

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 619**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010** **E 10710598 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 2403515**

54 Título: **Composiciones y métodos para provocar el crecimiento de neuritas**

30 Prioridad:

06.03.2009 GB 0903913

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

12.09.2014

73 Titular/es:

**MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
2nd Floor David Phillips Building Polaris House
North Star Avenue
Swindon Wiltshire SN2 1FL, GB**

72 Inventor/es:

TAKEI, YOSHINORI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 493 619 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

Composiciones y métodos para provocar el crecimiento de neuritas

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de lesión o enfermedad neurológica, en particular, la invención se refiere a la reducción de la inhibición de la regeneración neuronal, tal como el crecimiento de neuritas.

Antecedentes de la invención

Las neuronas extienden las neuritas para comunicarse con otras neuronas o con sus tejidos diana. Esta red neuronal en el sistema nervioso central (SNC) adulto se regenera solo de manera deficiente después de una lesión. Esto representa un problema en la técnica, que conduce a malos desenlaces en el paciente después de una lesión en la red neuronal.

La imposibilidad del SNC mamífero adulto de regenerarse se debe en parte a los inhibidores del crecimiento de neuritas asociados con la mielina dañada. La glucoproteína asociada con mielina (MAG), Nogo-A (también conocida como Reticulon 4A) y la glucoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp) son inhibidores asociados con mielina del crecimiento de neuritas que pueden unirse al receptor de Nogo 1 (NgR1). Estas proteínas asociadas con mielina, Nogo-A, MAG y OMgp, transmiten señales desde los oligodendrocitos a las neuronas a través de la unión a los receptores de Nogo. Esta señalización de Nogo tiene funciones críticas en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (SNC). Puede inhibir la diferenciación, migración y crecimiento neurítico de las neuronas, causando la recuperación deficiente del daño al SNC adulto.

Nogo-A se une a NgR1 a través de un dominio llamado Nogo-66. El dominio Nogo-66 está compuesto por 66 aminoácidos y el dominio Nogo-66 solo, sin otras regiones de Nogo-A, es suficiente para inhibir el crecimiento de neuritas. MAG, pero ni Nogo-A ni OMgp, puede inhibir el crecimiento de neuritas no solamente a través de NgR1 sino también a través de NgR2, una proteína homóloga de NgR1 (6).

Ng1 elabora los complejos de señalización que contienen LINGO-1 y o bien p75^{NTR} o TAJ/TROY (McGeey Strittmatter *Trends Neuro sci* 26, 193-198 (2003); Schwab et al *Trends Mol Med* 12, 293-297 (2006)). Tanto p75^{NTR} como TAJ/TROY pertenecen a la familia de receptores TNFalfa, y se propone que son los componentes principales que inicial las señales intracelulares para inhibición del crecimiento neurítico. NO se sabe con certeza si NgR2 elabora complejos que contienen LINGO-1 y o bien p75^{NTR} o TAJ/TROY

Si bien la información acerca de las funciones de la señalización de Nogo se está expandiendo, la información acerca de los mecanismos que controlan la señalización es limitada. Esto implica un problema en la técnica. Se sabe que el aumento de los niveles intracelulares de cAMP supera los efectos inhibidores de la señalización de Nogo en el crecimiento de neuritas. No obstante, se desconoce el mecanismo detallado mediante el cual cAMP supera los efectos de la señalización de Nogo.

BDNF, un miembro de la familia del factor de crecimiento nervioso de neurotrofina, no solamente estimula el crecimiento de neuritas de varios tipos de células neurales *in vitro* (17-19, 20), sino que también promueve parcialmente la recuperación de lesión de médula espinal (21-24). El pre-tratamiento con BDNF incrementa los niveles de cAMP intracelular en neuronas cultivadas, permitiendo que las neuronas extiendan las neuritas incluso en presencia de inhibidores asociados con mielina (25). Asimismo, BDNF está implicado en el rebrote de neuritas inducido por lesiones en el hipocampo (26). Estos informes indican que BDNF podría potencialmente ayudar en la regeneración de redes neuronales en el SNC incluso en presencia de los inhibidores asociados con mielina del crecimiento de neuritas. No obstante, el efecto es limitado y no es suficiente para completar la regeneración de las redes neurales.

Una línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y exhibe crecimiento de neuritas dependiente de BDNF después de 5 días de tratamiento con ácido retinoico (RA) (18). Las células SH-SY5Y inician la diferenciación en células de tipo neuronas y comienzan la expresión de proteínas específicas de neuronas en respuesta al RA.

No obstante, las células neurales diferenciadas de células SH-SY5Y por RA exhiben solamente cambios morfológicos limitados. Se requiere el tratamiento de BDNF para crecimiento eficiente de neuritas de células neurales derivadas de SH-SY5Y, de lo contrario, se requiere el tratamiento más prolongado con RA (27).

Se ha estudiado la caseína cinasa II (CK2) en el contexto de neuronas. La caseína cinasa II ha estado implicada en la fosforilación de dos proteínas superficiales distintas en las neuronas.

Ninguna proteína está relacionada con los receptores de Nogo. Asimismo, los estudios en esta área han sido absolutamente dependientes del uso de inhibidores de caseína cinasa II. Por consiguiente, se ha estudiado en la técnica la función de CK2 intracelular. Se sabe que la actividad de CK2 intracelular es necesaria para el crecimiento de neuritas propiamente dicho. Se sabe que la CK2 extracelular existe. Sin embargo, la información acerca de la CK2 extracelular se desconoce en gran medida, como se observó anteriormente. En más detalle, hay datos de que

la proteína precursora de amiloide beta y neuroglicano C pueden fosforilarse en las superficies de neuronas por CK2 extracelular endógena. No obstante, se desconocen los efectos de estas fosforilaciones sobre el crecimiento de neuritas (si los hubiese).

La caseína cinasa II se ha usado para tratar colágeno/laminina en ciertas preparaciones *in vitro*.

- 5 Estos tratamientos nunca han implicado células. Estos tratamientos solamente han implicado preparaciones *in vitro* de proteínas de matriz tales como colágeno o laminina.

No se conoce ningún tratamiento con caseína cinasa II de células en la técnica anterior. La aplicación de caseína II exógena a las células se desconoce en la técnica.

- 10 Ulloa et al (1993 EMBO vol 12 pág 1633-1640) inhibió la actividad de CK2 en la línea celular de neuroblastoma de ratón N2A con oligos antisentido y con un inhibidor específico. Las células N2A extienden las neuritas ni con ácido retinoico (RA) ni con BDNF. Usando una línea celular de N2A, hallaron que el crecimiento de neuritas a partir de células N2A se inhibe por agotamiento de CK2, y que la fosforilación de una proteína asociada con microtúbulos, MAP1B, es cambiada por el agotamiento. Se requiere MAP1B para la reordenación del citoesqueleto, que se requiere para el crecimiento de neuritas. Por lo tanto, concluyeron que el cambio de fosforilación de MAP1B causa la inhibición del crecimiento de neuritas por agotamiento de CK2. La fosforilación de MAP1B es intracelular. Se ha sabido que otras proteínas asociadas con la reordenación del citoesqueleto son fosforiladas por CK2, a nivel intracelular. Estos eventos de fosforilación intracelular son necesarios para el crecimiento de neuritas propiamente dicho. Ya que las neuronas normales, como también las células N2A, pueden extender las neuritas sin ninguna estimulación, la inferencia es que estos eventos de fosforilación intracelular son catalizados por un nivel basal de CK2 intracelular en las neuronas. La función no se relaciona con la señalización de Nogo.
- 15
- 20

No se conoce hasta la fecha ninguna relación entre la fosforilación y la señalización de Nogo. Se desconoce hasta el momento el mecanismo que controla la señalización de Nogo.

La presente invención busca superar el problema(s) asociado con la técnica anterior.

Compendio de la invención

- 25 Es un problema que el tejido nervioso adulto se regenere solo de manera deficiente, o no se regenere en absoluto. Esto implica un problema particular después del daño causado por factores tales como lesiones o enfermedades. Se han identificado diversos mecanismos que rigen la inhibición de la regeneración. Uno de dichos mecanismos es la inhibición del crecimiento de neuritas por señalización a través de los receptores de Nogo. Si bien diversos ligandos y receptores en esta ruta están bien caracterizados, no ha habido una forma confiable de reducir esta inhibición descrita en la técnica anterior.
- 30

- Los presentes inventores se han referido a estos problemas. A través de estudios detallados de señalización de Nogo, los inventores han identificado formas en las que puede inhibirse dicha señalización. A su vez, los inventores han identificado una diana molecular específica dentro del receptor de Nogo que es clave para la regulación de la señalización de Nogo. Esta diana es serina 281 del receptor de Nogo. La fosforilación de este residuo anula la unión de inhibidores del crecimiento de neuritas al receptor, reduciendo de este modo la inhibición de la neurorregeneración. Asimismo, los inventores describen y demuestran formas eficaces para lograr esto, tales como el tratamiento con proteína cinasa A y/o caseína cinasa II. La invención se basa en estos sorprendentes hallazgos.
- 35

- Por lo tanto, en un aspecto, la invención provee un método *in vitro* para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas de una neurona, donde dicha neurona comprende un receptor de Nogo, donde dicho método comprende poner en contacto dicha neurona con una composición capaz de causar la fosforilación de un receptor de Nogo, donde dicha composición comprende una proteína cinasa A o caseína cinasa II.
- 40

Adecuadamente, dicha composición comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II

Adecuadamente, dicha fosforilación es la fosforilación de un residuo de aminoácidos correspondiente a serina 281 de dicho receptor de Nogo.

- 45 Adecuadamente dicho receptor de Nogo es NgR1 humano.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido de proteína cinasa A para la elaboración de un medicamento para tratar una lesión de la médula espinal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de proteína cinasa A para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal:

- 50 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido de caseína cinasa II para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una lesión de la médula espinal.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de caseína cinasa II para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II, para uso como medicamento. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha composición para la elaboración de un medicamento para lesión de la médula espinal. En otro aspecto, la invención se refiere a dicha composición para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II, para uso como medicamento. En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicha composición para la elaboración de un medicamento para lesión de la médula espinal.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a dicha composición para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un polipéptido de proteína cinasa A o polipéptido de caseína cinasa II para la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad neurodegenerativa o un trastorno de mielinación.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido de proteína cinasa A o a un polipéptido de caseína cinasa II para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa o un trastorno de mielinación.

Adecuadamente, dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

Adecuadamente, dicho trastorno de mielinación es esclerosis múltiple.

20 Descripción detallada de la invención

La señalización de Nogo puede inhibir el crecimiento de neuritas (3, 4), la diferenciación (9, 10), migración (12) y formación de sinapsa (11) de neuronas en el SNC. Por lo tanto, la señalización de Nogo se ha identificado como un inhibidor importante de la regeneración del SNC, que no ocurre bajo condición fisiológica.

25 Se describe que la fosforilación de los receptores de Nogo, p. ej., caseína cinasa II (CK2), inhibe la unión de proteínas asociadas con mielina que inhiben la regeneración neuronal tal como el crecimiento de neuritas. Se demuestra que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) puede opcionalmente utilizarse para inducir la fosforilación del receptor de Nogo, que suprime la inhibición dependiente de Nogo del crecimiento de neuritas de neuronas derivadas de neuroblastoma. En otras realizaciones, el tratamiento de CK2 extracelular supera la inhibición del crecimiento de neuritas por parte de proteínas asociadas con mielina. Esto se demuestra, por ejemplo, 30 en neuronas adultas de rata. Por lo tanto, la invención da a conocer nuevas estrategias para controlar la señalización de Nogo y en consecuencia la regeneración neuronal.

Se describe por primera vez una relación entre la fosforilación y la señalización de Nogo. Se describe por primera vez el efecto del ecto-dominio en la fosforilación sobre la inhibición dependiente de Nogo del crecimiento de neuritas. La fosforilación de los receptores de Nogo puede no ser requerida para el crecimiento de neuritas propiamente dicho, pero se requiere para superar la inhibición del crecimiento de neuritas. La inhibición del crecimiento de neuritas ocurre bajo condiciones *in vivo*, p. ej., después de una lesión traumática del sistema nervioso central. 35

Asimismo, se demuestra que la señalización de Nogo inhibe el crecimiento de neuritas de células mamíferas tales como células neurales derivadas de SH-SY5Y, y que la inhibición se suprime por tratamiento extracelular con CK2 sin BDNF. El tratamiento con CK2 inhibe la unión de Nogo-66, MAG y OMgp a sus receptores, permitiendo el crecimiento de neuritas en presencia de estos inhibidores del crecimiento de neuritas. Por lo tanto, demostramos ventajosamente los efectos independientes de BDNF de la invención. Adecuadamente, el BDNF no se usa en los métodos de la invención. Adecuadamente, el BDNF se omite específicamente de los métodos de la invención. Adecuadamente, las composiciones de la invención no comprenden BDNF. 40

Definiciones

45 Se ha de entender que el término 'comprende' (que comprende, comprendiendo) tiene su significado normal en la técnica, es decir, que la característica o grupo de características mencionadas se incluye, pero que el término no excluye ninguna otra característica o grupo de características mencionadas que también pueden estar presentes.

Receptores de Nogo

50 En un sentido amplio, "Receptores de Nogo" puede hacer referencia a cualquier proteína que medie la inhibición dependiente de Nogo del crecimiento de neuritas, y no necesita referirse específicamente solamente a receptores (NgR) en el sentido clásico localizado de membrana, pero también puede hacer referencia a cualquier proteína de unión a Nogo que medie la señalización de Nogo, p. ej., mediante proteínas distintas de los miembros de la familia de NgR; de hecho, nuestros resultados con neuronas normales demuestran que el tratamiento con CK2 puede

bloquear dicha señalización de Nogo independiente de NgR, como también la señalización dependiente de NgR. No obstante, adecuadamente la expresión "Receptores de Nogo" puede recibir su significado convencional en la técnica en este documento, a menos que el contexto indique otra cosa.

NgR1 y sus proteínas homólogas NgR2 y NgR3 pertenecen a una familia de proteínas ligadas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) con ocho regiones de repetición ricas en leucina, que no tienen dominios intracelulares. Si bien NgR1 puede interactuar con Nogo-A, MAG y OMgp, NgR2 interactúa solamente con MAG en un modo dependiente del ácido siálico. Esta interacción también puede inhibir el crecimiento de neuritas. Se desconoce el ligando para NgR3.

NgR1 elabora un complejo que implica LINGO-1 y el receptor de neurotrofina p75^{NTR}. Alternativamente, TAJ/TROY, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral sin interés comercial ampliamente expresado en neuronas, está implicado en el complejo, en lugar de p75^{NTR}. Se desconoce si NgR2 puede formar complejo con LINGO-1, p75^{NTR} o TAJ/TROY, como se observa para NgR1.

Por consiguiente, la señalización de Nogo puede iniciarse con por lo menos tres ligandos en oligodendrocitos, y puede transducir señales en neuronas a través de por lo menos dos receptores. Las contribuciones relativas de sistemas de receptores de ligandos específicos en señalización de Nogo para inhibición del crecimiento de neuritas pueden variar entre los distintos tipos de células neuronales.

La presente invención se refiere a receptores de Nogo presentes en la superficie celular. De hecho, es una descripción específica de la invención que las sustancias exógenas se usan para provocar la fosforilación de los receptores de Nogo en la superficie celular de la célula diana. Por lo tanto, la expresión "receptor de Nogo", tal como se emplea en esta memoria, se refiere adecuadamente a una proteína receptora de Nogo presente en la superficie celular de una célula diana. Adecuadamente, la célula diana es una célula diana de un vertebrado, más adecuadamente una célula diana mamífera, más adecuadamente una célula diana humana. En algunas realizaciones, la célula diana es más adecuadamente una célula humana comprendida por el sujeto que se ha de tratar, tal como una neurona humana, tal como una neurona humana adulta.

En un aspecto amplio, la expresión "receptor de Nogo" puede hacer referencia al polipéptido de cualquiera de los receptores de Nogo conocidos, tal como NgR1, NgR2 o NgR3. Asimismo, en dirigir el receptor de Nogo, puede ser que se fosforile más de un tipo de receptor de Nogo. Esto puede generar ventajas a la invención, tales como reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas independiente del tipo o tipos de receptores de Nogo particulares que se expresan en la célula diana particular de elección. Asimismo, puede ser que al direccionar una multiplicidad de proteínas receptoras de Nogo, se logre un efecto más fuerte y/o rápido.

Es importante destacar que cada receptor de Nogo posee la serina conservada en el residuo de aminoácidos 281. Por lo tanto, las referencias a los mutantes de los receptores de Nogo de acuerdo con la invención pueden abarcar de igual manera cualquier polipéptido NgR conocido, siempre que, desde ya, tenga la mutación o sustitución específica que se está analizando.

Adecuadamente, un receptor de Nogo de acuerdo con la invención es uno o más de NgR1, NgR2 o NgR3. Más adecuadamente, un receptor de Nogo de acuerdo con la invención es uno o más de NgR1 o NgR2. Una ventaja de esto es que estos receptores de Nogo se caracterizan mejor, y en consecuencia son susceptibles a la producción de efectos *in vivo* más específicos o definidos. Lo más preferiblemente, un receptor de Nogo de acuerdo con la presente invención es NgR1. Éste tiene numerosas ventajas, algunas de las cuales se exponen en la sección de ejemplos.

La invención se refiere principalmente a aplicaciones en vertebrados, tales como mamíferos. Por consiguiente, de manera adecuada, el receptor de Nogo de la invención es un receptor de Nogo vertebrado, tal como un receptor de Nogo mamífero. Lo más adecuadamente el receptor de Nogo de la invención es un receptor de Nogo humano. Un receptor de Nogo humano tiene una secuencia de polipéptidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos del receptor de Nogo humano. Naturalmente, un polipéptido receptor de Nogo de acuerdo con la invención se puede producir mediante cualquier medio adecuado, tal como producción recombinante a partir de una célula hospedante no humana. Sin embargo, para facilidad de comprensión, un polipéptido receptor de Nogo producido a partir de una célula no humana se considerará un receptor de Nogo humano si la secuencia de aminoácidos corresponde a la secuencia de aminoácidos humana.

Los mutantes de los receptores de Nogo se describen y analizan en este documento. Se ha de apreciar el análisis anteriormente expuesto de que dichos mutantes pueden comprender uno de un número de subtipos de receptores de Nogo tales como NgR1, NgR2, NgR3, etc. Para facilidad de comprensión, los aminoácidos particulares o las mutaciones particulares se analizan en el contexto de una secuencia de referencia del receptor de Nogo.

