

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 337**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61K 45/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009** **E 09711963 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 2244702**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades o estados neurales**

30 Prioridad:

**21.02.2008 US 30354**

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

**22.12.2014**

73 Titular/es:

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE  
ADVANCEMENT OF LEARNING/MCGILL  
UNIVERSITY (100.0%)  
845 Sherbrooke Street West  
Montreal, Québec H3A 2T5, CA**

72 Inventor/es:

**RADZIOCH, DANUTA;  
DAVID, SAMUEL;  
LOPEZ-VALES, RUBEN y  
SKINNER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 525 337 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**

Tratamiento de enfermedades o estados neurales

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades o estados neurales. Más específicamente, la presente invención se refiere al tratamiento de una lesión neural o enfermedades neurodegenerativas, tales como una lesión de la médula espinal y ELA.

10

**Antecedentes de la técnica**

El manejo clínico de numerosos trastornos neurológicos se ha visto frustrado por la naturaleza progresiva de enfermedades degenerativas, traumáticas o neurológicas destructivas y la eficacia limitada y los efectos secundarios graves de los agentes farmacológicos disponibles. Estados tales como degeneración, lesión o traumatismo del sistema nervioso han sido esquivos a la mayoría de los intentos farmacológicos convencionales para aliviar o curar los estados.

15

La lesión traumática de la médula espinal, también denominada lesión de la médula espinal (LME) conduce a alteraciones funcionales debido a la muerte de neuronas y células de la glía y a la perturbación de las rutas axonales. Sin embargo, el ataque primario desencadena una cascada de acontecimientos patológicos, conocida como lesión secundaria, que se desarrolla horas y días después de la lesión primaria, dando como resultado daño tisular y pérdida funcional adicionales. La respuesta inflamatoria contribuye fuertemente al daño secundario tras LME mediante la liberación de citocinas, radicales libres, eicosanoides y proteasas, entre otras moléculas (Jones *et al.* (2005) *Curr Pharm Des* 11: 1223-1236).

20

25

Actualmente, sólo un agente terapéutico, la metilprednisolona (MP), se considera terapia convencional tras LME traumática. MP es un glucocorticosteroide sintético que se ha sometido a varios ensayos clínicos con seres humanos a gran escala y mostró beneficios clínicos menores cuando se administró en el plazo de 48 horas desde la LME.

30

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también denominada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno neurodegenerativo progresivo provocado por la degeneración de neuronas motoras, y está asociada con inflamación y niveles elevados de especies reactivas de oxígeno. Da como resultado en última instancia parálisis muscular e insuficiencia respiratoria. No se ha encontrado aún un tratamiento eficaz para ELA, aunque se ha aprobado recientemente el riluzol para el tratamiento de ELA. El riluzol retarda la aparición de la dependencia de respirador o traqueotomía y el deterioro de la fuerza muscular en algunos pacientes. Sin embargo, está asociado con varios efectos secundarios.

35

El documento WO 2007/104030 da a conocer el uso de derivados del ácido retinoico para el tratamiento de estados neuroinflamatorios. Sin embargo, el documento WO 2007/104030 no da a conocer el uso de fenretinida.

40

Por tanto, existe la necesidad de métodos y productos novedosos para prevenir y/o tratar enfermedades y estados neurales tales como LME y/o ELA.

45

**Sumario de la invención**

La presente descripción se refiere en general al tratamiento de enfermedades o estados neurales, basándose en el uso de un derivado del ácido retinoico, tal como fenretinida, y/o análogos, derivados, profármacos, precursores de la misma, y/o sales de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere al tratamiento de una lesión neural o enfermedades neurodegenerativas, basándose en el uso de un derivado del ácido retinoico, tal como fenretinida, y/o análogos, derivados, profármacos, precursores de la misma, y/o sales de la misma.

50

La presente invención se refiere en general al tratamiento de enfermedades o estados neurales, basándose en el uso de fenretinida o sales de la misma. Más específicamente, la presente invención se refiere al tratamiento de una lesión neural o enfermedades neurodegenerativas, basándose en el uso de fenretinida o sales de la misma.

55

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un derivado del ácido retinoico.

60

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un uso de un derivado del ácido retinoico para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un uso de un derivado del ácido retinoico para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto.

65

- 5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, comprendiendo dicha composición (a) un derivado del ácido retinoico; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, comprendiendo dicha composición: (a) un derivado del ácido retinoico; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un derivado del ácido retinoico para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto.
- 20 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un envase que comprende: (1) un derivado del ácido retinoico; y (2) instrucciones para el uso de dicho derivado del ácido retinoico para el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto.
- 25 En una realización, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida; (ii) un derivado funcional, análogo, conjugado, profármaco o precursor de fenretinida; (iii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) o (ii); o (iv) cualquier combinación de (i) a (iii).
- 30 En una realización adicional, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida; (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; o (iii) cualquier combinación de (i) y (ii).
- 35 En una realización, el método mencionado anteriormente comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de (i) fenretinida; (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; o (iii) cualquier combinación de (i) y (ii).
- 40 En una realización, la composición mencionada anteriormente comprende: (a) (i) fenretinida; (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; o (iii) cualquier combinación de (i) y (ii); y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 45 En la presente invención, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida; o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida.
- 50 En una realización de la presente invención, el uso mencionado anteriormente comprende el uso de (i) fenretinida; o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida.
- 55 En una realización de la presente invención, la composición mencionada anteriormente comprende: (a) (i) fenretinida; o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 En una realización, el método o uso mencionados anteriormente comprende además el tratamiento o la inhibición de (o la preparación de un medicamento para el tratamiento o la inhibición de) un estado asociado con dicha lesión neural seleccionada de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales; (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).
- 65 En una realización, la composición, el envase o el derivado del ácido retinoico mencionados anteriormente es además para tratar o inhibir un estado tras dicha lesión neural, en el que dicho estado se selecciona de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales; (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).
- En otra realización, el método o uso mencionados anteriormente comprende además el tratamiento o la inhibición de (o la preparación de un medicamento para el tratamiento o la inhibición de) un estado asociado con dicha enfermedad/dicho trastorno neurodegenerativo, en el que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la

función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía; y (g) cualquier combinación de (a) a (f).

5 En otra realización, la composición, el envase o el derivado del ácido retinoico mencionados anteriormente es además para tratar o inhibir un estado asociado con dicha enfermedad/dicho trastorno neurodegenerativo, en el que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía; y (g) cualquier combinación de (a) a (f).

10 En otra realización, la lesión neural mencionada anteriormente es una lesión del sistema nervioso central (SNC). En una realización adicional, la lesión del SNC mencionada anteriormente es una lesión de la médula espinal (LME). En una realización adicional, la LME mencionada anteriormente es LME aguda.

15 En una realización, el método o uso mencionados anteriormente comprende además aumentar la inervación (o la preparación de un medicamento para aumentar la inervación) tras dicha lesión neural.

20 En una realización, la composición, el envase o el derivado del ácido retinoico mencionados anteriormente es además para aumentar la inervación tras dicha lesión neural.

En una realización, la inervación mencionada anteriormente es inervación serotoninérgica.

25 En otra realización, los niveles de AA mencionados anteriormente son niveles de AA unido a fosfolípidos.

En otra realización, los niveles de DHA mencionados anteriormente son niveles de DHA unido a fosfolípidos.

30 En una realización, la enfermedad neurodegenerativa mencionada anteriormente es esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

En otra realización, el sujeto mencionado anteriormente es un mamífero. En una realización adicional, el mamífero mencionado anteriormente es un ser humano.

35 Otros objetos, ventajas y características de la presente invención resultarán más evidentes tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de realizaciones específicas de la misma, facilitada a modo de ejemplo sólo con referencia a los dibujos adjuntos.

#### Breve descripción de los dibujos

40 En los dibujos adjuntos:

la figura 1 muestra la cuantificación de los niveles de ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA) en plasma y tejido de la médula espinal después de LME. (A) El tratamiento con fenretinida (cuadrados negros) condujo a una reducción significativa en los niveles de AA en plasma en comparación con ratones tratados con vehículo (círculos blancos) desde el día 1 hasta el 28 después de LME. (B) Los niveles en plasma de DHA fueron significativamente mayores desde 3 hasta 28 dpi (días después de la lesión) en ratones tratados con fenretinida (cuadrados negros) en comparación con ratones control (círculos blancos). (C, D). El tratamiento con fenretinida (barra negra), pero no con vehículo (barra blanca) también produjo una disminución significativa en los niveles de AA (C) y un aumento en los de DHA (D) en la médula espinal en el día 3 después de LME (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ );

50 la figura 2 muestra (A) una evolución temporal de la recuperación locomotora evaluada usando la escala de Basso para ratones (BMS, *Basso Mouse Scale*) y (B) subpuntuaciones de BMS locomotoras. Obsérvese que los animales tratados con fenretinida (cuadrados negros) muestran habilidades motoras potenciadas significativamente empezando el día 7 después de LME en la BMS y en las subpuntuaciones (\* $p < 0,05$ ) en comparación con sus homólogos tratados con vehículo (círculos blancos);

60 la figura 3 muestra la cuantificación de la conservación de tejido evaluada mediante tinción para determinar Proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP, *Glial fibrillary acidic protein*) a los 28 días después de LME. (A) Los ratones tratados con fenretinida (barra negra) presentaron una reducción significativa en la pérdida de tejido en comparación con ratones control (barra blanca). (B) La conservación de tejido mejoró significativamente en el epicentro y en áreas adyacentes/circundantes en ratones tratados con fenretinida (cuadrados negros) en comparación con ratones tratados con vehículo sólo (círculos blancos). (C) Los ratones tratados con fenretinida (barras negras) también mostraron una mayor supervivencia neuronal en regiones que van desde 300 hasta 500  $\mu\text{m}$  de manera rostral y caudal con respecto al epicentro de la lesión, en comparación con ratones tratados con vehículo (barras blancas). (D) Los animales tratados con fenretinida (barra negra) presentan significativamente mayor inervación serotoninérgica en las astas anteriores a 1000  $\mu\text{m}$  de manera caudal con respecto al epicentro de la lesión en

comparación con animal al que se le administró el vehículo (barra blanca) (\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ );

la figura 4 muestra la cuantificación de ARNm que codifica para moléculas asociadas con inflamación en muestras de médula espinal tras lesión de la médula espinal. (A) Los ratones tratados con fenretinida (FEN, columna derecha) mostraron una reducción notable en la expresión de ARNm que codifica para fosfolipasa A<sub>2</sub> secretada (sPLA<sub>2</sub>) GIIA, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) en comparación con ratones tratados con vehículo (VEH, columna izquierda). (B, C) Las médulas espinales de ratones tratados con fenretinida (barras negras) mostraron una reducción significativa en los niveles de malondialdehído (MDA) (B) y nitrotirosina (C) en 3 dpi (\*  $p < 0,01$ ) en comparación con sus homólogos tratados con vehículo (barras blancas);

la figura 5 muestra los efectos del tratamiento con fenretinida (0,65 y 1,25  $\mu$ M) sobre la liberación de TNF- $\alpha$  de cultivos de células de la microglía estimuladas con LPS (10 ng/ml). La fenretinida indujo una reducción significativa en la liberación de TNF- $\alpha$  desde la microglía activada (\* $p < 0,05$ );

la figura 6 muestra niveles de ceramida unida a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT, *wild-type*) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G93A</sup>. Cada grupo se componía de n = 4 animales y se logró la significación estadística con  $p = 0,006$ ;

la figura 7 muestra niveles de malondialdehído (MDA) en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G93A</sup>. Cada grupo se componía de n = 4 animales y se logró la significación estadística con  $p = 0,002$ ;

la figura 8 muestra niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) unido a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G93A</sup>. Cada grupo se componía de n = 4 animales y se logró la significación estadística con  $p = 0,01$ ;

la figura 9 muestra niveles de ácido araquidónico (AA) unido a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G93A</sup>. Cada grupo se componía de n = 4 animales y se logró la significación estadística con  $p = 0,003$ ;

la figura 10 muestra niveles de nitrotirosina en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G93A</sup>. Cada grupo se componía de n = 4 animales y se logró la significación estadística con  $p = 0,01$ ;

la figura 11 muestra niveles de ceramida unida a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G37R</sup>. El grupo de tipo natural se componía de 3 animales mientras que el grupo de ratones transgénicos incluía 4 ratones;

la figura 12 muestra niveles de malondialdehído (MDA) en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G37R</sup>. El grupo de tipo natural se componía de 3 animales mientras que el grupo de ratones transgénicos incluía 4 ratones. Se logró la significación estadística con  $p = 0,02$ ;

la figura 13 muestra niveles de ácido docosahexaenoico (DHA) unido a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G37R</sup>. El grupo de tipo natural se componía de 3 animales mientras que el grupo de ratones transgénicos incluía 4 ratones. Se logró la significación estadística con  $p = 0,01$ ;

