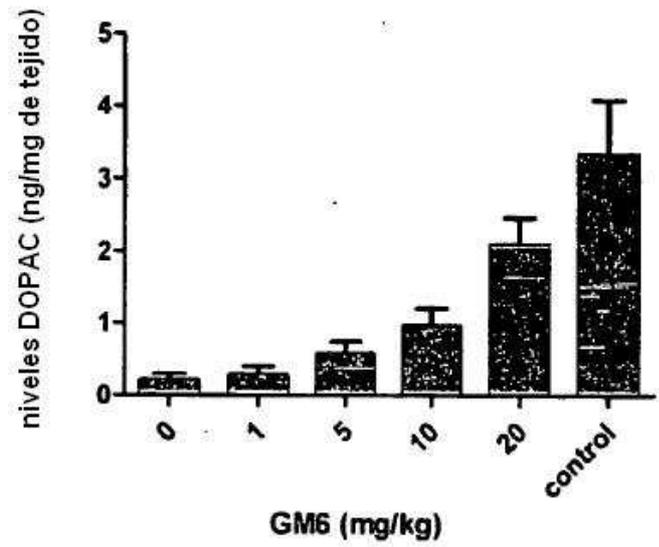
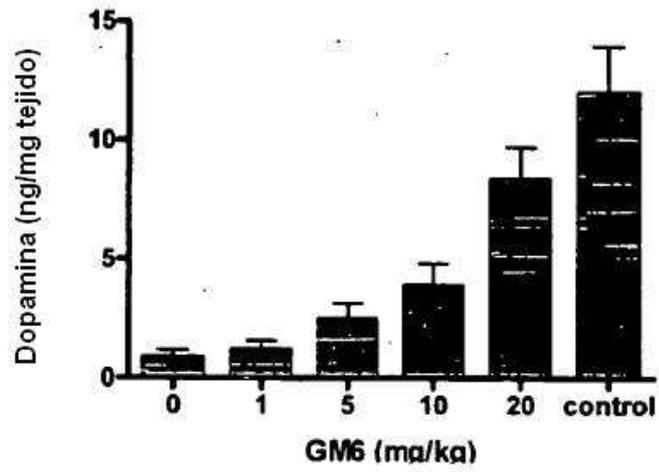