Secuencia de referencia

Se ha de apreciar que los residuos de aminoácidos particulares se analizarán usando sus identificadores numéricos en el polipéptido, como es convencional en la técnica. Cuando se hace referencia a residuos de aminoácidos particulares usando identificadores numéricos, la numeración se toma usando la secuencia de aminoácidos de NgR1

humano como la secuencia de referencia. Más adecuadamente, la secuencia de referencia del receptor de Nogo es la secuencia de aminoácidos humana NgR1 de NM023004:

**MKRASAGGSRL LAWVLWLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGIPAASQR
IFLHGNRISHVPAASFRACRNLTLWLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLSDNAQLRSVDPATF
HGLGRLHTLHLDRCGLQELGPGFLRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDLGNLTHFLHGNRI
SSVPERAFRGLHSLDRLLHQNRVAHVHPHAFRDLGRLMTLYLFANNLSALPTEALAPLRALQY
LRLNDNPWVCDRCRARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAGRDLKRLAANDLQGCAVATGP
YHPIWTGRATDEEPLGLPKCCQPDAAKASVLEPGRPASAGNALKGRVPPGDSPPGNGSGPR
HINDSPFGTLPGSAEPPLTAVRPEGSEPPGFPTSGPRRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGGG
GTGDSESGALPSLTCSLTPLGLALVLWTVLGPC**

- 5 Ésta se usará, como se entiende en la técnica, para localizar el residuo de interés. Éste no siempre es un ejercicio de recuento estricto – se debe prestar atención al contexto. Por ejemplo, si la proteína de interés tal como EHD2 humana es de una longitud ligeramente diferente, entonces la localización del residuo correcto en la secuencia humana correspondiente a (por ejemplo) S281 puede requerir que las secuencias se alineen y que se recoja el residuo equivalente o correspondiente, en lugar de simplemente tomar el residuo 281 de la secuencia de interés. Esto está dentro del ámbito del lector experimentado. Se exponen alineaciones ilustrativas en las figuras adjuntas.
- 10 Será obvio para el lector experimentado que la invención se ejemplifica predominantemente por referencia a NgR1. Se ha de observar que NgR1 exhibe alta homología de secuencia con otros polipéptidos de la familia NgR. Por lo tanto, en algunos aspectos, la invención se refiere al uso de NgR1 en el desarrollo de sustancias terapéuticas para aplicación a otras proteínas de la familia NgR.
- 15 En algunos aspectos de la invención, puede ser conveniente emplear una prueba funcional para detectar si un polipéptido particular ha de considerarse o no un polipéptido de la familia NgR. Además, o en lugar de, los criterios basados en secuencias anteriormente mencionados, se puede usar también el siguiente criterio funcional: la unión a ligandos tales como aquellos mencionados en este documento. Asimismo, la capacidad de funcionar en un ensayo de crecimiento de neuritas también se puede utilizar, tal como por sobreexpresión en células SH-SY5Y con tratamiento de RA como se describe en los ejemplos. Por ende, con el fin de determinar si un polipéptido particular
- 20 se considera en realidad o no un polipéptido de la familia NgR, se puede ensayar si ese polipéptido funciona o no en un ensayo de crecimiento de neuritas. Si la proteína NgR soporta la señalización de Nogo en este contexto, el polipéptido puede considerarse un receptor de Nogo (polipéptido de la familia NgR). Desde ya, el objetivo de la invención es reducir la inhibición del crecimiento de neuritas y esto debe tenerse en mente a la hora de evaluar la proteína(s) NgR – son las proteínas de tipo salvaje las que inhiben el crecimiento de neuritas en este ensayo, en particular cuando no se tratan con cinasa de acuerdo con la invención.
- 25

Mutantes de los receptores de Nogo de la invención

La invención se refiere a polipéptidos receptores de Nogo caracterizados por que la serina 281 está sustituida con cualquier otro aminoácido distinto de serina. Adecuadamente, se sustituye S281 con un aminoácido no fosfo-aceptor, de modo que adecuadamente S281 no es S, T ni Y.

- 30 Adecuadamente, la invención da a conocer un NogoR que tiene S281A. Éste tiene la ventaja de no ser fosforilable en este sitio. Esto significa que el receptor tiene la propiedad biológica de ser resistente a la inhibición de CKII/PKA de la unión al ligando. En otros términos, dicho mutante posee la novedosa función de señalización en respuesta a ligando(s) de Nogo, incluso en presencia de CKII/PKA.
- 35 Adecuadamente, la invención da a conocer un NogoR que tiene S281D. Éste tiene la ventaja de simular la fosforilación en S281. Esto significa que el receptor tiene la propiedad biológica de ser permanentemente desactivado, de modo tal que la inhibición del crecimiento de neuritas se reduce permanentemente usando este receptor. Más específicamente, este receptor no se une a ligando(s) de Nogo. En otros términos dicho mutante posee la novedosa función de NO unión (o señalización) en respuesta a ligando(s) de Nogo, más allá de la presencia de CKII/PKA.
- 40 Adecuadamente, los polipéptidos receptores de Nogo (NogoR) de la invención comprenden la secuencia de NM023004 excepto donde se indica, p. ej., en el residuo correspondiente a S281.
- 45 La invención se refiere también a NogoR que tienen por lo menos 60% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 70% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 75% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 80% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 85% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 90% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 95% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 97% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo

menos 98% de identidad con NM023004, adecuadamente por lo menos 99% de identidad con NM023004, siempre con la característica de que el residuo S281 sea distinto de serina.

Las formas truncadas adecuadamente corresponden a esta secuencia en toda la longitud de dicha forma truncada. Adecuadamente, un polipéptido NogoR de acuerdo con la presente invención comprende por lo menos 30 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 80 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 130 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 180 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 230 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 280 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 330 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 380 aminoácidos, adecuadamente por lo menos 382 aminoácidos (p. ej., NgR2 de longitud total), adecuadamente por lo menos 402 aminoácidos (p. ej., NgR3 de longitud total), adecuadamente por lo menos 417 aminoácidos (p. ej., NgR1).

Polipéptidos y mutantes

Las secuencias del receptor de Nogo se pueden modificar para uso en la presente invención. Típicamente, se efectúan modificaciones que mantienen la región de la secuencia que comprende serina 281 (o la sustitución en dicha dirección). Las sustituciones de aminoácidos pueden efectuarse, por ejemplo, de 1, 2 o 3 a 10, 20 o 30 sustituciones siempre que la secuencia modificada retenga el residuo S281 requerido. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos no naturales, por ejemplo aumentar la semivida de un polipéptido administrado terapéuticamente. Lo mismo se aplica a los polipéptidos PKA o CKII de la invención, en cuyo caso se requiere siempre que la actividad de PKA/CKII cinasa se retenga tras cualquier mutante o sustituciones introducidas.

Se pueden efectuar sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla que sigue. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse unos por otros:

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar – sin carga	CSTM
		NQ
	Polar – con carga	DE
		KR
AROMÁTICO		HFVY

Las proteínas de la invención se preparan típicamente por medios recombinantes, por ejemplo, como se describe a continuación. No obstante, también se pueden preparar por medios sintéticos usando técnicas conocidas por los expertos tales como síntesis de fase sólida. Las proteínas de la invención también pueden producirse como proteínas de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Los ejemplos de pares de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o activación de transcripción) y β -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre el par de proteínas de fusión y la secuencia de proteínas de interés para permitir la eliminación de secuencias de proteínas de fusión.

Las proteínas de la invención pueden estar sustancialmente en forma aislada. Se ha de entender que la proteína puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interfieren con el propósito que se tiene como fin de la proteína e incluso considerarse sustancialmente aislada. Una proteína de la invención puede estar también en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso en general comprenderá la proteína en una preparación en la que más de 90%, p. ej., 95%, 98% o 99% de la proteína en la preparación es una proteína de la invención.

Aplicaciones de la invención

El lector experto observará que la invención se refiere a un nuevo método para inhibir la señalización de Nogo. Este nuevo método implica la fosforilación del receptor de Nogo. Las técnicas descritas en este documento también implican mutantes de receptores de Nogo. Claramente, cada una de estas variaciones técnicas ligeramente distintas es una parte de la misma invención común que se refiere a la inhibición de la señalización de Nogo. Para practicidad y facilidad de comprensión, la invención se ha descrito principalmente en relación con reducir la inhibición del crecimiento de neuritas. Esto encuentra aplicación particular en campos tales como lesión de la médula espinal. No obstante, los aspectos más amplios de la invención pueden implicar la manipulación de otras propiedades de neuronas tales como su migración o diferenciación. De hecho, en principio cualquier procedimiento controlado o

afectado por la señalización de Nogo (tal como inhibición del crecimiento de neuritas, tal como migración de neuronas o tal como cualquier otro fenómeno biológico influenciado por la señalización de Nogo) se puede modular o controlar usando las técnicas descritas en este documento, tales como fosforilación del receptor de Nogo.

5 Sin desear estar influenciados por la teoría, los biomecanismos precisos del crecimiento de neuritas todavía son un tema de investigación activa. Puede ser que las técnicas de señalización de Nogo descritas en este documento afecten la regulación del crecimiento de neuritas en el sentido de afectar las señales de control, o puede ser que afecten la maquinaria del crecimiento de neuritas tal como proteínas implicadas en la formación de fibras que pueden estar íntimamente implicadas en la producción del efecto de crecimiento de neuritas. La presente invención no se refiere en sí misma a la biomecánica precisa del crecimiento de neuritas. Es una descripción clave de la
10 invención que la manipulación del estado de fosforilación del receptor de Nogo, o de hecho el uso de mutantes específicos del receptor de Nogo descritos en este documento, son útiles en la modulación del crecimiento de neuritas. Esta descripción, y las formas en que la invención se pone en práctica, son típicamente independientes del mecanismo molecular preciso que tiene lugar en el punto del crecimiento de neuritas físico propiamente dicho.

15 Una aplicación clave de la invención es en el tratamiento de lesión de la médula espinal. En particular, la invención encuentra aplicación en la promoción de regeneración después de una lesión en la médula espinal. Específicamente, la invención es útil para disminuir o reducir la inhibición del crecimiento de neuritas causada por la señalización mediante el receptor de Nogo. Al suprimir o reducir la señalización mediante el receptor de Nogo, la inhibición del crecimiento de neuritas se disminuye de manera útil. Esto ofrece condiciones que son ventajosamente permisivas al crecimiento de neuritas y en consecuencia a la regeneración.

20 Diversos ejemplos presentados en este documento implican la canulación del sujeto para aplicación de las composiciones de la invención. Se ha de destacar que cuando el sujeto que está siendo tratado es un ser humano, la canulación ventajosamente se evita. En lugar de canulación, se emplea adecuadamente una inyección tópica o una serie de inyecciones de las composiciones de la invención.

25 En la sección de ejemplos se demuestran aplicaciones *in vivo*. En general, la invención es en general aplicable de la siguiente manera:

- Se añade ng a µg de cinasa tal como CK2, opcionalmente con 100 µM ATP, después de la lesión, p. ej., de la médula espinal.

En un sistema experimental, se puede provocar una lesión de la médula espinal y disponer una cánula en la lesión. A través de esta cánula, se puede aplicar cinasa tal como CK2 sobre el área.

30 También es posible aplicar cinasa tal como CK2 con inyección, sin canulación. Esto se prefiere en sujetos humanos. No obstante, para sistemas experimentales, la canulación facilita la adición de cinasa, tal como CK2, oportunamente.

Puede luego examinarse si se observa brote de neuritas o no, por ejemplo con inmunofluorescencia de sección de tejido.

35 Después de la observación del brote, se pueden efectuar pruebas conductuales para evaluar la recuperación funcional.

Adecuadamente, se puede usar CK2 sola, o CK2 en combinación con condroitinasa ABC, que puede digerir sulfato de condroitina, otro inhibidor de regeneración del SNC.

Adecuadamente, se puede usar PKA, o PKA en combinación con condroitinasa ABC.

Adecuadamente, los métodos de la invención pueden ser *in vitro*.

40 Adecuadamente, los métodos de la invención pueden ser *in vivo*, por ejemplo en el tratamiento de un sujeto tal como un sujeto humano.

Fosforilación del receptor de Nogo

45 Se contempla que la mayoría de las aplicaciones o realizaciones prácticas de la invención afectarán la señalización del receptor de Nogo mediante la inducción de su fosforilación. Las realizaciones de la invención que implican los mutantes de los receptores de Nogo se analizan en este documento a continuación. No obstante, tomando en consideración la fosforilación del receptor de Nogo, los inventores han identificado sorpresivamente un sitio particular dentro del receptor de Nogo que media los efectos ventajosos de la invención. Este sitio es serina 281 del receptor de Nogo.

50 Los inventores derivaron su atención al estudio de serina 281 y los residuos de aminoácidos circundantes. Se usó una gama de técnicas experimentales, incluido análisis de secuencias como también experimentación directa, como se presenta en los ejemplos adjuntos, con el fin de validar su sorprendente hallazgo.

Uno de los discernimientos clave que describen los presentes inventores es que serina 281 del receptor de Nogo es de primordial importancia como diana para la presente invención. Asimismo, los inventores han descrito una serie de formas en las que serina 281 del receptor de Nogo puede ser dirigida y fosforilada. Dos de las formas más adecuadas de lograr esto son el uso de proteína cinasa A y/o caseína cinasa II para fosforilar directamente serina 281 del receptor de Nogo. Por lo tanto, si bien la proteína cinasa A y la caseína cinasa II no están necesariamente relacionadas físicamente entre sí, en el contexto de la presente invención forman un grupo técnico cohesivo individual de formas alternativas en las que se puede implementar la invención. En otros términos, la caseína cinasa II y la proteína cinasa A representan dos formas igualmente válidas de implementar la misma invención individual. Por lo tanto, la presencia de estas dos alternativas estructuralmente distintas en las reivindicaciones anejas es completamente coherente con un concepto inventivo único. Asimismo, estas dos enzimas comparten el mismo beneficio técnico en el contexto de la invención, que es, a saber, catalizar la fosforilación de serina 281 del receptor de Nogo. Al menos por estas razones, la solicitud puede verse claramente relacionada con un único concepto inventivo. Se describen diversas formas de lograr los beneficios técnicos de la invención con el fin de ayudar a comprender y a asegurar que los lectores experimentados no tengan dificultad en practicar la invención.

Serina 281

Como se observó anteriormente, es una parte importante del concepto inventivo central que las distintas formas técnicas en las que la invención se puede implementar estén de hecho dirigidas a producir el mismo efecto técnico, es decir, fosforilación de serina 281 del receptor de Nogo. En el curso de sus estudios, los inventores hallaron que este residuo es parte de un sitio aceptor de fosfato pronosticado tanto para CE2 como para PKA. A su vez, este hallazgo clave ha sido respaldado por investigación experimental, que demuestra que tanto CK2 como PKA catalizan la fosforilación de este importante residuo, y por lo tanto producen la reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas.

Caseína cinasa II

Adecuadamente, la caseína cinasa II es caseína cinasa II de un vertebrado, más adecuadamente de un mamífero. Más adecuadamente, la caseína cinasa II es caseína cinasa II humana

La caseína cinasa II más comúnmente ocurre como hetero-tetrámero. Este hetero-tetrámero típicamente comprende una subunidad catalítica que consiste en dos alfa polipéptidos, y una subunidad reguladora que consiste en dos polipéptidos beta. Dicho complejo es típicamente constitutivamente activo en el sentido de tener actividad de cinasa. Asimismo, la subunidad catalítica propia (es decir, el homodímero de dos polipéptidos alfa) tiene actividad catalítica incluso en ausencia de la subunidad reguladora.

Por consiguiente, o bien la forma de heterotetrámero de CK2 o la forma de homodímero de CK2 puede aplicarse en la presente invención, específicamente el heterotetrámero alfa-beta de CK2 o el homodímero alfa de CK2.

Más adecuadamente CK2 se usa en la forma de una preparación comercial, tal como la de New England Bio Labs. Ésta es adecuadamente la forma de la enzima holo de CK2.

Más adecuadamente, la CK2 utilizada está compuesta por dos cadenas de polipéptidos, donde cada cadena de polipéptidos tiene la secuencia de una subunidad alfa de CK2 humana tal como: nombre del gen; CSNK2A1, número de acceso NM001895.3, NM 177559.2, NM 177560.2 (3 subtipos) nombre del gen; CSNK2A2, número de acceso NMOO 1896.2.

Con respecto a CSNK2A1, NM001895 y NM 177559 pueden producir las mismas proteínas, aunque tienen diferentes regiones no codificantes 5'. NM 177560 codifica la isoforma b, que tiene una región N terminal más corta. Más adecuadamente, se usa la secuencia de proteínas de NM001895 y NM177559, que es la isoforma a:

```
MSGPVPSRARVYTDVNTHRPREYWDYESHVVEWGNQDDYQLVRKLGKGYSEVF EAINI
TNNEKVVVKILKPVKKKKIKREIKILENLRGGPNIITLADIVKDPVSRTPALVF EHVNN
TDFKQLYQTLTDYDIRFYMYEILKALDYCHSMGIMHRDVKPHNV MIDHEHRKLR LIDWG
LAEFYHPGQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYS LDMWSLGCMLASMI FRKEPFFHGH
DNYDQLVRIAKVLGTEDLYDYIDKYNIELDPRFNDILGRHSRKRWERFVHSENQH L VSP
EALDFLDKLLRYDHQSRLTAREAMEHPYFYTVVKDQARMGSSSMPGGSTPVSSANMSG
ISSVPTSPPLGPLAGSPVIAAANPLGMPVPAAAGAQQ
```

Con respecto a CSNK2A2, más adecuadamente se usa la siguiente secuencia:

MPGPAAGSRARVYAEVNSLRSREYWDYEAHVPSWGNQDDYQLVRKLGRGKYSEVF EAIN
 ITNNERVVVKILKPVKKKKIKREVKILENLRGGTNI IKLIDTVKDPVSKTPALVFEYIN
 NTDFKQLYQILTDFDIRFYMYELLKALDYCHSKGIMHRDVKPHNVMIDHQQKRLRLIDW
 GLAEFYHPAQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSLGCMLASMI FRREPFFHG
 QDNYDQLVRIAKVLGTEELYGYLKKYHIDLDPHFNDILGQHSRKRWFENFIHSENRLHVS
 PEALDLLDKLLRYDHQQLTAKEAMEHPYFYPVVKEQSQPCADNAVLSSGLTAAR

Proteína cinasa A

Adecuadamente, la proteína cinasa A es una proteína cinasa A de un vertebrado, más adecuadamente una proteína cinasa A de mamífero. Más adecuadamente, la proteína cinasa A es proteína cinasa A humana.

- 5 La proteína cinasa A utilizada puede estar compuesta por 2 subunidades alfa y 2 subunidades beta. El homodímero de la subunidad beta es el dominio inhibidor, y se requiere cAMP para disociación del homodímero beta del homodímero alfa.

- 10 Más adecuadamente, la proteína cinasa A utilizada está compuesta por 2 cadenas de polipéptidos alfa que tienen la secuencia de una subunidad alfa de PKA humana (es decir, un homodímero de subunidad alfa PKA): nombre del gen PRKACA, número de acceso NM002730.3, NM207518.1 (2 subtipos). Esto tiene la ventaja de evitar el uso de la subunidad beta (que requiere cAMP para activar el heterotetrámero alfa-beta de PKA) y por lo tanto tiene la ventaja adicional de evitar el uso de cAMP. Con respecto a PRKACA, NM 002730 codifica la isoforma 1, que se expresa de manera ubicua. NM207518 codifica PKA específica de células espermatozoides, isoforma 2. Más adecuadamente, se usa la secuencia de la isoforma 1, tal como:

MGNAAA AKKGSEQESVKEFLAKAKEDFLKKWESPAQNTAHL DQFERIKTLGTGSFGRVM
 LVKHKETGNHYAMKILDKQKVVLKQIEHTLNEKRILQAVNFPFLVKLEFSFKDNSNLY
 MVMEYVPGGEMFSLRRIGRFSEPHARFYAAQIVLTFEYLHSLDLIYRDLKPENLLIDQ
 QGYIQVTDFGFAKRVKGRWTWLCGTPEYLAPEIILSKGYNKAVDWWALGVLIYEMAAGY
 PPFADQPIQIYEKIVSGKVRFP SHFSSDLKDLLRNLLQVDLTKRFGNLKNGVNDIKNH
 KWFATTDWIAIYQRKVEAPFIPKFKGPGDTSNFDYEEEEIRVSINEKCGKEFSEF

15

Está disponible PKA de gran actividad específica de New England Biolabs.

Adecuadamente, se usa PKA del homodímero alfa.

