

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 568**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2008 E 08840727 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2212349**

54 Título: **Análogos sintéticos de péptidos de regeneración neuronal**

30 Prioridad:

**17.10.2007 US 999292 P**

**18.10.2007 US 999503 P**

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

**11.12.2013**

73 Titular/es:

**CURONZ HOLDINGS COMPANY LIMITED  
(100.0%)**

**Level 1, 29 Nugent Street  
Auckland, NZ**

72 Inventor/es:

**HARRIS, PAUL, WILLIAM, RICHARD;  
BRIMBLE, MARGARET, ANNE y  
SIEG, FRANK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 433 568 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

Análogos sintéticos de péptidos de regeneración neuronal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos sintéticos de péptidos de acuerdo con las reivindicaciones que tienen propiedades de regeneración neuronal, migración, proliferación, diferenciación y/o crecimiento axonal. Estos péptidos se denominan "Péptidos de Regeneración Neuronal" o "PRN." En particular, la presente invención se refiere a análogos de péptidos relativamente cortos de acuerdo con las reivindicaciones que tienen una o más propiedades biológicas de los PRN.

**Antecedentes**

15 Los péptidos de regeneración neuronal (PRN) son una clase de péptidos que se ha demostrado que presentan propiedades deseables para promover la función neuronal en mamíferos. Estas funciones incluyen supervivencia neuronal, proliferación neuronal, crecimiento neuronal, migración neuronal y diferenciación neuronal. Anteriormente se han descrito diversos PRN, e incluyen los desvelados en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos Nos 10/225.838 y 10/976.699, PCT/US02/026782, PCT/US2004/036203, PCT/US2006017534 (WO 2006/121926) y 20 PCT/US2006026994.

**Resumen**

25 Los PRN descritos hasta ahora tienen propiedades farmacodinámicas deseables y promueven la regeneración neuronal, migración, proliferación, diferenciación y/o crecimiento axonal. Recientemente se han descubierto análogos de PRN sintéticos que también tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas. Existe una necesidad en la técnica de moléculas sintéticas o péptidos modificados que tengan propiedades farmacodinámicas deseables similares a las de los PRN pero que también tengan propiedades farmacocinéticas mejoradas y/o sean químicamente estables.

30 Determinados aspectos de la presente incluyen nuevas moléculas de análogos de PRN sintéticos que pueden usarse para tratar trastornos del sistema nervioso central u otros sistemas en los que los PRN son eficaces. Otro aspecto es proporcionar terapias para trastornos de degeneración y muerte celular, incluyendo determinados trastornos del sistema nervioso. En algunos aspectos, los análogos de PRN sintéticos pueden usarse para tratar efectos adversos de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), esclerosis múltiple (EM), estrés oxidativo (por ejemplo, enfermedad de Huntington) o neuropatía periférica (NP). Un aspecto adicional de la presente invención es la producción de análogos de PRN con estabilidad mejorada.

40 Debe entenderse que las expresiones "compuesto PRN", "análogo de PRN", "SEC ID N°:" y otras expresiones de este tipo, para simplificar, se usan para identificar las moléculas de la invención y no para proporcionar su completa caracterización. Por tanto, en el presente documento, un "análogo de PRN" puede caracterizarse por tener una secuencia de aminoácidos particular, una representación de la estructura bidimensional particular, pero se entiende que la molécula en sí reivindicada tiene otras características, incluyendo estructura 3-dimensional, movilidad sobre determinados enlaces y otras propiedades de la molécula en su conjunto. Las moléculas en sí mismas y sus propiedades son, en general, los objetos de la presente invención.

También debe entenderse que la denominación de un péptido como un "PRN" no significa que este tenga exclusivamente efectos neuronales. Más bien, la expresión PRN pretende incluir péptidos que tengan componentes estructurales similares, como se describe en las solicitudes de patente anteriores, aunque puedan tener efectos sobre otros tipos de células, tejidos y/u órganos. En determinadas realizaciones, se proporcionan análogos de PRN relativamente cortos que pueden tener mayor estabilidad, debido, al menos en parte, a una menor degradación enzimática. En otras realizaciones, se proporcionan análogos de PRN que tienen aminoácidos modificados. En otras realizaciones adicionales, se proporcionan análogos de PRN que tienen sustituyentes no aminoácidos que reemplazan aminoácidos.

**Breve descripción de las figuras**

La presente invención se describirá con referencia a sus realizaciones específicas. Otras características y aspectos de la presente invención pueden apreciarse por referencia a las Figuras, en las que:

60 La **Figura 1** representa un gráfico de efectos neuroprotectores de dos PRN, la SEC ID N° 5 de la presente invención y la SEC ID N° 1 en cultivos celulares expuestos a la neurotoxina 3-NP.

La **Figura 2** representa un gráfico de resultados de estudios de efectos neuroprotectores de la SEC ID N° 1 en el que el péptido se conservó - 20 °C y a - 4 °C.

65 La **Figura 3** representa un gráfico de resultados de estudios de efectos neuroprotectores de la SEC ID N° 5 de la presente invención en el que el péptido se conservó a -20 °C o - 4 °C.

La **Figura 4** representa un gráfico de resultados de un estudio ampliado de efectos neuroprotectores de la SEC ID N° 5 de la presente invención y de la SEC ID N° 1 en cultivos celulares tratados con la neurotoxina 3-NP, similares a los mostrados en la **Figura 1**.

La **Figura 5** representa un gráfico que muestra efectos significativos a largo plazo de la secuencia REGRRDAPGRAGG (SEC ID N° 12) de la presente descripción disminuyendo la gravedad de disfunción motora en animales con EAE, cuando el PRN sintético se administró en el punto máximo de la enfermedad. La puntuación 1 es la puntuación más baja y solo implica una cola flácida, mientras que las puntuaciones más altas implican debilidad (puntuación 2) o parálisis completa de las patas traseras (puntuación 3). Para el análisis estadístico se utilizó el ensayo de Kruskal-Wallis; \*\*  $p < 0,01$  frente puntuación del día 1 de tratamiento (datos expresados como media  $\pm$  ETM).

La **Figura 6** representa un gráfico de resultados de puntuaciones de marcha en barra de equilibrio (*beam walking*) de ratas con neuropatía periférica inducida por piridoxina (800 mg/kg/día) y tratadas con vehículo o con la SEC ID N° 5 de la presente invención a dos dosis diferentes.

La **Figura 7** representa un gráfico de resultados de puntuaciones de marcha en barra de equilibrio de ratas con neuropatía periférica inducida por piridoxina (1.200 mg/kg) y tratadas con vehículo o con la SEC ID N° 5 de la presente invención.

La **Figura 8** representa gráficos de resultados de estudios de longevidad de ratones con un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y los efectos de dos dosis diferentes de un PRN sintético de la presente invención, SEC ID N° 5.

### Descripción detallada

En la presente descripción, se proporcionan compuestos PRN que tiene una secuencia de un péptido nativo. Por ejemplo, un PRN de este tipo es un péptido que tiene una longitud de 11 aminoácidos (11 unidades) con la siguiente estructura.



Debe apreciarse que los compuestos sintéticos o análogos de los PRN pueden tener extremos C amidados o pueden tener restos hidroxilo (OH) C terminales. También debe apreciarse que las expresiones "compuesto PRN", "análogo de PRN" y expresiones similares se refieren a compuestos de la presente invención o a péptidos PRN o a proteínas PRN previamente descritos.

### Análogos sintéticos de los PRN

La presente invención proporciona análogos sintéticos de los PRN que pueden tener uno o más de los siguientes tipos de modificaciones: (1) estabilización de giros  $\beta$ , (2) reemplazo de restos de glicina, (3) reemplazo del resto de glicina N terminal y/o (4) ciclado.

#### 1. Estabilización de giros $\beta$

Las probabilidades de Chou y Fasman para la predicción de giros  $\beta$  revelan que en la SEC ID N° 1 pueden encontrarse giros  $\beta$  probables en los dominios APGR (SEC ID N° 2) y RAGG (SEC ID N° 3), como se indica a continuación en negrita:



Los giros  $\beta$  pueden estabilizarse introduciendo impedimentos estéricos tales como aminoácidos alquilados. Entre los aminoácidos fáciles de conseguir que pueden usarse se incluyen el ácido aminoisobutírico (Aib,  $\alpha$ -H en alanina reemplazada con metilo) que puede usarse como un reemplazo para cualquiera o ambos restos de alanina y glicina.

#### A. Modificación del dominio APGR

En la secuencia APGR (SEC ID N° 2), la alanina o la glicina pueden reemplazarse con ácido aminoisobutírico (Aib). La sustitución de la alanina con Aib produce el siguiente análogo de la invención:  $\text{NH}_2\text{-G}^1\text{RRA-Aib-PGRAGG}^{11}\text{-NH}_2$  SEC ID N° 4

#### B. Modificación del dominio RAGG

En otra secuencia de giro  $\beta$  probable, RAGG (SEC ID N° 3), la alanina puede reemplazarse con ácido aminoisobutírico (Aib) para producir el análogo de la invención que tiene la secuencia:  $\text{NH}_2\text{-G}^1\text{RRAAPGR- Aib -GG}^{11}\text{-NH}_2$  SEC ID N° 5.

Los experimentos muestran que la SEC ID N° 5 fue: neuroprotectora (véanse las **Figs. 1-4**), estable en condiciones de conservación (**Figs. 2 y 3**), más neuroprotectora que el PRN no sustituido (**Figs. 1 y 4**), neuropatía periférica

(Figs. 6 y 7) y ELA (Fig. 8).

**2. Reemplazo de restos de glicina**

5 El reemplazo del resto de glicina interno por una asparagina (N) puede inducir giros  $\beta$  ya que la asparagina tiene mayor propensión de formar giros  $\beta$  en comparación con la glicina. Por lo tanto, el resto de glicina interno puede reemplazarse con asparagina en la posición de aminoácido 10 produciendo un péptido de la invención que tiene la siguiente secuencia:

10  $\text{NH}_2\text{-G}^1\text{RRAAPGRANG}^{11}\text{-NH}_2$  SEC ID N° 6

Se descubrió que este análogo de PRN era neuroprotector en el modelo *in vitro* de toxicidad neuronal inducida por 3-NP.

15 **3. Reemplazo del resto de glicina N terminal**

El truncamiento de  $\text{G}^1$  en el extremo N puede dar como resultado la pérdida de actividad biológica. El reemplazo de  $\text{G}^1$  con un grupo acetilo puede restablecer la actividad biológica. El análogo de PRN resultante está acetilado proporcionando un péptido que tiene la siguiente secuencia:

20  $\text{AcNH-RRAAPGRAGG}^{11}\text{-NH}_2$  SEC ID N° 7 estos compuestos se develan sólo con fines ilustrativos.

Se descubrió que este análogo de PRN era neuroprotector contra toxicidad inducida por 3-NP.

25 **4. Reemplazo de L-aminoácidos con D-aminoácidos**

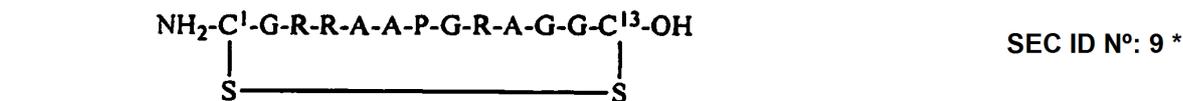
La estructura secundaria de un péptido puede verse afectada por la presencia de D-aminoácidos que reemplazan uno o más L-aminoácidos (de origen natural). El reemplazo del tercer aminoácido del extremo N produce un compuesto que tiene la siguiente secuencia:

30  $\text{NH}_2\text{-GR(D-Arg) AAPGRAGG-NH}_2$  SEC ID N° 8 estos compuestos se desvelan sólo con fines ilustrativos.