la figura 14 muestra niveles de ácido araquidónico (AA) unido a fosfolípidos en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G37R</sup>. El grupo de tipo natural se componía de 3 animales mientras que el grupo de ratones transgénicos incluía 4 ratones;

la figura 15 muestra niveles de nitrotirosina en plasma en ratones de tipo natural (WT) y transgénicos (Tg) SOD1<sup>G37R</sup>. El grupo de tipo natural se componía de 3 animales mientras que el grupo de ratones transgénicos incluía 4 ratones;

la figura 16 muestra los efectos de fenretinida sobre el rendimiento en varilla rotatoria. El efecto del tratamiento con fenretinida sobre el rendimiento motor en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup> de 88 a 137 días de edad. Los ratones tratados con 5 mg/kg de fenretinida (Fen, triángulos invertidos) mostraron un rendimiento motor mejorado significativamente en comparación con los controles tratados con vehículo (Veh, cuadrados) mediante ANOVA de dos factores ( $p < 0,0001$ ). Esta prueba estuvo seguida por pruebas posteriores de Bonferroni que revelaron adicionalmente mejoras significativas en el grupo tratado con fenretinida en el día 112, 116 y 119. Los valores son la media  $\pm$  EEM. \* significa  $p \leq 0,05$ . n  $\approx$  20 para cada grupo;

la figura 17 muestra el efecto del tratamiento con fenretinida sobre la supervivencia en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>. (A) Esta figura representa la supervivencia media de ratones tratados con fenretinida (Fen) y ratones control tratados con vehículo (Veh). La supervivencia media de ratones tratados con 5 mg/kg de fenretinida mejoró significativamente desde  $142,9 \pm 1,3$  d hasta  $147,9 \pm 1,4$  d en comparación con controles ( $p \leq 0,02$ ) mediante la prueba de la t no paramétrica. Los valores son la media  $\pm$  EEM. \* significa  $p \leq 0,05$ . (B) Esta figura representa la probabilidad acumulada (acum.) de supervivencia para ratones que comienzan el tratamiento a los 30 d de edad con

vehículo (Veh, cuadrados) o 5 mg/kg de fenretinida (Fen, triángulos invertidos). Existe un aumento significativo en la supervivencia en ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados ( $p \leq 0,05$ ). La mediana de los valores de supervivencia son 148,5 días para fenretinida y 143,5 días para ratones tratados con vehículo.  $n = 18$  para Veh,  $n = 12$  para fen.;

5 la figura 18 muestra la cinética plasmática para DHA unido a fosfolípidos. Esta gráfica presenta la concentración de DHA unido a fosfolípidos en ratones tratados con fenretinida (Fen, triángulos) o vehículo (Veh, cuadrados). El ANOVA de dos factores reveló una elevación significativa en los niveles de DHA en los animales tratados con fenretinida en comparación con los controles tratados con vehículo en la duración del estudio ( $p \leq 0,0001$ ). Pruebas posteriores de Bonferroni también revelaron DHA significativamente mayor tanto a los 60 como a los 120 días en ratones tratados con fenretinida. \* significa  $p \leq 0,05$ .  $n = 10$  para cada grupo;

la figura 19 muestra concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en plasma. Los niveles de AGPI se midieron a partir de muestras de plasma obtenidas 120 días después del nacimiento. Los ratones tratados con 5 dosis semanales de fenretinida (Fen) presentaron niveles aumentados significativamente del AGPI omega-3 ( $\omega$ -3) unido a fosfolípidos DHA (figura 19A), pero niveles reducidos significativamente del AGPI omega-6 ( $\omega$ -6) unido a fosfolípidos AA (figura 19B), en comparación con los controles tratados con vehículo (Veh). \*\* significa  $p \leq 0,01$ .  $n = 8$  para ambos grupos;

20 la figura 20 muestra el efecto de la terapia con fenretinida sobre la peroxidación lipídica/estrés oxidativo en plasma. Dos marcadores de peroxidación lipídica/estrés oxidativo, nitrotirosina (NT, figura 20A) y malondialdehído (MDA, figura 20B), disminuyeron significativamente en el día 120 en ratones tratados con fenretinida (Fen) en comparación con controles (Veh) en muestras de plasma medidas a los 120 días de edad. \*\*\* significa  $p \leq 0,001$ .  $n = 7$  u  $8$  para todos los grupos;

25 la figura 21 muestra concentraciones de AGPI en órganos afectados por ELA. (A) Los niveles de DHA unido a fosfolípidos aumentaron significativamente en la región lumbar de la médula espinal de ratones tratados con fenretinida en comparación con los controles tratados con vehículo. (B) No se detectó una diferencia en AA a partir de las mismas muestras de médula espinal. (C) Las muestras de corteza motora revelaron niveles menores significativamente de AA unido a fosfolípidos en ratones tratados con fenretinida. (D) Las concentraciones de DHA fueron mayores en muestras de corteza derivadas de ratones tratados con fenretinida. \* significó  $p \leq 0,05$ .  $n = 11$  ó  $12$  para todos los grupos;

35 la figura 22 muestra la cuantificación de neuronas motoras supervivientes. (A) Las neuronas motoras contadas en el asta anterior del 4º segmento lumbar de la médula espinal parecen ser más numerosas en ratones tratados con fenretinida. (B) Las imágenes representan la tinción de neuronas motoras. Las observaciones cualitativas indican que las muestras tratadas presentaban neuronas motoras más robustas. Las flechas indicaron las neuronas motoras alfa identificadas en el asta anterior.  $n = 4$  para ambos grupos; y

40 la figura 23 muestra la cuantificación de gliosis reactiva. (A) Los astrocitos con tinción positiva para GFAP ocuparon significativamente menos área de la 4ª asta anterior lumbar en ratones tratados con fenretinida (Fen) en comparación con controles tratados con vehículo (Veh). (B) Las observaciones cualitativas revelan que las médulas espinales de los animales tratados con vehículo presentan números mayores de astrocitos y que estas células son más hipertroficadas en comparación con muestras de ratones tratados con fenretinida. (C) Las microglías positivas para Mac2 fueron también significativamente menos numerosas en ratones tratados con fenretinida. (D) Las observaciones cualitativas también revelaron microglías hipertroficadas más numerosas en las médulas espinales de ratones tratados con vehículo. \* significa  $p \leq 0,05$ .

#### Divulgación de la invención

50 Se describen en el presente documento estudios que usan un modelo de ratón de lesión de la médula espinal (LME) y un modelo de ratón de ELA. Los resultados descritos en el presente documento muestran que la administración de fenretinida, un derivado del ácido retinoico, tras LME da como resultado una potenciación significativa en el rendimiento locomotor, la conservación de tejido, la innervación de fibras serotoninérgicas y la supervivencia de neuronas motoras. El tratamiento con fenretinida tras LME también estuvo asociado con (a) modulación de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y más particularmente con una disminución de los niveles de AA y un aumento de los niveles de DHA tanto en el plasma como en la médula espinal; (b) reducción en la expresión de mediadores proinflamatorios tales como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , sPLA<sub>2</sub> GIIA e iNOS en la médula espinal; y (c) atenuación del estrés oxidativo en la médula espinal lesionada. Los datos presentados en el presente documento también muestran que la administración de fenretinida a ratones transgénicos SOD1 mutantes (modelo de ratón de ELA) da como resultado (a) una mejora de la función motora, (b) una prolongación de la supervivencia, (c) una mejora de las razones de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) w-3:w-6 en el plasma y el SNC, (d) una reducción de la peroxidación lipídica/estrés oxidativo en el plasma y en el SNC, (e) un aumento del número de neuronas motoras y (f) una disminución de la activación de la glía en el SNC.

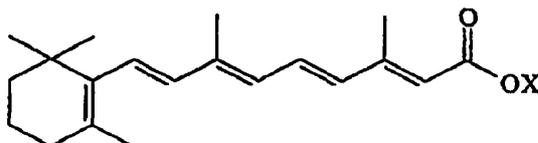
65 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una lesión neural

o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de (i) un derivado del ácido retinoico; (ii) un análogo funcional, conjugado, profármaco o precursor de (i); (iii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) o (ii); o (iv) cualquier combinación de (i) a (iii). En una realización, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente aumenta, y/o induce, la producción de ceramidas.

5

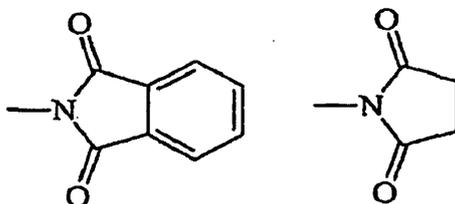
En realizaciones, los derivados del ácido retinoico que pueden usarse en la presente descripción, incluyen, por ejemplo:

10 (A) ésteres del ácido todo-*trans*-retinoico que tienen la siguiente fórmula:



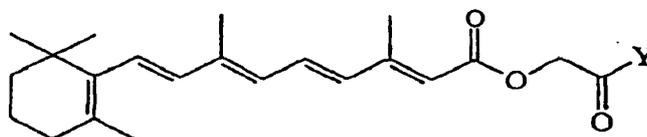
en la que X se selecciona de:

15



2-ciclohexiletilo; 10-carbometoxidecilo; 4-hidroxi-butilo; colesterilo; m- y p-vinilbencilo mixtos; y 4-bromobencilo;

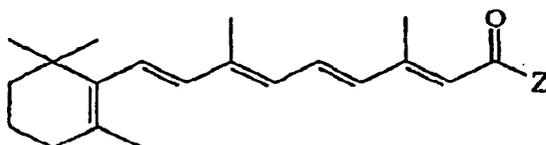
20 (B) ésteres del ácido todo-*trans*-retinoico que tienen la siguiente fórmula:



en la que Y se selecciona de colesteriloxilo; fenilo; 4-bromofenilo; 4-metoxifenilo; 4-nitrofenilo; 4-hidroxifenilo; 4-metilfenilo; 4-cianofenilo; 4-etoxifenilo; 4-acetoxifenilo; 2-naftilo; 4-bifenilo; 2,5-dimetoxifenilo; 2,4-diclorofenilo; 2,4-dimetilfenilo; 3,4-diacetoxifenilo; 3,4,5-trimetoxifenilo; y 2,4,6-trimetilfenilo; y

25

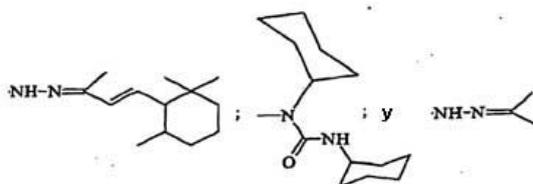
(C) amidas del ácido todo-*trans*-retinoico que tienen la siguiente fórmula:



30

en la que Z se selecciona de: n-propilamino; terc-butilamino; 1,1,3,3-tetrametilbutilamino; 1-morfolino; 4-hidroxifenilamino; 4-carbometoxi-2-hidroxifenilamino; beta-(3,4-dimetoxifenil)-etilamino; 2-benzotiazolilamino; 1-imidazolilo; 1-(2-nicotinoilhidrazolilo); 1-benzotriazolilo; 1-(1,2,4-triazolilo),

35



En otra realización, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida (todo-*trans*-N-(4-hidroxifenil)retinamida); (ii) un derivado funcional, análogo, conjugado, profármaco o precursor de fenretinida; o (iii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) o (ii).

40

En la presente invención, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida (todo-*trans*-N-(4-hidroxifenil)retinamida); o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida.

5 En otro aspecto, la presente descripción proporciona el uso de un derivado del ácido retinoico para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, o para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, en un sujeto.

10 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición que comprende (a) un derivado del ácido retinoico; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable, para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, o para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, en un sujeto.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un derivado del ácido retinoico para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, o para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, en un sujeto.

20 En una realización, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente (i) fenretinida; (ii) un derivado funcional, análogo, conjugado, profármaco o precursor de fenretinida; (iii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) o (ii); o (iv) cualquier combinación de (i) a (iii). En una realización adicional, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida; (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; o (iii) cualquier combinación de (i) y (ii).

25 En la presente invención, el derivado del ácido retinoico mencionado anteriormente es (i) fenretinida; o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida.

30 En realizaciones, el método mencionado anteriormente da como resultado o comprende además el tratamiento o la inhibición de un estado tras dicha lesión neural, en el que dicho estado se selecciona de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales (es decir, da como resultado una mejora de la supervivencia neuronal); (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).

35 En realizaciones, el uso, el derivado del ácido retinoico y/o la composición mencionados anteriormente da como resultado o es además para el tratamiento o la inhibición de un estado tras dicha lesión neural, en el que dicho estado se selecciona de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales (es decir, da como resultado una mejora de la supervivencia neuronal); (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).

40 En una realización, el tratamiento o la inhibición de la inflamación neural mencionados anteriormente está asociado con (i) una disminución de los niveles de TNF- $\alpha$ ; (ii) una disminución de los niveles de IL-1 $\beta$ ; (iii) una disminución de los niveles de iNOS; (iv) una disminución de los niveles de sPLA<sub>2</sub> GIIA, o (v) cualquier combinación de (i) a (iv).