- 20 Sin desear estar influenciados por la teoría, parece ser que la proteína cinasa A puede no tener una función fisiológica en el crecimiento de las neuritas. En otros términos, puede ser que *in vivo* en un sistema biológico natural, PKA puede no entrar en contacto con un receptor de Nogo y/o puede no fosforilarlo. No obstante, está claramente demostrado en este documento que PKA cataliza de hecho este evento de fosforilación clave. Por estos motivos, puede ser que el tratamiento que usa PKA ofrezca otra ventaja en evitar la alteración de cualquier proceso biológico natural.

- 25 A partir de una comparación de las enzimas que podrían utilizarse para dirigir serina 281, sin desear estar influenciados por la teoría, parecer ser que CK2 podría ser un candidato biológico más propenso a la fosforilación "natural" del receptor de Nogo. Por este motivo, puede ser que usar CK2 para los tratamientos de la invención podría ofrecer otra ventaja sobre el uso de otras posibles enzimas tales como PKA, ya que puede haber una mayor fidelidad o especificidad biológica, lograda con el uso del apareamiento cinasa-sustrato más probablemente natural o biológico. No obstante, como lo demuestran los presentes inventores, CK2 es un catalizador eficaz para llevar a cabo la fosforilación de serina 281 del receptor de Nogo.

- 30 Se ha de observar que las subunidades de las cinasas particulares de interés descritas en este documento pueden aplicarse igualmente en la presente invención. Una subunidad puede ser un subconjunto de la colección de proteínas que típicamente componen la enzima activa *in vivo*, o una subunidad puede referirse a un fragmento o una forma truncada de uno de los polipéptidos de la cinasa de interés. En particular, puede ser ventajoso usar solamente la subunidad catalítica de la enzima de interés. Esto puede proporcionar ventajas tales como una forma más activa de la enzima y/o puede evitar la inmunogenicidad u otras de dichas complicaciones que podrían surgir del uso de complejos o moléculas más grandes. De hecho, el uso de un polipéptido que está truncado, o mutado, tiene como fin estar dentro del alcance de la invención. Las mutaciones pueden efectuarse, por ejemplo, para potenciar actividad o proveer independencia de cofactores conocidos de la enzima que se esté utilizando. Si un lector experimentado

35

desea determinar si un fragmento o truncación particular de una enzima de interés yace o no dentro del alcance de la invención, es esencial que la enzima utilizada retenga su actividad catalítica funcional. Más específicamente, una cinasa utilizada en la presente invención es de interés solamente si es capaz de catalizar la incorporación de fosfato en el receptor de Nogo, tal como el residuo 281 del receptor de Nogo. Esto se puede ensayar fácilmente, por ejemplo, combinando la cinasa o el fragmento de interés con el receptor de Nogo en condiciones permisivas de fosforilación, y ensayando el receptor de Nogo de allí en más para determinar si la fosforilación realmente tuvo lugar. Asimismo, la actividad de la cinasa de interés puede evaluarse funcionalmente, por ejemplo aplicándola a células y ensayando su reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas. Claramente, solamente aquellas enzimas o fragmentos capaces de producir esta reducción funcional de la inhibición del crecimiento de neuritas son de interés o aplicación en la invención. Las formas ilustrativas en que se puede llevar a cabo este ensayo funcional se presentan en la sección de ejemplos.

Por lo tanto, a menos que el contexto indique lo contrario, las referencias a cinasas de interés en la invención tales como "proteína cinasa A" o "caseína cinasa II" se deben tomar como que incluyen cualquier subunidad, fragmento, mutante o truncación de esas cinasas, siempre que retengan la actividad catalítica de la cinasa para el receptor de Nogo como se explicó anteriormente, más adecuadamente en el ensayo funcional para reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas.

Adecuadamente, la proteína cinasa A o caseína cinasa II utilizada en la invención comprende el polipéptido de longitud total. Más adecuadamente, la proteína cinasa A o la caseína cinasa II utilizada en la invención compone el polipéptido correspondiente a la enzima/s de tipo natural humana. Más adecuadamente, la proteína cinasa A o la caseína cinasa II utilizada en la invención es como se describe en la sección de ejemplos.

Adecuadamente, la proteína cinasa A o caseína cinasa II utilizada en la invención comprende proteína recombinante expresada en *e. coli*.

Adecuadamente, la proteína cinasa A o la caseína cinasa II utilizada en la invención es exógena, es decir, no se elabora en las células locales al sitio de administración, en cambio se suministra externamente o exógenamente tal como en una composición de la invención.

Composiciones

Las composiciones de la invención comprenden uno o más catalizadores tales como enzimas capaces de llevar a cabo la fosforilación de NogoR serina 281. Adecuadamente, dicha enzima es PKA. Adecuadamente, dicha enzima es CKII.

Las composiciones de la invención pueden comprender PKA y CKII

CK2 está adecuadamente presente a 500 -1200 U/ml CK2 concentración final, o una cantidad equivalente si la composición se seca/liofiliza o se concentra, p. ej., almacenamiento.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende 10-100 μ M ATP, 5-0,5 μ g CK2, 1-10 mM Mg Cl₂ o Mg-acetato y 10-50 mM KCl o K-acetato.

Cuando la enzima utilizada es el homodímero de la subunidad alfa de CK2, Kion es opcional (de hecho, Kion no es necesario); por lo tanto, las composiciones que adecuadamente contienen solamente el homodímero de la subunidad alfa de CK2 como la enzima comprenden solamente Mg y ATP como componentes adicionales.

Usar el heterotetrámero alfa y beta de CK2 tiene la ventaja de que la subunidad beta potencia la especificidad del sustrato de fosforilación de CK2 y Kion promueve este efecto de subunidad beta. Por consiguiente, cuando se usa el heterotetrámero alfa y beta de CK2 como la enzima, adecuadamente Kion se incluye con el fin de obtener esta ventaja.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende 10-100 μ M ATP, 5-0,05 μ g PKA y 1-10 mM MgCl₂ o Mg-acetato.

Los polipéptidos de la invención pueden combinarse preferiblemente con distintos componentes para producir las composiciones de la invención. Preferiblemente, las composiciones se combinan con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición (que puede ser para uso humano o animal). Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen disoluciones salinas isotónicas, por ejemplo disolución salina tamponada con fosfato.

La composición de la invención puede administrarse por inyección directa.

La composición puede formularse para administración a sitios de tejido nervioso, tales como la médula espinal, y puede por lo tanto formularse para ser compatible con el líquido cefalorraquídeo u otros tejidos como éste.

Típicamente, cada proteína puede administrarse en una dosis de actividad particular en lugar de una cantidad de peso corporal mg/kg específica. Los niveles de actividad ilustrativos para administración se exponen en la sección

de ejemplos. A modo de ejemplo con respecto a volúmenes, para ratones, típicamente se inyectan alrededor de 2 μ l en el SNC. Por ende, para seres humanos, típicamente se inyectan 50-200 μ l de disolución de cinasa+ATP. Las dosis de los ingredientes activos son tal como se describe en este documento.

Formulación/Administración

- 5 Adecuadamente, se usa una inyección para administrar una composición de la invención tal como CKII y/o PKA.

Las composiciones de la invención (p. ej., que comprenden cinasa(s), ATP y/o ión o iones, se pueden administrar por vía tópica, p. ej., durante la cirugía de descompresión espinal.

Si no se requiere cirugía, la inyección se puede usar como método alternativo para la administración.

- 10 Después de la cirugía, las composiciones de la invención se pueden administrar por inyección periódica, durante un periodo eficaz, tal como hasta 1 mes o más, tal como hasta 3 meses.

Una matriz, tal como matrigel (BD Bioscience), puede usarse ventajosamente para mantener el reactivo en la región administrada. En lugar de la matriz, se puede usar cualquier sustancia y/o dispositivo de liberación lenta para controlar los periodos de dosificación/liberación.

ATP

- 15 Dado que algunas neuronas pueden segregar ATP, puede no ser un elemento esencial de la composición de la invención. Bajo condiciones *in vitro*, hemos demostrado los efectos de cinasa exógena tales como CK2 sin adición de ATP, ya que el medio de cultivo contiene ATP.

Adecuadamente, las composiciones de la invención comprenden ATP. Esto tiene la ventaja de suministrar ATP para ayudar a promover la fosforilación del receptor de Nogo.

- 20 Adecuadamente, la composición comprende 0,1-1 mM ATP para composiciones que comprenden o bien CK2 o PKA.

Magnesio

Adecuadamente, la composición comprende una fuente de 5 mM de ión de Mg^{2+} .

El ión de Mg^{2+} se puede suministrar como $MgCl_2$, o $MgAc$ (acetato de magnesio) tal como $(CH_3COO)Mg_2$.

- 25 Potasio

Cuando una composición de la invención comprende CK2, adecuadamente dicha composición también comprende ión de potasio. El ión de potasio típicamente no se necesita para las composiciones que comprenden PKA, pero puede incluirse opcionalmente, por ejemplo, cuando la composición que comprende PKA también comprende CKII.

- 30 El ión de potasio es adecuadamente provisto como 25-50 mM ión de K, tal como KCl o acetato de potasio (CH_3COOK).

El ión de potasio tal como KCl no es esencial, pero ventajosamente tiene efectos promotores sobre la actividad de cinasa del heterotetrámero alfa o beta CK2.

CAMP

- 35 AMP cíclico (cAMP) puede opcionalmente incluirse en las composiciones de la invención, particularmente cuando dichas composiciones comprenden PKA. Específicamente, cuando se usa solamente la forma alfa de PKA, cAMP es opcional. No obstante, cuando se usa la forma beta de PKA, es conveniente incluir cAMP en las composiciones de la invención y tiene la ventaja de potenciar/habilitar la actividad de PKA.

- 40 cAMP es adecuadamente provisto como cAMP dibutílico o como cAMP convencional. El compuesto se comercializa tal como Sigma Inc. o como Merck Inc. El uso de cAMP dibutílico tiene la ventaja de ser permeable a las células. Asimismo, el cAMP convencional no penetra en las membranas plasmáticas. Ya que las composiciones de la invención se aplican adecuadamente en forma extracelular, se utiliza adecuadamente cAMP convencional como cAMP de acuerdo con la presente invención, ya que ofrece la ventaja de minimizar o eliminar cualquier efecto colateral sobre la señalización intracelular, y ofrece la ventaja de confinar el cAMP añadido al entorno extracelular, ayudando así a retenerlo localizado con la enzima(s) de las composiciones de la invención.

- 45 Ventajas

Es una ventaja de la invención que la fosforilación de los receptores de Nogo suprime la señalización de Nogo, permitiendo la regeneración de neuritas.

Es una ventaja de la invención que la fosforilación de los receptores de Nogo bloquea la unión a sus agonistas.

La invención encuentra aplicación particular en lesión de la médula espinal.

Es una ventaja de la invención que el receptor de Nogo esté dirigido. Esto tiene la ventaja de proveer métodos y composiciones que actúan en un modo independiente del ligando.

5 Combinaciones

Puede ser ventajoso combinar la invención con la inhibición de la señalización de condroitina. Una forma de lograr esto es que la condroitinasa, tal como la condroitinasa ABC, puede aplicarse para promover condiciones permisivas del crecimiento de neuritas. Es una ventaja que la condroitinasa dirija una vía distinta de la vía de Nogo. Por consiguiente, es ventajoso combinar la condroitinasa con tratamientos o composiciones de la invención con el fin de proveer un enfoque dirigido dual para promoción del crecimiento de neuritas.

Puede ser ventajoso combinar la invención con otra forma de dirigir la vía de Nogo. Por ejemplo, puede ser ventajoso combinar la invención con la aplicación de un anticuerpo del receptor de Nogo, o con anticuerpos contra ligandos del receptor de Nogo. Es una ventaja de estas realizaciones que se usen múltiples intervenciones para dirigir el mismo punto en la vía de señalización. Por lo tanto, la posibilidad de efectos colaterales indeseados o señalización cruzada hacia otras vías ventajosamente se evita.

Puede ser también ventajoso combinar la invención con un anticuerpo anti-LINGO.

Un anticuerpo anti-LINGO ilustrativo puede ser tal como el suministrado por Biogen Inc. Dicha combinación tiene la ventaja de dirigir una molécula física distinta, incluso dentro del mismo complejo de señalización general. Por consiguiente, las combinaciones tales como esta ofrecen la ventaja de fidelidad de señalización, es decir, dirigir solamente una sola vía, combinada con la ventaja de dirigir múltiples moléculas distintas e intentar así lograr un bloqueo de la señal más robusto.

También puede ser ventajoso combinar la invención con rehabilitación, que puede ser eficaz para promover la conexión correcta de las neuronas. Dicha combinación puede también reducir ventajosamente la conexión aberrante.

Las composiciones de la invención pueden encontrar aplicación en la administración durante o después de una cirugía, tal como neurocirugía. En esta realización, la cirugía es un ejemplo de lesión del tejido nervioso adulto. Por lo tanto, la cinasa(s), ATP y cualquier ión de metal necesario, puede aplicarse durante la cirugía.

Opcionalmente, una composición de la invención también puede comprender Cethrin. Típicamente, esto se usa a 0,3, 1, 3, 6 o 9 mg por dosis.

La aplicación de una matriz, o la inclusión de una matriz en la composición o composiciones de la invención, tiene la ventaja de ayudar a los reactivos añadidos a permanecer o persistir en la lesión.

Los inhibidores de inflamación pueden estar comprendidos en una composición de la invención, y/o aplicarse lo antes posible después de la lesión/cirugía.

El trasplante de células madre puede llevarse a cabo, adecuadamente después de que ha cedido la inflamación (de lo contrario las células trasplantadas podrían ser exterminadas por el sistema inmunitario del hospedante). A modo de ejemplo, para un ratón, las células se trasplantan 5 días después de la lesión, es decir, se trasplantan las células después de la inflamación.

Por lo tanto, los inhibidores de inflamación, inhibidores de Rho (tales como la toxina C3) y/o células ES pueden combinarse de manera útil con la invención. Con respecto a las células ES, la activación forzada de la señalización de Nogo puede inhibir la diferenciación neuronal pero promover la diferenciación glial de células madre neuronales. De modo que, si Nogo está activo en el área lesionada, la diferenciación de células trasplantadas puede promoverse ventajosamente por la inhibición de la señalización de Nogo.

Reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas

Ha sido un problema persistente en la técnica que el recrecimiento o la regeneración de neuronas sucede solamente en forma deficiente, o no sucede en absoluto, en tejido nervioso adulto dañado. En este contexto, dañado puede inferir un daño físico causado por lesión, o puede inferir daño causado por un trastorno biológico tal como una enfermedad degenerativa. Claramente, en cualquier de dichos escenarios, se desea la regeneración o el recrecimiento del tejido nervioso.

Está bien consolidado que el crecimiento de neuritas está inhibido en tejido nervioso de adultos. Es un objeto de la invención eliminar o reducir esta inhibición. El resultado neto de esto es una promoción o potenciación de la regeneración tal como mediante el crecimiento de neuritas. Esto puede denominarse estimulación del crecimiento de neuritas. De hecho, para la mayoría de las aplicaciones, puede no haber una diferencia sustancial entre la

estimulación del crecimiento de neuritas y la reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas. No obstante, debido al conocimiento y a la comprensión adquiridos por los inventores de este sistema críptico, la invención se describe consistentemente en términos de reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas. Esto se debe a que está consolidado que ciertos ligandos de la familia de Nogo son inhibidores del crecimiento de neuritas. Por lo tanto, es la reducción de esta inhibición por señalización mediante el receptor de Nogo el tema de la invención. Si resulta útil considerar la eliminación de esta inhibición como "estimulación" del crecimiento de neuritas, entonces esto puede tenerse en cuenta o se puede hacer referencia a esto oportunamente, sin restar importancia al objetivo general de la invención que es eliminar o reducir la inhibición del crecimiento de neuritas, permitiendo o promoviendo (o de hecho estimulando) así la regeneración neural tal como mediante el crecimiento de neuritas.

A su vez, la invención puede combinarse ventajosamente con uno o más estimuladores del crecimiento de neuritas, provocando de este modo simultáneamente el crecimiento, como también eliminando o reduciendo la inhibición, y conduciendo a un rebrote o una regeneración más pronunciada o potenciada.

Otras aplicaciones

En un aspecto amplio, la invención se refiere a PKA para uso como medicamento.

En un aspecto amplio, la invención se refiere a CK2 para uso como medicamento.

En un aspecto amplio, la invención se refiere a un nuevo uso extracelular para CK2.

Se describe que la proteína cinasa A (PKA), como también CK2, puede inhibir la señalización Nogo. Más adecuadamente, la cinasa utilizada en la invención es PKA.

La invención se refiere a la reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas después de lesión de la médula espinal, en particular por inhibición de la señalización de Nogo.

Las aplicaciones de la invención no están limitadas solamente a la reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas. La señalización de Nogo está implicada en la diferenciación (9, 10, en la formación de sinapsa (11) y en la migración (12) de neuronas durante el desarrollo. También está implicada en la enfermedad de Alzheimer, un trastorno neurodegenerativo que causa demencia (13-15). Por lo tanto, la invención puede aplicarse ventajosamente en estas áreas, como también en áreas especialmente adecuadas tales como reducción de la inhibición del crecimiento de neuritas.

En particular, la invención puede aplicarse a enfermedad neurodegenerativa en general, tal como enfermedad de Alzheimer y/o enfermedad de Parkinson. Ésta es una aplicación particularmente adecuada de la invención, ya que NogoR puede unirse a amiloide B y a su precursor APP.

La invención también puede aplicarse a trastornos neurológicos más agudos, tales como accidente cerebrovascular.

La inhibición de Nogo conduce a aumento de mielinación. En consecuencia, la invención encuentra aplicación en cualquier trastorno de mielinación, tal como esclerosis múltiple. Por ende, la invención puede aplicarse a esclerosis múltiple. La esquizofrenia es otro ejemplo de trastorno nervioso conectado con un defecto de mielinación. Por ende, la invención puede aplicarse a esquizofrenia. Asimismo, la invención se refiere a un método para aumentar la mielinación en un sistema, donde dicho método comprende fosforilar un receptor de Nogo en dicho sistema, adecuadamente por adición de PKA y/o CKII a dicho sistema.

La invención también se refiere a un método para inhibir la unión de inhibidores del crecimiento de neuritas tales como ligando(s) de Nogo al receptor de Nogo, donde dicho método comprende inducir la fosforilación de dicho receptor de Nogo, tal como en serina 281.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. BDNF promueve el crecimiento de neuritas de SH-SY5Y tratadas con RA, e induce la fosforilación de NgR1. (A) Se incubaron células SH-SY5Y con los reactivos indicados. Las imágenes celulares se tomaron con microscopía de contraste de fases. (B) El número de células que extienden las estructuras de tipo neuritas de más de 40 μm y el número de células totales se contaron a partir de las imágenes tomadas en (A). Se examinaron más de 300 células en cada muestra. La proporción de células que extienden las estructuras de tipo neurita de más de 40 μm se indicó como un porcentaje del número de células totales. Se muestra un promedio de tres experimentos. Las barras de error indican S. E. (error estándar) entre los experimentos. Los datos se analizaron con la prueba t de Student. (C) Se prepararon extractos de células enteras a partir de células SH-SY5Y tratadas con RA después de incubación con o sin BDNF durante 24 horas, y se analizaron por SDS-PAGE. Se efectuó inmunotransferencia con los anticuerpos indicados. (D) El extracto de células enteras preparado a partir de células tratadas tanto con RA como con BDNF se incubó con los reactivos indicados durante 1 hora a 37°C. La inmunotransferencia se efectuó con anticuerpo anti-NgR1. (E) Se incubaron células SH SY5Y tratadas con RA, con BDNF en presencia o ausencia de uno de los siguientes: inhibidor de PKC - 500 nM G66983 o G66976; inhibidor de PKA - 2 μM KT5720 o un péptido inhibidor de PKA 14-22; o, o bien un inhibidor de caseína cinasa 500 nM o 1 μM , durante 24 horas.