Figura 22

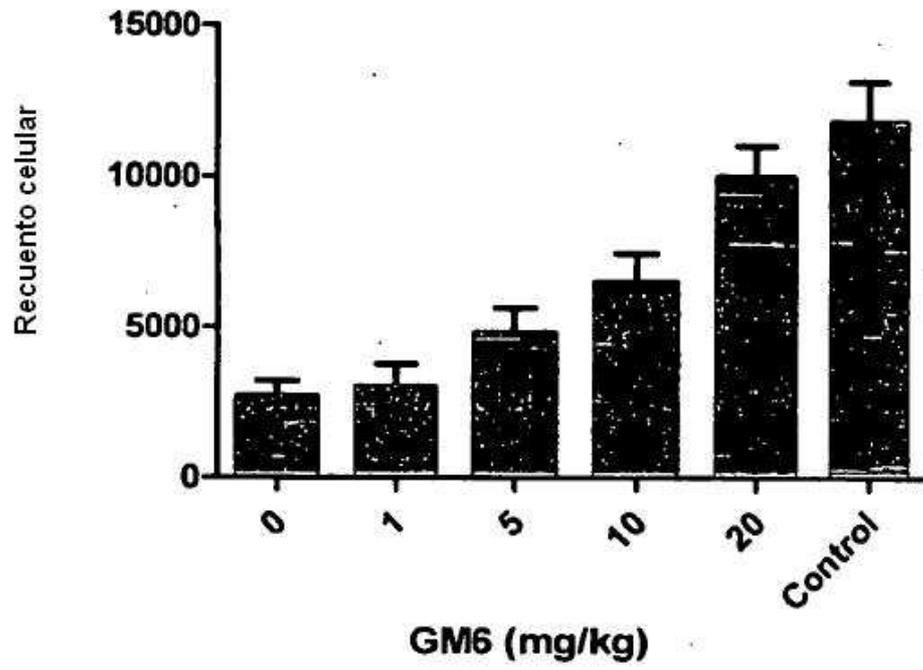


Figura 23

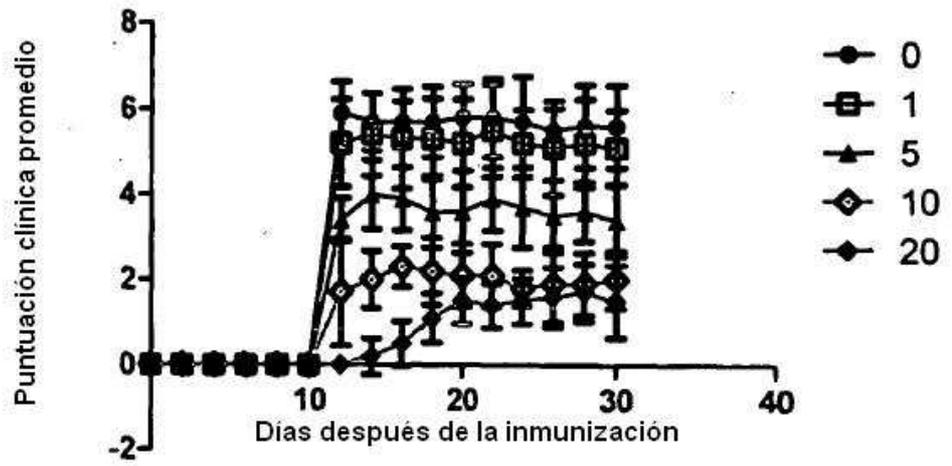


Figura 24A

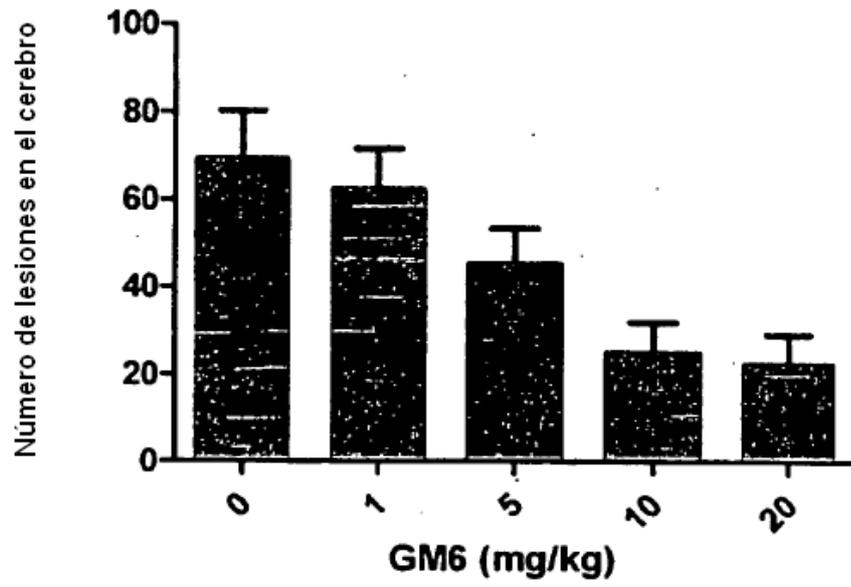


Figura 24B

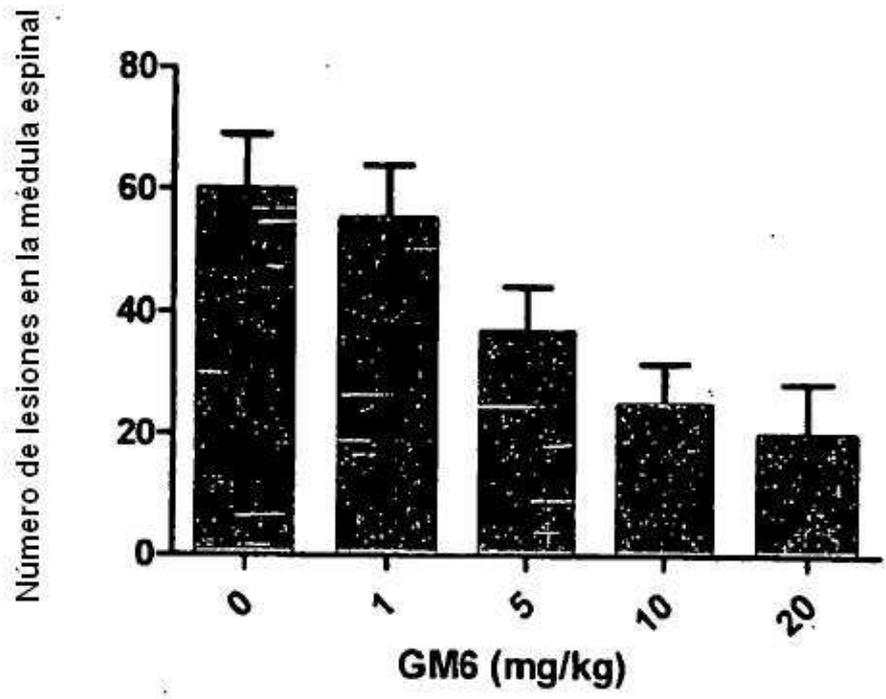
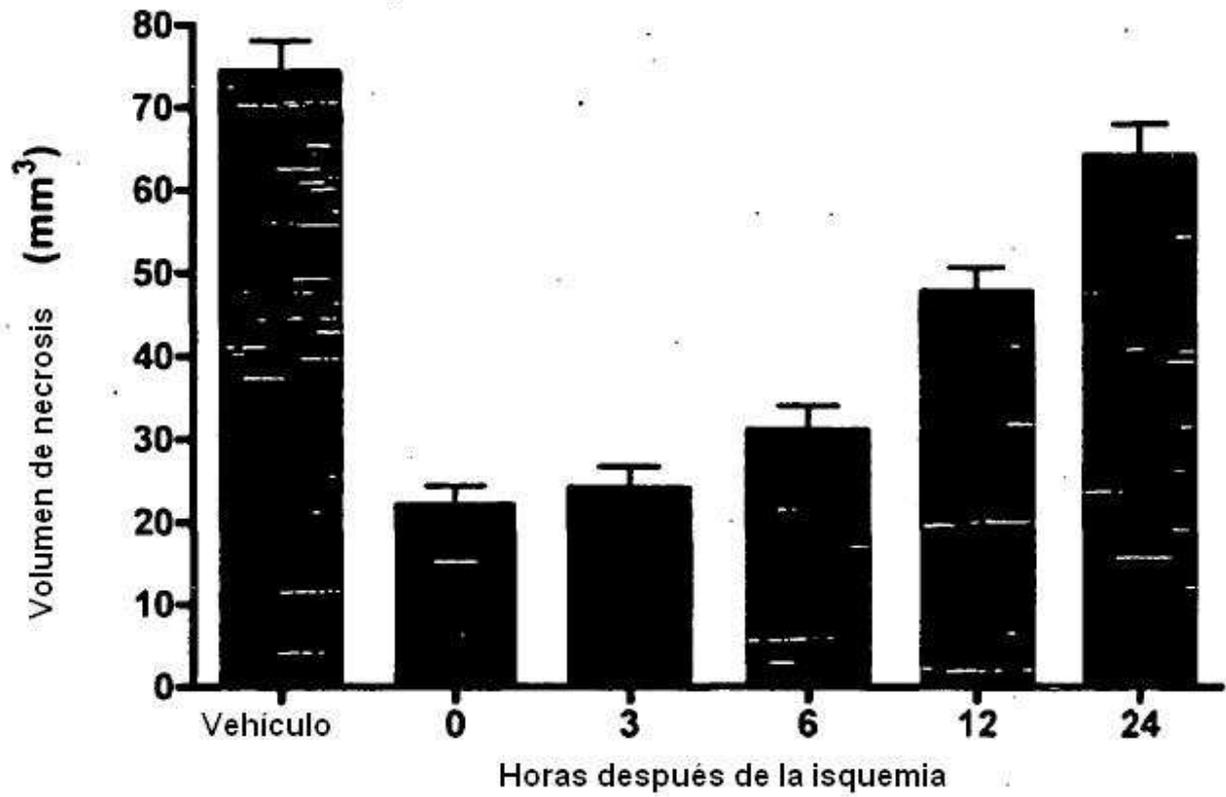