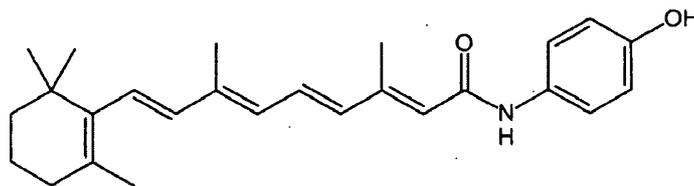
45 En realizaciones, el método, el uso, el derivado del ácido retinoico y/o la composición mencionados anteriormente da como resultado además o es además para aumentar la inervación tras dicha lesión neural. En una realización, la inervación es inervación serotoninérgica.

50 En una realización, el método mencionado anteriormente da como resultado o comprende además el tratamiento o la inhibición de un estado asociado con dicha enfermedad/dicho trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, ELA), en el que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía (por ejemplo, inflamación del SNC); y (g) cualquier combinación de (a) a (f).

55 En una realización, el uso, el derivado del ácido retinoico y/o la composición mencionados anteriormente da como resultado o comprende además el tratamiento o la inhibición de un estado asociado con dicha enfermedad/dicho trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, ELA), en el que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía; y (g) cualquier combinación de (a) a (f).

En una realización, la enfermedad/el trastorno neurodegenerativo mencionados anteriormente es ELA.

65 La fenretinida (todo-*trans*-N-(4-hidroxifenil)retinamida), que tiene el número de registro CAS 65646-68-6, es un retinoide sintético de la siguiente fórmula:



Derivados funcionales, análogos, profármacos o metabolitos de fenretinida que tienen la capacidad, tal como se describe en el presente documento, para prevenir y/o tratar una enfermedad o un estado neural también pueden usarse en la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, un "derivado de fenretinida" o "análogo de fenretinida" se refiere a un compuesto cuya estructura química comprende un resto 4-hidroxilo y una retinamida. Los ejemplos de derivados/análogos/metabolitos de fenretinida que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, 4-oxo-N-(4-hidroxifenil)retinamida (4-oxo-4-HPR), N-(4-metoxifenil)retinamida (4-MPR), 4-hidroxibencil-retinona, análogos de C-glicósido y arilamida de O-glucurónido de N-(4-hidroxifenil)retinamida, incluyendo pero sin limitarse a C-glucurónido de 4-(retinamido)fenilo, C-glicósido de 4-(retinamido)fenilo, C-xilósido de 4-(retinamido)bencilo; y análogos de  $\beta$ -glucurónido de retinoílo tales como, por ejemplo, 1-( $\beta$ -D-glucopiranosil)retinamida, 1-(D-glucopiranosiluronosil)retinamida y bexaroteno, descritos en el documento WO 07/136636, la solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0264514, las patentes estadounidenses n.ºs 5.516.792, 5.663.377, 5.599.953, 5.574.177, Anding *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67: 6270-6277 y Bhatnagar *et al.* (1991) *Biochem. Pharmacol.* 41: 1471-7.

La fenretinida y/o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma son particularmente adecuadas para el uso en los presentes métodos ya que se notifica que tiene menos efectos secundarios en comparación con retinoides que se producen de manera natural incluyendo la vitamina A (Ulukaya y Wood (1999) *Cancer Treat Rev.* 25: 229-35). El perfil de seguridad para fenretinida es excelente, ya que se han observado efectos secundarios mínimos en una variedad de ensayos clínicos que usan fenretinida de manera profiláctica (Ulukaya y Wood (1999), citado anteriormente). Ensayos clínicos han mostrado que la fenretinida no induce daño vascular generalizado en seres humanos (Reynolds y Lemons (2001) *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 15: 867-910). La fenretinida también se ha usado para tratar sujetos (de 2-21 años de edad) con neuroblastoma para definir la farmacocinética y la dosis tolerada máxima en niños, y para evaluar la toxicidad a corto y medio plazo en este intervalo de edad (Garaventa, *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9: 2032-2039).

La fenretinida se ha estudiado extensamente por sus actividades quimioprotectora y antitumoral descritas cuando se usa en una variedad de células malignas, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, neuroblastoma, sarcoma de Kaposi, cáncer de mama y glioma (Charles *et al.* (2001) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47: 444-450; Garaventa *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9: 2032-2039; Lippman *et al.* (2001) *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 605-618; Ponthan *et al.* (2003) *Oncol. Rep.* 10: 1587-1592; Puduvali *et al.* (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 2230-2235; Rao *et al.* (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* 48: 265-271), y se ha aprobado para ensayos clínicos de pacientes con cáncer y está evaluándose en ensayos clínicos de quimioprevención en cáncer de pulmón, mama y vejiga (Costa *et al.* (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 768: 148-62). A la fenretinida también se le ha concedido la designación para enfermedades huérfanas tanto en los EE.UU. como en Europa para las siguientes indicaciones (véase <http://www.cancertechnology.co.uk/>): (1) Tratamiento de enfermedad ósea maligna (UE), concedido el 26 de enero de 2007, número de designación EU/3/06/426; (2) Tratamiento de sarcoma de tejido blando (UE), concedido el 30 de enero de 2007, número de designación EU/3/06/427; (3) Tratamiento de la familia de tumores del sarcoma de Ewing (EE.UU.), concedido el 1 de febrero de 2007, número de designación 06-2361.

Una "cantidad eficaz" de un agente (por ejemplo, un derivado del ácido retinoico tal como fenretinida, o un análogo, derivado, profármaco o metabolito de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) o composición tal como se hace referencia en el presente documento es una cantidad que puede lograr un efecto profiláctico y/o terapéutico sobre una lesión neural (por ejemplo, lesión de la médula espinal) o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, ELA), de una célula y/o un tejido neural (por ejemplo, tejido del SNC, por ejemplo, médula espinal). Un efecto profiláctico y/o terapéutico incluye, pero no se limita a, una reducción en la apoptosis/destrucción (es decir, pérdida de) de células y/o tejidos neurales; un aumento de la supervivencia de células y/o tejidos neurales (por ejemplo, neuronas); una reducción o un retraso de la neurodegeneración, la recuperación de función motora; una reducción en el daño a largo plazo en células/tejidos neurales y/o en células/tejidos circundantes; una disminución de la inflamación en células/tejidos neurales (por ejemplo, inflamación asociada con LME, inflamación asociada con SLA); una reducción en el estrés oxidativo en células/tejidos neurales; una disminución en los niveles neurales de AA (por ejemplo, niveles de AA unido a fosfolípidos); un aumento en los niveles neurales de DHA (por ejemplo, niveles de DHA unido a fosfolípidos); una mejora en los reflejos de comportamiento; y un aumento de la supervivencia/el tiempo de supervivencia.

Una cantidad o dosis eficaz de un principio activo cualquiera variará algo de un compuesto a otro, de un sujeto a otro, y dependerá de factores tales como el estado del sujeto, el sitio de acción diana, el peso del paciente, la vía de administración y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica. Pueden determinarse tales dosificaciones según procedimientos farmacológicos de rutina conocidos por los expertos en la técnica, particularmente en vista de la divulgación proporcionada en el presente documento y las prácticas de dosificación

actuales de principios activos conocidos.

Por ejemplo, se ha usado fenretinida de manera sistémica logrando un nivel en plasma de aproximadamente 0,1, 2, 3, 5  $\mu\text{M}$  a 10 ó 20  $\mu\text{M}$ . Para la dosificación oral, la fenretinida se usa normalmente a de 50 ó 100 a 500 ó 1000, 2000 o 3000  $\text{mg}/\text{m}^2$  de área superficial corporal al día. En realizaciones particulares, se logran concentraciones en plasma de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ .

En una realización, el agente mencionado anteriormente se administra/se usa tan pronto como se diagnostica la lesión del SNC (por ejemplo, durante LME aguda) o el trastorno neurodegenerativo. En una realización, se continúa con el tratamiento hasta que se resuelve el proceso inflamatorio que resulta de, o está asociado con, la lesión o el trastorno. En otra realización, la administración o el uso mencionados anteriormente son administración o uso diarios. En una realización, la administración o el uso mencionados anteriormente se realizan durante un ciclo de aproximadamente 28 días. En otra realización, la administración o el uso mencionados anteriormente se realizan durante un ciclo de aproximadamente 5 días. En una realización adicional, el ciclo mencionado anteriormente se repite varias veces (por ejemplo, una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, etc.). En una realización adicional, la administración o el uso mencionados anteriormente se interrumpen entre dichos ciclos. En una realización adicional, la interrupción mencionada anteriormente es durante aproximadamente 3 días.

Un agente (por ejemplo, un derivado del ácido retinoico tal como fenretinida, o un análogo, derivado, profármaco o metabolito de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) de la presente invención para el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo puede prepararse para uso terapéutico según los métodos dados a conocer en el presente documento formulando los agentes con un portador/excipientes farmacéuticamente aceptable para obtener una composición (composición farmacéutica o medicamento). Por consiguiente, la presente descripción proporciona una composición que comprende (a) un derivado del ácido retinoico; y (b) un portador farmacéuticamente aceptable, para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, o para la preparación de un medicamento para tratar una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo, en un sujeto. En una realización, la composición mencionada anteriormente comprende:

(a) (i) fenretinida; (ii) un derivado funcional, análogo, conjugado, profármaco o precursor de fenretinida; (iii) una sal farmacéuticamente aceptable de (i) o (ii); o (iv) cualquier combinación de (i) a (iii); y

(b) un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la composición mencionada anteriormente comprende (i) fenretinida; (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida; o (iii) cualquier combinación de (i) y (ii).

En la presente invención, la composición mencionada anteriormente comprende (i) fenretinida; o (ii) una sal farmacéuticamente aceptable de fenretinida.

En la fabricación de una formulación farmacéutica, el principio activo, incluyendo una sal fisiológicamente aceptable del mismo, se mezcla normalmente con, entre otros, un portador/excipientes aceptable. El portador es aceptable en el sentido de ser compatible con cualquiera de los demás componentes en la formulación y no ser perjudicial para el sujeto. El portador puede ser un sólido o un líquido, o ambos, y se formula preferiblemente con el compuesto como una formulación de dosis unitaria, por ejemplo, un comprimido, que puede contener desde el 0,5% hasta el 95% en peso del principio activo. Pueden incorporarse uno o más principios activos en las formulaciones de la invención, que pueden prepararse mediante cualquiera de las técnicas de la farmacia bien conocidas que consiste esencialmente en mezclar los componentes, incluyendo opcionalmente uno o más componentes auxiliares. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins: Filadelfia, PA, 2000.

Las formulaciones de la invención incluyen aquéllas adecuadas para la administración oral, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), tópica (es decir, superficies mucosas y superficies de las vías respiratorias) y neural, aunque la vía más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad del estado que esté tratándose y de la naturaleza del principio activo particular que está usándose.

Se describen formulaciones que comprenden fenretinida, por ejemplo, en los documentos WO 02/05869, WO 07/115134, WO 04/069203, la publicación de patente estadounidense n.º 2005/0106216, la patente estadounidense n.º 4.874.795 y la patente estadounidense n.º 5.972.911.

En una realización, un agente de la invención (por ejemplo, un derivado del ácido retinoico tal como fenretinida, o un derivado, análogo, profármaco o metabolito de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) se administra de manera que entra en contacto con células neurales o tejidos neurales, tales como células o tejidos del sistema nervioso central (SNC). Tales tejidos incluyen tejidos cerebrales y de médula espinal (por ejemplo, cervical,

torácica o lumbar). Como tal, en realizaciones, un compuesto de la invención puede administrarse para tratar células/tejidos neurales *in vivo* mediante inyección intracraneal directa o inyección en el líquido cefalorraquídeo. Alternativamente, el compuesto puede administrarse de manera sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) y puede entrar en contacto con el tejido neural afectado mediante lesiones (cuando está comprometida la barrera hematoencefálica), o, en una realización adicional, puede estar en una forma que puede atravesar la barrera hematoencefálica y entrar en el sistema neural (por ejemplo, SNC). Además, en una realización, una composición de la invención puede formularse para tal administración a tejido neural.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse en unidades diferenciadas, tales como cápsulas, sellos, pastillas para chupar o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo; como polvo o gránulos; como disolución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como emulsión de aceite en agua o de agua en aceite. Tales formulaciones pueden prepararse mediante cualquier método de la farmacia adecuado que incluye la etapa de poner en asociación el compuesto activo y un portador adecuado (que puede contener uno o más componentes auxiliares tal como se indicó anteriormente). En general, las formulaciones de la invención se preparan mezclando uniformemente y de manera íntima el compuesto activo con un portador líquido o sólido finamente dividido, o ambos, y entonces, si es necesario, conformando la mezcla resultante. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse sometiendo a compresión o moldeo un polvo o gránulo que contiene el principio activo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos obtenidos por compresión pueden prepararse sometiendo a compresión, en una máquina adecuada, el compuesto en una forma fluida, tal como un polvo o gránulos mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte y/o agente(s) tensioactivo(s)/dispersante(s). Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo, en una máquina adecuada, el compuesto pulverulento humedecido con un aglutinante líquido inerte.