Los extractos de células enteras preparados a partir de estas células se analizaron por SDS-PAGE. Se efectuó inmunotransferencia con el anticuerpo anti-NgR.

Fig. 2. CK2 promueve el crecimiento de neuritas de células SH-SY5Y tratadas con RA sin BDNF. (A) Las células SH-SY5Y tratadas con RA se incubaron con los reactivos indicados durante 24 horas. Las imágenes celulares se tomaron con microscopia de contraste de fases. (B) El número de células que extienden las estructuras de tipo neuritas de más de 40 μm y un número de células totales se contaron a partir de las imágenes tomadas en (A). Se examinaron más de 300 células en cada muestra. El cálculo se realizó como en la Fig. 1B. El resultado de la prueba t de Student entre RA sola y RA+CK II+ATP fue $p=0,0014$. (C) El tipo salvaje y versiones mutantes marcadas con Myc de NgR1 se sobreexpresaron en células SH-SY5Y. Las células se trataron con RA, CK2 y ATP. Se detectó NgR1-Myc sobreexpresado con anticuerpo anti-Myc. (D) Las células SH-SY5Y que sobreexpresan 281 S/A NgR1-Myc mutante se incubaron con RA y NEP1-40. (E) Las células SH-SY5Y que sobreexpresan 281 S/D NgR1-Myc mutante se trataron como (C).

Fig. 3. CK2 fosforila NgR1 e inhibe la unión de las proteínas asociadas con mielina a NgR1. (A) NgR1 salvaje 281 S/A o NgR1 281 S/D mutante marcados con Myc se sobreexpresaron en células COS7. Las células sobreexpresadas se incubaron o bien con la combinación de ATP y CK2, o con NEP1-40 durante 30 min a 37°C. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con Nogo-GFP marcado con Hisx6 durante 3 horas a 4°C. Las células se fijaron y se efectuó inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Myc y anti-GFP.

(B) Las células COS7 que sobreexpresaban NgR1 de tipo salvaje marcado con Myc se trataron como se describe en (A). Las proteínas se extrajeron y NgR1 marcado con Myc se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-Myc. Se detectó Nogo-GFP marcado con Hisx6 co-precipitado por anticuerpo anti-GFP. (C) Las proteínas de la superficie celular en células COS7 que sobreexpresan NgR1 se marcaron con biotina. Las proteínas biotiniladas se fraccionaron y analizaron por SDS-PAGE. Se detectó NgR1-Myc biotinilado con anticuerpo anti-Myc. (D) Las células COS7 que sobreexpresan o bien NgR1-Myc salvaje o 281S/A NgR1-Myc mutante se incubaron con α - ^{32}P -ATP en presencia o ausencia de CK2. Las proteínas marcadas con Myc se inmunoprecipitaron y analizaron con SDS-PAGE. Las proteínas se mancharon en una membrana PVDF y la membrana se expuso a una película radiográfica para detectar ^{32}P incorporado. Después de la auto-radiografía, la membrana se usó para inmunotransferencia con anticuerpo anti-Myc (E y F). Las células COS7 que sobreexpresan NgR1 salvaje o 281S/A o 281S/D mutante marcadas con Myc se trataron como se describe en (A). Después de lavar con PBS, las células se incubaron o bien con OMgp marcado con His (E) o con MAG marcado con HA (F) durante 3 horas a 4°C.

Las células se fijaron y se efectuó la inmunofluorescencia o bien con anticuerpos anti-Myc y anti-His (E) o anticuerpos anti-Myc y anti-HA (F).

Fig. 4. El motivo diana de CK2 que contiene serina²⁸¹ en NgR1 humano se conserva en NgR1 y NgR2 de vertebrados. (A) Se compararon las secuencias de aminoácidos de la región flanqueante C-terminal en NgR1 de ser humano (número de acceso en GenBank NM 023004), ratón (NM 022982), rata (AF462390), danio (NM 203478) y pollo (XM415292). Los aminoácidos idénticos a NgR1 humano se indican en rojo. (B) Se compararon las secuencias de aminoácidos de las regiones flanqueantes C-terminales en NgR1 (número de acceso en GenBank NM 023004), NgR2 (NM 178570) y NgR3 (NM 178568) humano, y NgR1 (NM 022982), NgR2 (NM 199223) y NgR3 (NM 177708) de ratón. (C) El extracto de células enteras se preparó a partir de células COS7 que sobreexpresan NgR2 marcado con Myc después de la incubación con α - ^{32}P -ATP en presencia o ausencia de CK2. Se inmunoprecipitó NgR2 marcado con Myc a partir del extracto de células enteras y se analizó por SDS-PAGE. Se mancharon las proteínas en una membrana PVDF, y la membrana se trató como se describe en la Fig. 3c. (D) Las células COS7 que sobreexpresan NgR2 humano marcado con Myc se incubaron con o sin la combinación de ATP y CK2 durante 30 min a 37°C. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con MAG marcado con HA durante 3 horas a 4°C. Las células se fijaron y se efectuó el análisis de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Myc y anti-HA. (E) Después de la incubación con CK2 y ATP, se digirió NgR2-Myc con tripsina en gel y los péptidos tripticos se analizaron con espectrometría de masas. Se describe la secuencia peptídica detectada como fosfo-péptido.

Fig. 5. CK2 rescata neuronas de rata post-natales de la inhibición del crecimiento de neuritas con los inhibidores asociados a mielina, Nogo, MAG y OMgp. (A) Las neuronas DRG de ratas 5 días post-natales se cultivaron con o sin el fragmento Nogo-66 en presencia de los reactivos indicados. Después de 24 horas de la adición de los reactivos indicados, las células se fijaron y se detectó α -tubulina III por inmunofluorescencia. (B) El número de células que extienden las neuritas de más de 20 μm y un número de células positivas de α -tubulina III totales se contó a partir de las imágenes tomadas en (A). La población de células que extienden las estructuras de tipo neurita de más de 20 μm se indicó como un porcentaje del número de células totales. Se muestra un promedio de tres experimentos. Las barras de errores indican S. E. entre los experimentos. Los datos se analizaron con la prueba t de Student. (C y D) Se sembraron neuronas DRG de ratas 5 días postnatales, en un portaobjetos de una cámara de 8 pocillos revestida con poly-D-Lysine y o bien MAG (C) o OMgp (D), y se incubó con o sin CK2 durante 24 horas. Las células se fijaron y se efectuó análisis de inmunofluorescencia con anti- α tubulina III. (E) Se contó el número de células que extienden las neuritas de más de 20 μm y el número total de células positivas de α -tubulina III a partir de las imágenes tomadas (en C y D). La población de células que extienden las estructuras de tipo neuritas de más de 20 μm se indicó como un porcentaje del número de células totales. El cálculo se realizó como en (B). (F) Se cultivaron neuronas CG de ratas 8 días postnatales con o sin los inhibidores asociados a mielina indicados, durante 24 horas

en presencia o ausencia de CK2. Las células se fijaron y se detectó α -tubulina III por inmunofluorescencia (G) Las neuronas CG que sobreexpresan o bien NgR1-Myc de tipo salvaje o 281 S/A NgR1-Myc mutante se cultivaron con o sin el fragmento Nogo en presencia o ausencia de CK2 durante 24 horas. El NgR1-Myc sobreexpresado se detectó por inmunofluorescencia. (H) Se contó el número de células positivas Myc que extienden las neuritas de más de 20 μ m y el número de células Myc-positivas a partir de las imágenes tomadas (en G). El cálculo se realizó como en (B).

La Figura 6 muestra secuencias de aminoácidos de NgR1 de vertebrados. Los números de acceso en NCBI de los NgR1 son: rata; AF 462390, ser humano; NM 023004, ratón; NM 022982, danio; NM 203478, pollo; XM 415292. Los caracteres rojos indican aminoácidos homólogos a NgR1 humano. Los caracteres verdes indican aminoácidos similares a NgR1 humano. NF; región flanqueante N-terminal, LRR; motivo de repetición rico en leucina, CF: región flanqueante C-terminal.

La Figura 7 muestra: A, las células SH-SY5Y tratadas con RA se cultivaron con los reactivos indicados durante 24 horas. Después de la fijación, se detectó beta-tubulina III con anticuerpo anti-beta-tubulina III. B, se sobreexpresó NgR1-Myc de tipo salvaje o 281S/A mutante en células SH-SY5Y. Después de 5 días de tratamiento con RA, estas células se incubaron con 500 U/ml PKA y 500 nM (74 kBq/ml) ATP. Luego se inmunoprecipitó NgR1-Myc y se analizó con SDS-PAGE. C, las células SH-SY5Y tratadas con RA que sobreexpresan o bien NgR1 mutante o de tipo salvaje 281 S/A se incubaron con 500 U/ml PKA y 500 nM ATP durante 24 horas, y se fijaron. Se detectó NgR1-Myc con anticuerpo anti-Myc. PKA, como también CK2, indujo el crecimiento de neuritas a partir de células SH-SY5Y tratadas con RA (Fig. 7A). NgR1-Myc de tipo salvaje fosforilado con PKA (Fig. 7B). La mutagénesis en serina 281 inhibió fuertemente la fosforilación con PKA (Fig. 7B) y el crecimiento de neuritas después del tratamiento con PKA (Fig. 7C). Por lo tanto, tanto PKA como CK2 pueden fosforilar NgR1 y cancelar los efectos inhibidores de la señalización de Nogo sobre el crecimiento de las neuritas.

La Figura 8 muestra secuencias de aminoácidos de NgR humanos. Los números de acceso en NCBI de los NgR son los de la Figura 4B. Los caracteres rojos indican aminoácidos homólogos a NgR1 humano. El triángulo cerrado indica la posición de serina 281 en NgR1 humano.

La Figura 9 muestra fotografías y una alineación de secuencia. (A) La longitud total de PirB se expresó en células COS7 con la marca del péptido de unión a estreptoavidina (SBP) en la terminal C. Las células COS 7 se incubaron con 2000 U/ml PKA, 5 mM MgSO₄ y 100 μ M 32P-ATP en OptiMEM (Invitrogen) a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron y las proteínas se extrajeron con 0,5% Triton X-100, Tris HCl 20 mM (pH8,0) y NaCl 150 mM. Se precipitó PirB marcado con SBP del extracto con perlas magnéticas de estreptoavidina (Invitrogen). Las proteínas unidas a las perlas se analizaron con SDS-PAGE, y 32P incorporado se detectó por autoradiografía. (B) Las células COS7 que sobreexpresaban PirB se trataron como se describe en (A), excepto para ATP frío. Las proteínas analizadas por SDS- PAGE se mancharon con azul de coomassie brillante G-250. La banda correspondiente a PirB se cortó y se analizó por espectrometría de masas. La secuencia de aminoácidos de fosfo-péptido detectada por espectrometría de masas se recuadró. El triángulo cerrado indica el aminoácido fosforilado, serina 425. Se compararon las secuencias de aminoácidos alrededor del sitio de fosforilación LILRB1, 2, 3 y 5 humano, y PirB de rata y ratón. Los residuos de aminoácidos homólogos a PirB de ratón se indicaron con caracteres rojos.

La Figura 10 muestra fotografías y un gráfico de barras. (A) El cultivo organotípico de cortes entorrinal-hipocámpico se preparó a partir de ratones 129X1/SvJmsSlc (albino) 5 y 6 días postnatales. El medio de cultivo se cambió cada 2 días. En el día 10 *in vitro* (DIV), en el día 10 *in vitro* (DIV) 10, se efectuó una transección de la proyección entorrinal-hipocámpica con un bisturí estéril. Los cortes lesionados se cultivaron por 8 días con o sin 1250 U/ml PKA y 100 pM ATP. En DIV 17, se aplicó una pequeña alícuota de pasta Dil (Invitrogen) en el lado entorrinal de la transección. En el DIV 18, los cortes se observaron con microscopía confocal para examinar la regeneración de la proyección entorrinal-hipocámpica. La localización de la lesión efectuada en DIV 10 se indica como una línea de puntos blanca. (B) La intensidad de la señal de Dil cerca de la circunvolución dentada se midió con ImageJ (versión 1.42q, National institute of Health, EE. UU.). El área medida (100 μ m cuadrados) se indicó en (A) como un cuadrado blanco abierto. La intensidad se indicó como un porcentaje de la señal de Dil en el control (sin lesión). El experimento se repitió 5 veces por triplicado. Las imágenes típicas se indican en (A), y se graficó el promedio de los 5 experimentos independientes en (B). Se usó una prueba t de Student para evaluar la significancia estadística.

La invención se describe ahora a modo de ejemplo. Estos ejemplos tienen como fin ser ilustrativos y no limitar las reivindicaciones anejas.

Ejemplos

Métodos y reactivos

Se adquirió una línea celular de neuroblastoma humana. Se adquirió SH-SY5Y de ATCC. Se adquirieron medio F12 de Ham, medio Neurobasal-A, anticuerpo monoclonal anti-GFP de ratón y suplemento B27 de Invitrogen. Se adquirieron ácido retinoico, creatinina fosfoquinasa, anticuerpo monoclonal anti-Myc de ratón y poly-D-Lysine de Sigma. Se adquirieron neuronas de rata y suplemento NSF-1 de LONZA. BDNF, G66983, G66976, el inhibidor de

CK2 (4,5,6,7-Tetrabromo-2-azabencimidazol). Se adquirieron KT 5720, péptido inhibidor de PKA miristoilado 14-22 amida y péptido NEP1-40 de Merck. Se adquirió anti-LINGO-1 de Millipore.

Se adquirieron anti-Nogo A y anti-NgR de Santa Cruz. Se adquirió ATP de Roche. Se adquirieron CK2 y fosfatasa de proteína lambda de New England Biolab. Se adquirió colágeno IV, OMgp-His y Nogo-Fc de R&D. Se adquirió anticuerpo anti-Myc policlonal de conejo de Cell Signaling. Se adquirió α -³²P-ATP de GE healthcare.

Cultivo celular

Se cultivaron células SH-SY5Y en medio F12 de Ham con 10% suero bovino fetal a 37°C en 5% CO₂ y 95% aire. Los números de pasaje entre 15 y 21 se usaron en los experimentos descritos en este documento. Otros pasajes inducen la diferenciación espontánea y las células tienden a extender las neuritas sin BDNF (no se muestran los datos). Para tratamiento de RA, las células se siembran (20.000 células/pocillo) en portaobjetos de 4 cámaras revestidas con colágeno IV. Después de 24 horas de cultivo, el medio se cambió a medio F12 de Ham que contenía 10 μ M RA y 10% suero bovino fetal. El medio se cambió a medio nuevo en el día 3 y las células se usaron para experimentos después de 5 días de cultivo. Encinas et al. (18) describieron que las células SH-SY5Y tratadas con RA inician la apoptosis después de la extracción de suero solamente cuando las células se cultivan a baja densidad. La densidad celular utilizada en este documento fue mayor que en el documento de Encinas et al (18), y la muerte celular debida a agotamiento de suero o BDNF no fue significativa en este documento, las células SH-SY5Y tratadas con RA durante 5 días se denominan SH-SY5Y tratadas con RA. Para tratamiento de BDNF, las células SH-SY5Y tratadas con RA se lavaron con medio F12 de Ham libre de suero y se incubaron con 25 ng/ml BDNF en medio F12 de Ham libre de suero durante 24 horas. Como control (RA solo), las células SH-SY5Y tratadas con RA se incubaron con F12 de Ham libre de suero solo durante 24 horas.

Las neuronas DRG de ratas en el día 5 postnatal se resuspendieron en medio Neurobasal-A que contenía glutamina 2 mM y 2% suplemento NSF-1, y se sembraron (5.000 células/pocillo) en portaobjetos de cámaras de 8 pocillos recubiertas con poly-D-Lysine. Después de 4 horas de sembrado, el medio se reemplazó por medio nuevo.

Las neuronas CG de ratas en el día 8 postnatal se resuspendieron en medio Neurobasal-A que contenía KCl 25 mM, glutamina 2 mM y 2% suplemento B27, y se sembraron (10.000 células/pocillo) en portaobjetos de cámaras de 8 pocillos recubiertas con poly-D-Lysine. Después de 4 horas de sembrado, el medio se reemplazó por medio nuevo.

Tratamiento de células con CK2

Para el tratamiento con CK2 de células SH-SY5Y tratadas con RA, las células se lavaron con F12 de Ham libre de suero y se incubaron o bien con 100 nM ATP o con 500 U/ml CK2, o con ambos, en F12 de Ham libre de suero que contenía 25 mM KCl y 5 mM MgCl₂ durante 24 horas.

Para el tratamiento con CK2 de neuronas DRG de ratas en el día 5 postnatal, el medio se cambió a medio neurobasal-A que contenía 2 mM glutamina, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 2% suplemento NSF-1 con 500 U/ml CK2, después de 4 horas de incubación del sembrado. Como control (sin tratamiento), el medio se cambió a medio sin CK2. Para neuronas CG de rata del día 8postnatal, se usó medio neurobasal-A que contenía 2 mM glutamina, 2% suplemento B27 y 25 mM KCl.

Para el tratamiento con CK2 de células COS7, las células se lavaron con medio F12 de Ham libre de suero y se incubaron con o sin 500 pM ATP y 1200 U/ml CK2 en medio F12 libre de suero que contenía 25 mM KCl y 5 mM MgCl₂ durante 30 min a 37°C.

Fosforilación por CK2 con α -³²P-ATP

Para tratamiento de células COS7 que sobreexpresan NgR1 o NgR2 marcado con Myc, las células se rasparon del plato de cultivo. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en PBS que contenía 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 1200 U/ml de CK2, 200 μ M ATP (3,7 kBq/ml). Después de la incubación durante 30 min a 30°C, la fosforilación finalizó y las proteínas se extrajeron con 0,1% Triton X 100, 250 mM NaCl y 25 mM EDTA. Las proteínas marcadas con Myc se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Myc y se analizaron por SDS-PAGE.

Expresión y purificación de proteínas asociadas a mielina

Se sintetizó ADN de la primera cadena de ARNm purificado de cerebro fetal humano (TAKARA) con transcriptasa inversa II superscript (Invitrogen) y oligo dT. El ADNc de Nogo-A humano se amplió por PCR con el ADN de primera cadena como molde. El fragmento de Nogo-A ampliado (número de acceso en Genbank NM 020532), Nt 3444-3709, se integró en pEGFP N2 (TAKARA). La región del fragmento de Nogo-A y EGFP se cortó e integró en el vector pcDNA 3.1/His (Invitrogen). La región de Hisx6, Nogo-A y EGFP del vector se cortó del vector e integró en el vector pBen-SBP-SET (Stratagene), luego se transfeció a ArcticExpress (DE3)R.I.L E. coli (Stratagene). La expresión del fragmento Hisx6-Nogo-A-proteína EGFP se indujo por 1 mM IPTG durante la noche a 18°C. Hisx6 Nogo-A-fragmento GFP se purificó con una columna TALON (TAKARA).

Para expresión de MAG humano (NM. 002361), se amplió aDnc de MAG (Nt 198-1655) por PCR con ADN de la primera cadena como molde, y se añadió un codón de terminación en el extremo 3' del MAG aDnc por PCR. El MAG aDnc se integró en el vector pDisplay (Invitrogen). El plásmido se transfeció en células COS7. Las células transfectadas se mantuvieron con DMEM que contenía 10% suero y 600 µg/ml de geneticina (Invitrogen). Para purificación de MAG, las células se cultivaron con medio VP-SFM (Invitrogen) con 2 mM L-glutamina durante 3 días. Se purificó MAG marcado con HA del medio acondicionado con el kit de purificación de proteína marcada con HA (Sigma).