Figura 25A

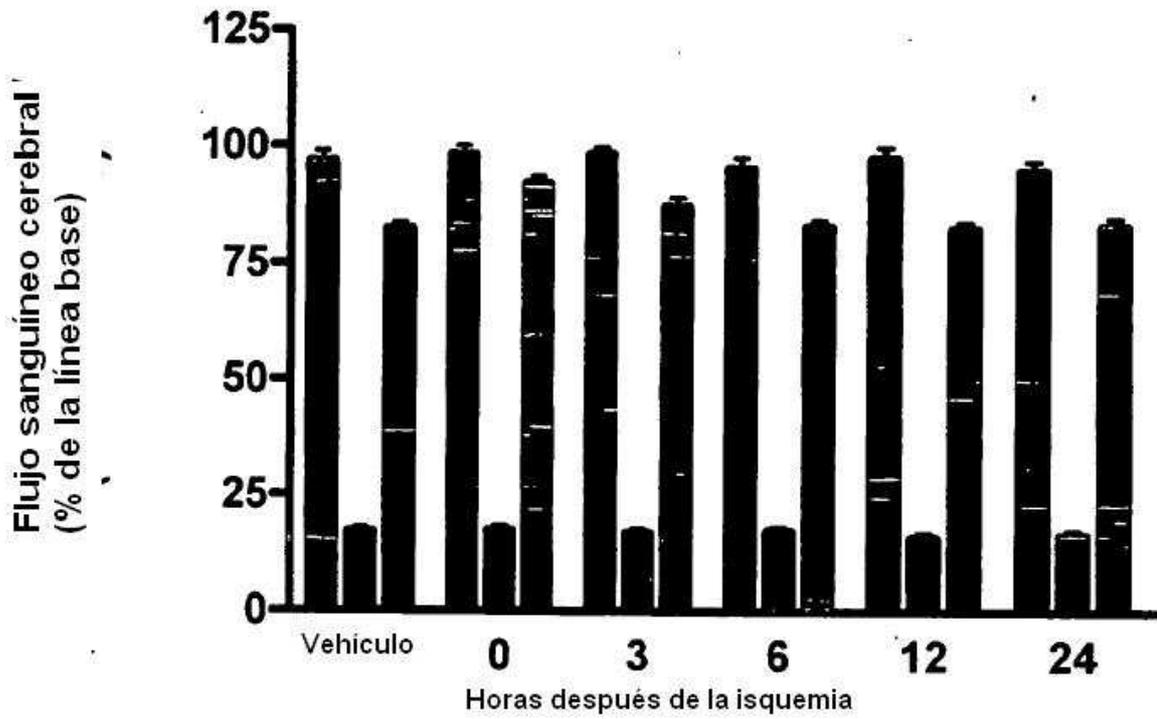
L	G	T	F	W	G	D	T	L	N	C	W	M	L	S	A	F	S	R	Y	A	R	C	L	A	E	G	H	D	G	P	T	Q	SEQ ID NO
																F	S	R	Y	A	R												2
				W							M	L	S	A	F	S																	3
											M	L	S	A	F	S	R																8
												L	S	A	F	S	R	Y															9
													S	A	F	S	R	Y	A														10
														A	F	S	R	Y	A	R													11
															F	S	R	Y	A	R	C												12
										C	W	M	L	S	A	F	S																13
				W							M	L	S	A	F	S	R																14
											M	L	S	A	F	S	R	Y															15
												L	S	A	F	S	R	Y	A														16
													S	A	F	S	R	Y	A	R													17
														A	F	S	R	Y	A	R	C												18
															F	S	R	Y	A	R	C	L											19
									N	C	W	M	L	S	A	F	S																20
										C	W	M	L	S	A	F	S	R															21
				W							M	L	S	A	F	S	R	Y															22
											M	L	S	A	F	S	R	Y	A														23
												L	S	A	F	S	R	Y	A	R													24
													S	A	F	S	R	Y	A	R	C												25

Figura 26



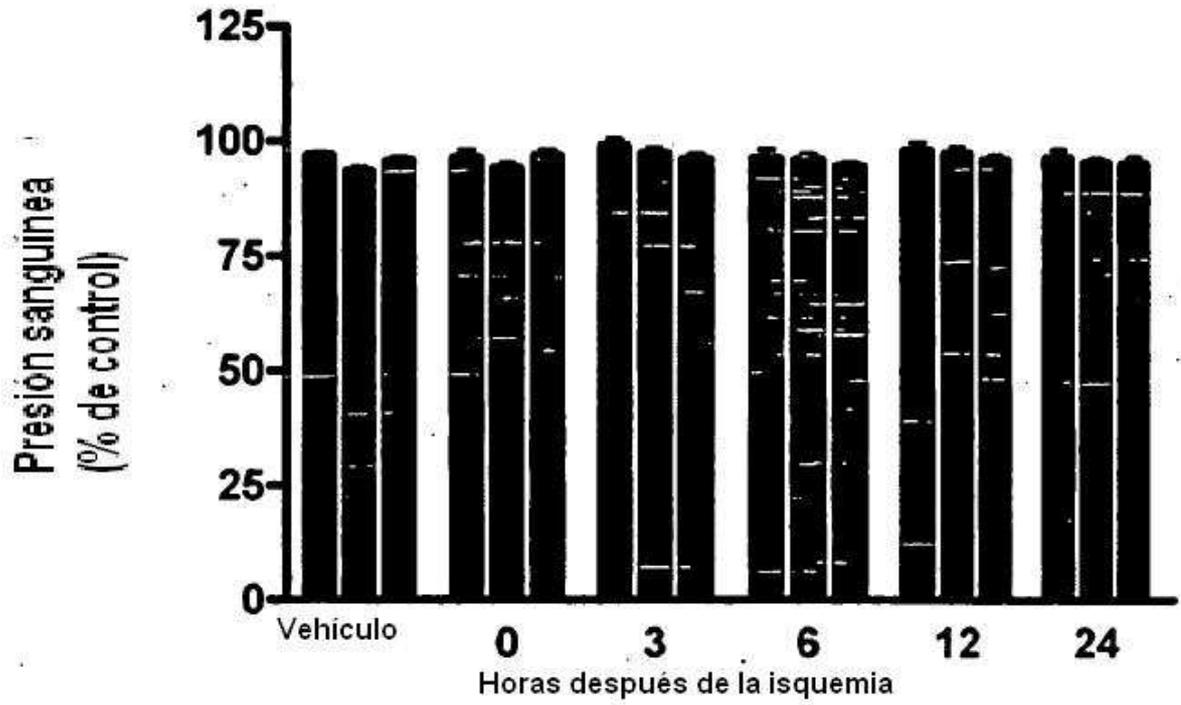
p<0,001 para grupos de 0, 3, 6, 12 horas en comparación con grupo de vehículo
p=NS para el grupo de 24 horas con respecto al grupo de vehículo

Figure 27



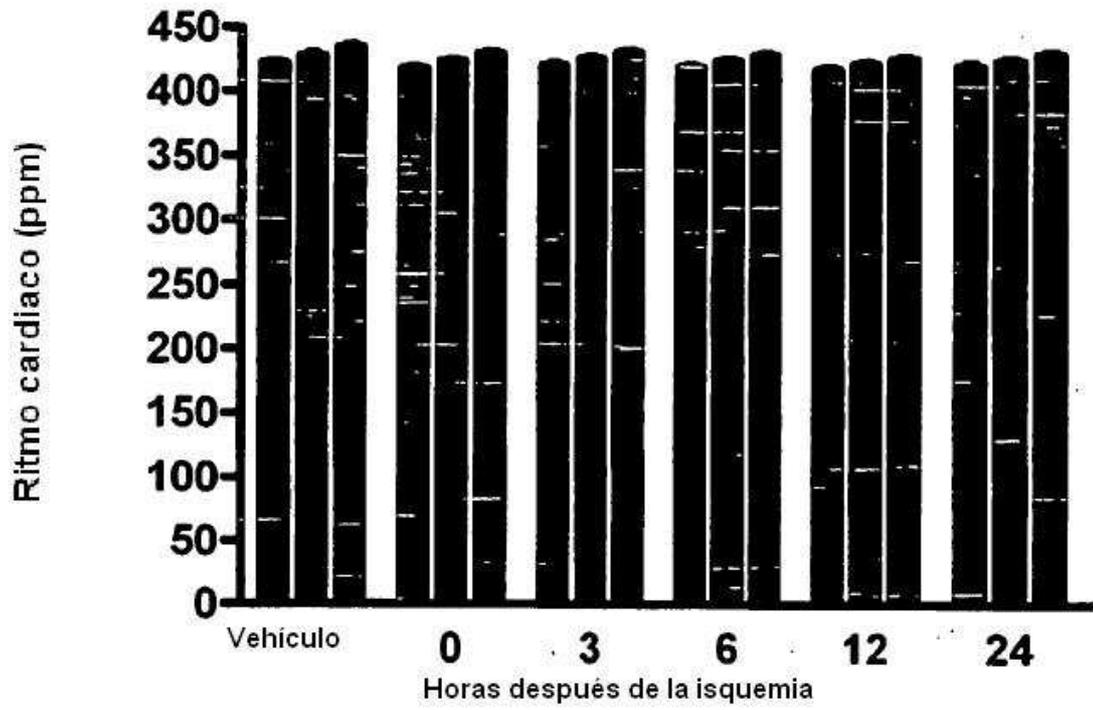
$p = NS$ para todas las muestras en comparación con el vehículo