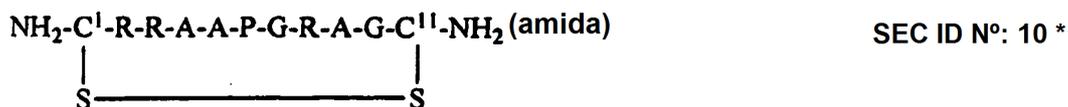
Se descubrió que este análogo de PRN era neuroprotector en el modelo *in vitro* de toxicidad neuronal inducida por 3-NP.

35 **5. Ciclación**

La síntesis de un peptidomimético cíclico de la SEC ID N° 1 puede realizarse. Un procedimiento implica añadir un resto de cisteína en cada extremo de la secuencia y después oxidar el producto resultante para producir un disulfuro cíclico que tiene la siguiente secuencia:



45 Como alternativa, ambos restos de glicina N y C terminales pueden reemplazarse con un resto de glicina y oxidarse de manera similar como se ha indicado anteriormente, produciendo un análogo que tiene la siguiente secuencia.



50 El ciclado directo del resto C terminal por el resto N terminal puede realizarse creando un enlace amida para producir un péptido que tiene la siguiente secuencia.



El uso de dicroísmo circular puede indicar estructura secundaria y el uso de programación informática de simulación por ordenador para el modelado de péptidos pequeños también puede realizarse usando procedimientos convencionales. Estas dos técnicas pueden usarse para determinar características estructurales de los análogos de PRN de la presente divulgación.

5

### Síntesis de análogos sintéticos de los PRN

Los materiales de partida y los reactivos utilizados en la preparación de estos compuestos se encuentran disponibles en cualquiera de los proveedores comerciales, tales como, Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Bachem (Torrance, California), Sigma (St. Louis, MO), o se preparan mediante procedimientos bien conocidos por un experto habitual en la técnica siguiendo los procedimientos descritos en referencias tales como Fieser y Fieser's Reagents for Organic Synthesis, vols.1-17 John Wiley y Sons, Nueva York, NY, 1991; Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, vols. 1-5 y anexos, Elsevier Science Publishers, 1989; Organic Reactions, vols. 1-40, John Wiley y Sons, Nueva York, N.Y., 1991; March J; Advanced Organic Chemistry, 4<sup>a</sup> ed. John Wiley y Sons, Nueva York, N.Y., 1992; y Larock: Comprehensive Organic Transformations, VCH Editoriales, 1989. En la mayoría de los casos, los aminoácidos y sus ésteres o amidas, y aminoácidos protegidos, se encuentran ampliamente disponibles en el comercio; y la preparación de aminoácidos modificados y sus amidas o ésteres se describe ampliamente en la bibliografía química y bioquímica y por tanto es muy conocida por expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, el ácido *N*-pirrolidín acético se describe en Dega-Szafran Z y Pryzbylak R. Synthesis, IR and NMR studies of zwitterionic  $\alpha$ -(1-pyrrolidine)alkano-carboxylic acids and their *N*-methyl derivatives. J. Mol. Struct.: 436-7, 107-121, 1997, y el ácido *N*-piperidín acético se describe en Matsuda O, Ito S y Sekiya M.

Convenientemente, la producción sintética de los polipéptidos de la presente invención puede realizarse según el procedimiento sintético en fase sólida descrito por Goodman, M. (ed.), "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics" in Methods of organic chemistry (Houben-Weyl) (Workbench Edition, E22a,b,c,d,e; 2004; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York). Esta técnica es muy conocida y es un procedimiento común para la preparación de péptidos. El concepto general de este procedimiento depende de la unión del primer aminoácido de la cadena con un polímero sólido mediante un enlace covalente. Los aminoácidos protegidos sucesivos se añaden, simultáneamente (estrategia por etapas), o en bloques (estrategia por segmentos), hasta que se ensambla la secuencia deseada. Finalmente, el péptido protegido se elimina del soporte de resina sólida y los grupos protectores se escinden. Mediante este procedimiento, los reactivos y productos secundarios se eliminan por filtración, eliminando de este modo la necesidad de purificar productos intermedios.

Los aminoácidos pueden unirse a cualquier polímero adecuado como una resina. La resina debe contener un grupo funcional al cual pueda unirse firmemente el primer aminoácido protegido mediante un enlace covalente. Diversos polímeros son adecuados para esta finalidad, tal como celulosa, alcohol polivinílico, polimetil metacrilato y poliestireno. Las resinas adecuadas se encuentran disponibles en el comercio y son muy conocidas por los expertos en la técnica. Como grupos protectores apropiados que pueden usarse en dicha síntesis se incluyen *tert*-butiloxicarbonilo (BOC), *bencilo* (Bzl), *t*-amiloxicarbonilo (Aoc), *tosilo* (Tos), *o*-bromo-fenilmetoxicarbonilo (BrZ), 2,6-diclorobencilo (BzlCl<sub>2</sub>) y fenilmetoxicarbonilo (Z o CBZ). En Goodman, citado anteriormente, así como en McOmie JFW: Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, Nueva York, 1973, se identifican grupos protectores adicionales.

Los procedimientos generales de preparación de péptidos de la presente invención implican unir inicialmente a la resina un aminoácido carboxilo terminal protegido. Después de la unión, la resina se filtra, se lava y se elimina el grupo protector en el grupo alfa-amino del aminoácido carboxilo terminal. La eliminación de este grupo protector debe realizarse, por supuesto, sin romper el enlace entre ese aminoácido y la resina. Después, el siguiente amino, y si fuera necesario, el aminoácido protegido de la cadena lateral, se acopla al grupo amino libre del aminoácido en la resina. Este acoplamiento se produce por la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo libre del segundo aminoácido y el grupo amino del primer aminoácido unido a la resina. Esta secuencia de sucesos se repite con aminoácidos sucesivos hasta que todos los aminoácidos están unidos a la resina. Finalmente, el péptido protegido se escinde de la resina y los grupos protectores eliminados revelan el péptido deseado. Las técnicas de escisión utilizadas para separar el péptido de la resina y para eliminar los grupos protectores dependen de la selección de la resina y de los grupos protectores y son conocidos por personas familiarizadas con la técnica de síntesis peptídica.

Los péptidos pueden ciclarse mediante la formación de un enlace disulfuro entre dos restos de cisteína. Los procedimientos para la formación de dichos enlaces son bien conocidos e incluyen procedimientos tales como los descritos en G. A. Grant (Ed.) Synthetic Peptides A User's Guide 2<sup>a</sup> Ed., Oxford University Press, 2002, W. C. Chan y P. D. White (Eds.) Fmoc Solid Phase Synthesis A Practical Approach, Oxford University Press, 2000 y referencias internas.

Técnicas alternativas para la síntesis peptídica se describen en Bodanszky y col. Peptide Synthesis, 2<sup>a</sup> ed, John Wiley y Sons, Nueva York, 1976. Por ejemplo, los péptidos de la invención también pueden sintetizarse utilizando metodologías convencionales de síntesis peptídica en solución que implican acoplamiento en etapas o en bloque de aminoácidos o fragmentos peptídicos usando procedimientos químicos o enzimáticos de formación de enlaces amida (véase, por ejemplo, H. D. Jakubke en The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press, Nueva

York, 1987, páginas 103-165; J. D. Glass, citado anteriormente., páginas 167-184; y en Patente Europea 0324659 A2, que describen procedimientos enzimáticos de síntesis peptídica). Estos procedimientos de síntesis en solución son muy conocidos en la técnica.

- 5 Los sintetizadores peptídicos comerciales, tales como el Modelo 430A de Applied Biosystems, se encuentran disponibles para llevar a la práctica estos procedimientos.

#### **Usos terapéuticos de análogos de PRN**

- 10 Los análogos de PRN de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones pueden usarse para tratar trastornos neurológicos. Los PRN han sido inexplicablemente eficaces en el tratamiento de degeneración neuronal asociada con trastornos cerebrales autoinmunes, incluyendo la EAE y la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la lesión tóxica a células neuronales.

#### **15 Trastornos y afecciones tratables con análogos de PRN**

Los trastornos y afecciones en los que los compuestos PRN de la presente invención, de acuerdo con las reivindicaciones, pueden ser beneficiosos incluyen:

- 20 Afecciones del sistema nervioso central, que incluyen infecciones del sistema nervioso central, incluyendo infecciones bacterianas, fúngicas, espiroquetales, parasitarias y sarcoideas, incluyendo infecciones pirogénicas, meningitis bacteriana aguda o leptomeningitis.

25 Enfermedades cerebrovasculares que incluyen, ictus, ictus isquémico, hipoxia/isquemia, trombosis aterosclerótica, infartos lacunares, embolismo, hemorragia hipertensiva, rotura de aneurismas, malformaciones vasculares, ataques isquémicos transitorios, hemorragia intracraneal, hemorragia subaracnoidea espontánea, encefalopatía hipertensiva, enfermedades inflamatorias de las arterias cerebrales, perfusión disminuida ocasionada, por ejemplo, por insuficiencia cardíaca (posiblemente resultante de cirugía de derivación coronaria) y otras formas de enfermedad cerebrovascular.

30 Traumatismos cráneo cerebrales incluyendo fracturas basales del cráneo y lesiones en nervios craneales, fístula carótido cavernosa, neumocéfalo, aerocele y rinorrea, contusión cerebral, hemorragia intracerebral traumática, lesión cerebral traumática, lesión cerebral traumática penetrante e inflamación cerebral aguda en niños.

35 Enfermedades desmielinizantes incluyendo neuromielitis óptica, encefalomiélitis diseminada aguda, encefalitis hemorrágica necrotizante aguda y subaguda, esclerosis cerebral difusa de Schilder y esclerosis múltiple junto con neuropatía periférica. Enfermedades degenerativas del sistema nervioso incluyendo síndrome de uno o más de demencia progresiva, atrofia cerebral difusa, atrofia cortical difusa de tipo no Alzheimer, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Pick, demencia fronto-temporal, degeneración talámica, tipos de corea no huntingtoniana y demencia, degeneración córtico-espinal (Jakob), el complejo demencia-Parkinson-esclerosis lateral amiotrófica (Guamanina y otros) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

40 Las neuropatías periféricas son afecciones comunes y discapacitantes caracterizadas por daños a, o pérdida de, neuronas periféricas. Existen más de 100 tipos de neuropatía periférica, cada uno con su propio conjunto de síntomas, patrón de desarrollo y pronóstico característico. La neuropatía periférica puede ser hereditaria o adquirida. Las formas hereditarias de neuropatía periférica pueden producirse por mutaciones genéticas. En la siguiente Tabla 1 se muestran algunos tipos de neuropatía periférica y características comunes con ellos. La Tabla 1 citada anteriormente muestra comparaciones entre neuropatía periférica diabética y neuropatía periférica inducida por piridoxina, estreptozotina y quimioterapia