Expresión de NgR1-Myc y NgR2-Myc

Se amplió aDnc de NgR2 por PCR con ADN de la primera cadena como molde. El producto PCR se ligó a un vector pCR Blunt (Invitrogen). Se confirmó la secuencia del aDnc de NgR2 insertado en pCR Blunt. Se adquirió el clon IMAGE que codifica NgR1 de longitud total de Gene Service Inc. Los aDnc de NgR1 (NM 023004, Nt. 184-1543) y NgR2 (NM 17857, Nt. 1-1200), respectivamente, se transfirieron a un vector pDisplay con el sitio Sal1 y Kpn1. La región que codifica NgR, marca Myc y la transmembrana se corta del vector con Kpn1 y Not1. Los fragmentos Kpn1-Not1 se integraron en pCEP4 (Invitrogen). Se usó electroporación con Nucleofector (amaxa) para la transfección. Se transfectaron NgR/pDisplay en COS7 y NgR1-Myc- se transfeció el dominio transmembrana/pCEP4 en células SH-SY5Y. Para la transfección en neuronas de rata, se usó el kit NeuroMag (OZ Bioscience). Las neuronas cultivadas durante 24 horas en portaobjetos de cámaras de 8 pocillos recubiertas con laminina y con o sin el fragmento Nogo-66 se usaron para transfección. Después de la transfección, las neuronas se cultivaron durante otras 24 horas y se añadió CK2 al medio de cultivo hasta una concentración final de 500 U/ml. Las neuronas se cultivaron con CK2 durante 24 horas y se fijaron.

Ensayo de crecimiento de neuritas

Para inhibición del crecimiento de neuritas con inhibidores asociados a mielina, 1 µg de Nogo-Fc, 500 µg de MAG marcado con HA o 500 µg de OMgp marcado con His se mancharon en distintos pocillos de portaobjetos de cámaras de 8 pocillos recubiertas con poly-D-Lysine, y se dejaron durante la noche en una mesa limpia sin cubrir. Después de lavar con PBS dos veces, las neuronas se sembraron y trataron como se describe en "cultivo celular". Las neuronas se cultivaron durante 24 horas a 37°C y se fijaron con 2% paraformaldehído y 0,1% triton X100 en PBS. Se efectuó análisis de inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina III.

Ensayo de unión de proteínas asociadas con mielina

Después del tratamiento con o sin CK2, las células COS7 que sobreexpresaban NgR salvaje o mutante se incubaron con Nogo-GFP marcado con Hisx6 (10 µg/ml), HA-MAG (50 µg/ml) u OMgp marcado con Hisx6 (10 µg/ml) en PBS durante 3 horas a 4°C. Las células se lavaron dos veces y se fijaron con 2% paraformaldehído en PBS durante 20 min a 4°C, luego con 2% paraformaldehído y 0,1% Triton X 100 en PBS. Para examinar los niveles de expresión de NgR1 en la superficie celular, se usó un kit de aislamiento de proteínas de superficie celular (Pierce). Las proteínas superficiales de células COS7 que sobreexpresan NgR1 se marcaron con biotina y se extrajeron. Las proteínas biotiniladas se precipitaron con perlas de estreptavidina y se analizaron con SDS-PAGE.

Cada muestra fraccionada de 5×10^6 células se analizó con SDS-PAGE.

Inmunotransferencia

Las células se rasparon de los platos y se lavaron con PBS dos veces, y luego se resuspendieron en PBS que contenía 0,1% Triton X100 y cóctel inhibidor de fosfatasa (Roche) y cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche). Después de la incubación durante 15 min en hielo, las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes que contenían 30 mg de proteínas se analizaron por SDS-PAGE y se mancharon a membrana de PVDF. La membrana de PVDF se incubó en tampón de bloqueo (5% leche desnatada, 0,4% Triton X-100 en PBS) durante 1 hora, anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo y anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante. Los anticuerpos unidos se visualizaron con el kit ECL oECL Plus (GE healthcare).

Ensayo de inmunofluorescencia

Las células fijadas se lavaron con PBS y se incubaron con 3% BSA y 0,5% Triton X-100 en PBS a temperatura ambiente durante 30 min y con anticuerpo primario. 3% BSA y 0,5% Triton X-100 en PBS a 37°C durante 2 horas. Después de lavar con PBS, las células se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario apropiado, 3% BSA y 0,5% Triton X-100 en PBS a 37°C durante 30 min.

Después de lavar con PBS 3 veces, las células se montaron con medio de montaje VECTASHIELD con DAPI (VECTOR) y se observaron con microscopía de barrido láser confocal.

Inmunoprecipitación

Después del tratamiento de CK2 (Fig. 3C) o incubación con Nogo-GFP (Fig. 3B), las proteínas se extrajeron con 0,1% Triton X100 en PBS que contenía cóctel inhibidor de fosfatasa y cóctel inhibidor de proteasa libre de EDTA. Los

extractos se incubaron con 25 µg de anticuerpo policlonal de conejo anti-Myc y perlas magnéticas de proteína A (New England Biolab) durante 2 horas a 4°C. Después de lavar 5 veces con 0,1% Triton X100 en PBS, las perlas se incubaron con 1x tampón de carga SDS-PAGE y se calentó durante 3 min.

Espectrometría de masas

- 5 Las células COS7 que sobreexpresan NgR2-Myc se cultivaron con 500 U/ml de CK2 y 500 pM ATP durante 1 hora. La extracción celular y la inmunoprecipitación de NgR2-Myc con anticuerpo anti-Myc se describieron anteriormente. Las proteínas precipitadas se analizaron por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron con tinción de azul de coomassie coloidal brillante. La banda correspondiente a NgR2-Myc se cortó del gel. Las proteínas en la pieza de gel se digirieron en gel con tripsina. El análisis de espectrometría de masas fue realizado por Cambridge Centre for Proteomics (Cambridge, Reino Unido).

Ejemplo 1: la señalización de Nogo inhibe el crecimiento de neuritas de células SH-SY5Y tratadas con RA

- 15 Las células SH-SY5Y demostraron cambios morfológicos limitados después del tratamiento con RA durante 5 días, pero se observó un crecimiento de neuritas eficiente después del tratamiento secuencial con RA durante 5 días y BDNF durante 1 día (Fig. 1A), como lo indicaron previamente Encinas et al. (18). Se halló que NEP1-40, un inhibidor competitivo de la unión de Nogo-66 a NgR1 (28), promovió el crecimiento de neuritas de células neurales diferenciadas de células SH-SY5Y por RA, sin BDNF (Fig. 1A y B). Esto indica que la señalización de Nogo inhibe el crecimiento de neuritas de las células neurales derivadas de SH-SY5Y, y que BDNF suprime los efectos de la señalización de Nogo.

- 20 Como se muestra en la Fig. 1C, las proteínas implicadas en la señalización de Nogo, Nogo-A, NgR1 y LINGO-1, se expresaron en células SH-SY5Y tratadas con RA. Si bien ni Nogo-A ni LINGO-1 exhibieron cambios importantes después del tratamiento con BDNF, la banda superior de NgR1 aumentó con el tratamiento de BDNF (Fig. 1C, flecha). El tratamiento con fosfatasa lambda redujo la banda superior solamente en ausencia de inhibidores de fosfatasa (Fig. 1D). Estos resultados indican que BDNF promueve la fosforilación de NgR1 endógeno en células SH-SY5Y tratadas con RA, contribuyendo a la movilidad inferior en SDS-PAGE. Para investigar qué cinasa está implicada en la fosforilación de NgR1, las células SH-SY5Y tratadas con RA se incubaron con BDNF en presencia de inhibidores de cinasa. Ni los inhibidores de PKC Gö6983 o Gö6976, ni los inhibidores de PKA KT 5720 y un péptido inhibidor de PKA muestran efectos sobre el nivel de la banda superior de NgR1. No obstante, un inhibidor de CK2 redujo la banda superior (Fig. 1E). Coherente con esto, BDNF se conoce por activar CK2 en células neurales (29). Estos resultados indican que la actividad de tipo CK2 está implicada en la fosforilación de NgR1. Por lo tanto, BDNF induce la fosforilación de NgR1 por actividad de tipo CK2, que coincide con la promoción del crecimiento de neuritas por BDNF.

Ejemplo 2: las células SH-SY5Y tratadas con RA extienden las neuritas después del tratamiento extra-celular con CK2, sin BDNF

- 35 NgR1 es una proteína de membrana anclada a glucosilfosfatidilinositol, que no tiene un dominio citoplásmico (30, 31). Por lo tanto, los sitios de fosforilación en NgR1 después del tratamiento con BDNF son extracelulares, y podrían fosforilarse por tratamiento extracelular con CK2. Ni la adición de ATP solo ni CK2 solo al medio de cultivo indujo el crecimiento de neuritas de células neurales derivadas de SH-SY5Y. No obstante, las células demostraron crecimiento de neuritas significativo después de la incubación simultánea tanto con CK2 como con ATP durante 24 horas (Fig. 2A y B). Por lo tanto, el tratamiento extracelular con CK2 suprime los efectos inhibidores de señalización de Nogo sobre el crecimiento de neuritas de las células neurales derivadas de SH-SY5Y, sin BDNF.

Ejemplo 3: Serina²⁸¹ en NgR1 humano es una diana clave para supresión mediada por CK2 de señalización de Nogo

- 45 NgR1 humano contiene 5 sitios candidatos para fosforilación por CK2, treonina¹⁷³, serina¹⁹², serina²⁸¹, treonina³²⁵ y serina³⁴⁵, y estos sitios candidatos se sustituyeron a alanina. La cinasa utilizada en este ejemplo es CK2. Cuando las células SH-SY5Y tratadas con RA que sobreexpresan estos mutantes de NgR1 se trataron con ATP y CK2 durante 24 horas, las células que portan la sustitución de serina²⁸¹ a alanina (281 S/A) en NgR1 no pudieron exhibir crecimiento de neuritas significativo (Fig. 2C). No obstante, las células que portan 281S/A NgR1 mutante todavía tuvieron el potencial de extender las neuritas, ya que demostraron crecimiento de neuritas después del tratamiento con NEP1-40 durante 24 horas (Fig. 2D). Estos resultados indican que 281 S/A 20 NgR1 mutante no es constitutivamente activo y que se necesita la unión de Nogo para la inhibición del crecimiento de neuritas de SH-SY5Y tratadas con RA.

- 50 La serina²⁸¹ en NgR1 se sustituyó a ácido aspártico (281 S/D) y se sobreexpresó NgR1 mutante en células SH-SY5Y tratadas con RA (Fig. 2E). Si bien el ácido aspártico está negativamente cargado, al igual que un residuo de serina fosforilado, las células que sobreexpresan 281 S/D NgR1 mutante no extendieron las neuritas después del tratamiento con RA sin el co-tratamiento con CK2 y ATP (Fig. 2E). Esto indica que 281 S/D NgR1 no es un mutante constitutivamente negativo de NgR1.

Estos resultados indican que la serina²⁸¹ en NgR1 humano es esencial para que CK2 suprima los efectos inhibidores de la señalización de Nogo, aunque pueden fosforilarse otras proteínas de membrana por tratamiento extracelular con CK2 (32, 33).

Ejemplo 4: CK2 inhibe la unión de los inhibidores asociados a mielina a NgR1 de tipo salvaje, pero no a NgR1 mutante que porta una sustitución de serina²⁸¹

El fragmento Nogo-66 se unió a células COS7 que sobreexpresan NgR1 de tipo salvaje (Fig.3A). No obstante, el fragmento Nogo-66 no pudo unirse a las células después del tratamiento con CK2 y ATP. Cuando se sobreexpresó 281 S/A NgR1 mutante, en lugar de NgR1 de tipo salvaje, el tratamiento con CK2 no pudo bloquear la unión del fragmento Nogo-66. NEP1-40 inhibió la unión del fragmento Nogo-66 tanto a NgR de tipo salvaje como 281 S/A mutante).

Cuando 281 S/D NgR1 mutante se sobreexpresa, la unión del fragmento Nogo-66 no se observó, incluso sin tratamiento con CK2 (Fig. 3A derecha). Tomado junto con los resultados en la Fig. 2E, 281 S/D NgR1 mutante no puede unirse a Nogo-66 ni inhibir la señalización a través de NgR1 endógeno. La interacción entre el fragmento Nogo-66 y NgR1 sobreexpresado también se observó en el ensayo de inmunoprecipitación (Fig. 3B). Si bien el tratamiento con ATP o CK2 solo no pudo inhibir la interacción, el co-tratamiento con ATP y CK2 inhibió la unión del fragmento Nogo-66 al NgR1 sobreexpresado. Para examinar los niveles de expresión de NgR1-Myc mutante y de tipo salvaje en la superficie celular, las proteínas de la superficie celular se biotinilaron. Los niveles comparables de NgR1-Myc biotinilado, salvaje, 281S/A y 281S/D, se detectaron por inmunotransferencia (western blotting) (Fig. 3C).

Asimismo, el NgR1 sobreexpresado se fosforila después del tratamiento extracelular con CK2. Las células COS7 que sobreexpresan o bien el tipo salvaje o 281 S/A NgR1 mutante se incubaron con CK2 en presencia de γ -³²P-ATP y los NgR1 sobreexpresados inmunoprecipitaron. Si bien NgR1 de tipo salvaje como 281 S/A mutante se fosforilaron con tratamiento de CK2, la fosforilación de 281S/A NgR1 mutante fue mucho más débil que aquella de NgR1 salvaje (Fig. 3D). Estos resultados indican que se requiere serina²⁸¹ de NgR1 tanto para fosforilación eficiente de NgR1 por CK2 como para inhibición de la interacción entre Nogo-66 y NgR1.

Las Fig. 3E y F demuestran que el tratamiento con CK2 inhibió la unión de OMgp y MAG a NgR1 salvaje, pero no a 281S/A NgR1mutante. Ni OMgp ni MAG unidos a COS7 sobreexpresan 281 S/D NgR1 mutante. Estos resultados indican que el tratamiento con CK2 puede inhibir la unión de Nogo-66, MAG y OMgp a NgR1 y que serina²⁸¹ en NgR1 es esencial para el efecto de CK2.

Ejemplo 5: la serina²⁸¹ de NgR1 humano se conserva tanto en NgR1 como NgR2 de vertebrados

La Fig. 4A demuestra que serina²⁸¹ está en la región flanqueante C-terminal de las repeticiones ricas en leucina en NgR1 humano (30, 31), y que el motivo diana para CK2 que incluye serina²⁸¹ se conserva en seres humanos, ratones, ratas, danios y pollos. NgR1 de ratón, rata y pollo tiene otro motivo diana candidato para CK2 en la región flanqueante C-terminal, en serina³⁰⁴. No obstante, esta última serina no está conservada en NgR1 de danio y ser humano.

Además del motivo diana de CK2, la serina²⁸¹ está implicada en el motivo diana de PKA, y el motivo diana de PKA está también conservado en otras especies (Fig. 4A). Esto indica que PKA, además de CK2, podría fosforilar NgR1, anulando así efectos inhibidores de señalización de Nogo en el crecimiento de neuritas. No obstante, no pudimos detectar una contribución de PKA a la fosforilación de NgR1 en células SH-SY5Y tratadas con RA después del tratamiento con BDNF (Fig. 4E).

Asimismo, el motivo diana de CK2 que contiene la serina²⁸¹ de NgR1 humano se conserva en NgR2 de ratón y humano (Fig. 4B). La serina²⁸¹ en NgR1 humano corresponde a serina²⁸² en NgR2 humano. Aunque NgR3 tiene un sitio diana candidato para la fosforilación CK2 en la región flanqueante C-terminal, similar a NgR1 y NgR2. El sitio tiene 11 aminoácidos en dirección 5' de la serina²⁸¹ de NgR1. A la inversa, el motivo diana PKA que contiene serina²⁸¹ en NgR1 se conserva en los tres NgR.

Coherente con el motivo diana CK2 conservado en NgR2, CK2 fosforila NgR2 (Fig. 4C), y el tratamiento de CK2 inhibió la unión de MAG a células COS7 que sobreexpresan NgR2 (Fig. 4D). Si bien NgR2 humano contiene dos sitios diana CK2, serina²⁸² y treonina³⁶⁶, solamente el sitio diana CK2 que contiene serina²⁸² está conservado en NgR1 humano. La espectrometría de masas detectó fosforilación del péptido que contiene serina²⁸² de NgR2 humano, pero no el péptido que contiene treonina³⁶⁶, después del tratamiento con CK2 (Fig. 4E).

Ejemplo 6: CK2 rescata neuronas de rata de la inhibición del crecimiento de neuritas por Nogo, MAG o OMgp.

Se examinó si la fosforilación de los NgR puede rescatar neuronas de rata de la inhibición del crecimiento de neuritas por parte de los inhibidores asociados a mielina. Cuando se trataron neuronas DRG de rata postnatales con CK2 durante 24 horas, las neuronas superaron la inhibición del crecimiento de neuritas por parte del fragmento Nogo-66 (Fig. 5A y B). ATP solo no suprime los efectos inhibidores del fragmento Nogo-66 (no se muestran datos). Si bien BDNF puede inducir el crecimiento de neuritas de células SH-SY5Y tratadas con RA (Fig. 1A y B), BDNF no puede bloquear el efecto del fragmento Nogo-66 sobre las neuronas DRG (Fig. 5A y B). Esto indica una diferencia

entre las células de neuroblastoma y las neuronas normales en la señalización de BDNF, y coincide con los efectos limitados de BDNF sobre el crecimiento de neuritas *in vivo* (21-24, 26).

El tratamiento con CK2 puede rescatar las neuronas de la inhibición del crecimiento de neuritas no solamente por parte del fragmento Nogo-66 sino también por parte de MAG o OMgp (Fig. 5C-E). La Fig. 5F muestra que no solamente las neuronas DRG de ratas 5 días postnatales, sino que además las neuronas granulosas del cerebelo (CG) de ratas 8 días postnatales pueden extender las neuritas en presencia de Nogo-66, MAG o OMgp, cuando las neuronas se tratan con CK2 durante 24 horas.

Ejemplo 7: CK2 no puede rescatar neuronas que expresan 281 S/A NgR1 mutante de la inhibición del crecimiento de neuritas por Nogo-66

Para evaluar el requerimiento de la serina²⁸¹ en NgR1, se sobreexpresaron NgR1 salvaje y 281 S/A mutante en neuronas CG de ratas 8 días postnatales. Las neuronas CG que sobreexpresan NgR1 salvaje y 281S/A NgR1 mutante extendieron las neuritas, que fueron bloqueadas por el fragmento Nogo-66. Después del tratamiento con CK2 durante 24 horas, las neuronas que sobreexpresan NgR1 salvaje extendieron las neuritas en presencia del fragmento Nogo-66. Contrariamente, las neuronas que sobreexpresan 281 S/A NgR1 mutante no pudieron extender las neuritas incluso después del tratamiento con CK2 durante 24 horas (Fig. 5G y H). Estos resultados indican que CK2 puede inhibir la señalización de Nogo a través de NgR1 salvaje pero no a través de 281 S/A NgR1 mutante, lo cual coincide con las Fig. 2 y 3. Por consiguiente, la señalización de Nogo a través de NgR1 puede bloquear el crecimiento de neuritas de neuronas de ratas postnatales como se indicó previamente (3, 4), y la serina²⁸¹ de NgR1 es indispensable para que CK2 suprima los efectos inhibidores de la señalización de Nogo sobre el crecimiento de neuritas.

Ejemplo 8: Método para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas en un sujeto

Se demuestra un método para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas. En este ejemplo, el sujeto es un ratón. Las neuronas de ratón comprenden un receptor de Nogo.