Figura 28



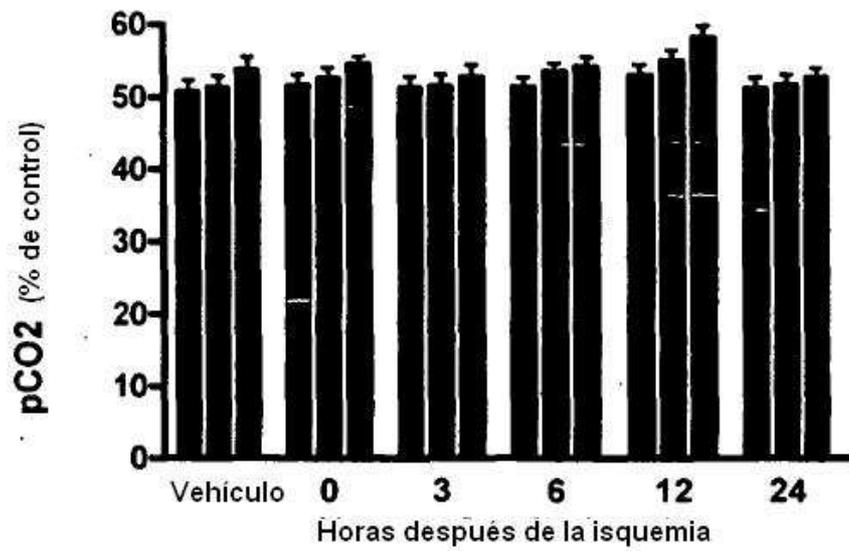
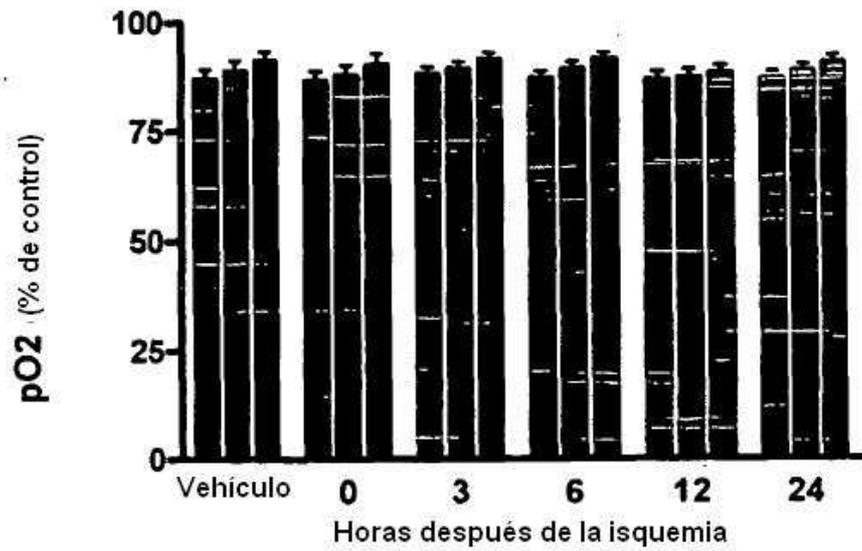
p = NS para todas las muestras en comparación con el vehículo

Figura 29



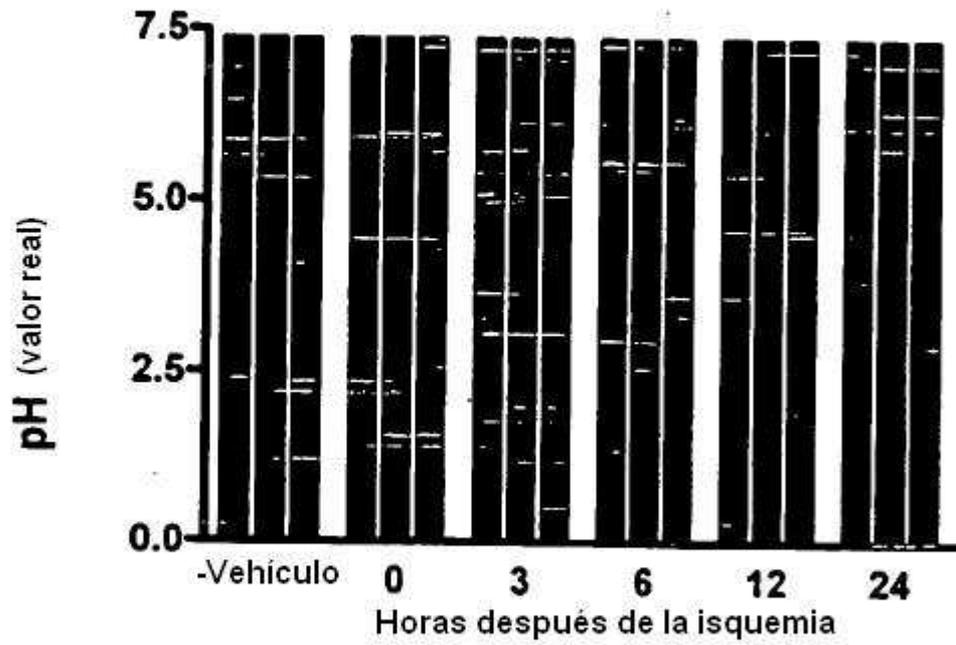
$p = \text{NS}$ para todas las muestras en comparación con el vehículo