Las formulaciones adecuadas para la administración bucal (sublingual) incluyen píldoras para chupar que tienen el principio activo en una base aromatizada, habitualmente sacarosa y acacia o goma tragacanto; y pastillas que contienen el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia.

Las formulaciones para la administración parenteral son preparaciones acuosas estériles de manera conveniente del principio activo, preparaciones que son preferiblemente isotónicas con la sangre del receptor pretendido. Estas preparaciones pueden administrarse por medio de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intradérmica. Tales preparaciones pueden prepararse de manera conveniente mezclando el compuesto con agua o un tampón de glicina y haciendo que la disolución resultante sea estéril e isotónica con la sangre. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden mezclarse, por ejemplo, con vitamina E y/u otros complementos alimenticios y antioxidantes alimenticios adecuados [tal como Peptamen® (Nestlé)].

Las formulaciones adecuadas para la aplicación tópica (por ejemplo, en el tracto bucal, nasofaringe o bucofaringe) adoptan la forma de una pomada, crema, loción, pasta, gel, pulverización, aerosol o aceite. Los portadores que pueden usarse incluyen vaselina, lanolina, polietilenglicoles, alcoholes, potenciadores transdérmicos, y combinaciones de dos o más de los mismos.

En una realización, el tratamiento mencionado anteriormente comprende el uso/la administración de más de un (es decir, una combinación de) principio activo/agente terapéutico (por ejemplo, un derivado del ácido retinoico tal como fenretinida, o un derivado, análogo, profármaco o metabolito de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma). La combinación de agentes profilácticos/terapéuticos y/o composiciones de la presente invención pueden administrarse o coadministrarse (por ejemplo, de manera consecutiva, simultánea, en diferentes momentos) en cualquier forma de dosificación convencional. La coadministración en el contexto de la presente invención se refiere a la administración de más de un agente terapéutico en el transcurso de un tratamiento coordinado para lograr un desenlace clínico mejorado. Tal coadministración también puede ser coextensiva, es decir, que se produce durante periodos de tiempo solapantes. Por ejemplo, puede administrarse un primer agente a un paciente antes de, de manera concomitante a, antes y después de, o después de que se administre un segundo principio activo. Los agentes pueden, en una realización, combinarse/formularse en una única composición y por tanto administrarse al mismo tiempo.

También se contempla que los compuestos activos/las composiciones/formulaciones de la presente invención (o combinaciones de los mismos) pueden usarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos usados actualmente para prevenir y/o tratar enfermedades y/o estados neurales (por ejemplo, lesión de la médula espinal o enfermedades/trastornos neurodegenerativos) o sus efectos asociados (por ejemplo, dolor). Por ejemplo, los compuestos/las composiciones/formulaciones de la presente invención pueden usarse en combinación con (es decir, administrarse antes de, después de o de manera simultánea a) metilpredisolona, calmantes o analgésicos, o factores neurotróficos.

La invención proporciona además kits o envases (por ejemplo, envases comerciales) que comprenden la(s) composición/composiciones o agente(s) mencionado(s) anteriormente junto con instrucciones para su uso para el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo en un sujeto. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente descripción proporciona un kit o envase que comprende:

(i) un derivado del ácido retinoico, tal como fenretinida, y/o análogos, derivados, profármacos, precursores de la misma, y/o sales de la misma, o la composición mencionada anteriormente; y

5 (ii) instrucciones para su uso para el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo en un sujeto.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un kit o envase que comprende: (i) fenretinida o sales de la misma, o la composición mencionada anteriormente; y

10 (i) fenretinida o sales de la misma, o la composición mencionada anteriormente; y

(ii) instrucciones para su uso para el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad/un trastorno neurodegenerativo en un sujeto.

15 Tal kit también puede comprender, por ejemplo, recipientes, dispositivos para administrar el agente/la composición, etc.

20 En una realización, la lesión neural mencionada anteriormente es una lesión del SNC. En una realización adicional, la lesión del SNC mencionada anteriormente es una lesión de la médula espinal (LME). En una realización adicional, la LME mencionada anteriormente es LME aguda. En otra realización, la enfermedad/el trastorno neurodegenerativo mencionados anteriormente es ELA. En una realización adicional, la ELA mencionada anteriormente es ELA familiar.

25 La lesión neural y las enfermedades/trastornos neurodegenerativos se refieren en general a enfermedades o estados que dan como resultado, o están asociados con, daño en células/tejidos neurales. Tales daños pueden ser el resultado, por ejemplo, de un traumatismo físico del tejido neural y/o de inflamación/estrés oxidativo dentro de un tejido neural. La referencia a lesión de la médula espinal (LME) en el presente documento incluye cualquier forma de traumatismo físico, químico o genético de la médula espinal. Un traumatismo físico incluye un ataque al tejido tal como una abrasión, incisión, contusión, punción, compresión, etc., tal como pueden surgir del contacto traumático de un objeto extraño con cualquier lugar de o accesorio/adyacente a la cabeza, el cuello o la columna vertebral. Otras formas de lesión traumática pueden surgir de la constricción o compresión de tejido del SNC por una acumulación inapropiada de líquido (por ejemplo, un bloqueo o una disfunción de la producción, el recambio o la regulación del volumen normales de líquido cefalorraquídeo o humor vítreo, o un hematoma o edema subdural o intracraneal). De manera similar, puede surgir una constricción o compresión traumática por la presencia de una masa de tejido anómalo, tal como un tumor metastásico o primario o por enfermedad (poliomielitis, espina bífida, ataxia de Friedreich, etc.). En una realización, el método, el uso, la composición y/o el envase de la presente invención son útiles para la prevención y/o el tratamiento de una lesión secundaria que resulta de un ataque/una lesión inicial del SNC (por ejemplo, la médula espinal).

40 Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" o "paciente" se usan de manera intercambiable para significar cualquier animal, preferiblemente un mamífero, incluyendo seres humanos, primates no humanos así como animales domésticos y de granja, y animales de zoológicos, que participan en competiciones deportivas o mascotas tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano.

45 Aunque se dan a conocer diversas realizaciones de la invención en el presente documento, pueden realizarse muchas adaptaciones y modificaciones dentro del alcance de la invención según el conocimiento general común de los expertos en esta técnica. Tales modificaciones incluyen la sustitución de equivalentes conocidos para cualquier aspecto de la invención para lograr el mismo resultado sustancialmente de la misma manera. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En las reivindicaciones, el término "que comprende" se usa como un término abierto, sustancialmente equivalente a la expresión "que incluye, pero no se limita a". Los artículos "un/o", "una" y "el/la" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Los siguientes ejemplos son ilustrativos de diversos aspectos de la invención y no limitan los amplios aspectos de la invención tal como se da a conocer en el presente documento.

### 55 Ejemplos

La presente invención se ilustra en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

#### Ejemplo 1: Materiales y métodos

60 *Contusión de la médula espinal y administración de fármacos.* Todos los procedimientos quirúrgicos se aprobaron por el Comité de Cuidado de los Animales de la Universidad de McGill y se siguieron las directrices del Consejo Canadiense de Cuidado de los Animales. Se anestesiaron ratones BALB/c hembra (de 8-10 semanas de edad) adultos (Charles River Canadá) con ketamina:xilazina:acepromazina (50:5:1 mg/kg). Después de realizar una laminectomía en la 11<sup>a</sup> vértebra torácica, se contusionó la médula espinal expuesta usando el dispositivo Infinite™  
65 Horizons Impactor (Precision Scientific Instrumentation, Lexington, KY). Se produjeron lesiones moderadas usando una fuerza de 50 kdynas y desplazamientos de tejido que oscilaron entre 400-600 μm (Ghasemlou *et al.* (2005) Exp.

Neurol. 196: 9-17).

*Preparación y tratamiento con fenretinida.* Se resuspendió polvo de fenretinida en etanol al 95% en condiciones estériles para generar una disolución madre 2 µg/µl. Se incorporó esta disolución en una dieta líquida diaria de Peptamen™ (Nestle Canadá, Brampton, ON) a una dosis de 5 mg/kg/día para el consumo oral tal como se describió previamente (Guilbault *et al.* (2008) *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 47-56). Se protegió la suspensión de la luz y se mantuvo a 4°C antes del tratamiento de los ratones. Una hora tras la cirugía y durante los tres días posteriores, se administró la fenretinida mediante alimentación por sonda en dos dosis, cada una suspendida en 300 µl de Peptamen™. Se eligió la alimentación por sonda como método de administración de fármacos inmediatamente después de la cirugía debido a la pérdida de apetito e ingesta reducida de alimentos durante las primeras 48 h después de la lesión. Después del día tres, se alimentaron los ratones con la mezcla de fenretinida/Peptamen™. En este punto, se separaron los ratones en jaulas individuales para determinar la cantidad de alimentos y fármaco consumida. Tras el día 3, se administró la dieta cada mañana con una monitorización cuidadosa de la cantidad consumida por cada ratón. Más específicamente, se incorporó la dosis diaria de fenretinida en 12 ml de Peptamen™, que representa el 80% del consumo de alimentos diario del ratón, para garantizar un consumo del 100%. Se proporcionaron los alimentos a los ratones a media mañana. Se preparó la dieta para los animales control y se administró del mismo modo que el tratamiento con fármaco; sin embargo, los animales control recibieron Peptamen™ sin fenretinida añadida pero con una cantidad equivalente de etanol.

*Análisis de lípidos. (A) Para estudios de LME:* para establecer la cinética plasmática, se extrajeron muestras de sangre de la vena safena en el día 0, 1, 3, 7, 11 y 21 después de la lesión. En el día 28, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. Se mezclaron todas las muestras de sangre con 10 µl de EDTA para impedir la coagulación y se centrifugaron a 350 x g durante 7 minutos a 4°C. Entonces se retiró el plasma y se extrajeron los lípidos con cloroformo-metanol (2:1, vol./vol.) que contenía hidroxianisol butilado (BHA) 1 mM, tal como se describió previamente (Folch *et al.* (1957) *J Biol Chem* 226: 497-509). Se secaron las fracciones lipídicas bajo nitrógeno y se resuspendieron en heptano tal como se describió previamente (De Sanctis (1991) *Med Sci Res* 19: 335-337). Se identificaron los fosfolípidos mediante extracción por cromatografía en capa fina. Se usó diazometano para esterificar los ácidos grasos liberados y se identificaron los ésteres mediante CG/EM (Hewlett Packard 5880A, WCOT) columna capilar (Supelco™ -10, 35 m x 0,5 mm, 1 µm de grosor) usando patrones comerciales (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canadá). Se evaluaron los niveles totales de DHA y AA así como de DHA unido a fosfolípidos, AA unido a fosfolípidos, malonildialdehído (MDA) y nitrotirosina en muestras tanto de plasma como de médula espinal. *(B) Para estudios de ELA:* Se analizaron todas las muestras de plasma, médula espinal, corteza cerebral y tronco encefálico para determinar la concentración lipídica de cada una. Se evaluaron los niveles de ceramidas, ácido docosahexaenoico (DHA) unido a fosfolípidos, ácido araquidónico (AA) unido a fosfolípidos, malonildialdehído (MDA) y nitrotirosina en todas las muestras. Para determinar la concentración lipídica de muestras de tejido y plasma, se realizó el análisis usando un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se secaron las fracciones lipídicas extraídas bajo nitrógeno y se resuspendieron en heptano. Se realizó la separación de los fosfolípidos mediante cromatografía en capa fina (CCF), detectado mediante yodo. Entonces se sometieron las fracciones lipídicas separadas a ELISA para establecer las concentraciones de cada especie lipídica. Se usaron los fosfolípidos procedentes de la sílice seca, una vez resuspendidos en etanol, para recubrir placas Nunc™ específicas para la unión de lípidos. Entonces se lavaron las placas y se incubaron con tampón de bloqueo durante 1 h a 37°C (PBS, Tween™ 20 al 0,1% y albúmina sérica bovina al 1%). Tras la etapa de bloqueo, se incubaron las placas con IgM murina (Sigma-Aldrich), anticuerpo (Ac) específico para la especie lipídica particular, deseada durante 1 h a 37°C. Tras otro lavado, se incubaron las placas con Ac de IgM anti-ratón conjugado con peroxidasa durante 1 h a 37°C. La etapa final implicó incubar las placas con sustrato de peroxidasa (TMB; Roche, Laval, QC). Se determinó la intensidad de la reacción colorimétrica mediante espectrofotometría a 405 nm y se calculó el nivel de cada especie lipídica usando una curva patrón como referencia. Se identificaron los datos aberrantes como datos que se encontraban fuera de ± 2 desviaciones estándar de la media del grupo cuando se eliminó el punto en cuestión.