Se usa un modelo de lesión de médula espinal. Después de la inducción de la lesión experimental, dicha neurona se pone en contacto con una composición capaz de causar la fosforilación de un receptor de Nogo. En esta etapa, se aplica una de las dos composiciones siguientes, típicamente por inyección o mediante introducción de una cánula al momento de la lesión experimental:

1. (PKA):

10-100 μ M ATP, 5-0,05 μ g PKA y 1-10 mM MgCl₂ o Mg-acetato;

o

2. (CKII):

10-100 μ M ATP, 5-0,5 μ g CK2, 1-10 mM MgCl₂ o Mg-acetato y 10-50 mM KCl o K-acetato.

Para aplicaciones humanas, se usan niveles superiores de cinasas, típicamente 0,05-5 mg cinasa, o bien PKA o CK2. La concentración de iones y ATP para uso humano es típicamente la expuesta anteriormente.

Ejemplo 9 - PirB/LILRB

Nogo-A, MAG y OMgp son proteínas asociadas a mielina que pueden unirse a NgR (Gonzenbach, R. R. y Schwab, M. E. (2008). Disinhibition of neurite growth to repair the injured adult CNS: focusing on Nogo. *Cell Mol Life Sci* 65, 161-176.). Recientemente, se ha descrito que PirB (receptor de tipo Ig apareado a B, NM0U095) de ratón y sus homólogos humanos LILRB (receptor de tipo inmunoglobulina de leucocitos Bs) son el segundo grupo de receptores para proteínas asociadas a mielina (Atwal. J. K., Pinkston-Gosse, J., Syken, J., Stawicki, S., Wu, Y. Shatz, C. y Tessier-Lavigne, M. (2008).

PirB es un receptor funcional para inhibidores de mielina de regeneración axonal. *Science* 322, 967-970). Si bien la expresión de PirB/LILRB parece estar limitada en algunas regiones específicas del cerebro, puede cooperar con los NgR para inhibir el crecimiento de neuritas (Atwal et al., *ibid*).

En la Figura 9, PirB se sobreexpresó en células COS7, y las células se incubaron con subunidad catalítica de proteína cinasa A (PKA) y ATP. PirB en la superficie celular puede ser un sustrato de PKA (Figura 9A).

La espectrometría de masas indica que el sitio de fosforilación es serina⁴²⁵ en el dominio extracelular de PirB.

El sitio diana de PKA se conserva en ser humano, rata y ratón (Figura 9B). Estos resultados indican que el tratamiento extracelular con PKA podría tener efectos ventajosos sobre la señalización de PirB/LILRB, además de la señalización de NgR.

Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a un método para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas de una neurona, en donde dicha neurona comprende un receptor de PirB/LILRB, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha neurona con una composición capaz de causar la fosforilación de PirB/LILRB, en donde dicha composición comprende proteína cinasa A o caseína cinasa II. Adecuadamente, dicha composición comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II. Adecuadamente, dicha fosforilación es la fosforilación de un residuo de aminoácidos correspondiente a serina 425 de dicho PirB/LILRB.

Puede ser ventajoso dirigir tanto Nogo como PirB/LILRB; en esta realización, la invención proporciona un método para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas de una neurona, en donde dicha neurona comprende un receptor de Nogo y un receptor de PirB/LILRB, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha neurona con una composición capaz de causar fosforilación de un receptor de Nogo y un receptor de PirB/LILRB, en donde dicha composición comprende proteína cinasa A o caseína cinasa II. Adecuadamente, dicha composición comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II. Adecuadamente, dicha fosforilación es fosforilación de un residuo de aminoácido correspondiente a serina 281 de dicho receptor de Nogo y fosforilación de un residuo de aminoácidos correspondiente a 425 de dicho PirB/LILRB.

Ejemplo 10 – Regeneración del SNC mamífero de acuerdo con la presente invención

En este ejemplo, demostramos la acción de la invención sobre el SNC mamífero.

Las neuronas de corteza entorrinal forman una fuerte proyección hacia la circunvolución dentada del hipocampo durante el periodo postnatal. El sistema del hipocampo-corteza entorrinal es una de las primeras regiones en ser afectada en la enfermedad de Alzheimer, y se cree que los problemas en el sistema son resultado tanto del sentido de la dirección debilitado como del trastorno de la memoria.

El cultivo de la porción organotípica del cerebro preserva muchas funciones del sistema *in vivo*, y se usa ampliamente como modelo de cerebro intacto.

La proyección entorrinal-hipocámpica en el cerebro intacto puede conservarse en el cultivo de la porción organotípica *in vitro*. Las porciones entorrinal-hipocámpicas preparadas de ratones 5-7 días postnatales demuestran una regeneración deficiente de la lesión, después de 6 días de cultivo *in vitro* (Kluge, A., Hailer, N. P., Horvath, T. L., Bechmann, I. y Nitsch, R. (1998). Tracing of the entorhinal-hippocampal pathway in vitro. *Hippocampus* 8, 57-68. Prang, P., Del Turco, D. y Kapfhammer, J. P. (2001). Regeneration of entorhinal fibers in mouse slice cultures is age dependent and can be stimulated by NT-4, GDNF, and modulators of G- proteins and protein kinase C. *Exp Neurol* 169, 135-147).

Se sabe que los proteoglicanos de sulfato de condroitina y las proteínas mielina asociadas son los principales inhibidores de la regeneración (Mingorance, A., Sole, M., Muneton, V. Martinez, A., Nieto-Sampedro, M Soriano, E y del Rio, J. A. (2006). Regeneration of lesioned entorhino-hippocampal axons in vitro by combined degradation of inhibitory proteoglycans and blockade of Nogo-66/NgR signaling. *FASEB J* 20,491-493).

Se puede observar la migración de microglía, que es el macrófago residente en el sistema nervioso central (SNC), y se pueden formar estructuras de tipo cicatriz glial por las células gliales en el cultivo organotípico después de la lesión (Mingorance et al., *ibid*). Todas estas respuestas del cultivo de la porción entorrinal-hipocámpica a la lesión son similares a aquellas del cerebro normal *in vivo*. Por lo tanto, la validez de demostrar la invención en este sistema de modelo como una ilustración de su aplicabilidad en mamíferos en general está bien consolidada.

En la Figura 10, las porciones entorrinal-hipocámpicas de ratones 5 o 6 postnatales se sometieron a transección en el día *in vitro* (DIV) 10, y se incubaron con o sin PKA y ATP durante 8 días.

Dil (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato) es un tinte de membrana lipófila que se disemina lateralmente para manchar toda la célula, pero no puede promover la interacción de una célula con otra. En consecuencia, la proyección de neuronas puede ser rastreada con Dil.

En porciones sin tratamiento o en porciones tratadas o bien con PKA o ATP, la localización de Dil se limitó en el lado entorrinal de la transección (Figura 10), indicando que las porciones de cerebro pueden regenerar la red neural, tan deficientemente como aquella en el cerebro *in vivo*. Solamente cuando las porciones se incubaron con ATP y PKA, se observó Dil en el lado hipocámpico más allá de la transección (Figura 10).

Estos resultados indican que el tratamiento con la combinación de PKA y ATP puede superar los inhibidores endógenos para regeneración del SNC, promoviendo la regeneración de la red neuronal de acuerdo con la presente invención.

No obstante, no se detectó Dil más allá de la circunvolución dentada del hipocampo, incluso después del tratamiento con PKA y ATP. Esto indica que el tratamiento no cambia las estructuras de la capa intrínseca en el hipocampo normal (Figura 10). Ésta es una característica importante de la promoción de la regeneración del SNC, para evitar la regeneración inesperada que puede provocar trastornos.

Por lo tanto, se demuestra que la adición exógena de PKA de acuerdo con la presente invención es un método útil para promover la regeneración del SNC, que está estrictamente inhibida bajo condiciones normales.

Resumen de la sección de ejemplos

Se describe que la señalización de Nogo puede suprimirse por fosforilación de los receptores de Nogo. Los sitios de fosforilación en los receptores de Nogo son extracelulares (Figs. 3 y 4). BDNF induce la fosforilación del ecto-dominio de NgR1 en células neurales diferenciadas de células SH-SY5Y por RA (Fig. 1). La fosforilación del ecto-dominio de los NgR inhibe la unión de inhibidores asociados a mielina del crecimiento de neuritas, Nogo-66, MAG y OMgp (Fig. 3 y 4).

La fosforilación del ecto-dominio ha sido descrita en muchos tipos de células, incluidas neuronas, células inmunitarias, células epiteliales y células endoteliales (34). La fosforilación del ecto-dominio puede catalizarse por ambas ecto-proteína cinasas después de que las proteínas de sustrato se clasifican a la membrana plasmática, y a las cinasas intracelulares antes de la clasificación (33, 35). Si bien las cinasas intracelulares usan ATP intracelular como fuente de grupo fosfato, ecto-proteína cinasa usa ATP extracelular. La concentración de ATP extracelular bajo condiciones fisiológicas se ha estimado a nivel micromolar (36). Cuando se dañan los tejidos, ATP puede liberarse de las células muertas o lesiones a través de membranas plasmáticas dañadas. La inflamación, que puede inducirse por tejido dañado, puede también inducir la liberación de ATP de una diversidad de tipos de células, incluidas las neuronas (37). Por lo tanto, la concentración de ATP extracelular podría incrementarse con el daño al tejido. Si bien se ha descrito la función *in vitro* de la fosforilación del ecto-dominio (34), su función *in vivo* todavía no está clara.

Recientemente, se demostró que la fosforilación del ecto-dominio de colágeno XVII puede inhibir su propagación por metaloproteinasas (38). La fosforilación del ecto-dominio de colágeno XVII es catalizada por CK2, y su sitio de fosforilación está ubicado en el sitio diana para metaloproteinasas (38). Si bien se sabe que los NgR también son propagados por las por metaloproteinasas (39, 40) y pueden fosforilarse por CK2 (Fig. 1-4), el sitio de fosforilación no está incluido en el sitio de propagación. El sitio de propagación en NgR1 es el aminoácido 358 (39), y el sitio de fosforilación es 281 (Fig. 3 y 4). No pudimos detectar fragmentos digeridos de NgR1 cuando las células SH-SY5Y tratadas con RA se analizaron por inmunotransferencia (Fig. 1). La fosforilación del ecto-dominio de NgR1 parece no regular su propagación. En cambio, se indica que la fosforilación del ecto-dominio de NgR bloquea la unión de inhibidores asociados con mielina del crecimiento de neuritas, Nogo, MAG y OMgp (Fig. 3 y 4).

Si bien BDNF puede inducir la fosforilación de NgR1 y superar la señalización de Nogo en células SH-SY5Y tratadas con RA (Fig. 1), no puede atenuar los efectos de la señalización de Nogo sobre el crecimiento de neuritas de neuronas primarias de rata (Fig. 5). Asimismo, si bien se ha descrito que la actividad ecto-CK2 endógena está asociada con las células neurales (34), la incubación de células neurales con ATP solo no pudo inhibir la señalización de Nogo (Fig. 2).

Por consiguiente, la actividad ecto-CK2 endógena parece ser suficiente para inhibir la señalización de Nogo.

Estos resultados indican que la fosforilación de los NgR podría ocurrir naturalmente en el SNC, lo que es coherente con el hecho de que la señalización de Nogo puede inhibir el crecimiento de neuritas en el SNC (3, 4).

Se indica que el tratamiento extracelular con CK2 exógena, en lugar de BDNF, rescata las neuronas de la inhibición del crecimiento de neuritas por parte de la señalización de Nogo (Fig. 5). El tratamiento extra-celular con CK2 exógena fosforila serina²⁸¹ en NgR1, lo que puede inhibir la unión de Nogo, MAG y OMgp a NgR1 (Fig. 3). El sitio de fosforilación de CK2 en NgR1, serina²⁸¹, se conserva en NgR2, y la fosforilación de NgR2 inhibe la unión de MAG (Fig. 4). Si bien se cree que la señalización a través de los NgR es la vía principal de la señalización de Nogo, Un documento reciente indica que las neuronas de NgR1- ratón todavía son sensibles a la inhibición del crecimiento de neuritas por señalización de Nogo (8). Esto indica que la señalización de Nogo podría inhibir el crecimiento de neuritas de neuronas no solamente a través de los NgR, sino también a través de receptores de Nogo desconocidos. Si bien el agotamiento de NgR1 no parece rescatar las neuronas de los efectos inhibidores del fragmento Nogo-66 (8), el tratamiento extra-celular con CK2 puede (Fig. 5). Por lo tanto, parece ser que el tratamiento con CK2 debe bloquear tanto vías desconocidas dependientes como independientes de NgR para la inhibición del crecimiento de neuritas por los inhibidores asociados a mielina, Nogo-66, MAG y OMgp. Dado que el sitio diana para CK2, serina²⁸¹, es también un sitio diana para PKA (Fig. 4), el tratamiento extracelular con PKA, como también CK2, es útil en el bloqueo de la señalización de Nogo.

En resumen, se halló que BDNF induce la fosforilación de NgR1 en células SH-SY5Y tratadas con RA por una actividad de tipo CK2, que supera la inhibición del crecimiento de neuritas causada por la señalización de Nogo. No obstante, esta inhibición de la señalización de Nogo por BDNF no ocurre en neuronas de rata. En lugar de BDNF, el tratamiento extracelular con CK2 exógena rescata las neuronas de la inhibición del crecimiento de neuritas por señalización de Nogo. CK2 fosforila ecto-dominios tanto de NgR1 como de NgR2, lo cual bloquea la unión de MAG a NgR2, y Nogo, MAG y OMgp a NgR1. Estos resultados indican que la fosforilación de los receptores de Nogo puede suprimir la señalización de Nogo. Por ende, la fosforilación de los receptores de Nogo se demuestra como una nueva diana para la manipulación de la señalización de Nogo.

Referencias

1. M. E. Schwab, P. Caroni, Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro. *J Neurosci* 8, 2381-2393 (1988).
2. M. E. Schwab, Repairing the injured spinal cord. *Science* 295, 1029-1031 (2002).
3. .
5. T. Oertle, M. E. van der Haar, C. E. Bandtlow, A. Robeva, P. Burfeind, A. Buss, A. B. Huber, M. Simonen, L. Schnell, C. Brosamle, K. Kaupmann, R. Vallon, M. E. Schwab, Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 23, 5393-5406 (2003).
6. K. Venkatesh, O. Chivatakarn, H. Lee, P. S. Joshi, D. B. Kantor, B. A. Newman, R. Mage, C. Rader, R. J. Giger, The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein. *J Neurosci* 25, 808-822 (2005).
7. N. R. Mehta, P. H. Lopez, A. A. Vyas, R. L. Schnaar, Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells. *J Biol Chem* 282, 27875-27886 (2007).
8. O. Chivatakarn, S. Kaneko, Z. He, M. Tessier-Lavigne, R. J. Giger, The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci* 27, 7117-7124 (2007).
9. B. Wang, Z. Xiao, B. Chen, J. Han, Y. Gao, J. Zhang, W. Zhao, X. Wang, J. Dai, Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *PLoS ONE* 3, e1856 (2008).

10. F. Wang, Y. Zhu, The interaction of Nogo-66 receptor with Nogo-p4 inhibits the neuronal differentiation of neural stem cells. *Neuroscience* 151, 74-81 (2008).
11. E. M. Aloy, O. Weinmann, C. Pot, H. Kasper, D. A. Dodd, T. Rulicke, F. Rossi, M. E. Schwab, Synaptic destabilization by neuronal Nogo-A. *Brain Cell Biol* 35, 137-156 (2006).
12. Z. Su, L. Cao, Y. Zhu, X. Liu, Z. Huang, A. Huang, C. He, Nogo enhances the adhesion of olfactory ensheathing cells and inhibits their migration. *J Cell Sci* 120, 1877-1887 (2007).
13. J. H. Park, D. A. Gimbel, T. GrandPre, J. K. Lee, J. E. Kim, W. Li, D. H. Lee, S. M. Strittmatter, Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci* 26, 1386-1395 (2006).
14. V. Gil, O. Nicolas, A. Mingorance, J. M. Urena, B. L. Tang, T. Hirata, J. Saez-Valero, I. Ferrer, E. Soriano, J. A. del Rio, Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 433-444 (2006).
15. H. Y. Zhu, H. F. Guo, H. L. Hou, Y. J. Liu, S. L. Sheng, J. N. Zhou, Increased expression of the Nogo receptor in the hippocampus and its relation to the neuropathology in Alzheimer's disease. *Hum Pathol* 38, 426-434 (2007).
16. S. S. Hannila, M. T. Filbin, The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209, 321-332 (2008).
17. R. H. Fryer, D. R. Kaplan, L. F. Kromer, Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 148, 616-627 (1997).
18. M. Encinas, M. Iglesias, Y. Liu, H. Wang, A. Muhaisen, V. Cena, C. Gallego, J. X. Comella, Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 75, 991-1003 (2000).
19. R. Salie, J. D. Steeves, IGF-1 and BDNF promote chick bulbospinal neurite outgrowth in vitro. *Int J Dev Neurosci* 23, 587-598 (2005).
20. E. Pastrana, M. T. Moreno-Flores, J. Avila, F. Wandosell, L. Minichiello, J. Diaz-Nido, BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons. *Neurochem Int* 50, 491-498 (2007).
21. B. S. Bregman, M. McAtee, H. N. Dai, P. L. Kuhn, Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol* 148, 475-494 (1997).
22. L. B. Jakeman, P. Wei, Z. Guan, B. T. Stokes, Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol* 154, 170-184 (1998).

23. Y. Jin, I. Fischer, A. Tessler, J. D. Houle, Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury. *Exp Neurol* 177, 265-275 (2002).
24. P. Lu, A. Blesch, M. H. Tuszynski, Neurotrophism without neurotropism: BDNF promotes survival but not growth of lesioned corticospinal neurons. *J Comp Neurol* 436, 456-470 (2001).
25. D. Cai, Y. Shen, M. De Bellard, S. Tang, M. T. Filbin, Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 22, 89-101 (1999).
26. C. Dinocourt, S. E. Gallagher, S. M. Thompson, Injury-induced axonal sprouting in the hippocampus is initiated by activation of trkB receptors. *Eur J Neurosci* 24, 1857-1866 (2006).
27. S. Pahlman, A. I. Ruusala, L. Abrahamsson, M. E. Mattsson, T. Esscher, Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14, 135-144 (1984).
28. T. GrandPré, S. Li, S. M. Strittmatter, Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417, 547-551 (2002).
29. P. R. Blanquet, Neurotrophin-induced activation of casein kinase 2 in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 86, 739-749 (1998).
30. W. A. Barton, B. P. Liu, D. Tzvetkova, P. D. Jeffrey, A. E. Fournier, D. Sah, R. Cate, S. M. Strittmatter, D. B. Nikolov, Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *Embo J* 22, 3291-3302 (2003).
31. X. L. He, J. F. Bazan, G. McDermott, J. B. Park, K. Wang, M. Tessier-Lavigne, Z. He, K. C. Garcia, Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron* 38, 177-185 (2003).
32. J. Walter, A. Schindzielorz, B. Hartung, C. Haass, Phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein at the cell surface by ectocasein kinases 1 and 2. *J Biol Chem* 275, 23523-23529 (2000).
33. S. Yamauchi, Y. Tokita, S. Aono, F. Matsui, T. Shuo, H. Ito, K. Kato, K. Kasahara, A. Oohira, Phosphorylation of neuroglycan C, a brain-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, and its localization in the lipid rafts. *J Biol Chem* 277, 20583-20590 (2002).
34. F. A. Redegeld, C. C. Caldwell, M. V. Sitkovsky, Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? *Trends Pharmacol Sci* 20, 453-459 (1999).
35. J. Walter, A. Capell, A. Y. Hung, H. Langen, M. Schnolzer, G. Thinakaran, S. S. Sisodia, D. J. Selkoe, C. Haass, Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations. *J Biol Chem* 272, 1896-1903

(1997).