Figuras 30A y 30B



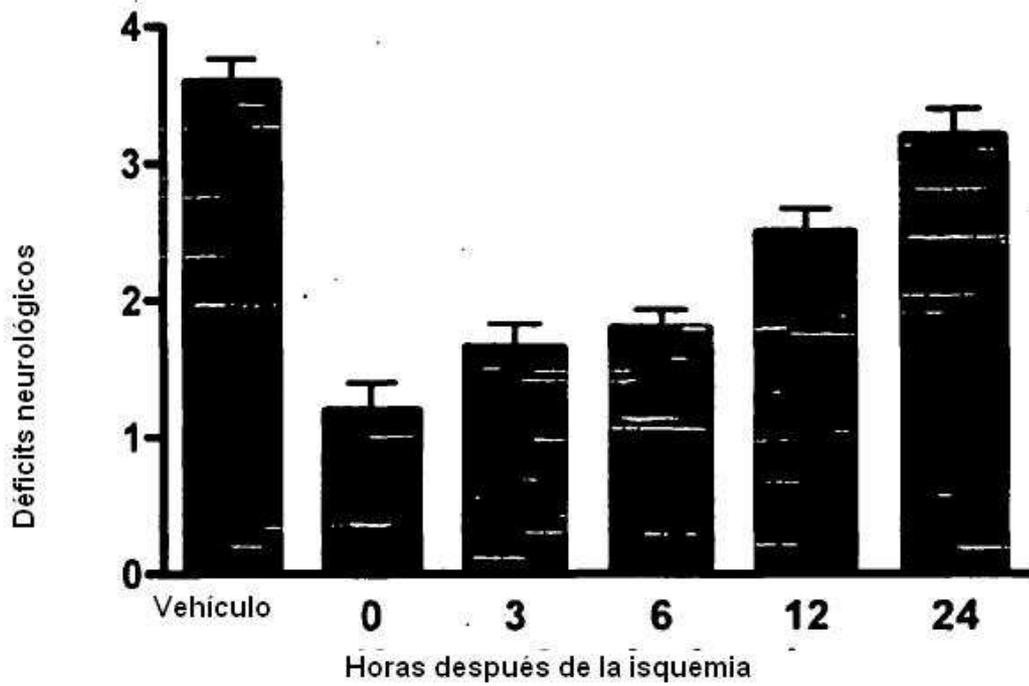
$p = NS$ para todas las muestras en comparación con el vehículo

Figura 31



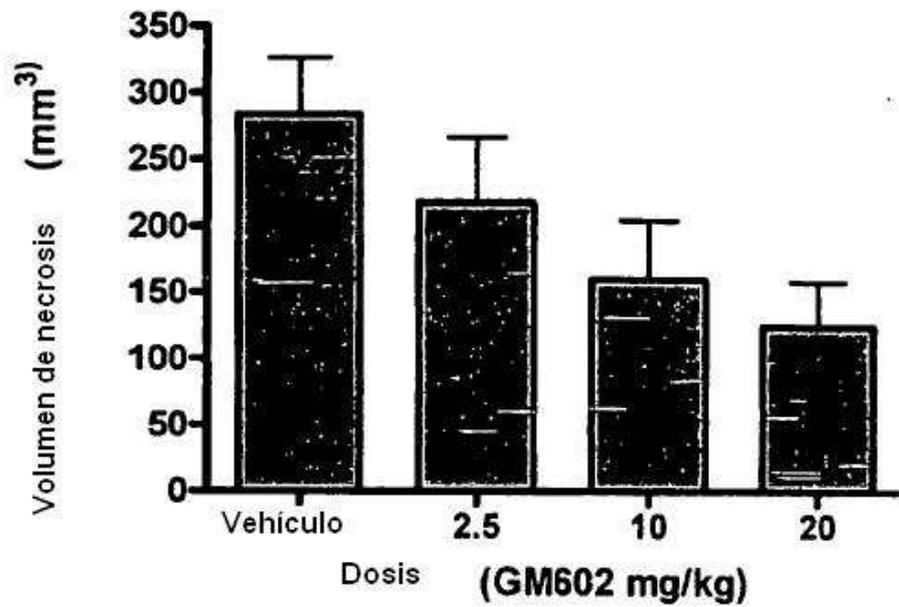
$p = \text{NS}$ para todas las muestras en comparación con el vehículo

Figura 32



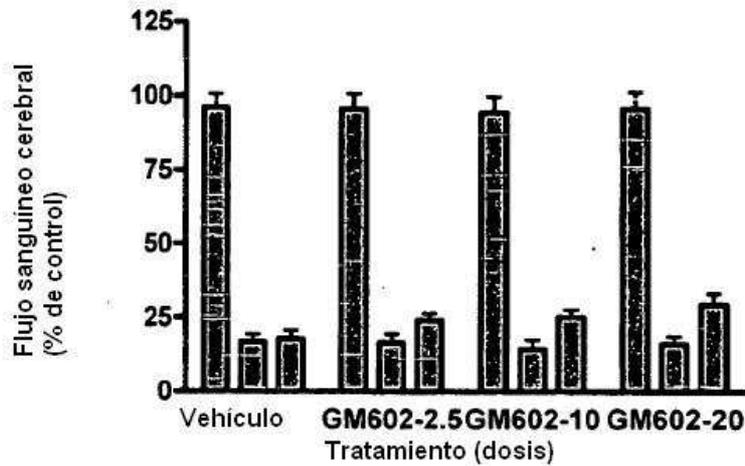
p < 0,001 para los grupos de 0, 3, 6 horas en comparación con el grupo de vehículo
p < 0,002 para el grupo de 12 horas en comparación con el grupo de vehículo
p = NS para el grupo de 24 horas en comparación con el grupo de vehículo

Figura 33



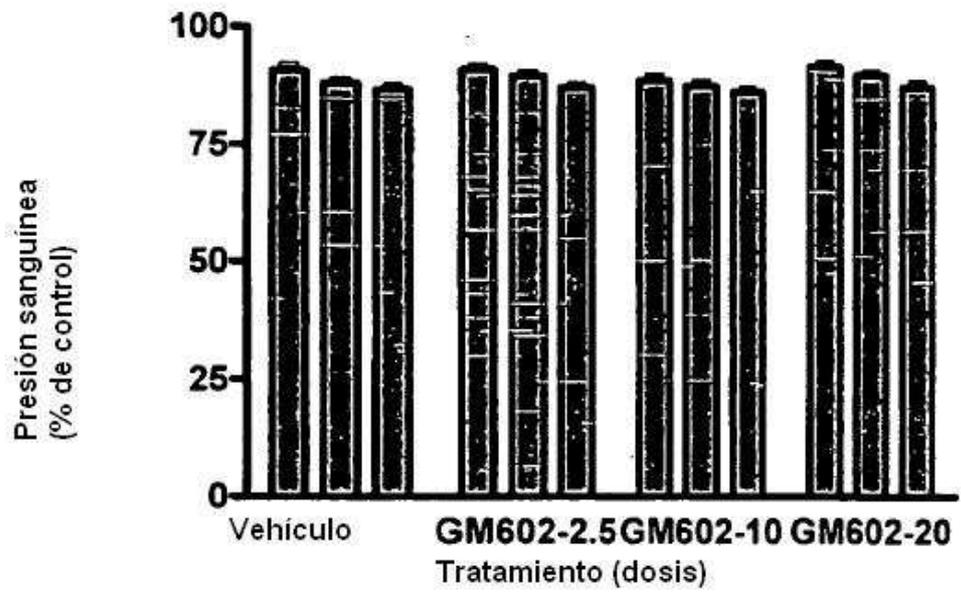
$p < 0,0045$ para el grupo de 2,5 mg/kg en comparación con el grupo de vehículo
 $p < 0,0001$ para los grupos de 10 y 20 mg/kg en comparación con el grupo de vehículo