*RT-PCR.* Se recogió una longitud de 5 mm de la médula espinal que contenía el sitio de lesión en 1 dpi de los grupos experimentales y control. Se reunieron las tres médulas espinales y se extrajo el ARN usando el kit para tejido lipídico RNeasy™ (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Se realizó la amplificación mediante PCR con cebadores específicos para IL-1β, TNF-α, MCP-1, COX-1, COX-2, iNOS, cPLA<sub>2</sub> GIVA, iPLA<sub>2</sub> GVIA y sPLA<sub>2</sub> GIIA de ratón (tabla I). Se usó peptidilprolil isomerasa A (PPIA) como control para normalizar las muestras de ADNc usadas para la amplificación mediante PCR. Se cuantificaron los cambios en la expresión de ARNm entre las muestras tratadas con vehículo y fenretinida como una razón del valor de densidad óptica de PPIA usando el software ImageQuant™ 5.0.

Tabla I: Cebadores usados para la amplificación mediante PCR

Gen	Secuencia de cebador (5' - 3')	SEQ ID NO:
COX-1	Directo: CCCAGCCCTCCGACCTACAA	1
	Inverso: CCCCGGAAGCAACCCAAACAC	2

<b>COX-2</b>	Directo: CAGCACTTCACCCATCAGTT	3
	Inverso: CTGGTCATTGGAGGCCTTTG	4
<b>cPLA<sub>2</sub> GIVA</b>	Directo: ATGCCGCCCGGTGTCCTT	5
	Inverso: TGGGTCCTTGAGCCTCATCATCA	6
<b>iPLA<sub>2</sub> GVIA</b>	Directo: GGTGCGCGTCTGCTCTGTA	7
	Inverso: AGTGGCGTGTTCCCGTGCTCTCC	8
<b>sPLA<sub>2</sub> GIIA</b>	Directo: AGGCGCCTGGAGAAAAGTGGATGT	9
	Inverso: GTGGGGCTGGGAGAGGTGTGA	10
<b>iNOS</b>	Directo: CCTGTGTTCCACCAGGAGAT	11
	Inverso: AAGGCCAAACACAGCATACC	12
<b>MCP1</b>	Directo: ATGAAGGTCTCCACCACTG	13
	Inverso: GCATTCAGTTCCAGGTCA	14
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Directo: AAGTTTGTCATGAATGATTCCCTC	15
	Inverso: GTCTCACTACCTGTGATGAGT	16
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Directo: ATGAGCACAGAAAGCATG	17
	Inverso: GAAGACTCCTCCCAGGTA	18
<b>PPIA</b>	Directo: CCTTGGGCCGCGTCTCCTTC	19
	Inverso: ATGGGGTAGGGACGCTCTCCTGAG	20

- 5 *Evaluación funcional.* Se evaluó la recuperación locomotora en una prueba en campo abierto usando la escala de Basso para ratones (BMS) (Basso *et al.* (2006) J Neurotrauma 23: 635-659), que se desarrolló específicamente para pruebas locomotoras después de lesiones por contusión en ratones. Se llevó a cabo el análisis de BMS de coordinación y movimientos de las extremidades posteriores por dos evaluadores entrenados independientes, y se tomó la puntuación de consenso. Se presenta la puntuación final como la media  $\pm$  EEM. La BMS es una escala comprimida con una puntuación máxima de 9 en comparación con la escala BBB de 20 puntos para ratas. Por tanto, pequeñas diferencias en la BMS pueden representar grandes diferencias funcionales.
- 10 *Análisis histológico. (A) Para estudios de lesión de la médula espinal:* 28 días después de lesión, se perfundieron los ratones con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1 M. Se retiró una longitud de 5 mm de la médula espinal que contenía el sitio de lesión, se sometió a crioprotección con sacarosa al 30% en PB 0,1 M y se cortó en secciones en serie (16  $\mu$ m de grosor). Se sometieron a inmunotinción las secciones de tejido en serie usando anticuerpos policlonales de rata contra proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (1/400; Zymed Labs) y anticuerpos policlonales de conejo contra 5-hidroxitriptamina (5-HT) (1/5000; Sigma, Aldrich). Además, se tiñó una serie de secciones en serie de médula espinal con violeta de cresilo para cuantificar la pérdida neuronal. Se visualizaron secciones de tejido con un microscopio Axioskop™ 2 Plus (Zeiss) y se capturaron las imágenes usando una cámara Retiga™ 1300 de QImaging, y se realizó la cuantificación usando el sistema de análisis de imágenes BioQuant™ Nova Prime (BioQuant Image Analysis Corp.). Se calculó la conservación de tejido delineando las áreas teñidas con GFAP, y se evaluó la supervivencia neuronal contando los perfiles de neuronas en el asta anterior por debajo del nivel del conducto central de la médula espinal en secciones de tejido teñidas con violeta de cresilo. Se realizó la evaluación de la inervación de fibras serotoninérgicas calculando el área ocupada por axones serotoninérgicos en las astas anteriores de secciones de médula espinal tomadas a una distancia de 1000  $\mu$ m de manera caudal con respecto al sitio de lesión.
- 15
- 20
- 25 *(B) Para estudios de ELA:* se anestesiaron profundamente los ratones con un cóctel de ketamina (7,5 mg/ml) y xilazina (0,5 mg/ml) administrado mediante inyección intraperitoneal a una dosis de 20 ml/kg de peso corporal. Entonces se sacrificaron los animales mediante perfusión transcardiaca con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,1 M. Se retiró cuidadosamente el cuarto segmento lumbar de la médula espinal, identificado por su contribución al nervio ciático, se fijó posteriormente durante 1 hora en disolución de paraformaldehído al 4% y se sometió a crioprotección durante la noche en sacarosa al 30% en PBS 0,1 M. Se cortaron secciones en serie de 10  $\mu$ m en un criostato Leica™ (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y se sometieron a inmunotinción con anticuerpos policlonales de rata contra GFAP (1:400; Zymed Labs) o anticuerpos policlonales de rata contra Mac-2 (1:4) para detectar la presencia y activación de la glía. Se capturaron imágenes
- 30

digitales de ambas astas anteriores cada 300  $\mu\text{m}$ . Se importaron las imágenes al software de medición SigmaScan™ Pro Image versión 5.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y se cuantificaron las microglías y astrocitos activados superando un umbral de intensidad. Entonces se normalizaron los valores para el área total examinada. Se tiñeron secciones en serie de un conjunto independiente para la detección de cuerpos de Nissle usando tinción de violeta de cresilo y se cuantificó el número de neuronas motoras que sobrevivieron en el asta anterior. Se identificaron los datos aberrantes como datos que se encontraban fuera de  $\pm 2$  desviaciones estándar de la media del grupo cuando se eliminó el punto en cuestión.

*Activación de microglía in vitro.* Se prepararon cultivos de microglía de ratón tal como se describió previamente (Saura J *et al.*, 2003. *Glia* 44: 183-189). Brevemente, se trataron cultivos de glía mixtos confluentes preparados a partir de la corteza cerebral neonatal durante 30 min con tripsina (al 0,08%) en presencia de EDTA 0,25 mM y  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM. Este tratamiento da como resultado el desprendimiento de una capa intacta de células que contienen prácticamente todos los astrocitos y deja una población de células firmemente unidas identificadas como >98% de microglía tal como se evalúa mediante recuentos de células inmunorreactivas CD11b (Saura J *et al.*, (2003) *Glia* 44: 183-189). Se estimularon estas células de la microglía mediante la adición de lipopolisacáridos (LPS) (10 ng/ml) en DMEM/F12 con penicilina/estreptomicina al 1% y vitaminas al 1% durante 6 h. La determinación de la concentración de LPS y el tiempo de incubación se basó en experimentos anteriores usados para optimizar las condiciones para medir la liberación de  $\text{TNF}\alpha$  desde la microglía activada. Se inició el tratamiento con fenretinida (0,625 ó 1,25  $\mu\text{M}$  en DMEM/F12) 18 horas antes de la estimulación con LPS, y se continuó junto con estimulación con LPS. El protocolo para el tratamiento con fenretinida se basó en estudios previos sobre toxicidad y reducción de los niveles de  $\text{TNF}\alpha$  en macrófagos. Se determinó mediante ELISA la cantidad de  $\text{TNF}\alpha$  liberado en 50  $\mu\text{l}$  del medio condicionado.

*Ratones transgénicos.* Se utilizaron ratones transgénicos  $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$  [B6SJL-Tg(SOD1\*G93A)1Gur/J], disponibles en Jackson Laboratories (n.º de artículo 002726). Estos animales se derivaron de una colonia mantenida en un contexto de C57BL/6. Se alojaron todos los animales y se reprodujeron en la Instalación para Animales del Instituto de Investigación del Centro de Salud de la Universidad de McGill. Se mantuvieron los ratones en jaulas con lechos de virutas de madera estériles y se mantuvieron en rejillas ventiladas. Todo el alojamiento, la reproducción y la experimentación con animales se realizaron en condiciones libres de patógenos específicos en una instalación con barreras. Se obtuvo el genotipo de las crías entre los 21 y 28 días de edad usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real según los protocolos de Jackson Laboratory. Se separaron los animales transgénicos  $\text{SOD1}$  mutantes seleccionados para experimentación (1 animal/jaula) en la duración de todos los estudios. Se suministró a los ratones dieta para ratones irradiada modificada para NIH-31 (Harlan Teklad, Indianápolis, IN) a voluntad en todo momento. Comenzando en el día 30, también se les dio a los ratones usados para experimentación 12,5 ml de dieta líquida (dieta líquida Peptamen™; Nestle Canadá, Brampton, ON, Canadá) 5 días a la semana que contenía o bien 5 mg/kg de fenretinida o bien un volumen equivalente de vehículo (etanol al 95%). Después de asignar aleatoriamente los ratones o bien al grupo de fenretinida o bien al control (vehículo), entonces se asignó cada ratón aleatoriamente a uno de tres grupos experimentales para analizar el comportamiento, la concentración de lípidos en plasma o la histología. Todos los procedimientos realizados siguieron las directrices del Consejo Canadiense de Cuidado de Animales.

*Recogida de tejido para análisis de ácidos grasos.* Se sacrificaron los ratones mediante la inhalación de  $\text{CO}_2$  seguido por desangramiento mediante punción cardíaca. Se procesó la sangre recogida tal como se describe en la siguiente sección. Se sometieron a transección los segmentos de la región lumbar de la médula espinal, identificados usando las costillas y vértebras como guía, y se retiró todo el tejido de la médula espinal y se homogeneizó antes de almacenarlo en hidroxianisól butilado (BHA) 1 mM en cloroformo/metanol (2:1 vol.) a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que se realizó el análisis para mantener la integridad de las muestras. Se recogieron muestras de corteza cerebral y tronco encefálico, se homogeneizaron y se almacenaron por separado en la misma disolución de BHA. Se trataron las muestras de sangre recogidas según el mismo protocolo que las muestras extraídas en diferentes puntos de tiempo.

*Recogida de sangre.* Se recogieron muestras de sangre en el día 60, 90 y 120 además del momento en el criterio de valoración clínico mencionado anteriormente. Se colocaron los ratones bajo una lámpara de calentamiento durante 5 minutos antes de la toma de muestras. Entonces se colocaron los ratones en un dispositivo de sujeción y se inmovilizó y rasuró una extremidad posterior. Se perforó la vena safena con una aguja 25G y se recogieron 100  $\mu\text{l}$  de sangre y se mezclaron con 10  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,5 M para impedir la coagulación. Entonces se centrifugaron las muestras a 350 x g durante 7 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y se retiraron 40  $\mu\text{l}$  de plasma y se almacenaron en 400  $\mu\text{l}$  de la disolución de BHA descrita anteriormente. Se almacenaron todas las muestras a  $-80^\circ\text{C}$  hasta que se realizó el análisis.

*Análisis de la función motora.* Se analizó la función motora mediante varilla rotatoria (Med Associates Inc., St. Albans, VT) dos veces a la semana comenzando a los 70 días de edad. Se implementó un periodo de aclimatación de 3 días antes de comenzar las mediciones para permitir que los animales se familiarizaran con el aparato. Se colocaron los animales sobre la varilla con una rotación constante de 16 rpm y se usó el tiempo hasta que disminuyó la latencia como medición de la función motora. Se les proporcionó a los animales que permanecieron sobre el aparato después de 300 segundos una puntuación perfecta y se finalizó el ensayo. Se realizaron tres ensayos consecutivos con un periodo de descanso de un minuto entre cada ensayo y se registró el mejor resultado de los

tres ensayos. Los ratones usados para análisis de plasma también se incluyeron en los experimentos con varilla rotatoria ya que se determinó después de evaluar su rendimiento que no estaba alterado. En el caso poco frecuente de que mejorase el rendimiento de un animal, se omitió el punto de tiempo “antes de la mejora” menor ya que no se consideró representativo de su verdadera capacidad dada la naturaleza progresiva de la parálisis en ratones SOD1<sup>G93A</sup>.