36. E. M. Schwiebert, Extracellular ATP-mediated propagation of Ca(2+) waves. Focus on "mechanical strain-induced Ca(2+) waves are propagated via ATP release and purinergic receptor activation". *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C281-3 (2000).
37. J. Sawynok, X. J. Liu, Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. *Prog Neurobiol* 69, 313-340 (2003).
38. E. P. Zmina, A. Fritsch, B. Schermer, A. Y. Bakulina, M. Bashkurov, T. Benzing, L. Bruckner-Tuderman, Extracellular phosphorylation of collagen XVII by ecto-casein kinase 2 inhibits ectodomain shedding. *J Biol Chem* 282, 22737-22746 (2007).
39. A. R. Walmsley, G. McCombie, U. Neumann, D. Marcellin, R. Hillenbrand, A. K. Mir, S. Frentzel, Zinc metalloproteinase-mediated cleavage of the human Nogo-66 receptor. *J Cell Sci* 117, 4591-4602 (2004).
40. A. R. Walmsley, A. K. Mir, S. Frentzel, Ectodomain shedding of human Nogo-66 receptor homologue-1 by zinc metalloproteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 112-116 (2005).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para reducir la inhibición del crecimiento de neuritas de una neurona,
en donde dicha neurona comprende un receptor de Nogo,
en donde dicho método comprende poner en contacto dicha neurona con una composición capaz de causar la fosforilación de un receptor de Nogo, en donde dicha composición comprende proteína cinasa A o caseína cinasa II.
2. Un método *in vitro* según la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II
3. Un método *in vitro* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha fosforilación es la fosforilación de un residuo de aminoácidos correspondiente a serina 281 de dicho receptor de Nogo.
4. Un método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho receptor de Nogo es NgR1 humano.
5. El uso de un polipéptido de proteína cinasa A para la fabricación de un medicamento para tratar lesión de la médula espinal.
6. Un polipéptido de proteína cinasa A para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.
7. Uso de un polipéptido de caseína cinasa II para la fabricación de un medicamento para tratar lesión de la médula espinal.
8. Polipéptido de caseína cinasa II para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.
9. Una composición que comprende proteína cinasa A y caseína cinasa II, para uso como medicamento.
10. Uso de una composición según la reivindicación 9 para la fabricación de un medicamento para tratar lesión de la médula espinal.
11. Una composición según la reivindicación 9 para uso en el tratamiento de lesión de la médula espinal.
12. Uso de un polipéptido de proteína cinasa A o de un polipéptido de caseína cinasa II para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad neurodegenerativa o un trastorno de mielinación.
13. Un polipéptido de proteína cinasa A o un polipéptido de caseína cinasa II para uso en el tratamiento de una enfermedad degenerativa o un trastorno de mielinación.
14. Uso según la reivindicación 12, o un polipéptido de proteína cinasa A o un polipéptido de caseína cinasa II según la reivindicación 13, en donde dicha enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.
15. Uso según la reivindicación 12, o un polipéptido de proteína cinasa A o un polipéptido de caseína cinasa II según la reivindicación 13, en donde dicho trastorno de mielinación es esclerosis múltiple.