Figura 34



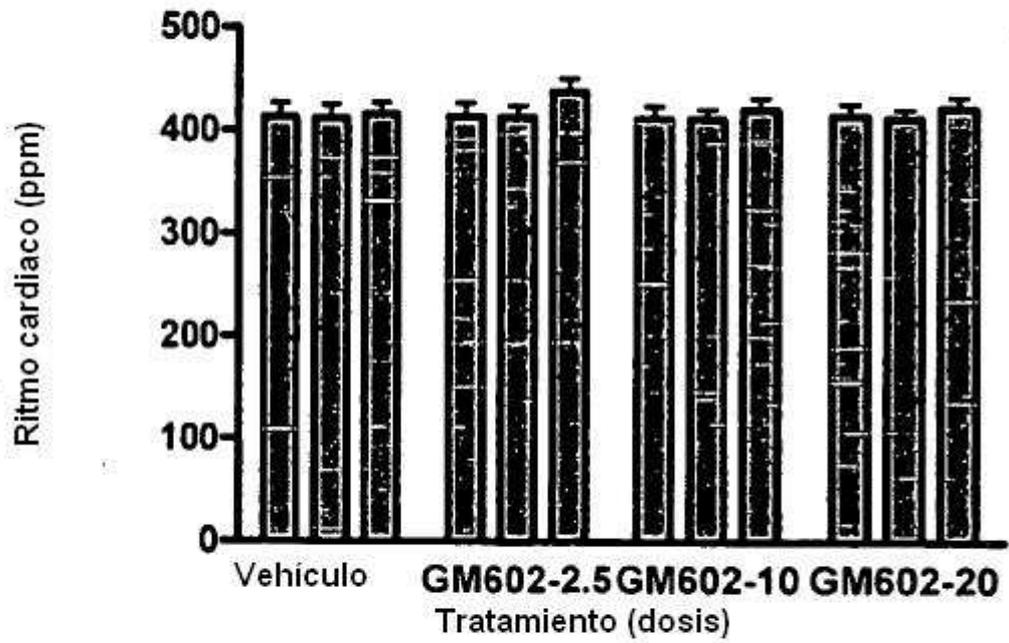
p<0,0001 para CBF de todos los grupos post-isquemia en comparación con los grupos pre-isquemia
p<NS para CBF de los grupos de vehiculo post isquemia antes vs después de la administración salina
p<0,0001 para CBF de cada grupo con GM602 post isquémico permanente antes vs después de la administración de GM602

Figura 35



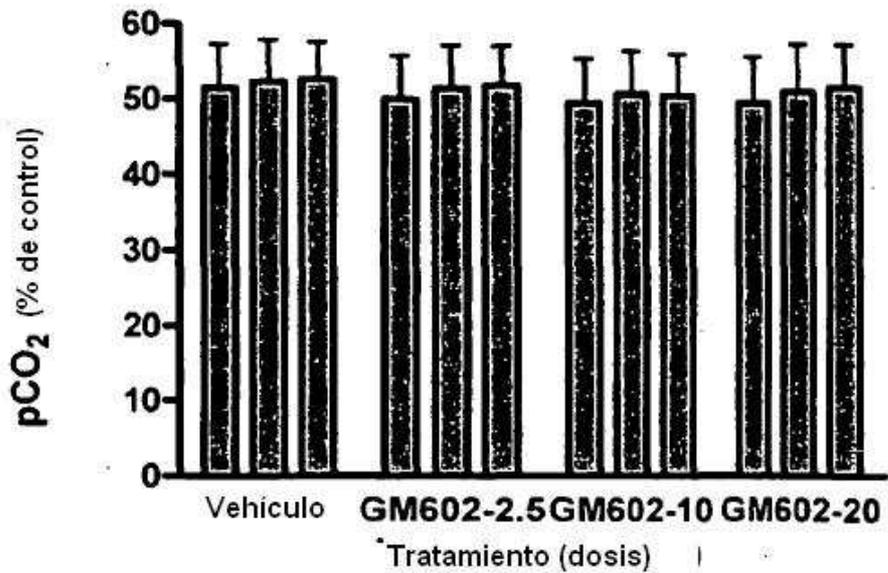
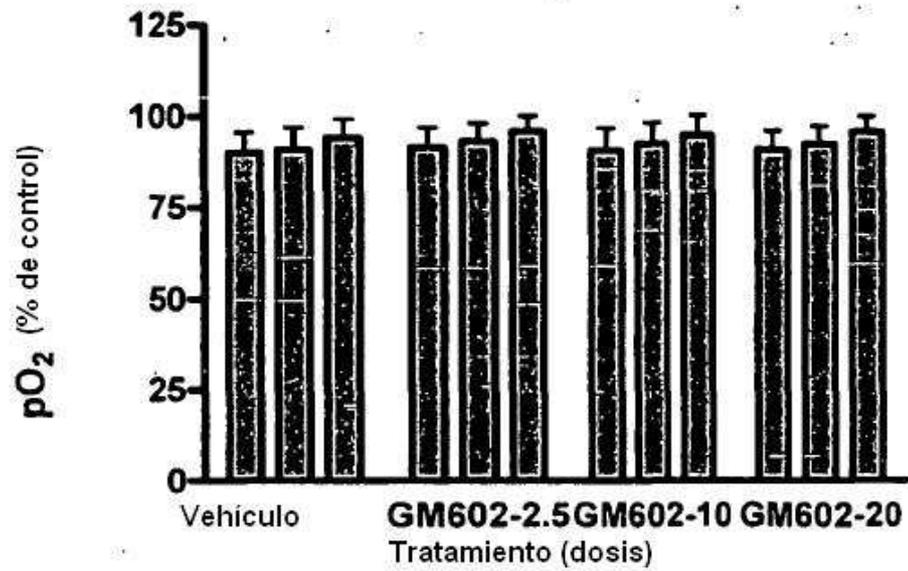
$p = NS$ para todos los grupos en comparación con el control