*Supervivencia.* Los ratones SOD1<sup>G93A</sup> normalmente desarrollan los primeros signos de alteración motora aproximadamente a los 90 días de edad. Las fases iniciales se presentan con temblor en reposo y una ligera alteración de la marcha que progresa hasta una parálisis completa de las extremidades posteriores en la fase terminal. Se determinó que el criterio de valoración clínico se producía cuando un ratón no podía enderezarse por sí mismo en menos de 30 segundos después de girarse sobre un lado o cuando se había producido una pérdida de peso mayor del 20%.

*Análisis del genotipo de ratón mediante RT-QPCR en tiempo real.* Se realizó amplificación de ADN obtenido de tejido de la cola en el detector de secuencias Stratagene™ MX-4000 (Stratagene, La Jolla, CA). Se realizó PCR usando el kit para RT-PCR SYBR Green Quantitative™ (Sigma, St. Louis, MO). El programa de amplificación para ADN de SOD1<sup>G93A</sup> consistió en una etapa de activación enzimática durante 3 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de una etapa de desnaturalización durante 30 s a 95°C, una etapa de hibridación durante 30 s a 60°C y una etapa de extensión durante 45 s a 72°C. Se realizó el análisis de la curva de fusión después de la amplificación para determinar la especificidad de los productos de PCR (que también se confirmó con electroforesis en gel). Se usaron dos conjuntos de cebadores, en matraces de reacción independientes, para amplificar tanto los genes WT como transgénicos SOD1: Tg directo: 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA-3' (SEQ ID NO: 21), Tg inverso: 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA-3' (SEQ ID NO: 22), WT directo: 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3' (SEQ ID NO: 23) y WT inverso: 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3' (SEQ ID NO: 24). Se diluyeron ambos conjuntos de cebadores hasta una concentración final de 250 nM y se sometieron a prueba para optimizar las condiciones.

*Análisis estadísticos. (A) Para estudios de LME:* se presentan los datos como la media  $\pm$  error estándar de medición (EEM). Se realizaron análisis estadísticos usando una prueba de la t o ANOVA de dos factores de medidas repetidas con la prueba de Tukey *post-hoc* para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$ . *(B) Para estudios de ELA:* se analizaron los datos y se calcularon los datos estadísticos con el software GraphPad Prism™ versión 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se realizó el análisis de rendimiento en varilla rotatoria mediante análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con pruebas posteriores de Bonferroni en cada punto de tiempo. Se analizó la supervivencia mediante la prueba de rangos logarítmicos de representaciones gráficas de supervivencia acumulada de Kaplan-Meier y una prueba de la t no paramétrica para datos independientes del tiempo de supervivencia medio. También se analizaron comparaciones de concentraciones de lípidos a lo largo de la duración del estudio mediante ANOVA de dos factores con pruebas posteriores de Bonferroni mientras que se realizaron comparaciones en el día 120 con pruebas de la t no paramétricas para datos independientes. También se realizaron comparaciones de neuronas motoras, microglía y astrocitos con el análisis de la prueba de la t no paramétrica. Se fijó la significación para todos los análisis en un valor de  $p$  de dos colas  $\leq 0,05$ . Se presentaron los datos como la media  $\pm$  EEM.

#### Ejemplo 2: La fenretinida modula los niveles de AA y DHA después de LME.

Los niveles en plasma de ácido araquidónico (AA), un ácido graso proinflamatorio, aumentaron rápidamente tan pronto como 1 día después de LME desde 35 nmoles/mg de proteína hasta 45 nmoles/mg de proteína ( $p < 0,05$ ). Los niveles permanecieron en una meseta en el nivel elevado hasta el día 28 ( $p < 0,001$ ; figura 1A). En cambio, los niveles en plasma de ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso antiinflamatorio y protector, aumentan de manera transitoria en el día 1 después de LME y entonces disminuyen bruscamente en el día 4 después de la lesión y luego se mantienen en este bajo nivel en la duración de 28 días del estudio ( $p < 0,01$ , véase la figura 1B). El tratamiento con fenretinida dio como resultado una diferencia estadísticamente significativa en los niveles en plasma de AA comenzando en el día 1 después de la lesión y que continuó disminuyendo incluso más en la totalidad de la duración del estudio. Sorprendentemente, esto estuvo acompañado por un aumento concomitante en los niveles de DHA en el plasma hasta por encima de los niveles de control no tratado previamente para cualquier duración del estudio.

Entonces se evaluó si la fenretinida también podría modular los niveles de AA y DHA en la médula espinal lesionada en 3 dpi, el primer punto de tiempo en el que los niveles de AA y DHA estuvieron modulados significativamente en plasma. Se detectó una disminución similar en AA ( $p < 0,05$ ) y un aumento en DHA ( $p < 0,001$ ; figuras 1C, D) en tejido lesionado de la médula espinal.

#### Ejemplo 3: La fenretinida potencia la recuperación funcional después de LME.

Se evaluó el efecto de fenretinida sobre la potenciación de la recuperación funcional y la protección de tejidos después de LME. Los resultados presentados en la figura 2A muestran que la administración diaria de fenretinida que se inició 1 hora después de LME mejoró la función locomotora evaluada usando la escala de Basso para

ratones (BMS) de 9 puntos en comparación con los ratones tratados con vehículo (figura 2A; \* $p < 0,05$ ; RM-ANOVA de dos factores, prueba de Tukey *post-hoc*). El análisis *post-hoc* reveló diferencias significativas en la puntuación de BMS comenzando en el día 7 dpi y permaneciendo potenciada significativamente en la duración del seguimiento. En 28 dpi, los ratones tratados con vehículo pudieron dar pasos esporádica o frecuentemente pero sin coordinación (puntuación de 4,6). En cambio, los ratones tratados con fenretinida presentaron pasos plantares con coordinación esporádica y una posición de las patas más paralela (puntuación de 5,8). Además, las habilidades locomotoras finas evaluadas mediante las subpuntuaciones de BMS también mostraron una mejora significativa en ratones tratados con fenretinida del día 7 al 28 después de LME. En 28 dpi, los ratones a los que se les administró fenretinida tuvieron una subpuntuación media 2,2 puntos mayor que los ratones tratados con vehículo (figura 2B).

Ejemplo 4: La fenretinida reduce/previene el daño tisular después de LME.

Se evaluó a continuación si estaban asociadas mejoras en la función motora mediadas por fenretinida con una reducción en el daño de tejido de la médula espinal. Secciones histológicas de médula espinal teñidas para GFAP mostraron que el tratamiento con fenretinida reducía la pérdida de tejido en aproximadamente el 20% (figura 3A, \*\*  $p < 0,001$ , prueba de la t). La prevención de la pérdida de tejido lograda después del tratamiento con fenretinida era evidente en el epicentro de la lesión y en áreas adyacentes, para una distancia de 1000  $\mu\text{m}$  (figura 3B; \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ , RM-ANOVA de dos factores, prueba de Tukey *post-hoc*).

También se evaluó el efecto de fenretinida sobre la pérdida neuronal en las astas anteriores después de LME. Secciones de médula espinal teñidas con violeta de cresilo presentaron números significativamente mayores de neuronas en ratones tratados con fenretinida en comparación con ratones tratados con vehículo, extendiéndose desde 500  $\mu\text{m}$  a cada lado del epicentro de la lesión en comparación con ratones control lesionados tratados con vehículo (figura 3C; \* $p < 0,05$ , RM-ANOVA de dos factores, prueba de Tukey *post-hoc*).

Puesto que los axones serotoninérgicos desempeñan un papel importante en la locomoción en roedores (Ribotta *et al.* (2000) J Neurosci 20: 5144-5152), se sometió a prueba el efecto del tratamiento con fenretinida sobre la innervación de fibras serotoninérgicas de manera caudal con respecto al sitio de la lesión. Secciones de médula espinal teñidas para serotonina mostraron que el tratamiento con fenretinida dio como resultado una innervación serotoninérgica ~60% mayor en el asta anterior a 1 mm de manera caudal con respecto al epicentro de la lesión (figura 3B, \* $p < 0,01$ , prueba de la t).

Ejemplo 5: La fenretinida reduce la expresión de mediadores proinflamatorios y atenúa el estrés oxidativo después de LME.

Para someter a prueba si la fenretidina modula la respuesta inflamatoria, se midieron los niveles de ARNm de varios mediadores proinflamatorios mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que en 1 dpi, los niveles de ARNm para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dos potentes citocinas proinflamatorias, se redujeron en aproximadamente el 30% y el 40%, respectivamente, después del tratamiento con fenretinida (figura 4A). Además, se observó una disminución de 2 veces en los niveles de ARNm de iNOS, una enzima relacionada con inflamación y estrés oxidativo, tras el tratamiento con fenretinida. También, se redujeron los niveles de ARNm de sPLA<sub>2</sub> GIIA, pero no los niveles de ARNm de cPLA<sub>2</sub> GIVA e iPLA<sub>2</sub> GVIA, en aproximadamente el 50% después del tratamiento con fenretinida (figura 4A). No se observaron cambios en los niveles de ARNm de COX-1, COX-2 y MCP-1 (figura 4A).

Se evaluó el efecto del tratamiento con fenretinida sobre el estrés oxidativo después de LME midiendo los niveles de malonildialdehído (MDA), un producto de peroxidación lipídica, y nitrotirosina, un indicador de daño inducido por óxido nítrico (NO). Los resultados de ELISA de muestras recogidas en 3 dpi, un punto de tiempo en el que los niveles de DHA en la médula espinal aumentaron significativamente después de la lesión, mostraron que disminuyeron los niveles de MDA y nitrotirosina en aproximadamente 2 veces en ratones tratados con fenretinida en comparación con ratones control no tratados (figuras 4B, C).

Ejemplo 6: Efecto de fenretinida sobre la activación de células de la microglía.

La fenretinida redujo la expresión de mediadores proinflamatorios después de LME, lo que sugiere que el fármaco modula la respuesta inflamatoria. Se estudió entonces el efecto de fenretinida sobre células de la microglía. Se activaron células de la microglía *in vitro* mediante la adición de LPS (10 ng/ml) y se midió la liberación de TNF $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo. Los resultados de ELISA de los sobrenadantes obtenidos de células de la microglía estimuladas con LPS mostraron una reducción del 20% y el 40% en los niveles de proteína de TNF $\alpha$  cuando se trataron con 0,625 y 1,25  $\mu\text{M}$  de fenretinida, respectivamente (figura 5), en comparación con células no tratadas. Estas dosis de fenretinida no tuvieron ningún efecto tóxico sobre las células basándose en estudios de viabilidad celular y desprendimiento celular. Estos resultados proporcionan evidencias directas de que la fenretinida reduce la activación de la microglía. Se obtuvieron resultados similares con macrófagos derivados de médula ósea activados.

Ejemplo 7: Niveles en plasma de moléculas asociadas con inflamación y/o estrés oxidativo en modelos de ratón de ELA.

Las figuras 6-15 muestran una comparación de los niveles en plasma de diversas moléculas generalmente asociadas con inflamación y/o daños/estrés oxidativos (ceramidas, AA, DHA, MDA y nitrotirosina) en ratones de tipo natural frente a dos modelos de ratón de ELA, concretamente ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup> (figuras 6-10) y SOD1<sup>G37R</sup> (figuras 11-15). Estos ratones, que sobreexpresan formas mutantes de Cu, Zn-superóxido dismutasa (SOD1) humana, muestran degeneración de neuronas motoras estatificada y dependiente de la edad con profundo daño celular y bioquímico a las fibras nerviosas y tejido de la médula espinal (Wong *et al.*, 1995. *Neuron* 14: 1105-16; Hensley *et al.*, 2006. *Antioxid redox signal* 8: 2075-87). Los resultados presentados en las figuras 6-15 muestran que los niveles de estas moléculas tienden a aumentar/ser mayores en ratones con ELA en comparación con ratones normales.