50

**Tabla 1: Características comunes a neuropatías periféricas**

	<b>Piridoxina (vitamina B6) Intoxicación</b>	<b>Neuropatía diabética inducida por estreptozotocina</b>	<b>Neuropatía periférica diabética</b>	<b>Neuropatía periférica inducida por quimioterapia</b>
<b>Modelo/Afección</b>	Modelo experimental y afección clínica	Modelo experimental	Afección clínica	Modelo experimental y afección clínica
<b>Patología principal</b>	Axonopatía reversible del sistema nervioso periférico, que produce velocidad de conducción de fibras sensoriales reducida, limitada a células de gran diámetro, sin desmielinización. [1,2,3,4,5,6]	Axonopatía del sistema nervioso periférico, que produce velocidad de conducción de fibras sensoriales y autónomas reducida, siendo la degeneración dependiente de la longitud de la fibra. [11,12,13]	Axonopatía progresiva del sistema nervioso periférico, que produce velocidad de conducción de fibras sensoriales reducida, siendo la degeneración dependiente de la longitud de la fibra. [19,20,21]	Neuronopatía del sistema nervioso periférico, así como daños en ganglios radiculares dorsales, que produce velocidad de conducción de fibras sensoriales reducida, con y sin desmielinización. [22,23]
<b>Mecanismo de tonicidad propuesto</b>	La saturación de piridoxal quinasa en el hígado puede inhibir la piridoxal fosfato neuronal, alterando el metabolismo neuronal. El metabolismo neuronal alterado conduce a un soporte energético empobrecido de axonas grandes. [2,3]	Toxicidad selectiva en células β de los islotes pancreáticos que conduce a una afección diabética hiperglucémica con neurotoxicidad resultante, como en la diabetes clínica. [14,15,16]	Degeneración axonal walleriana resultante de neurotoxicidad hiperglucémica. El aumento de glucosa favorece el metabolismo a través de la ruta del poliol que da como resultado la producción de estrés oxidativo. [16,19,20]	(Para compuestos de platino). Trastorno del metabolismo y transporte axonal en nervios sensoriales periféricos seguido de acumulación en el DRG lo que conduce a axonopatía. [22,24]
<b>Nervios periféricos afectados</b>	Principalmente nervios sensoriales descendientes grandes, incluyendo nervios peroneo y sural que descienden desde el nervio ciático. [3,6,7]	Principalmente nervios autónomos y sensoriales, incluyendo el nervio peroneo y otros nervios que descienden desde el nervio ciático. [11,13]	Principalmente nervios sensoriales descendientes grandes, incluyendo nervios peroneo y sural que descienden desde el nervio ciático. [19,20]	Principalmente nervios sensoriales descendientes grandes, incluyendo nervios peroneo y sural que descienden desde el nervio ciático. [22,23]
<b>Resultados funcionales</b>	Alteración motora de patas traseras debido a pérdida de retroalimentación sensorial, particularmente de las patas traseras. [3,6,7,8,9,10]	Síntomas de hiperalgesia/alodinia predominantemente positivos. [17,18]	Síntomas de dolor o parestesia inicialmente positivos, progresando después a síntomas negativos con pérdida de retroalimentación sensorial, particularmente desde los pies. [19,20]	Neuronopatía sensorial, con percepción de vibración disminuida, parestesia, pérdida de reflejo tendinoso, dolor y, después, ataxia (alteración motora). [22,23]

La neuropatía periférica adquirida puede deberse a: lesión física (traumatismo) en un nervio, tumores, toxinas (incluyendo quimioterapia), respuestas autoinmunitarias, deficiencias nutricionales, alcoholismo, trastornos vasculares y metabólicos (por ejemplo, neuropatía diabética). La neuropatía periférica asociada al VIH es un efecto secundario común de fármacos que dirigen a la transcriptasa inversa del virus VIH. Los síntomas de neuropatía periférica pueden variar desde sensaciones de entumecimiento temporal, hormigueo, y pinchazos, sensibilidad al tacto o debilidad muscular, a síntomas más extremos tales como ardor, atrofia muscular, parálisis y disfunción de órganos o glándulas.

La primera publicación de una neuropatía sensorial humana inducida por una dosis elevada de piridoxina (vitamina B6) procede de Schaumburg y col, New Eng. J. Medicine 309: 445-448, 1983. La ingesta diaria estaba en el intervalo de 2000-6000 mg/día durante períodos de 2 a 14 meses. Todos los pacientes presentaron una pérdida sensorial de tipo "media-guante" con entumecimiento en manos, pies y apoyo inestable.

El uso de modelos de neuropatía periférica en ratas permite analizar anomalías neurológicas inducidas por piridoxina. Por ejemplo, la administración a ratas de 1200 u 800 mg/kg/día de piridoxina durante 5-10 días produce necrosis de neuronas sensoriales, afectando específicamente a neuronas de gran diámetro en el nervio ciático y en el ganglio radicular dorsal (Xu y col, Neurology 39: 1077-1083, 1989).

5 La neuropatía periférica inducida por piridoxina en animales es un sistema reconocido para estudiar los efectos de agentes terapéuticos. En particular, este sistema predice los efectos de dichos agentes sobre la neuropatía periférica en seres humanos.

## 10 **Trastornos metabólicos**

Los trastornos metabólicos adquiridos del sistema nervioso incluyen enfermedades metabólicas que se presentan como un síndrome que comprende uno o más de confusión, estupor o coma-isquemia-hipoxia, hipoglucemia, hiperglucemia, hipercapnia, disfunción hepática y síndrome de Reye, enfermedades metabólicas que se presentan como un síndrome extrapiramidal progresivo, enfermedades metabólicas que se presentan como ataxia cerebelar, hipertermia, enfermedad celíaca, enfermedades metabólicas que producen psicosis o demencia incluyendo enfermedad de Cushing y encefalopatía sensible a esteroides, psicosis tiroidea e hipotiroidismo y encefalopatía pancreática. Un ejemplo de un trastorno metabólico puede dar como resultado neuropatía es el exceso de piridoxina descrito más delante de forma más detallada.

## 20 **Enfermedades del sistema nervioso debidas a deficiencia nutricional, alcohol y alcoholismo**

Los trastornos del sistema nervioso debidos a drogas y otros agentes químicos incluyen opiáceos y analgésicos sintéticos, fármacos hipnótico-sedantes, estimulantes, fármacos psicoactivos, toxinas bacterianas, venenos de plantas, picaduras y mordeduras venenosas, metales pesados, toxinas industriales, agentes antineoplásicos e inmunosupresores, talidomida, antibióticos aminoglicosídicos (ototoxicidad) y derivados de penicilina (espasmos), agentes cardioprotectores (beta-bloqueantes, derivados de la planta *Digitalis* y amiodarona).

30 Como se ilustra en la lista anterior, las composiciones y procedimientos de la presente invención pueden encontrar uso en el tratamiento de lesión y enfermedad neuronal humana. Aún más generalmente, las composiciones y procedimientos de la invención encuentran uso en el tratamiento de pacientes humanos que padecen daño neuronal como resultado de lesión cerebral aguda, incluyendo, pero sin limitación, lesión axonal difusa, lesión hipóxico isquémica perinatal, lesión cerebral traumática, ictus, infarto isquémico, embolismo y hemorragia hipertensiva; exposición a toxinas del SNC, infecciones del sistema nervioso central, tales como, meningitis bacteriana; enfermedades metabólicas, tales como las que implican encefalopatía hipóxico isquémica, neuropatía periférica y enfermedades relacionadas con las reservas de glucógeno; o de lesión neuronal crónica o enfermedad neurodegenerativa, incluyendo, pero sin limitación, esclerosis múltiple, demencia por cuerpos de Lewy, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. Los pacientes que padecen dichas enfermedades o lesiones pueden beneficiarse enormemente mediante un protocolo de tratamiento que puede iniciar la proliferación y migración neuronal, así como el crecimiento de neuritas.

Aún más generalmente, la invención tiene aplicación en la inducción de migración neuronal y neuroblástica en áreas de lesión después de agresión en forma de traumatismo, exposición a toxinas, asfixia o hipoxia-isquemia.

## 45 **Administración de análogos de PRN**

Los análogos de PRN pueden usarse mediante administración directa al paciente. Un análogo de PRN puede administrarse como parte de un medicamento o preparación farmacéutica. Esto puede implicar combinar un análogo de PRN con un vehículo, adyuvante o excipiente farmacéuticamente apropiado. Adicionalmente, un análogo de PRN puede usarse con otro agente neuroprotector, proliferativo u otro que no sea un PRN. La selección del vehículo, adyuvante o excipiente puede depender de la vía de administración que vaya a emplearse.

La vía de administración puede variar ampliamente para ajustarse a una afección particular. Un análogo de PRN puede administrarse por vías diferentes: intraperitoneal, intravenosa o intracerebroventricular. La aplicación periférica puede ser una vía de elección al no haber interferencia directa con el sistema nervioso central.

Puede emplearse cualquier vía de administración periférica conocida en la técnica. Estas pueden incluir vías parenterales, por ejemplo, inyección en la circulación periférica, subcutánea, intraorbital, oftálmica, intraespinal, intracisternal, tópica, infusión (usando, por ejemplo, dispositivos de liberación lenta o mini bombas tales como bombas osmóticas o parches dérmicos), implante, aerosol, inhalación, escarificación, administración intraperitoneal, intracapsular, intramuscular, intranasal, oral, bucal, pulmonar, rectal o vaginal. Las composiciones pueden formularse para administración parenteral a seres humanos u otros animales en cantidades terapéuticamente eficaces (por ejemplo cantidades que eliminan o reducen la afección patológica del paciente) para proporcionar terapia para las enfermedades neurológicas descritas anteriormente.

Una vía de administración incluye inyección subcutánea (por ejemplo, disuelta en cloruro sódico al 0,9 %) y administración oral (por ejemplo, en una cápsula).

5 También se apreciará que, en ocasiones, puede ser deseable administrar directamente el análogo de PRN al SNC del paciente mediante cualquier vía de administración apropiada. Como ejemplos se incluyen la administración por inyección lateral cerebroventricular o a través de una derivación quirúrgicamente insertada en el ventrículo cerebral lateral del cerebro del paciente, en el líquido cefalorraquídeo o directamente en una zona afectada del cerebro de un paciente.

#### 10 Dosis terapéutica de análogos de PRN

En algunas realizaciones de la presente divulgación, los procedimientos para el tratamiento de lesión cerebral comprenden administrar uno o más análogos de PRN en un intervalo de dosis de aproximadamente 0.01 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal. En otras realizaciones de la presente divulgación, puede ser útil una dosis de 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal. En realizaciones adicionales de la presente divulgación, una dosis de un PRN puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,1 mg/kg.

En otras realizaciones de la presente divulgación, la determinación de una cantidad eficaz de un análogo de PRN a administrar se encuentra dentro de la experiencia de un experto habitual en la técnica y será rutinaria para los expertos en la técnica. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la cantidad a usar de un análogo de PRN puede calcularse mediante estudios *in vitro* usando un sistema de ensayo tal como se describe en el presente documento. La cantidad final a administrar de un análogo de PRN dependerá de la vía de administración, del análogo de PRN utilizado y de la naturaleza de la afección o trastorno neurológico que vaya a tratarse. Un intervalo de dosis adecuado puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 15 µg por 25 1 kg de peso corporal o en otras realizaciones de la presente descripción, entre aproximadamente 20 µg/kg a aproximadamente 30 µg/kg de peso corporal al día.

Para la inclusión en un medicamento, el análogo de PRN puede sintetizarse directamente mediante procedimientos convencionales, tales como el procedimiento gradual de síntesis en fase sólida de Merrifield y col, 1963 (J. Am. Chem. Soc. 15:2149-2154) o Goodman M. (ed.), "Synthesis of Peptides and Peptidomimetics" in Methods of organic chemistry (Houben-Weyl) (Workbench Edition, E22a,b,c,d,e; 2004; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Nueva York). Dichos métodos de síntesis peptídica son conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Fields Colowick, 1997, Solid Phase Peptide Synthesis (Methods in Enzy-mology, vol. 289), Academic Press, San Diego, CA. De manera alternativa, la síntesis puede implicar el uso de sintetizadores peptídicos disponibles en el mercado, tal como el modelo 430A de Applied Biosystems.