Figura 36



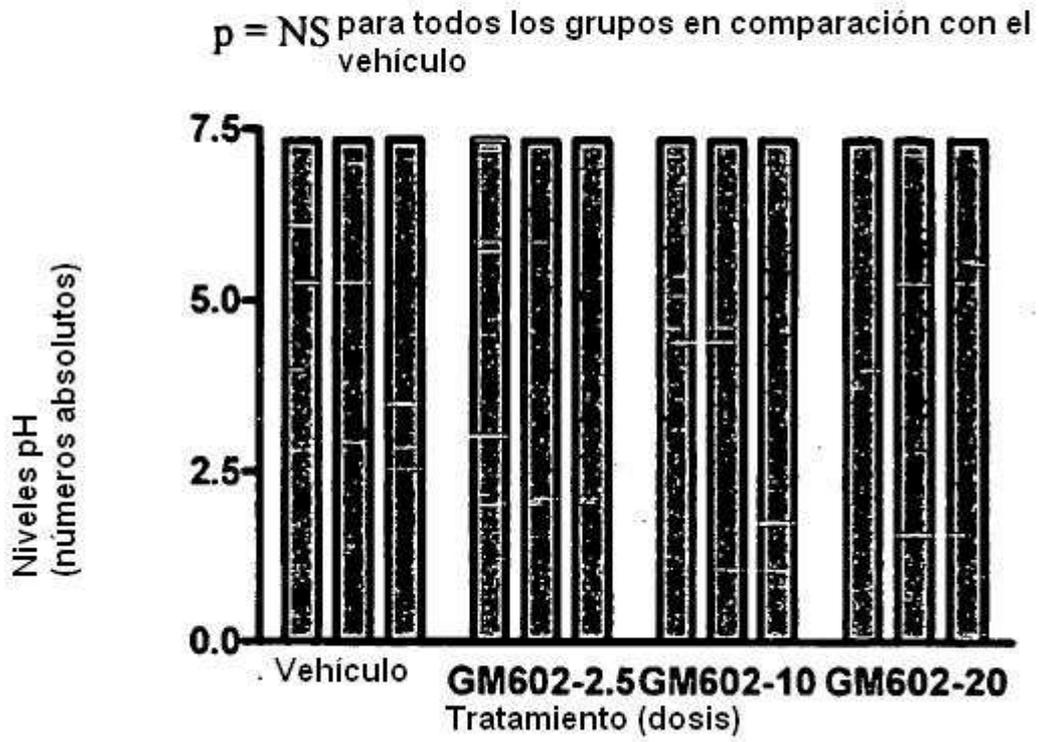
$p = NS$ para todos los grupos en comparación con el vehiculo

Figuras 37A y 37B



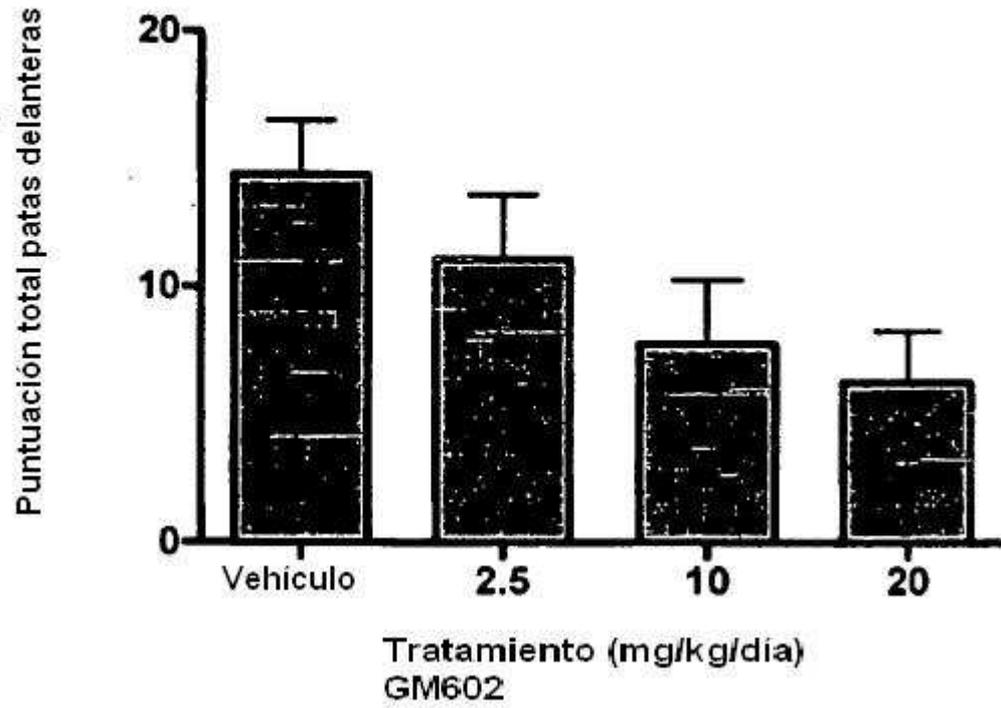
p = NS para todos los grupos en comparación con el vehículo