#### Ejemplo 8: Efectos de fenretinida sobre la función motora en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

Se midió la alteración de la función motora mediante pruebas en varilla rotatoria dos veces a la semana. Los ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup> tratados con fenretinida rindieron significativamente mejor en la varilla rotatoria que los animales control tratados de manera simulada, lo que sugiere que el fenotipo patológico puede modularse mediante el tratamiento con fenretinida. Los animales tratados de manera simulada mostraron un deterioro en la función motora 2 semanas antes de que se detectase cualquier alteración en el grupo tratado con fenretinida, lo que indica que el tratamiento con fenretinida retrasa la aparición de la enfermedad en este modelo. En todos los puntos de tiempo después del día 91, el grupo tratado con fenretinida rindió mejor que los animales control y esta diferencia fue significativa ( $p \leq 0,05$ ) independientemente en el día 112, 116 y 119, tal como se muestra en la figura 16. Aumentó el rendimiento en el día 112 desde  $162 \pm 23$  s ( $n = 26$ ) para los animales tratados con vehículo hasta  $216 \pm 25$  s ( $n = 19$ ) en los animales tratados con 5 mg/kg de fenretinida. Mejoró el rendimiento en el día 116 desde  $98 \pm 18$  s ( $n = 26$ ) para los animales tratados con vehículo hasta  $154 \pm 27$  s ( $n = 20$ ) observado en los animales tratados con fenretinida. En el día 119, el tratamiento con fenretinida potenció el rendimiento desde  $46 \pm 13$  s ( $n = 25$ ) en los animales tratados con vehículo hasta  $109 \pm 27$  s ( $n = 18$ ) en los animales tratados con fenretinida tal como se muestra en la figura 16. Además de estos puntos de tiempo específicos en los que mejoró significativamente el rendimiento por fenretinida, se encontró que el rendimiento en varilla rotatoria global a lo largo de toda la duración del estudio se potenciaba significativamente en los animales tratados con fenretinida en comparación con los animales control ( $p \leq 0,0001$ ), representado en la figura 16.

#### Ejemplo 9: Efectos de fenretinida sobre la supervivencia de ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

Para establecer si la fenretinida podría potenciar la supervivencia de ratones SOD1<sup>G93A</sup>, se registró el día en el que los animales alcanzaron el criterio de valoración clínico objetivo como su duración de supervivencia. Se usaron curvas de Kaplan-Meier para calcular las diferencias de supervivencia así como una comparación de la supervivencia media entre grupos tratados con fármaco y control. La supervivencia media de ratones SOD1<sup>G93A</sup> tratados con fenretinida mejoró significativamente desde  $143 \pm 1,4$  d ( $n = 17$ ) para los animales control hasta  $148 \pm 1,4$  d ( $n = 12$ ) para los animales tratados con fármaco ( $p \leq 0,05$ ), tal como se muestra en la figura 17A. Esta diferencia constituye un aumento en la supervivencia de casi el 10% desde la aparición de enfermedad. La mediana de supervivencia de los animales tratados también fue significativamente ( $p \leq 0,05$ ) mayor que en los no tratados, tal como se evidencia a partir de la representación gráfica de supervivencia acumulada de Kaplan-Meier mostrada en la figura 17B. La mortalidad temprana también era más común en los animales control. Más del 22% de los ratones tratados de manera simulada murieron antes de que un único ratón tratado con fenretinida alcanzase el criterio de valoración clínico, y el 17% de los animales tratados con fenretinida seguían estando vivos después de que todos los ratones control hubieran alcanzado el criterio de valoración, tal como se representa en la figura 17B.

#### Ejemplo 10: Efectos de fenretinida sobre los perfiles de ácidos grasos esenciales (AGE) en plasma en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

Para determinar el efecto de tratamiento sobre los perfiles lipídicos sistémicos, se recogieron muestras de plasma en el día 60, 90, 120 y en el criterio de valoración clínico tanto para grupos tratados con fenretinida como control. Se analizó cada muestra para determinar la contribución de DHA, AA, MDA, NT y ceramidas. Se encontró que los niveles de DHA unido a fosfolípidos estaban elevados significativamente en el plasma de los animales tratados con fenretinida en comparación con ratones control. Se detectaron concentraciones de DHA elevadas significativamente en la duración del experimento ( $p \leq 0,0001$ ), mostrado en la figura 18. Además, se encontraron aumentos significativos en DHA independientemente en el día 60 y 120 en ratones tratados con fenretinida. El tratamiento con fenretinida aumentó el DHA unido a fosfolípidos en el día 60 desde  $2,22 \pm 0,15$  ( $n = 9$ ) de los animales control hasta  $2,88 \pm 0,18$  ( $n = 8$ ), un aumento de aproximadamente el 30% ( $p \leq 0,05$ ). Se observó también un aumento similar (aproximadamente del 25%) en el día 120 desde  $2,63 \pm 0,07$  ( $n = 8$ ) para ratones tratados de manera simulada hasta  $3,26 \pm 0,17$  ( $n = 8$ ) ( $p \leq 0,01$ ) para el grupo tratado con fármaco (figuras 18 y 19A). AA unido a fosfolípidos, aunque ligeramente menor a los 60 días de edad en ratones tratados con fenretinida, sólo alcanzó una reducción estadísticamente significativa en muestras tomadas en el día 120, disminuyendo desde  $39,50 \pm 0,94$  ( $n = 8$ ) para ratones control hasta  $34,87 \pm 0,91$  ( $n = 7$ ) ( $p \leq 0,01$ ) para el grupo tratado con fenretinida (una disminución de aproximadamente el 12%), tal como se muestra en la figura 19B. No se observaron diferencias estadísticamente

significativas en las concentraciones de ceramidas en ninguno de los puntos de tiempo. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en los niveles de ácidos grasos totales, AA unido a fosfolípidos o DHA unido a fosfolípidos entre grupos tratados con vehículo y tratados con fenretinida cuando se midió en el criterio de valoración clínico. Estos resultados demuestran que el tratamiento con fenretinida contribuye a mantener un entorno de

5 disminución de ácidos grasos  $\omega$ -6 mientras aumentan los ácidos grasos  $\omega$ -3.

Ejemplo 11: Efectos de fenretinida sobre la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo en plasma en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

10 También se analizaron las muestras sometidas a prueba para determinar AGE para determinar la presencia de dos marcadores de peroxidación lipídica/estrés oxidativo: nitrotirosina (NT) y malondialdehído (MDA). A los 60 días de edad, los ratones tratados con fenretinida tenían menores niveles de NT, una diferencia que fue estadísticamente significativa en el día 120, punto en el cual los animales control presentaban niveles de NT mayores en un 45% que los ratones tratados con fenretinida ( $p \leq 0,001$ ), tal como se muestra en la figura 20A. MDA mostró un perfil similar

15 que se redujo significativamente ( $p = 0,001$ ) en aproximadamente el 38% a los 120 días de edad en ratones tratados con fármaco (figura 20B). Estos resultados demuestran que el tratamiento con fenretinida está asociado con una disminución en la peroxidación lipídica, y por tanto puede proporcionar protección frente a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y al estrés oxidativo, que están presentes a altos niveles en ratones SOD1<sup>G93A</sup>.

20 Ejemplo 12: Efectos de fenretinida sobre los perfiles de AGE y la peroxidación lipídica/el estrés oxidativo en órganos afectados por ELA de ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

Para establecer si la diferencia en perfiles lipídicos en plasma observada en muestras de plasma también podría observarse en los órganos afectados directamente por ELA, se analizaron muestras de la región lumbar de la

25 médula espinal, el tronco encefálico y la corteza cerebral para determinar la presencia de la misma especie lipídica y marcadores de peroxidación lipídica. Se recogieron muestras cuando cada animal alcanzó el criterio de valoración clínico. Ni los niveles de AA ni los de DHA alcanzaron una diferencia significativa entre los grupos tratados con vehículo y tratados con fenretinida en las muestras de tronco encefálico. AA en las muestras de médula espinal y DHA en las muestras de corteza tampoco se vieron afectados significativamente por el tratamiento con fenretinida,

30 tal como se muestra en las figuras 21B y 21D, respectivamente, aunque DHA sí que mostró una tendencia ascendente en el grupo tratado con fenretinida (figura 21D). Hubo un aumento estadísticamente significativo (aproximadamente del 28%) en los niveles de DHA unido a fosfolípidos en la región lumbar de la médula espinal de ratones tratados con fenretinida ( $p \leq 0,05$ ), tal como se muestra en la figura 21A. También, el ácido araquidónico unido a fosfolípidos fue menor en aproximadamente el 10% en la corteza cerebral de los animales tratados con

35 fenretinida ( $p \leq 0,05$ ), tal como se representa en la figura 21C. Estos resultados confirman que el tratamiento con fenretinida contribuye a mantener un entorno de disminución de ácidos grasos  $\omega$ -6 mientras aumentan los ácidos grasos  $\omega$ -3, incluyendo en órganos afectados por ELA.

40 Ejemplo 13: Efectos de fenretinida sobre la supervivencia de neuronas motoras en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

Se derivaron todas las preparaciones histológicas de segmentos L4 de médula espinal tomados a los 130 días de edad. Para cuantificar el número de neuronas motoras supervivientes, se tiñeron secciones histológicas con violeta de cresilo y se contaron las neuronas motoras de cada asta anterior mediante un individuo ciego para el número de animal y las condiciones de tratamiento.

45

Se muestran imágenes representativas que representan la tinción de neuronas motoras en la figura 22B. Se realizaron recuentos de ambas astas anteriores en secciones cada 300  $\mu$ m y se tomó un promedio de 4 secciones (8 astas anteriores) para cada animal. Tal como se muestra en la figura 22A, los ratones tratados con fenretinida presentaron aproximadamente del 20% al 30% más neuronas motoras que los ratones control.

50

Ejemplo 14: Efectos de fenretinida sobre la activación de la glía en ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>.

También se realizó inmunohistoquímica en diferentes secciones en serie de los mismos animales. Se usaron anticuerpos contra tanto la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), mostrados en la figura 23B, como el antígeno Mac-2 (Mac-2), mostrado en la figura 23D, para identificar astrocitos y microglía activados, respectivamente. Se capturaron las imágenes de ambas astas anteriores cada 300  $\mu$ m y se importaron al software de cuantificación de imágenes SigmaScan<sup>TM</sup> Pro. Se cuantificó el área ocupada por células teñidas de forma oscura y se normalizó para el área total. Tal como se ilustra en la figura 23A, el análisis de las secciones teñidas con GFAP reveló que los ratones tratados de forma simulada tenían una tinción mayor en el 50% del asta anterior que los ratones tratados con fenretinida ( $p \leq 0,05$ ). El área teñida de manera positiva para Mac-2 también era significativamente mayor en los animales control, con el 60% más de área teñida ( $p \leq 0,05$ ), tal como se muestra en la figura 23C. Puede observarse a partir de las imágenes representativas en las figuras 23B y 23D que los ratones tratados con vehículo no sólo presentaban un mayor número de células de la glía, sino que estas células presentaron mayor hipertrofia. Estos hallazgos demuestran que la activación de la glía, un marcador de inflamación del SNC, disminuye en los animales

55

60

65 tratados con fenretinida.

Aunque se ha descrito la presente invención anteriormente en el presente documento mediante realizaciones específicas de la misma, puede modificarse, sin apartarse del espíritu y la naturaleza de la invención objeto tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 5
- Lista de secuencias**
- 10 <110> EL INSTITUTO REAL PARA EL AVANCE DEL APRENDIZAJE/UNIVERSIDAD DE MCGILL RADZIOCH, Danuta DAVID, Samuel LOPEZ-VALES, Ruben SKINNER, Tom
- <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES O ESTADOS NEURALES
- <130> Documento 780/11168.347
- 15 <150> Documento US 61/030.354
- <151> 21-02-2008
- 20 <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- 35 <400> 1
- ccccagccct cgcacctaca a 21
- 40 <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- 50 <400> 2
- ccccggaagc aaccacaaca c 21
- 55 <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- 60 <213> Secuencia artificial
- <220>
- 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 3  
 cagcacttca cccatcagtt        20  
 5 <210> 4  
    <211> 20  
    <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
    <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 4  
 20 ctggtcattg gaggccttg        20  
    <210> 5  
    <211> 18  
 25 <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
    <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 5  
 35 atgccgcccg ggtcctt        18  
    <210> 6  
    <211> 23  
 40 <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
    <400> 6  
 50 tgggtccttg agcctcatca tca        23  
    <210> 7  
 55 <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
    <223> Oligonucleótido sintético  
 65 <400> 7

ggtgcgcgtc ctgctctgta 20  
 <210> 8  
 5 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 8  
 agtggcggtgt tcccgctc tcc 23  
 <210> 9  
 20 <211> 24  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 30 <400> 9 24  
 aggcgcctgg agaaaagtgg atgt 24  
 35 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 10  
 gtggggctgg gagaggtgtg a 21  
 50 <210> 11  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 11  
 65 cctgtgttc accaggagat 20

<210> 12  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 12  
 15 aaggccaac acagcatacc 20  
 <210> 13  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 13  
 30 atgaaggctc ccaccactg 19  
 <210> 14  
 35 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
 45 gcattcagtt ccaggcca 18  
 <210> 15  
 50 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 60 <400> 15  
 aagtttgta tgaatgattc cctc 24  
 65 <210> 16

<211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 16  
 gtctcactac ctgtgatgag t 21  
 15 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 17  
 atgagcacag aaagcatg 18  
 30 <210> 18  
 <211> 18  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 18  
 45 gaagactcct cccaggta 18  
 <210> 19  
 <211> 20  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 19  
 60 ccttgggccg cgtctcctc 20  
 <210> 20  
 65 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 20  
 10 atgggtagg gacgctctcc tgag 24  
 <210> 21  
 15 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 21  
 catcagccct aatccatctg a 21  
 <210> 22  
 30 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 40 <400> 22  
 cgcgactaac aatcaaagt a 21  
 45 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 23  
 60 ctaggccaca gaattgaaag atct 24  
 <210> 24  
 <211> 25  
 65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 24