Como una propuesta general, la cantidad total farmacéuticamente eficaz de un análogo de PRN administrada por vía parenteral por dosis estará en el intervalo que puede medirse mediante una curva de respuesta a la dosis. Por ejemplo, para determinar la dosificación, un análogo de PRN en la sangre puede medirse en líquidos corporales del mamífero a tratar. Como alternativa, al paciente pueden administrarse cantidades en aumento de un compuesto PRN y comprobar los niveles del análogo de PRN en el suero del paciente. La cantidad a emplear del análogo de PRN puede calcularse sobre una base molar basada en estos niveles del análogo de PRN en el suero

Un procedimiento para determinar la dosificación apropiada del compuesto supone medir los niveles de PRN en un líquido biológico, tal como un líquido corporal o sanguíneo. La medición de dichos niveles puede realizarse mediante cualquier medio, incluyendo RIA y ELISA. Después de medir los niveles del análogo de PRN, el líquido se pone en contacto con el compuesto utilizando dosis sencillas o múltiples. Después de esta etapa de puesta en contacto, los niveles del análogo de PRN vuelven a medirse en el líquido. Si los niveles del análogo de PRN en el líquido se encuentran en una cantidad suficiente para producir la eficacia deseada para la cual se administra la molécula, entonces la dosis de la molécula puede ajustarse para producir eficacia máxima. Este procedimiento puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Este procedimiento puede realizarse *in vivo*, por ejemplo, después de extraer el líquido de un mamífero y de medir los niveles del análogo de PRN, el compuesto del presente documento se administra al mamífero utilizando dosis sencillas o múltiples (es decir, la etapa de puesta en contacto se realiza por administración a un mamífero) y después los niveles del análogo de PRN vuelven a medirse del líquido extraído del mamífero.

Los análogos de PRN se administran adecuadamente mediante un sistema de liberación sostenida. Como ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida se incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos con forma de, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919, documento EP 58.481), poli(2-hidroxiethyl metacrilato) (Langer y col. 1981), acetato etilvinílico (Langer y col, citado anteriormente) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen un compuesto asociado con liposomas. Los liposomas que contienen el compuesto se preparan por procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, como se ilustra en el documento DE 3.21.8,121; Hwang y col, 1980; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Solicitud de Patente japonesa . 83-118008, Patentes de Estados Unidos Nos

4.485.045 y 4.544.545 y documento EP 102.324. En algunas realizaciones, los liposomas son de tipo unilaminar pequeño (a partir de o de aproximadamente 200 a 800 Angstroms) en los que el contenido lipídico es mayor que aproximadamente 30 moles. por ciento de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia más eficaz.

5 También pueden emplearse péptidos PEGilados que tienen una vida más larga en comparación con los péptidos no PEGilados, basándose, por ejemplo, en la tecnología de conjugados descrita en el documento WO 95/32003 publicado el 30 de noviembre de 1995.

10 En algunas realizaciones, el compuesto puede formularse generalmente mezclando cada uno a un grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéutica, o parenteralmente, aceptable, es decir, uno que no sea tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y que sea compatible con otros principios de la formulación. Por ejemplo, preferentemente la formulación no incluye agentes oxidantes ni otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para los polipéptidos. Puede apreciarse que las dosis anteriores no pretenden ser limitantes. Los expertos en la  
15 técnica pueden determinar otras dosis fuera de los intervalos anteriores.

En algunas realizaciones, las formulaciones pueden prepararse poniendo en contacto un compuesto de manera uniforme e íntima con transportadores líquidos o con transportadores sólidos finamente divididos o con ambos.  
20 Después, si se desea, el producto puede conformarse en la formulación deseada. En algunas realizaciones, el transportador es un transportador parenteral, como alternativa, una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Como ejemplos de dichos vehículos transportadores de incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, una solución tamponada y solución de dextrosa. En el presente documento también son útiles vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles y oleato de etilo.

25 El transportador contiene adecuadamente menores cantidades de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química. Dichos materiales son deseablemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen, sólo como ejemplo, tampones, tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes, tal como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (con menos de aproximadamente diez restos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos;  
30 proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tal como polivinilpirrolidona; glicina; aminoácidos, tales como, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, trehalosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como, manitol o sorbitol; contra-iones tal como sodio; tensioactivos no iónicos, tales como, polisorbatos, poloxámeros o polietilenglicol (PEG); y/o sales  
35 neutras, por ejemplo, NaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> y similares. En determinadas realizaciones, un péptido de la presente invención puede estabilizarse usando sacarosa 0,5 M o trehalosa 0,5 M. El uso de dichos azúcares puede permitir la conservación prolongada de los péptidos.

40 Un compuesto PRN puede formularse deseablemente en dichos vehículos a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8. Como alternativa, el pH puede ser de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, transportadores o estabilizantes anteriores dará como resultado la formación de sales del compuesto. La preparación final puede ser un líquido estable o un sólido liofilizado.

45 En otras realizaciones, pueden usarse adyuvantes. Son adyuvantes típicos que pueden incorporarse en comprimidos, cápsulas y similares, aglutinantes tales como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como celulosa microcristalina; un agente disgregante como almidón de maíz o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante tal como sacarosa o lactosa; un agente aromatizante tal como menta, gaulteria o cereza. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, además de los materiales anteriores,  
50 esta también puede contener un transportador líquido tal como un aceite graso. Pueden utilizarse otros materiales de diversos tipos como recubrimientos o como modificadores de la forma física de la unidad de dosificación. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, un edulcorante tal como sacarosa, conservantes como propil parabeno, un agente colorante y un agente aromatizante tal como cereza. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Por ejemplo, puede desearse la  
55 disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo, tal como agua o aceite vegetal de origen natural, como aceite de sésamo, de cacahuete o de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similar. Tampones, conservantes, antioxidantes y similares pueden incorporarse de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

60 Es deseable que para usar un análogo de PRN, para administración terapéutica, este deber ser estéril. La esterilización puede realizarse fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas que tienen un tamaño de poro de aproximadamente 0,2 micrómetros). Generalmente, las composiciones terapéuticas pueden depositarse en un recipiente con un puerto de entrada estéril, por ejemplo, una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja para inyección hipodérmica.  
65

En otras realizaciones, un análogo de PRN puede conservarse en envases monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales herméticamente cerrados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para su reconstitución. Como un ejemplo de una formulación liofilizada, viales de 10 ml se cargan con 5 ml de solución acuosa del compuesto al 0,01% (p/v) esterilizada por filtración y la mezcla resultante se liofiliza. La solución para infusión puede prepararse reconstituyendo los compuestos liofilizados usando agua bacteriostática u otro disolvente adecuado.

En realizaciones de la divulgación, un kit puede contener una cantidad predeterminada de compuesto PRN liofilizado, una solución fisiológicamente compatible para la preparación de una forma de dosificación, un vial de mezcla, un dispositivo de mezcla e instrucciones para su uso. Dichos kits pueden fabricarse y almacenarse de acuerdo con las prácticas habituales en la industria.

Una composición que contiene un compuesto PRN puede administrarse a través de una o más diversas vías de administración. Como ejemplo, puede utilizarse administración intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intraventricular, por inhalación, lavado, por vía rectal, transdérmica y subcutánea.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar realizaciones específicas de la presente invención. Los expertos habituales en la técnica pueden utilizar las descripciones y enseñanzas del presente documento para producir otras realizaciones y variaciones sin excesiva experimentación. Se considera que dichas realizaciones y variaciones forman parte de la presente invención.

#### **Ejemplo 1: Efectos de los compuestos PRN sobre la supervivencia y proliferación de microexplantes cerebelares**

##### **Preparación del compuesto PRN**

Los compuestos PRN se obtuvieron en Auspep (Australia). Los péptidos se sintetizaron utilizando síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos se proporcionaron con un extremo C amidado, y tenían una pureza de más del 95 %, analizada por análisis de espectro MALDI-EM. Los péptidos se conservaron liofilizados a - 80 °C con argón en sacarosa 0,5 M o trehalosa 0,5 M hasta su uso. Se reconstituyeron en PBS, como alternativa en transferrina humana 100 µg/ml/PBS o en otras realizaciones en BSA 100 µg/ml/PBS, en sacarosa 0,5 M o trehalosa 0,5 M.

##### **Preparación del cultivo celular**

Cortex cerebelares laminados de los dos hemisferios se explantaron de una rata Wistar P3, P4, P7 o P8, se cortaron en trozos pequeños en GBSS con solución D(+) glucosa al 0,65 % y se trituraron mediante una aguja de calibre 0,4 mm y posteriormente se prensaron a través de un tamiz de tamaño de poro 125 µm. Los microexplantes obtenidos se centrifugaron (60 X g) 2 veces para un intercambio de medio en medio STARTV asérico, complementado con BSA, (Biochrom). Finalmente, los microexplantes se reconstituyeron en medio STARTV 500 µl. Para el cultivo, 38 µl de la suspensión celular se incubaron durante 1 hora en un cubre-objetos revestido con poli-D-lisina en una placa de Petri de 35 mm con una atmósfera que comprendía CO<sub>2</sub> al 5 % en aire y 100 % de humedad a 34 °C. Posteriormente, se añadieron las toxinas dañinas (como se describe más adelante), se añadieron los análogos de PRN y 1 ml de medio STARTV, y los cultivos se evaluaron después de 2-3 días de cultivo.

Para los experimentos inmunohistoquímicos y de migración neuronal, los microexplantes cerebelares se fijaron después de 2-3 días en cultivo siguiendo el siguiente régimen: los microexplantes se fijaron durante 2 minutos, tratamiento en serie con paraformaldehído al 0,4%; 1,2%; 3%, respectivamente, seguido de una incubación de 5 minutos en paraformaldehído al 4 %/glutaraldehído al 0,25 % en fosfato sódico 0,1 M (pH 7,4).

##### **Efectos de los compuestos PRN sobre lesión neuronal inducida por toxinas**

El estrés oxidativo puede dar lugar a neurodegeneración. Este es un posible mecanismo para los síntomas observados en trastornos humanos con enfermedad de Huntington. Anteriormente se ha demostrado que la toxina productora de estrés oxidativo, el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), produce efectos en animales experimentales que imitan a los efectos observados en seres humanos con enfermedad de Huntington. Por tanto, los estudios de fármacos terapéuticos, realizados en animales experimentales, con neurotoxicidad inducida por 3-NP, son predictivos de los efectos de estos fármacos en el tratamiento de seres humanos con enfermedad de Huntington u otros trastornos caracterizados por estrés oxidativo.

Se diseñaron procedimientos generales para realizar experimentos de administración de fármacos y toxicológicos de tal manera que se administraron 1/100 partes de toxina y fármaco neuroprotector simultáneamente a los microexplantes cerebelares recién preparados. Se preparó glutamato como una solución madre 50 mM en agua MilliQ mientras que el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) 50 mM se ajustó a un pH (pH 6,8 – 7,2) en agua Milli-Q. En el ensayo las concentraciones de la toxina inductora de estrés oxidativo, ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y la

excitotoxina, glutamato, eran de 0,5 mM cada una. Los péptidos PRN liofilizados se reconstituyeron en PBS o en transferrina humana 100 µg/ml como una solución madre de 10 µM. Posteriormente, se realizaron diluciones en serie. Los microexplantes cerebelares se cultivaron durante 48-72 horas a 34 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % en aire y una humedad al 100 % antes de que se fijasen en cantidades en aumento de paraformaldehído (0,4 %, 1,2 %, 3 % y 4 %, cada tratamiento 2-3 minutos).

Usando las toxinas descritas anteriormente, los explantes cerebelares se expusieron durante 24 horas, al inicio del cultivo a diluciones de PRN (ensayo de supervivencia) o PRN y BrdU 0,1 µM (ensayo de proliferación). Posteriormente, el 80 % del medio se cambió con adición de nuevas toxinas y PRN. Los cultivos cerebelares se fijaron como se ha descrito anteriormente después de 3 días *in vitro*. La detección del nivel de BrdU incorporado se realizó como se ha descrito anteriormente.

### Reducción de datos y análisis estadístico

Para el análisis estadístico de supervivencia, se seleccionaron cuatro campos (cada campo con un área de 0,65 mm<sup>2</sup>) de cada cultivo cerebelar fijado con las densidades celulares más altas, y se contaron las células que presentaban crecimiento neurítico (ensayo de supervivencia).