Figura 38



Figuras 39A-39D

39A. Colocación patas delanteras



Figuras 39B. Colocación patas traseras

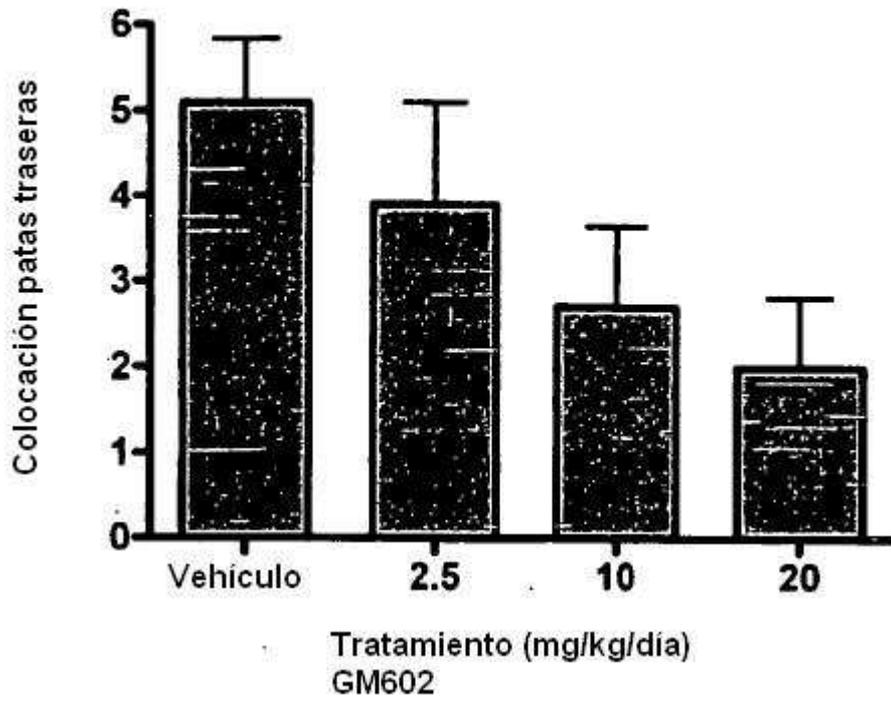


Figura 39C. Equilibrio en la barra

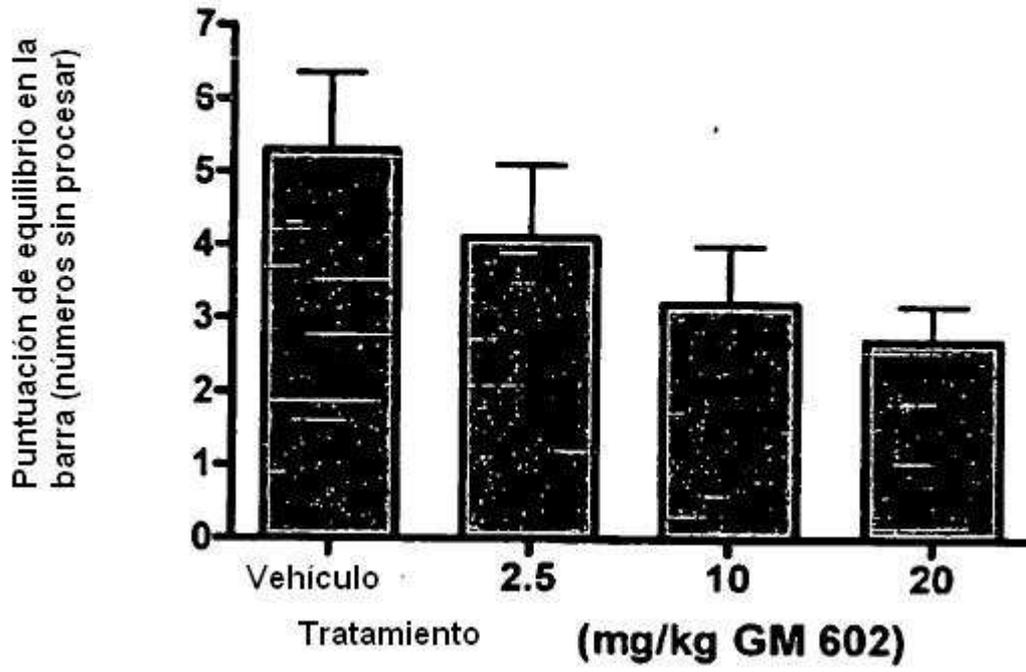


Figura 39D. Locomoción espontánea

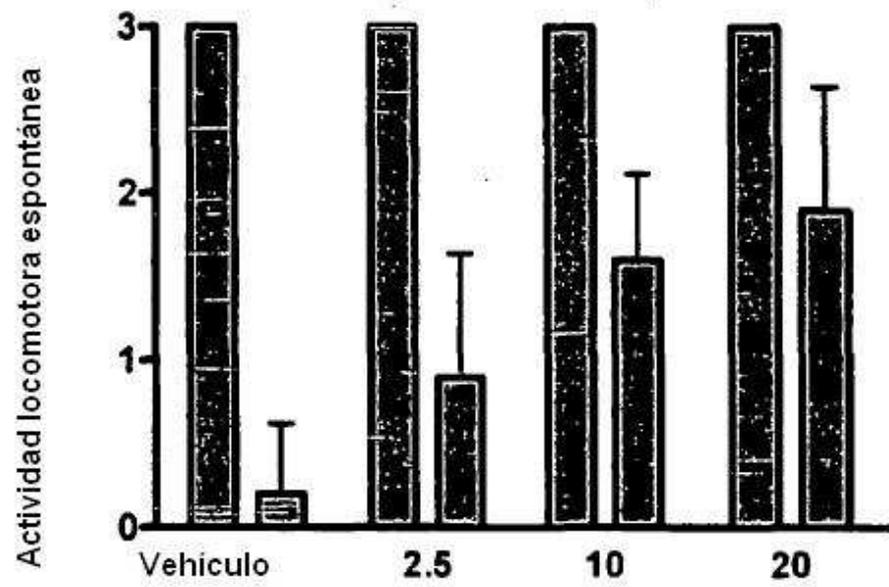
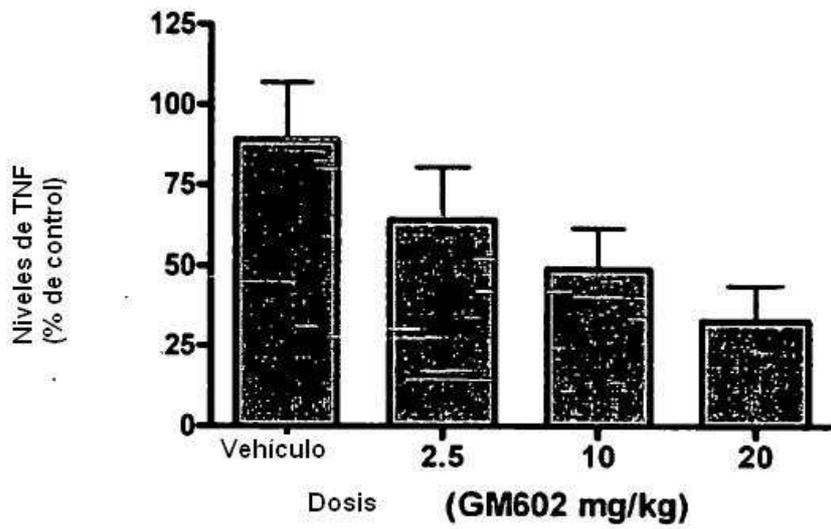


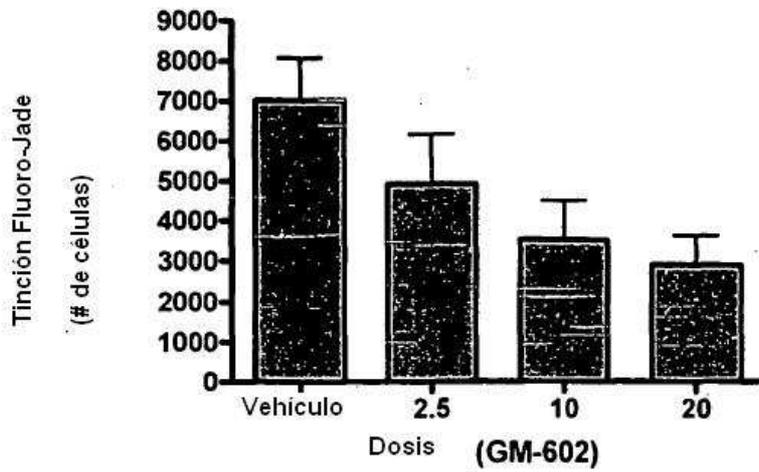
Figura 40



$p < 0,005$ para el grupo tratado con GM602 2,5 mg/kg en comparación con el grupo tratado con vehículo

$p < 0,0001$ para grupos tratados con GM602 10 y 20 mg/kg en comparación con el grupo tratados con vehículo

Figura 41:



p=0,0007 para el grupo tratado con GM602 2,5 mg/kg en comparación con el grupo tratado con vehículo
 p<0,0001 para los grupos tratados con GM602 10 y 20 mg/kg en comparación con el grupo tratado con vehículo