Figura 1

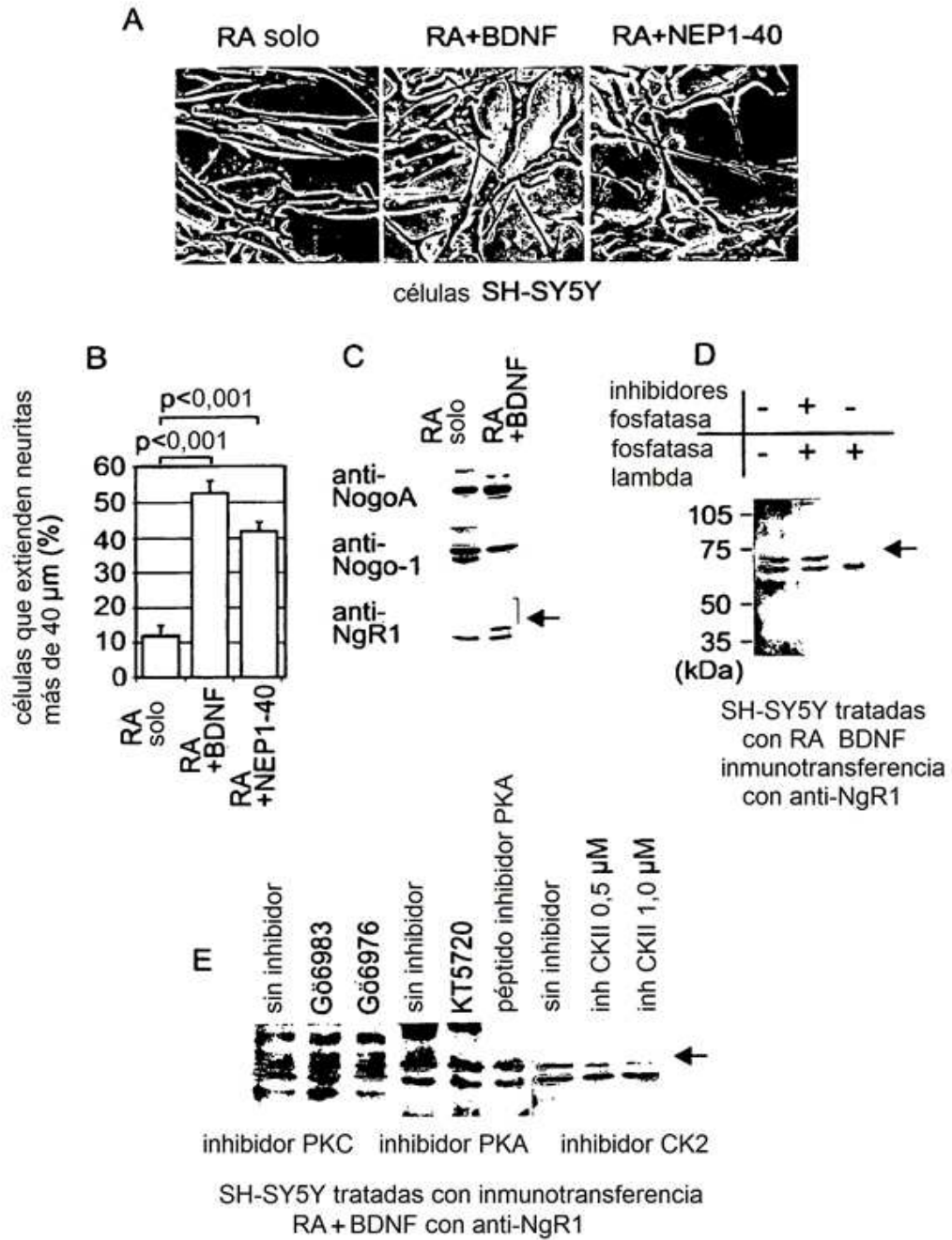


Figura 2

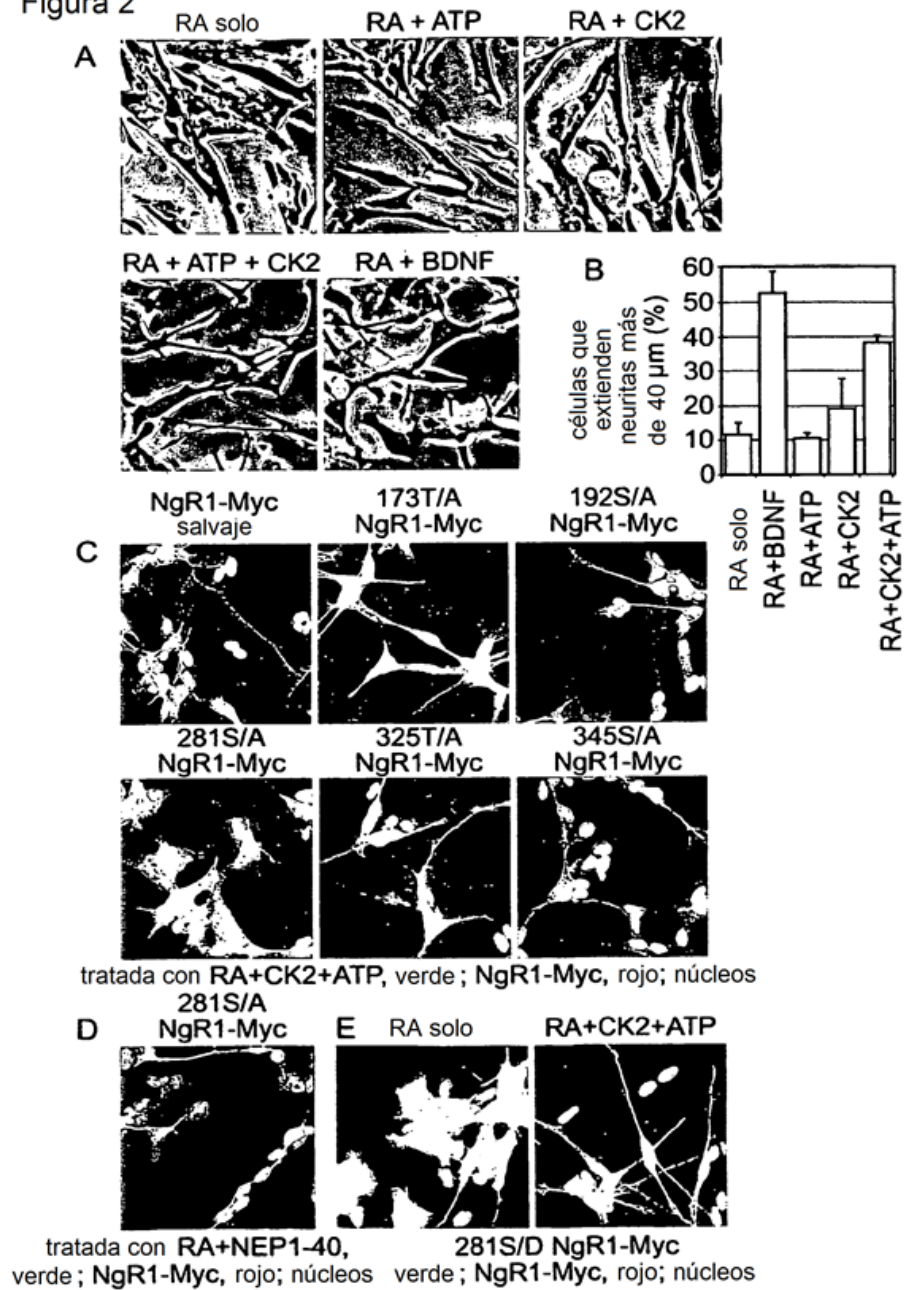


Figura 3

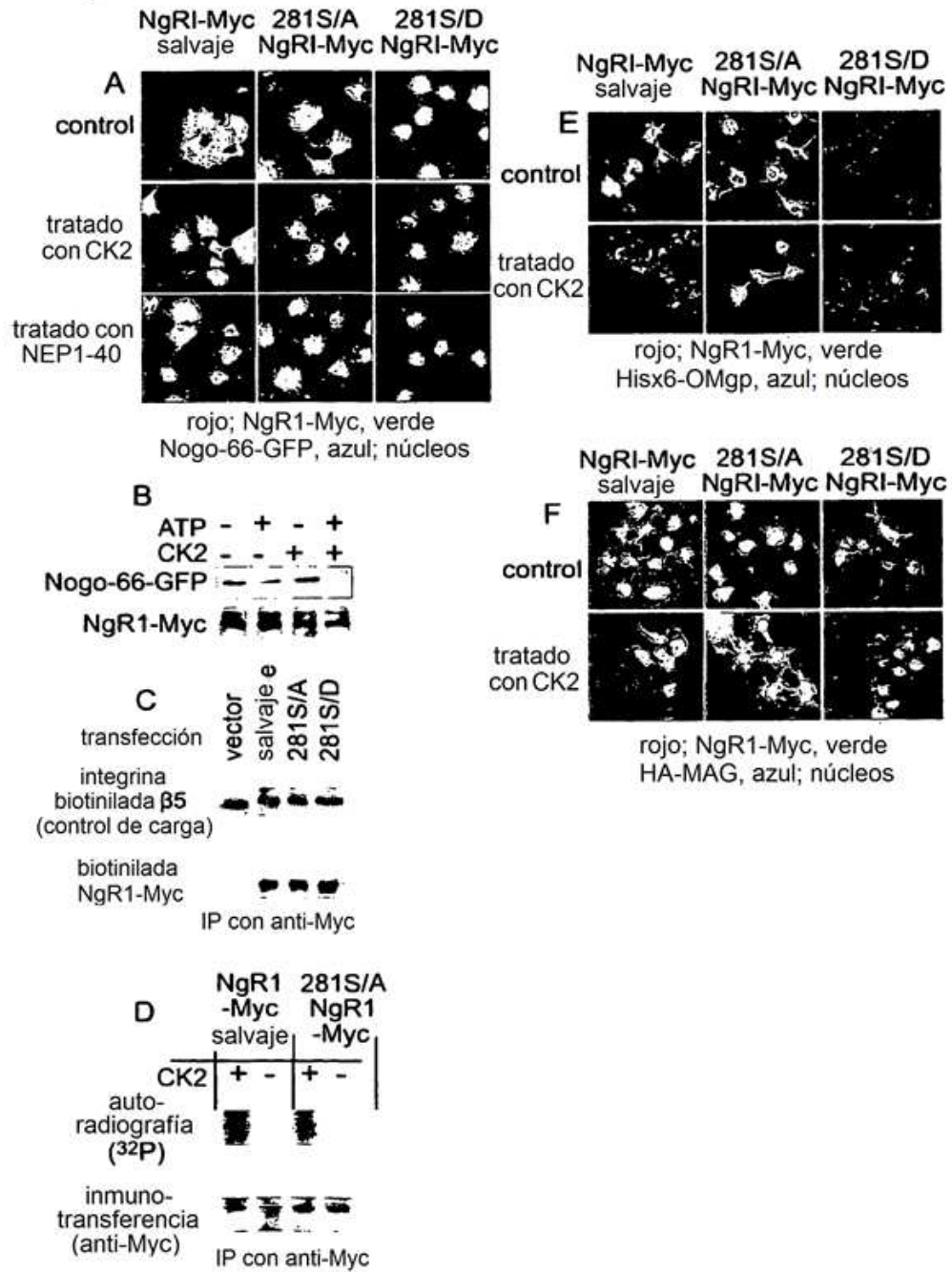


Figura 4

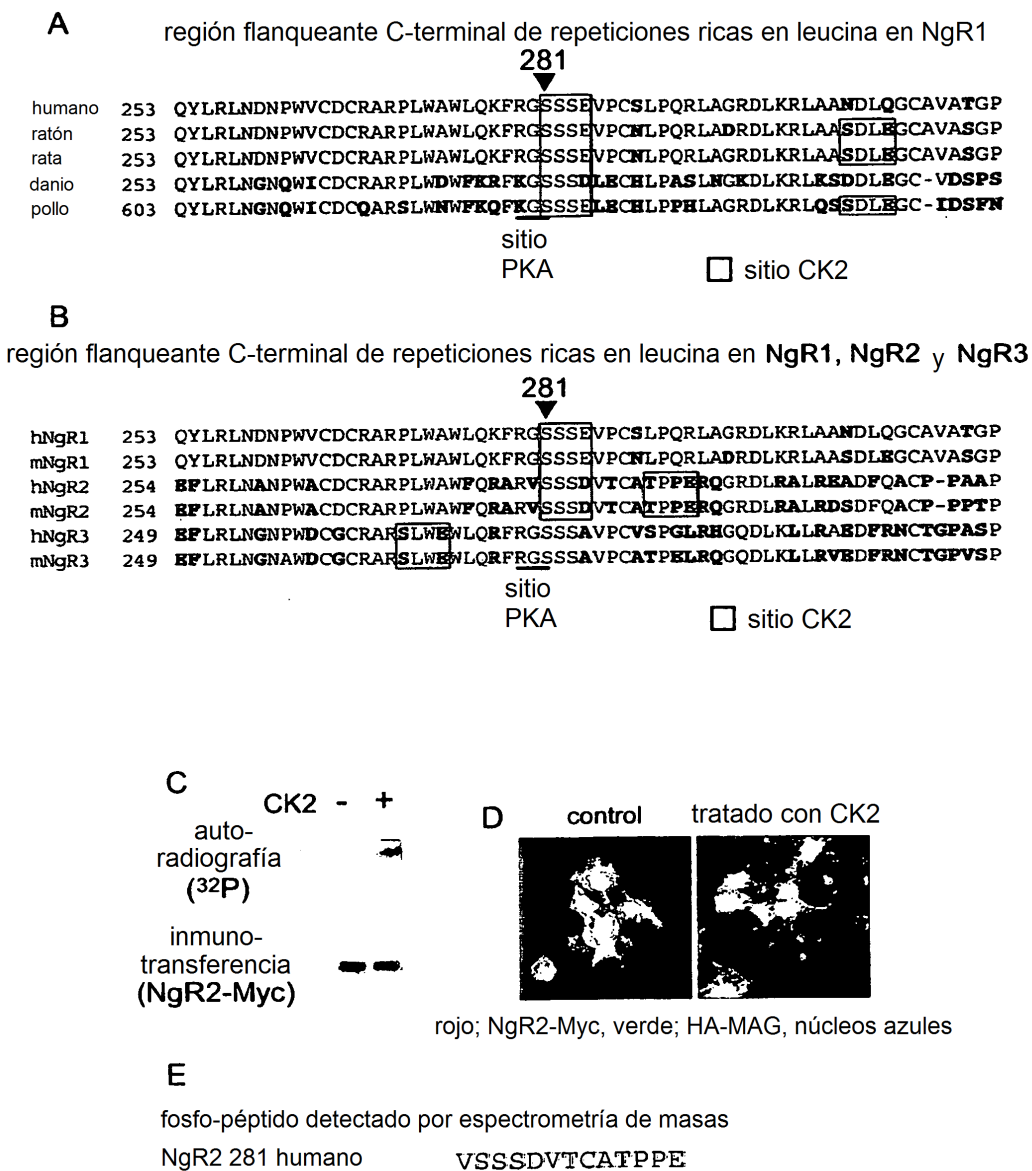


Figura 5

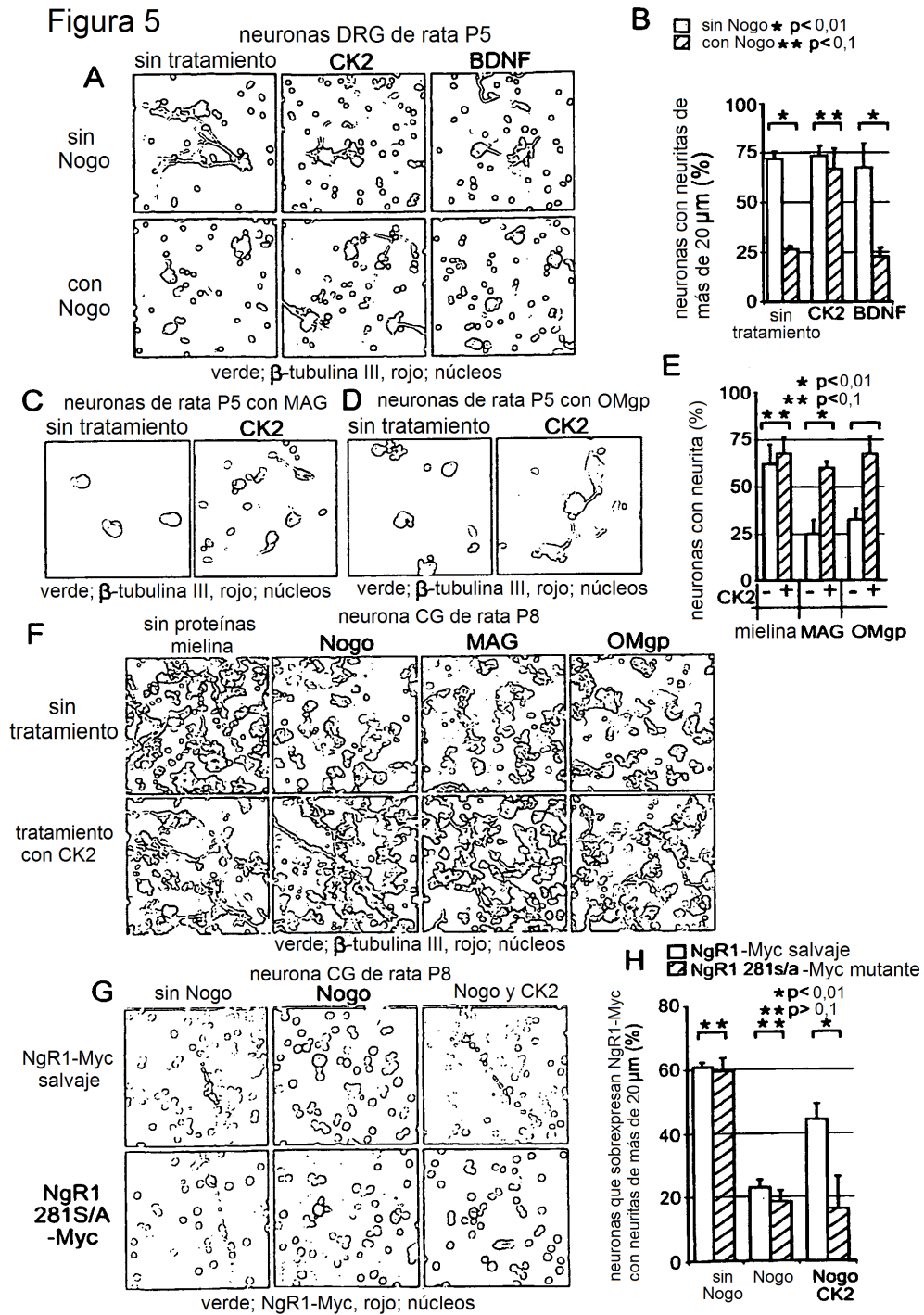


Figura 6

		NF	
humano	1	MKRASAGGSRLLA	WVLQAWQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPVGIPAA
ratón	1	MKRASAGGSRLLA	WVLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPTGIPASS
rata	1	MKRASAGGSRLP	TWVLQAWRVATPCPGACVCYNEPKVTTSCPQQGLQAVPTGIPASS
danio	1	MKTLLIVEGGRLL	CLMFVNLNLPVINS
pollo	351	SARSLPEGSKLL	LILVLCNLQSEVES
		LRR1	LRR2
humano	60	QRIFLHGNRISHVPAAS	FACRNLTILWLHSNVLARIDAAFTGLALLEQLDLSDNAQL
ratón	60	QRIFLHGNRISHVPAAS	FQSCRNLTILWLHSNALARIDAAFTGLTLEQLDLSDNAQL
rata	60	QRIFLHGNRISYVPAAS	FQSCRNLTILWLHSNALAGIDAAFTGLTLEQLDLSDNAQL
danio	60	QRIFLQSNKLTIVRST	SFSSVHNLTVLWYSNNISHIEAGAFYGLERLEELDIDGNSNL
pollo	410	QRIFLHNNKITIVRST	SFTSCRNLTILWLHSNNISLIEPGAFYGLNKEELDLSDNNTNL
		LRR3	LRR5
humano	119	RSVDPATFFHGLGR	LHTLHLDRCGLELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDDTFRDL
ratón	119	HVVDPATFFHGLGR	LHTLHLDRCGLELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDNTFRDL
rata	116	RVVDPATFFHGLGR	LHTLHLDRCGLELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDNTFRDL
danio	119	RIISPTAFRGLTKL	HTLHLDRCGLELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDNTFRDL
pollo	469	KSINPVTFRGLVH	LHTLHLDRCGLELGPGLFRGLAALQYLYLQDNALQALPDNTFRDL
		LRR5	LRR6
humano	178	GNLTHLFLHGNRI	ESVPERAFRGLHSLDRLLHHQNRVAHVHPHAFRDLGRMLTYLFLAN
ratón	178	GNLTHLFLHGNRI	ESVPERAFRGLHSLDRLLHHQNRVAHVHPHAFRDLGRMLTYLFLAN
rata	178	GNLTHLFLHGNRI	ESVPERAFRGLHSLDRLLHHQNRVAHVHPHAFRDLGRMLTYLFLAN
danio	178	ANLTYLFLHNNKIK	VTFDEHGRGLVNLDRLLHHQNRIVHVVQQAENDL SKLTTFLFFN
pollo	528	ANLTYLFLHNNKIK	SLSENVFRGLINLDRLLHHQNRVSLVHRRSFEDLGKVMTYLFLFN
		LRR8	CF
humano	237	NLSALPTEALAPL	RALQYLRINDNPWVCDRCARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAG
ratón	237	NLSMLPAEVLMP	PLRSLOYLRLINDNPWVCDRCARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAD
rata	237	NLSMLPAEVLMP	PLRSLOYLRLINDNPWVCDRCARPLWAWLQKFRGSSSEVPCSLPQRLAG
danio	237	NLTMLTGESMNPL	VSLQYLRLNGNQCWICDCARPLWDWFKRFKGSSEVPCSLPQRLAG
pollo	587	NLTMLTGESMNPL	VSLQYLRLNGNQCWICDCARPLWDWFKRFKGSSEVPCSLPQRLAG
		CF	
humano	296	RDEKRLAANDLQ	CAVATGPEYPIWTGR-----ATDEEPL-----GLPKCCQPDAA
ratón	296	RDEKRLAANDLQ	CAVATGPEYPIWTGR-----ATDEEPL-----GLPKCCQPDAA
rata	296	RDEKRLAANDLQ	CAVATGPEYPIWTGR-----ATDEEPL-----GLPKCCQPDAA
danio	296	KDLKRLKSDDE	EGC-VDSPSQVQTSIFNSKVHSGKFLSLDDPL--VESIPRCCLSD-ND
pollo	646	RDEKRLKSDDE	EGC-IDSFNQIRTSVFSTKTRSGKLATGSPPLSSHDSMKCCQPE-MD
humano	343	KASVLEPGRP	PASAGNALKGRVPPGDTTPPGNGSGPRHINDSPFGTLPSSAEPLTALRPG
ratón	343	KASVLEPGRP	PASAGNALKGRVPPGDTTPPGNGSGPRHINDSPFGTLPSSAEPLTALRPG
rata	343	KASVLEPGRP	PASAGNALKGRVPPGDTTPPGNGSGPRHINDSPFGTLPSSAEPLTALRPG
danio	351	KSSIISSKSIP	DPSSYNSRQITNNPLKEKENISKTKFREVERTKNETRKNQSLNDGPLG
pollo	703	KSFIIYAKGK	AGPSSSHSRPSSNNPLKDKENMSKTKYVETDPSKNG-SNKQ-INDSPFG
humano	402	GSEPPGF-----	PTSGP-RRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGGGGTGDS
ratón	402	GSEPPGL-----	PTSGP-RRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGASGTGDA
rata	402	GSEPPGL-----	PTSGP-RRRPGCSRKNRTRSHCRLGQAGSGSSGTGDA
danio	410	TMSNNLDQSL	DRIDPELLGNLEPSTAPTKKKKKCSKPKSDQNCCLG-----
pollo	764	FPIVDPLTKLR--	PEFLEPIEPSTVPTKKRQGCCKKNKSKAQCRLTQGG-----
humano	445	EGSGALPSLT	CSLTPLGLALVLTVLGPC
ratón	445	EGSGALPALAC	SLAPLGLALVLTVLGPC
rata	445	EGSGALPALAC	SLAPLGLALVLTVLGPC
danio	457	EGST-IQVLA----	VIFLPLF-WLSLALS
pollo	810	NSST-LQLSLT	SL-LISPLV-WLSLALS

rata: AF 462390, ser humano; NM 023004, ratón; NM 022982,
 danio; NM 203478, pollo; XM 415292

□ sitio diana CK2 (T/S X X D/E)

Figura 7

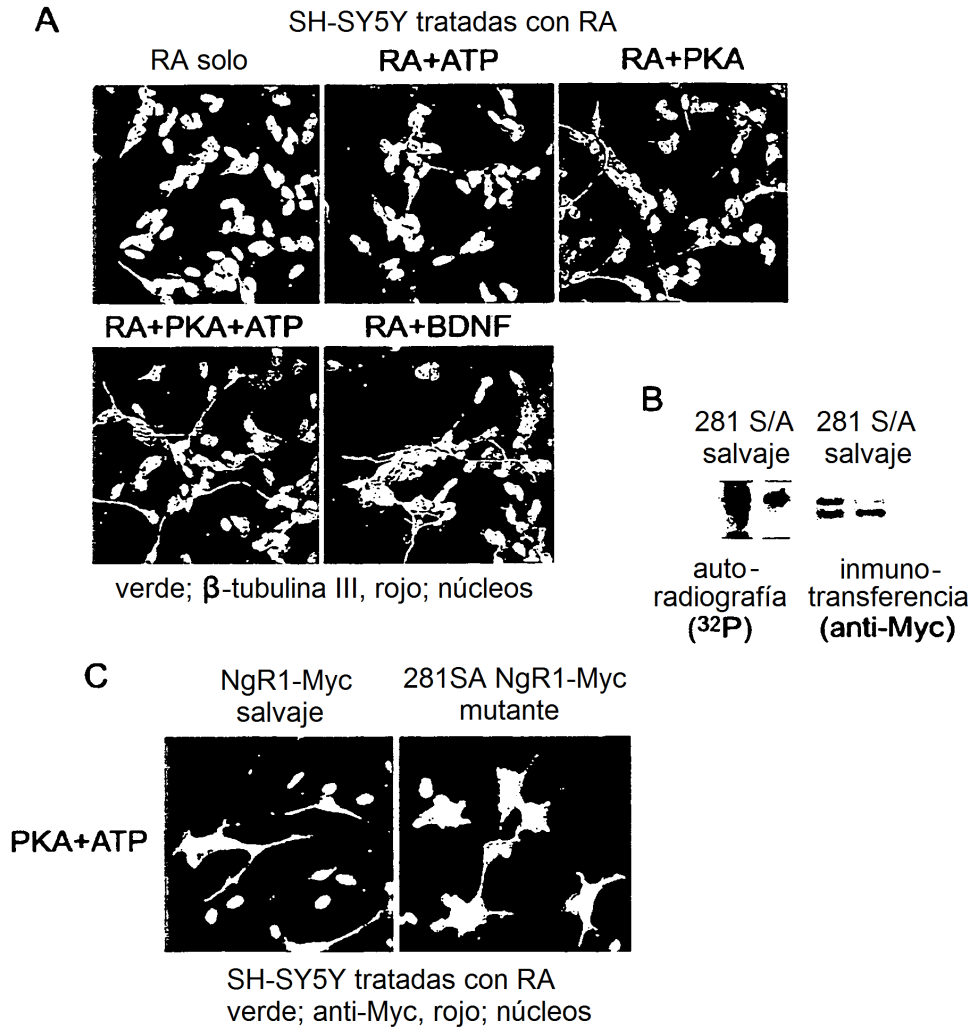


Figura 8

Ngr1 1 **MKRAS**----**AGGSRL**LAWVLWLQANQVAAPCPGACVCYNEPKVTTSC**PQOGLQAVPVGIP**
 Ngr2 1 **MLPGLRRL**LQAPASACLLMLLALPLAAPS**CPMLCTCYSSP**-PTVSC**QANNFSSVPLSLP**
 Ngr3 1 **MLR**-----**KGCCVEL**LLLLVAARLPLGGG**CP**RD**CV**CPAP-**MTVSCQ**AE**NFAAI**PEGIP

 Ngr1 57 **AASQRIF**LHG**NRIS**EVPAAS**FRAC**RL**TI**LWL**HSN**VLARIDAA**FTGL**ALLE**QLDLS**DNA
 Ngr2 60 **PSTQRL**FL**QNN**L**IR**TL**RP**GT**FG**--**SN**LL**TL**WL**FS**NN**LS**TIYPGT**FR**HL**Q**A**EE**LDLGDNR
 Ngr3 54 **VDSERV**FL**QNN**RI**GL**L**Q**PG**HS**--**P**AM**VT**LW**IYS**N**IT**Y**I**HP**ST**FE**GF**V**HE**LELDLGDNR

 Ngr1 117 **QLRS****VD**PAT**FF**GL**GR**L**HT**L**HL**DR**CG**L**Q**EL**GP**GL**FR**GL**AA**LQYLYLQDN**ALQ**AL**PDD****TF**RL
 Ngr2 118 **HLRS****LE**PD**TF**Q**GL**ER**LQ**SL**HL**Y**RC**L**SS**L**PG**NI**FR**GL**VS**LQYLYLQ**ENS**LL**HL**QDD**L**FAD
 Ngr3 112 **QLR**TL**AP**ET**FF**Q**GL**V**KL**HA**LY**L**YK**CG**L**S**AL**PAG**V**FG**LE**S**L**QYLYLQDN**HE**Y**L**QDD**I**FVD

 Ngr1 177 **LGN**L**TH**LFLHG**NRIS****SV**PE**RA**FRGL**HS**LDRLL**HH**Q**NR**VA**EV**HP**HA**FRD**LGR**IM**TL**YL**FAN**
 Ngr2 178 **L**ANLS**HL**FLHG**NRL****RL**LT**EH**VFRGL**GS**LDRLL**HH**GN**R**L**Q**GV**H**RA**FR**GL**S**RL**TI**YL**FNN**
 Ngr3 172 **L**VNLS**HL**FLHG**NK**LS**L**GP**GT**FRGL**VN**LDRLL**HH**EN**Q**L**Q**W**V**HE**K**AF**HD**L**R**RL**TT**LF**L**FNN

 Ngr1 237 **N**LSAL**P**TEALAP**L**RAL**Q**YLR**LN**DN**P**W**V**CD**C**RAR**PL**WAW**LQ**K**FRG****SSSE**VPC**S**L**P**Q**R**LAGR
 Ngr2 238 **S**LAS**L**PGEALAD**L**PS**LE**FL**R**LNAN**P**W**A**CD**C**RAR**PL**WAW**FQ**AR**V****SSSD**VT**C**A**T**PF**R**QGR
 Ngr3 232 **S**LSE**L**QGECLAP**L**GALE**F**FL**R**LN**G**N**P**W**D**CG**C**RAR**S**L**WE**N**LQ**R**FR**GSS**S**AV**P**C**V**S**P**GL**R**H**GQ**

 Ngr1 297 **DLK**RLA**AND**L**Q**CA**V**AT**G**PY**HP**I**WT**GRA**TDEE**PL**GL**PK**CCQ**PD**AA**DKA**SVLE**PGR**P**AS**SAG**
 Ngr2 298 **DL**RAL**RE**AD**FQ**AC**P**-**P**AA**P**TR-**P**GS**R**ARG**NS**-----**S**NHLY**G**VA**E**A-----**G**APPAD**PS**
 Ngr3 292 **DLK**LL**RA**ED**FN**CT**G**PAS**PEQ**-**I**K**S**HT**L****TTD**RA**AR**KE**HS****P**EG**P**TR**S**-----**K**GH**P**H**G**PR

 Ngr1 357 **N**ALK**G**RV**P**PG**D**SP**P**GN**G**SG**P**RH**I**ND**S**PF**CT**LP**G**SA**EP**PL**T**AV**R**PE**G**SE**PP**GF**PT**SG**P**RRR
 Ngr2 346 **TL**YR-----**D**L**P**AK**D**SR**G**R**Q**-----**G**GD**AP****TEDD**Y**W**GG**Y**G-----**G**ED**Q**R**G**
 Ngr3 347 **P**G**H**R-----**K**PG**K**N**CT**N**P**R**N**R**Q**I**S**KAG**A**G**K**Q**A**PE**L**PD**Y**AP**D**Y**Q**HK**F**S**FDI**-**M**PT**A**R**P**K**R**K

 Ngr1 417 **P**GC**S**R**K**NR**T**R**SE**C**R**L**G**Q**A**GS**G**GG**G**T**G**D**SE**G**S**GA**L**PS**L**TC**S**L**T**PL**G**LA**L**VL**W**TV**L**GPC
 Ngr2 382 **E**Q**M**CP**G**AAC**Q**AP**D**SR**G**P-----**A**LS**A**GL**P**SP**LL**CL**LL**LV**P**PH**L**
 Ngr3 402 **G**K**C**AR**T**PI**R**AP**S**GV**Q**QA-----**S**S**A**SS**L**GA**S**LL**A**W**T**L**G**LA**V**TL**R**

□ sitio diana CK2 (T/S X X D/E)

Figura 9

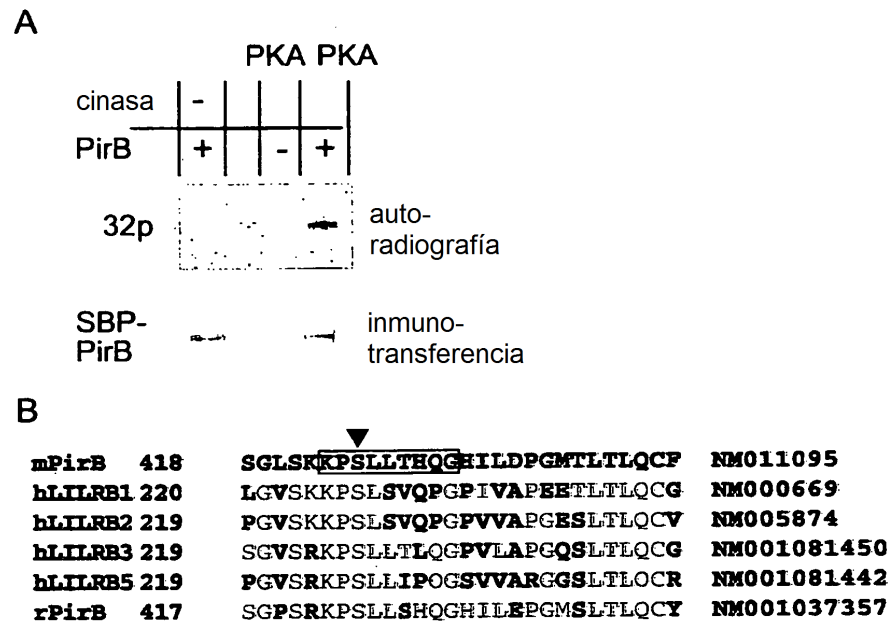


Figura 10B

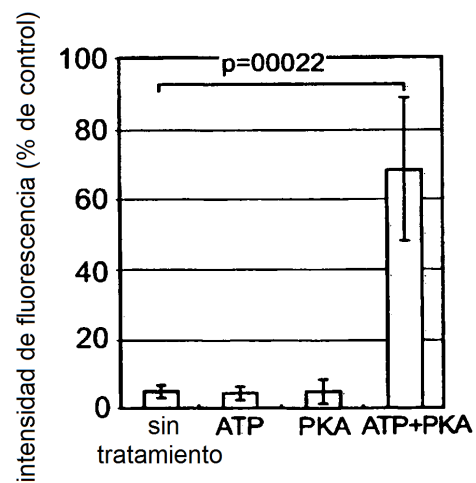


Figura 10A