### Resultados

#### Neuroprotección

Los análogos de PRN promovieron supervivencia neuronal aumentada en explantes tratados con 3-NP (véanse los Ejemplos 2, 3 y 4).

#### Ejemplo 2: Promoción de supervivencia de células neuronales por compuestos PRN

Se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 5 de la presente invención en cultivos celulares preparados de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior. La SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 5 tienen la misma secuencia de aminoácidos, con la excepción de que la alanina (A) en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 se reemplazó por ácido aminoisobutírico (Aib), produciendo así un compuesto que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N° 5. Puede apreciarse que, además del cambio en cuanto a la estructura lineal del péptido, el reemplazo de alanina por Aib puede estabilizar el giro beta, y por tanto, producir un péptido que tiene estructura 3-dimensional diferente y diferentes movilidades sobre determinados enlaces en comparación con el péptido no sustituido.

Se expusieron cultivos celulares sólo a vehículo (columna en blanco) sólo a neurotoxina 3-NP (columna sombreada) a 3-NP más diferentes concentraciones de la SEC ID N° 5 (columnas con trama) o a 3-NP más diferentes concentraciones de un PRN no sustituido, la SEC ID N° 1 (columna de color oscuro). Después, se contaron los números de células que tenían neuritas como un indicador de supervivencia de células neuronales.

La **FIG. 1** representa un gráfico de resultados de estos estudios. La toxina 3-NP en solitario produjo una gran pérdida de células que presentaban neuritas en comparación con los controles tratados con vehículo, indicando que el compuesto es realmente neurotóxico. El péptido que tiene la secuencia SEC ID N° 1 a concentraciones de 10 fM o 1 pM disminuyó significativamente los efectos neurotóxicos de 3-NP (media ± ETM;  $p < 0,001$ ;  $n = 4$ ). De manera similar, la SEC ID N° 5 disminuyó la neurotoxicidad inducida por 3-NP de una manera dependiente de la concentración, con un umbral de por debajo de aproximadamente 1 fM y un efecto máximo a una concentración de aproximadamente 100 fM (media ± ETM:  $p < 0,001$ ;  $n = 4$  cada uno).

A partir de este estudio, se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 5 es neuroprotectora. Este resultado significa que la SEC ID N° 5 puede ser un compuesto PRN terapéutico valioso para el tratamiento de degeneración neuronal en seres humanos que padecen trastornos neurológicos. Además, como se sabe que el estrés oxidativo induce neurodegeneración similar a la neurodegeneración observada en seres humanos con enfermedad de Huntington, los compuestos PRN sintéticos de la presente invención pueden usarse para tratar a seres humanos con neurodegeneración ocasionada por estrés oxidativo.

#### Ejemplo 3: Estabilidad y efectos neuroprotectores de compuestos PRN no sustituidos

Para determinar la estabilidad en conservación de los PRN de la presente invención, se llevaron a cabo diversos estudios utilizando la SEC ID N° 1. En este estudio, se sintetizó la SEC ID N° 1 y después el péptido se conservó a temperaturas de - 20 °C o - 4 °C durante nueve (9) semanas. Después, la eficacia del PRN en cuanto a la protección de neuronas cerebelares contra el efecto neurotóxico de 3-NP se sometió a ensayo, como se ha descrito anteriormente. Se trataron explantes cerebelares sólo con vehículo (columna en blanco), sólo con el agente neurotóxico 3-NP (columna con puntos clara) o con 3-NP más cuatro concentraciones de la SEC ID N° 1 que se había conservado durante 9 semanas a una temperatura de - 20 °C, o a - 4 °C.

La **FIG. 2** representa los resultados de estos estudios. Los explantes cerebelares tratados sólo con 3-NP (barra con puntos clara) mostraron pocas células que presentaban neuritis en comparación con los explantes de control tratados con vehículo (barras en blanco). La SEC ID N° 1 que se había conservado a - 20 °C mostró efectos neuroprotectores a todas las concentraciones ensayadas (desde  $10^{-13}$  M; de 100 fM a  $10^{-10}$  M; 100 pM) observándose efectos estadísticamente significativos a concentraciones de  $10^{-11}$  M y  $10^{-10}$  M.

Por otro lado, la SEC ID N° 1, conservada a una temperatura de - 4 °C, produjo una pequeña disminución en cuanto al efecto neurotóxico de 3-NP. A partir de este estudio, se llegó a la conclusión de que el PRN no sustituido perdía actividad durante el período de tiempo de 9 semanas con conservación a - 4 °C y que la conservación de la SEC ID N° 1 a - 20 °C podía proteger su fuerza.

#### **Ejemplo 4: Estabilidad y efectos neuroprotectores de los PRN sustituidos**

En este estudio, se determinó la estabilidad de un PRN sustituido, la SEC ID N° 5, a diferentes condiciones de conservación y a diferentes concentraciones como en el Ejemplo 3 anterior. Se sintetizó la SEC ID N° 5 y después el péptido se conservó durante 9 semanas a una temperatura de - 20 °C o - 4 °C. Después, la eficacia de la SEC ID N° 5 disminuyendo el efecto neurotóxico de 3-NP se sometió a ensayo, como se describe en los Ejemplos 2 y 3 anteriores.

La **FIG. 3** representa un gráfico de estos estudios. Los explantes cerebelares se trataron solo con vehículo (columna en blanco), solo con 3-NP (columna con puntos clara) o 3-NP más concentraciones de la SEC ID N° 5, a cuatro concentraciones que variaban de  $10^{-13}$  M a  $10^{-10}$  M, que se habían conservado a - 20 °C o a - 4 °C. Cuando se conservó a - 20 °C, la SEC ID N° 5 produjo efectos neuroprotectores similares a los encontrados para la SEC ID N° 1 que se había conservado a - 20 °C, como se muestra en el Ejemplo 3 y se representa en la FIG. 2.

Sorprendentemente se descubrió que incluso cuando la SEC ID N° 5 se conservaba a - 4 °C, ésta mantenía su efecto neuroprotector. De hecho, el grado de neuroprotección proporcionado por la SEC ID N° 5, tras conservar a - 4 °C, no fue estadísticamente diferente en comparación con el grado de neuroprotección proporcionado después de conservación a -20 °C. Este resultado fue completamente inesperado basándose en los estudios de la SEC ID N° 1 mostrados anteriormente. La estabilidad aumentada del NPR que tiene la SEC ID N° 5 significa que este compuesto será más adecuado para la conservación y el transporte en condiciones de uso habituales.

#### **Ejemplo 5: Efectos neuroprotectores de los PRN no sustituidos y sustituidos**

En un conjunto de datos más grande obtenido utilizando los procedimientos del Ejemplo 1, se confirmaron los resultados mostrados en la **FIG. 1**. La **FIG. 4** representa un gráfico de resultados de estudios de microexplantes cerebelares tratados con la neurotoxina 3-NP, que demuestran neuroprotección por la SEC ID N° 5 y SEC ID N° 1 en un estudio de 6 en cada grupo. Se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 5 protegían a las neuronas de la muerte después de su exposición a la neurotoxina 3-NP. También se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 1 podían ser agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de seres humanos que padecen neurotoxicidad.

#### **Ejemplo 6: Efectos terapéuticos y profilácticos de análogos de PRN en un modelo de esclerosis múltiple**

Para determinar si los PRN tenían un impacto sobre inflamación crónica en el sistema nervioso central que conduce a daño axonal grave y lesiones posteriores (tal como en esclerosis múltiple; EM), los PRN se sometieron a ensayo en un modelo de ratón de encefalitis autoinmune experimental (EAE) que simula el estado progresivo grave de la EM, utilizando, como inmunógeno, glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG).

#### **Procedimientos y Materiales**

##### *Animales*

Se utilizaron ratones hembra, de 6-8 semanas de vida, cepa C57B1/6J, con un peso promedio de 24 gramos cada una.

##### *Preparación de PRN*

El péptido que tenía la secuencia:  $\text{NH}_2\text{-REGRRDAPGRAGG-NH}_2$  SEC ID N° 12 (también conocido como SEC ID N° 30 desvelada en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número 10/976.699), se obtuvo en Auspep (Australia). El péptido SEC ID N° 12 se proporcionó con un extremo C amidado, y tenía una pureza mayor del 95 %, determinada por HPLC con espectrometría MALDI-EM. La secuencia se confirmó por espectrometría de masas. El péptido se conservó liofilizado a una temperatura de - 80 °C en gas argón hasta su uso. El péptido se reconstituyó en PBS el día de uso.

*Inducción de EAE*

Una cantidad de 200 µl L de una emulsión que contenía 200 µg del péptido encefalitogénico MOG35-55

5 MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK SEC ID N° 13

se obtuvo en C S Bio Co. USA) en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, USA) que contenía *Mycobacterium tuberculosis* 800 µg (Difco, Detroit, USA) se inyectó por vía subcutánea en un costado. De manera inmediata, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de toxina tosferínica 400 ng (List Biological Laboratorios, USA) y de nuevo 48 horas más tarde.

**Tratamiento***Terapéutico*

15 En el punto máximo de la enfermedad (día 17 después de la inmunización con MOG) los animales se trataron con la SEC ID N° 12 por vía intraperitoneal (i.p.) durante 14 días con una dosis diaria de 0,1 µg de péptido/animal (4,16 µg/kg).

**Evaluación del deterioro neurológico**

Se controló diariamente a los ratones y el deterioro neurológico se puntuó sobre una puntuación clínica arbitraria de la siguiente manera: 0, sin síntomas clínicos; 1, cola flácida; 2, debilidad en patas traseras; 3 parálisis en patas traseras; 4 debilidad en patas traseras y debilidad de patas delanteras; 5 paraplejia; 6 muerte.

25

**Resultados***Efectos terapéuticos de los PRN en ratones con EAE*

30 En la FIG. 5 se muestra el resultado obtenido 37 días después del primer tratamiento con PRN. Existe un efecto terapéutico significativo de la SEC ID N° 12 cuando se administra por vía intraperitoneal. Se ha observado un efecto farmacológico similar para el compuesto neuroregenerativo EPO en una terapia de combinación con metilprednisolona. La desventaja de EPO es que debido a su gran tamaño no puede sintetizarse o administrarse fácilmente. Se llega a la conclusión de que el PRN tiene potencial significativo a largo plazo para disminuir la gravedad de la disfunción motora que se produce en el modelo de enfermedad de EAE de EM cuando se administra como fármaco terapéutico en el punto máximo de la enfermedad. La puntuación 1 es la puntuación más baja e implica solo una cola flácida mientras que las puntuaciones más altas implican debilidad (puntuación 2) o parálisis completa de las patas traseras (puntuación 3). \*\* p < 0,01 frente a puntuación del día 1 de tratamiento.

35

**Ejemplo 7: Efectos de los análogos PRN en animales con neuropatía periférica**

Para determinar si los análogos de PRN de la presente invención pueden ser agentes terapéuticos útiles para el tratamiento de neuropatía periférica, se realizaron diversos estudios en ratas con neuropatía periférica inducida por piridoxina.

45

Se demostró que NH<sub>2</sub>-G<sup>1</sup>RRAAPGR-Aib-GG<sup>11</sup>-NH<sub>2</sub> (SEC ID N° 5) aplicada diariamente a dosis muy bajas en forma de bolo sencillo podía atenuar las deficiencias motoras en animales tratados con dosis tóxicas de piridoxina.

**Materiales y procedimientos**

50

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 278-349 g al comienzo de la intoxicación con cloruro de piridoxina. Antes de la intoxicación, se acostumbró a las ratas a caminar a través de una barra de equilibrio a intervalos diarios durante una semana.

55 *Experimento 1:* Por vía intraperitoneal (i.p.) se administró a las ratas cloruro de piridoxina 400 mg/kg disuelto en agua destilada estéril ajustada a pH neutro, dos veces al día durante 8 días, y simultáneamente se administró el péptido, que tenía la secuencia SEC ID N° 5, por vía i.p. durante un total de 10 días. Se observó a las ratas durante un total de 29 días.

60 *Experimento 11:* Durante un período de tiempo más corto se administró a las ratas una dosis más alta de piridoxina (1200 mg/kg/día). El cloruro de piridoxina disuelto en agua destilada estéril ajustada a pH neutro se administró por vía i.p. a las ratas a una dosis de 600 mg/kg dos veces al día durante 4 días. Simultáneamente el péptido que tenía la secuencia SEC ID N° 5 se administró durante 4 días. El día 5, se comprobaron las deficiencias motoras en las ratas.

65

Utilizando una barra de equilibrio de precisión se analizaron las deficiencias motoras tras la intoxicación con piridoxina y los efectos de la SEC ID N° 5. Se grabaron en vídeo siete pasos consecutivos a través de una barra de equilibrio de 1,5 m de longitud y según la posición de los tarsos de las patas, estos pasos se puntuaron entre 1 a 4 (1 - tarsos de las patas posteriores por encima del centro de la barra; 2- tarsos en contacto con la mitad superior del centro de la barra; 3 - tarsos en contacto con la mitad inferior del centro de la barra y 4- tarsos por debajo del centro de la barra). También se sumaron los resultados de las puntuaciones de los siete pasos. Se obtuvo una puntuación de 30 si el animal sólo podía sostenerse en la barra pero no podía caminar. En el caso de no poder sostenerse en la barra la puntuación era de 32.

## 10 Grupos de tratamiento

*Experimento I.* Las dos concentraciones ensayadas para la SEC ID N° 5 fueron 40 ng/kg/día y 4 µg/kg/día.

*Experimento II:* Se ensayaron solución salina y la SEC ID N° 5 a una dosis de 4 µg/kg/día .

## 15 Análisis estadístico

Los datos de deficiencias motoras se evaluaron mediante un análisis de varianza bilateral y ensayo post-hoc de Bonferroni. Se llegó a la conclusión de que la significado estadístico resultó ser si  $p < 0,05$  entre las cohortes de tratamiento con fármaco y tratamiento con vehículo.

20

## Resultados

*Experimento I:*

25 Cuatro días después del cese de intoxicación con piridoxina ambas cohortes de ratas tratadas con la SEC ID N° 5 presentaron deficiencias motoras atenuadas (baja dosificación:  $p < 0,05$ ; alta dosificación:  $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo tratado con vehículo. El día 16 después del inicio de intoxicación con piridoxina el grupo tratado con dosis alta de SEC ID N° 5 presentó deficiencias motoras menos significativas en comparación con el grupo control ( $p < 0,05$ ). (Figura 6).

30

*Experimento II:*

35 Cuatro días después de la intoxicación con altas dosis de piridoxina se produjeron deficiencias motoras sustanciales en el grupo de control de ratas. El día 5 el grupo de ratas tratado con la SEC ID N° 5 (dosificación: 4 µg/kg/día) mostró una atenuación altamente significativa de deficiencias motoras ( $p < 0,001$ ) (Figura 7).

## Conclusiones

40 Se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 5 mostraba atenuación, altamente significativa y clínicamente sustancial, de deficiencias motoras por neuropatía periférica inducida por piridoxina. También se llegó a la conclusión de que se toleraba bien una dosis de 4 µg/kg/día de la SEC ID N° 5. La concentración de 4 µg/kg/día funcionó también bien en el modelo más crónico de intoxicación por piridoxina (800 mg/kg/día durante 8 días) y en la intoxicación aguda por piridoxina inducida por 1200 mg/kg/día administrada durante 4 días.

45 A partir de estos estudios, también se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 5 podía ser un tratamiento eficaz en neuropatías periféricas de seres humanos.

## Ejemplo 8: Efecto de la SEC ID N° 5 en animales con esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

50 En esta serie de estudios, se examinaron los efectos de la SEC ID N° 5 en ratones que tenían un defecto genético (SOD-1) que produce una enfermedad de las neuronas motoras similar a la de los seres humanos con ELA. Los animales con este trastorno muestran una pérdida progresiva de coordinación motora a lo largo del tiempo y finalmente mueren prematuramente debido a la enfermedad. Este sistema en animales es útil para estudiar los efectos de agentes potencialmente útiles en el tratamiento de ELA en seres humanos. Por tanto, los resultados obtenidos tienen gran valor de predicción de los resultados obtenidos en seres humanos con ELA.

55

## Procedimientos

60 Los ratones se asignaron al azar para recibir vehículo o la SEC ID N° 5 desde el punto de comienzo de la enfermedad en adelante. La aparición de la enfermedad en cada grupo de asignación del tratamiento no era significativamente diferente: 92-93 días.

El tratamiento con la SEC ID N° 5 (40 µg/kg, administrada 1/día i.p. (**FIG. 8A**) o 0,4 µg/kg, administrada 1/día, i.p. (**FIG 8B**)) comenzó el día de la aparición de la enfermedad.

65

## Resultados

En dos estudios, el tratamiento con la SEC ID N° 5 produjo una ampliación significativa de la duración de vida en los ratones con trastorno similar a ELA (**Figuras 8A y 8B**). Una dosis diaria de 40 µg/kg i.p. de la SEC ID N° 5 estimuló significativamente la longevidad después de la aparición de la enfermedad. Las **Figuras 8A y 8B** muestran curvas de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones transgénicos mutantes (ALS) SOD-1.

Los animales tratados con vehículo comenzaron a morir el día 120, y el día 143 todos estaban muertos (Estudio 1; **FIG. 8A**; línea continua). De manera similar, en el Estudio 2 (**FIG. 8B**; línea continua), los animales tratados con vehículo comenzaron a morir el día 120 y el día 154 todos estaban muertos (**FIG. 8B**; línea continua).

Por otro lado, en el Estudio 1 (**FIG 8A**; línea discontinua) los ratones tratados con la SEC ID N° 5 comenzaron a morir más tarde (el día 131) en comparación con los animales tratados con vehículo y vivieron más (hasta 156 días). Significativamente, las dos curvas de Kaplan- Meier no se solaparon (**FIG. 8A**; 40 µg/kg SEC ID N° 5;  $p < 0,01$  en comparación con la supervivencia de los animales tratados sólo con vehículo). En el Estudio 2 los animales tratados con la SEC ID N° 5 (**FIG. 8B**; línea discontinua; 0,4 µg/kg) comenzaron a morir más tarde (el día 125) en comparación con los animales tratados con vehículo (**FIG. 8B**; línea continua) y en general, vivieron más (hasta 189 días: **FIG. 8B**; línea discontinua; SEC ID N° 5).

## Conclusiones

A partir de estos estudios se llegó a la conclusión de que la SEC ID N° 5 es un agente eficaz que tiene una estabilidad inesperadamente mejorada en comparación con su homólogo no sustituido. También se llegó a la conclusión de que la estabilización del giro beta de un PRN podía mejorar la eficacia terapéutica y mejorar la estabilidad, pudiendo ambas cosas mejorar la utilidad terapéutica de los análogos de PRN. Los hallazgos inesperados de que los análogos de PRN sustituidos tenían tanto una fuerza mejorada como una estabilidad mejorada indican que los análogos de PRN pueden ser alternativas terapéuticas valiosas para el tratamiento de diversas afecciones caracterizadas por neurodegeneración.

Por lo tanto, los análogos de PRN de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos crónicos así como agudos incluyendo ELA, neurotoxicidad, neurodegeneración asociada con estrés oxidativo, trastornos autoinmunitarios, lesión cerebral traumática y otras enfermedades y afecciones neurológicas. Además, se llegó a la conclusión de que los análogos de PRN podían tener efectos terapéuticos beneficiosos en situaciones en las que la pérdida de función neurológica es un síntoma.

### Ejemplo 9: migración mediada por análogos de PRN en afecciones (sin lesión) fisiológicas

Se sometió a ensayo un análogo de PRN con respecto a la actividad inductora de migración/quimioatrayente en células madre neuronales de ratón en un ensayo de migración haptotáctico como se describe a continuación.

#### Procedimientos

##### *Recubrimiento inicial de PRN*

Pocillos control de placas Transwell (Corning) con tamaño de poro de 12 µm se revistieron en 1,5 ml de vehículo BSA/PBS. Las restantes placas se revistieron usando 0,1 ng/ml de análogo de PRN (preparado en PBS que contenía BSA 10 µg/ml).

##### *Recubrimiento de matriz extracelular*

Se utilizó laminina (7 µg/ml) como recubrimiento de matriz extracelular (MEC) para células madre primarias de ratón. La matriz se incubó a 37 °C; CO<sub>2</sub> al 5 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células se siembran sobre los insertos (30.000 células por pocillo). Las placas se fijaron a los 1-2 días *in vitro* (DIV).

##### *Recubrimiento de insertos*

Se usó una mezcla de PDL/PLL 5 µg/ml (en PBS) para recubrir los insertos. Posteriormente los insertos se aclararon con agua Milli-Q.

##### *Fijación celular*

Los insertos se desecharon y los pocillos se fijaron en diluciones sucesivas de PFA (0,4, 1,2, 3 y 4 %) durante 3-5 minutos en cada dilución. Los pocillos se aclararon y se conservaron en diluciones sucesivas de PFA (0,4, 1,2, 3 y 4 %) 3-5 minutos en cada dilución. Los pocillos se aclararon y se conservaron en PBS hasta el recuento. Todas las células que presentaron crecimiento neurítico y que se desplazaron hasta la cámara inferior se contaron como

células migratorias.

## Resultados

- 5 En placas tratadas con análogo de PRN migraron más células en comparación con las que migraron en placas tratadas sin análogo de PRN. Los análogos de PRN pueden inducir migración celular neuronal y estos pueden usarse para tratar neurodegeneración asociada con lesión o enfermedad o neuronal.

### Ejemplo 10: Migración mediada por análogos de PRN en afecciones por lesión

- 10 Se sometió a ensayo un análogo de PRN con respecto a la actividad inductora de migración/quimioatrayente en células madre neuronales de ratón en un ensayo de migración haptotáctico en afecciones por lesión, como se describe a continuación.

## 15 Procedimientos

### *Producción de una monocapa de astrocitos*

- 20 Ratas Wistar o Sprague Dawley P1 (día 1 postnatal) se sacrificaron por decapitación. Se extirparon los hemisferios corticales y se recogieron en distintos tubos que contenían DMEM 4 ml - 1 tubo por córtex. El tejido se trituró mecánicamente. Las células se transfirieron al medio utilizando una pipeta estéril y se filtraron a través de un filtro celular de 100  $\mu$ m en un tubo de centrifuga de 50 ml. A cada tubo se le proporcionaron 50 ml de DMEM. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 350 x g a 22 °C. Las células se resuspendieron en 40 ml de DMEM + FBS al 10 %.
- 25 Después las células se sembraron en una placa de 12 pocillos + ácido ocaidaico 5 nM (para eliminar neuronas induciendo muerte celular apoptótica) y se incubó a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 10 % durante 24 horas en una cámara Boyden. El medio + FBS se reemplazó después de 1 día por DMEM reciente + FBS al 10 %. El crecimiento celular se controló hasta llegar a confluencia (14-18 días).

### *Lesión farmacológica y mecánica*

- 30 La inducción de lesiones en la monocapa de astrocitos se realizó usando el agente farmacológico factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) y por raspado simultáneo mecánico de la monocapa para activar los astrocitos. Se administró TGF $\beta$ 1 10 ng/ml a la monocapa de astrocitos durante 24 horas. Adicionalmente, los cultivos de astrocitos se lesionaron mecánicamente con un escalpelo (un raspado a lo largo del fondo del pocillo).

### *Siembra de células madre pre-marcadas*

- 40 Se sembraron células madre neuronales (NSC, Neural Stem Cells) embrionarias de ratón marcadas con diacetato de fluoresceína sin diferenciar en insertos recubiertos con Poli-D-Lisina (PDL – 5  $\mu$ g/ml). El compartimiento inferior de la cámara Boyden recibió 100 fM de un análogo de PRN.

### *Fijación celular*

- 45 Los insertos se desecharon y los pocillos se fijaron en diluciones sucesivas de PFA (0,4, 1,2, 3 y 4 %) durante 3-5 minutos en cada dilución. Los pocillos se aclararon y se conservaron en diluciones sucesivas de PFA (0,4, 1,2, 3 y 4 %) durante 3-5 minutos en cada dilución. Los pocillos se aclararon y se conservaron en PBS hasta el recuento. Todas las células que presentaron crecimiento neurítico y que se desplazaron hasta la cámara inferior se contaron como células migratorias.

## 50 Análisis

El número de células madre migratorias marcadas volvió a analizarse después de 24 horas mediante un sistema de formación de imágenes computerizado basado en fluorescencia (Discovery-1).

## 55 Resultados

- 60 Los análogos de PRN estimulan más la migración de células madre en comparación con los controles tratados con vehículo. Se llega a la conclusión de que los análogos de PRN inducen la migración de células madre neuronales, y que los análogos de PRN pueden ser útiles para tratar la neurodegeneración asociada con lesión o enfermedad neuronal.

## Referencias

- 65 [1] Schaumburg H, Kaplan J, Windebank A, Vick N, Rasmus S, Pleasure D, Brown MJ (1983) Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. A new megavitamin syndrome. N. Engl. J. Med. 309: 445-448.  
[2] Krinke G, Naylor DC, Skorpil V (1985) Pyridoxine megavitaminosis: an analysis of the early changes induced

with massive doses of vitamin B6 in rat primary sensory neurons. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 44: 117-129. [3] Windebank AJ, Low PA, Blehrud MD, Schmelzer JD, Schaumburg HH (1985) Pyridoxine neuropathy in rats: specific degeneration of sensory axons. *Neurology* 35: 1617-1622.

5 [4] Albin RL, Albers JW, Greenberg HS, Townsend JB, Lynn RB, Burke Jr. JM, Alessi AG (1987) Acute sensory neuropathy-neuronopathy from pyridoxine overdose. *Neurology* 37: 1729-1732.

[5] Dalton K, Dalton MJ (1987) Characteristics of pyridoxine overdose neuropathy syndrome. *Act Neurol. Scand.* 76: 8-11.

[6] Xu Y, Sladky JT, Brown MJ (1989) Dose-dependent expression of neuropathy after experimental pyridoxine intoxication. *Neurology* 39: 1077-1083.

10 [7] Perry TA, Weerasuriya A, Mouton PR, Holloway HW, Greig NH (2004) Pyridoxine-induced toxicity in rats: a stereological quantification of the sensory neuropathy. *Exp Neurol.* 190: 133-144.

[8] Helgren ME, Cliffer KD, Torrento K, Cavnor C, Curtis R, Distefano PS, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997) Neuro-trophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *J. Neurosci.* 17: 372-382.

15 [9] Callizot N, Warter J-M, Poindron P (2001) Pyridoxine-induced neuropathy in rats: a sensory neuropathy that responds to 4-methylcatechol. *Neurobiol. Dis.* 8: 626-635.

[10] Perry TA, Holloway HW, Weerasuriya A, Mouton PR, Duffy K, Mattinson JA, Greig NH (2007) Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp. Neurology* 203:293-303.

20 [11] Jakobsen J, Lundbæk K. (1976) Neuropathy in experimental diabetes: an animal model. *Br. Med. J.* 2: 278-279

[12] Bell RH, Hye RJ (1983) Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J. Surg. Res.* 35: 433-460.

[13] Mattingly GE, Fischer VW. (1983) Peripheral neuropathy following prolonged exposure to streptozotocin-induced diabetes in rats: a teased nerve fiber study. *Acta Neuropathol.* 59: 133-138.

25 [14] Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50: 536-546.

[15] Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA (2003) Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 52: 165-171.

30 [16] Tomlinson DR, Gardiner NJ (2008) Glucose neurotoxicity. *Nature Neurosci. Rev.* 9:36-45. [17] Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufmann F, Burcklen L, Adler J. (1987) Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 30: 653-658.

[18] Courteix C, Eschalièr A, Lavarenne J. (1993) Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain.* 53: 81-88.

35 [19] Dyck PJ, Giannini C. (1996) Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 1181-1193.

[20] Yagihashi S, Yamagishi S-I, Wada R. (2007) Pathology and pathogenic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs, and symptoms. *Diab. Res. Clin. Prac.* 77S: S184-S189.

40 [21] Chong MS, Hester J (2007) Diabetic painful neuropathy. Current and future treatment options. *Drugs* 67: 569-585. [22] Quasthoff S, Hartung HP (2002) Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurol.* 249: 9-17.

[23] Windebank AJ, Grisold W. (2008) Chemotherapy-induced neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 13: 27-46. [24] Gregg RW, Molepo JM, Monpetit VJ, Mikael NZ, Redmond D, Gadia M, Stewert DJ. (1992) Cisplatin neurotoxicity: the relationship between dosage, time, and platinum concentration in neurologic tissues, and morphologic evidence of toxicity. *J. Clin. Oncol.* 10: 795-803.

45 Los compuestos y las composiciones de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones encuentran uso industrial en muchos aspectos del comercio, incluyendo la fabricación, formulación y venta farmacéutica. Los compuestos y composiciones de la presente invención de acuerdo con las reivindicaciones encuentran uso industrial en campos de neurología médica, y en particular, para el tratamiento de trastornos neurológicos en animales y en seres humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Neuren Pharmaceuticals Limited Neuren Pharmaceuticals Inc. Inventor (1) Paul William Richard Harris Inventor (2) Margaret Anne Brimble Inventor (3) Frank Sieg
- <120> ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE PÉPTIDOS DE REGENERACIÓN NEURONAL
- 60 <130> NEUN-01091W00
- <140>
- <141> 17-10-2008
- <150> 60/999.292
- 65 <151>17-10-2007

<150> 60/999.503  
<153> 18-10-2007  
  
<160> 13  
5  
<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 11  
10  
<212> PRT  
<213> HUMANA  
  
<220>  
<221> MOD RES  
15  
<222> (11)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 1  
  
**Gly Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 2  
<211> 4  
25  
<212> PRT  
<213> HUMANA  
  
<400> 2

**Ala Pro Gly Arg**  
1 . . . . . 5

<210> 3  
<211> 4  
30  
<212> PRT  
<213> HUMANA  
  
<400> 3

**Arg Ala Gly Gly**  
1 . . . . . 5

<210> 4  
<211> 11  
40  
<212> PRT  
<213> SINTÉTICA

<220>  
<221> MOD RES  
45  
<222> (11)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 4  
  
**Gly Arg Arg Ala Aib Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
1 . . . . . 5 . . . . . 10

<210> 5  
<211> 11  
55  
<212> PRT  
<213> SINTÉTICA

5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 5

**Gly Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Aib Gly Gly**  
**1 5 10**

10  
 <210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA  
 15  
 <400> 6

**Gly Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Asn Gly**  
**1 5 10**

20  
 <210> 7  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA

25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)  
 <223> AMIDACIÓN

30  
 <220>  
 <221> MOD RES'  
 <222> (1)  
 <223> ACETILACIÓN

35  
 <400> 7

**Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
**1 5 10**

40  
 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA

45  
 <220>  
 <221> MOD RES  
 <222> (4)  
 <223> D-Arg

<400> 8

**Gly Arg Asp Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
**1 5 10**

50  
 <210> 9  
 <211> 1  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA'  
 55

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(13)  
 5 <223> DISULFURO

<400> 9

**Cys Gly Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly Cys**  
**1 5 10**

10 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(11)  
 <223> DISULFURO

20 <400> 10

**Cys Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Cys**  
**1 5 10**

25 <210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> AMIDACIÓN

35 <400> 11

**Gly Arg Arg Ala Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
**1 5 10**

40 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> SINTÉTICA

45 <220>  
 <221> MOD RES  
 <222> (13)  
 <223> AMIDACIÓN

50 <400> 12

**Arg Glu Gly Arg Arg Asp Ala Pro Gly Arg Ala Gly Gly**  
**1 5 10**

55 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

<400> 13

ES 2 433 568 T3

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val  
1 5 10

His Leu Tyr Arg Gln Gly Lys  
15 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un compuesto de péptido de regeneración neuronal (PRN) sintético que comprende un dominio de péptido modificado APGR y/o un dominio de péptido modificado RAGG, en el que el compuesto PRN se selecciona del grupo que consiste en la SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6.
2. El compuesto PRN sintético de la reivindicación 1 que consiste en la SEC ID N° 5.
- 10 3. El compuesto PRN sintético de la reivindicación 1 que consiste en la SEC ID N° 4.
4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto PRN sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. El compuesto PRN sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en terapia.
- 20 6. El compuesto PRN sintético de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno neurológico en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto PRN sintético o de la composición farmacéutica.
- 25 7. El compuesto PRN sintético o la composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde el trastorno neurológico es esclerosis lateral amiotrófica, lesión neurotóxica, lesión oxidativa, esclerosis múltiple, neuropatía periférica, hipoxia/isquemia, lesión craneal traumática o cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria, preferentemente neuropatía periférica diabética.

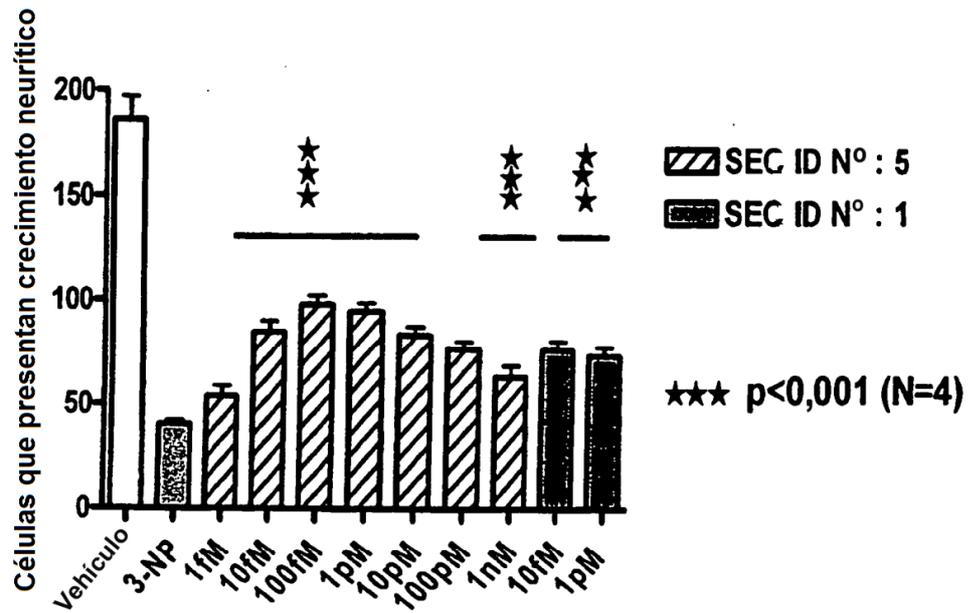


FIG. 1

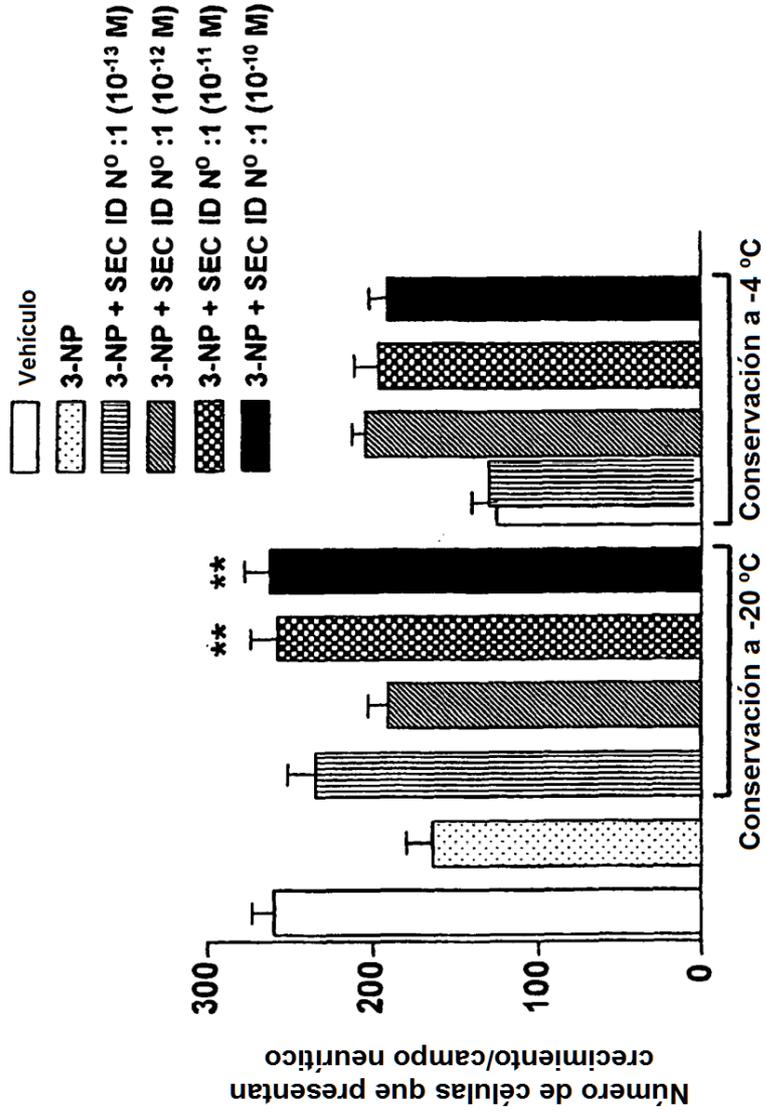


FIG. 2

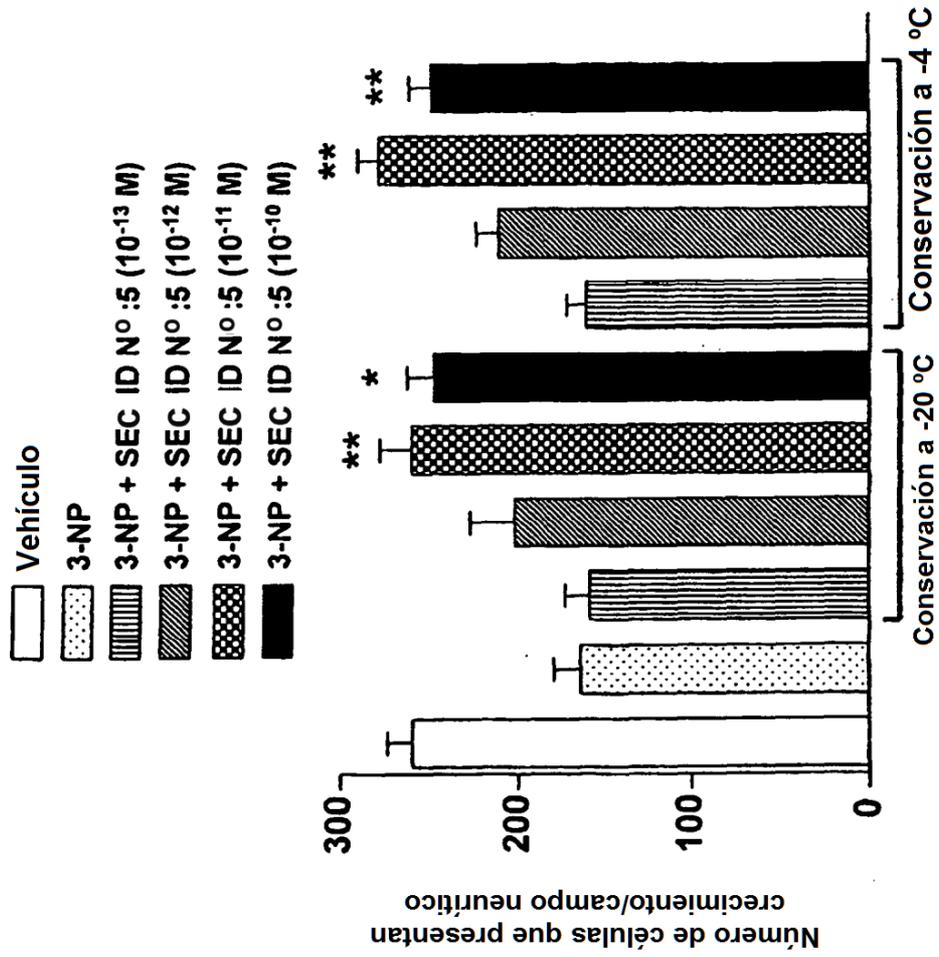


FIG. 3

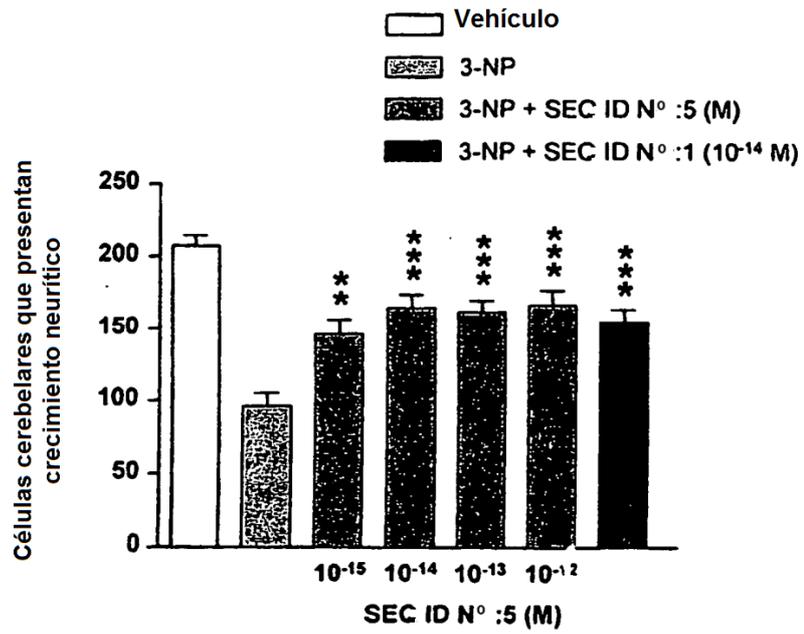


FIG. 4

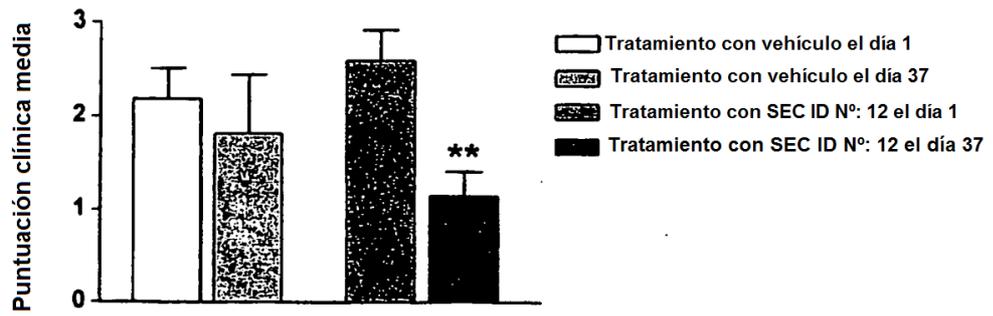


FIG. 5

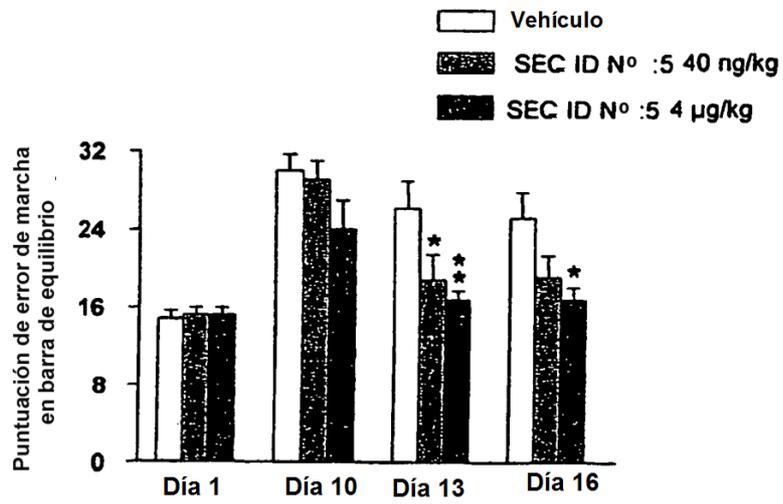


FIG. 6

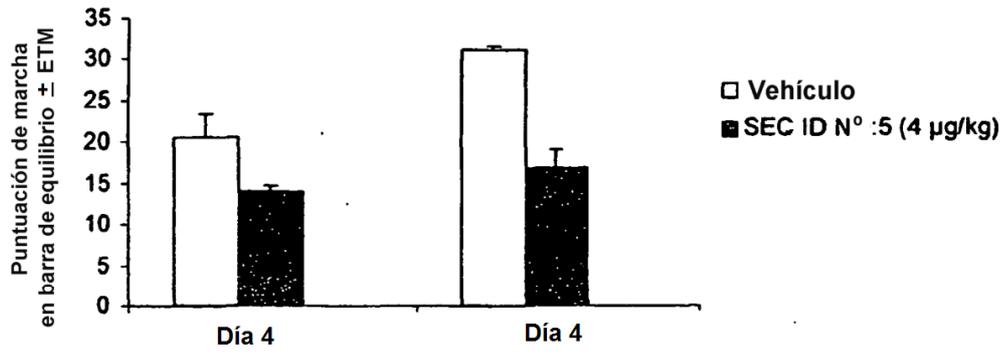


FIG. 7

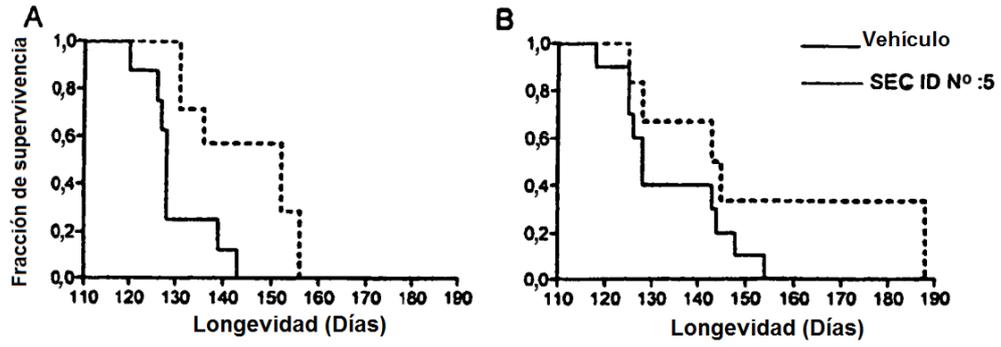


FIG. 8