10 gtaggtggaa attctagcat catcc 25

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Composición para su uso en el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, comprendiendo dicha composición:
- 5 (a) fenretinida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y
- (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 2.- Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha lesión neural es una lesión del sistema nervioso central (SNC).
- 3.- Composición para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha lesión del SNC es una lesión de la médula espinal (LME).
- 15 4.- Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha LME es LME aguda.
- 5.- Composición para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha lesión neural es una lesión secundaria que resulta de una LME inicial.
- 20 6.- Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición es además para su uso en el tratamiento o la inhibición de un estado tras dicha lesión neural, en la que dicho estado se selecciona de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales; (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).
- 25 7.- Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición es además para su uso en el tratamiento o la inhibición de un estado asociado con dicha enfermedad neurodegenerativa, en la que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía; y (g) cualquier combinación de (a) a (f).
- 30 8.- Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 7, en la que dicha enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 35 9.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de una lesión neural o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto.
- 40 10.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha lesión neural es una lesión del sistema nervioso central (SNC), preferiblemente una lesión de la médula espinal (LME).
- 45 11.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha LME es LME aguda.
- 12.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha lesión neural es una lesión secundaria que resulta de una LME inicial.
- 50 13.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que dicha fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma es además para su uso en el tratamiento o la inhibición de un estado tras dicha lesión neural, en la que dicho estado se selecciona de (a) inflamación neural; (b) pérdida de células o tejidos neurales; (c) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (d) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (e) estrés oxidativo neural; y (f) cualquier combinación de (a) a (e).
- 55 14.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 9, en la que dicha fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma es además para su uso en el tratamiento o la inhibición de un estado asociado con dicha enfermedad neurodegenerativa, en la que dicho estado se selecciona de (a) disminución de la función motora; (b) aumento de los niveles neurales de ácido araquidónico (AA); (c) disminución de los niveles neurales de ácido docosahexaenoico (DHA); (d) estrés oxidativo neural; (e) disminución del número de neuronas motoras; (f) aumento de la activación neural de la glía; y (g) cualquier combinación de (a) a (f).
- 60 15.- Fenretinida o sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso según la reivindicación 7 ó 14, en la que dicha enfermedad neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica (ELA).
- 65

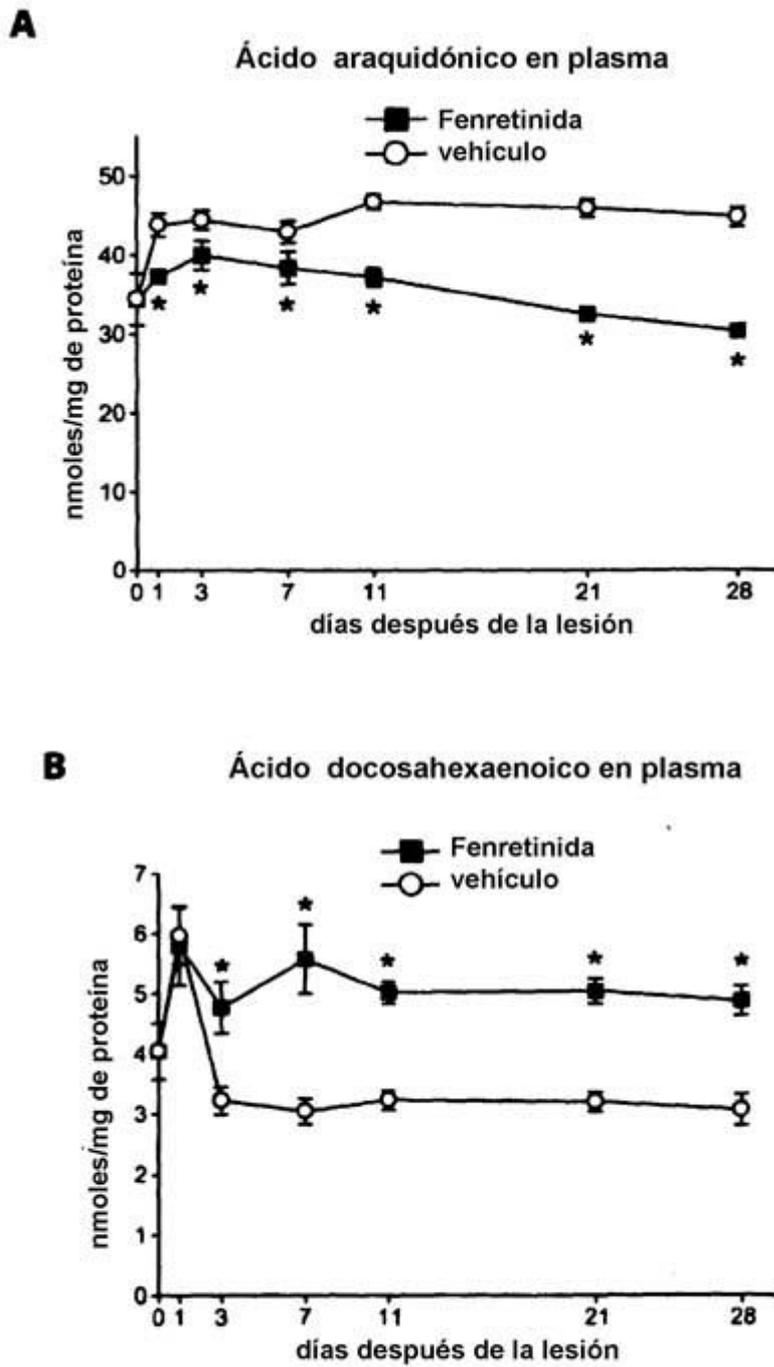
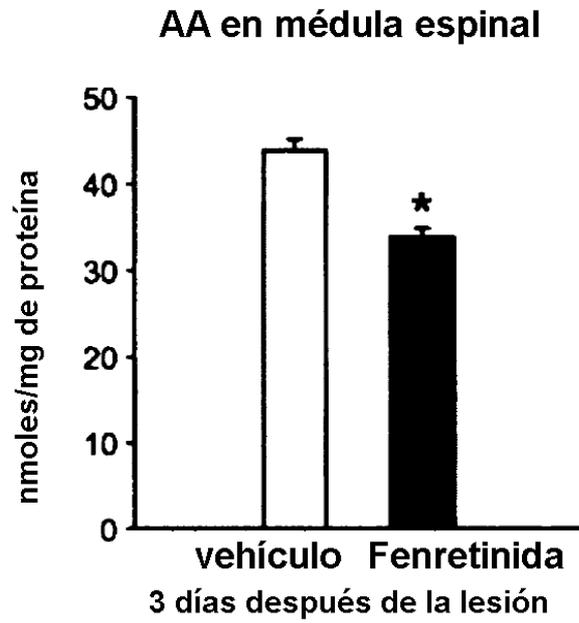
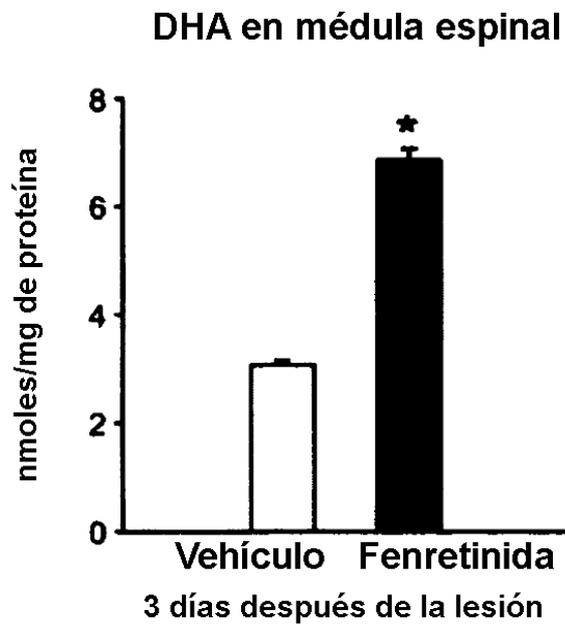


Fig. 1

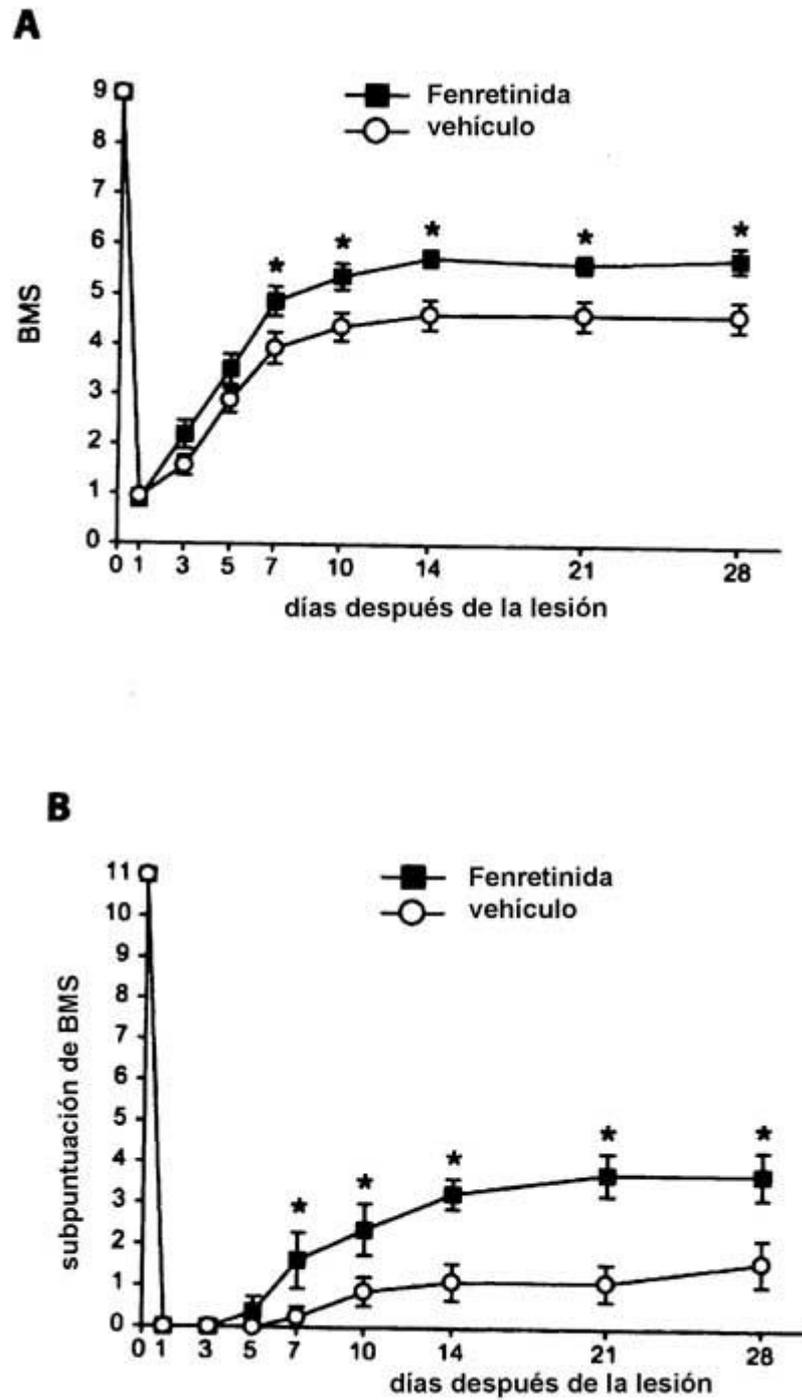
**C**



**D**

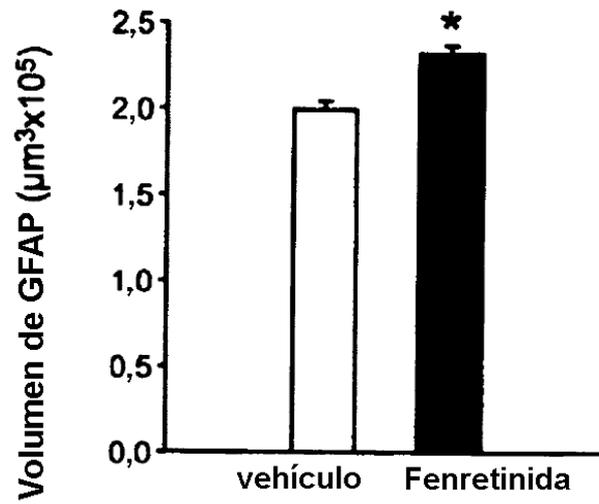


**Fig. 1 (continuación)**

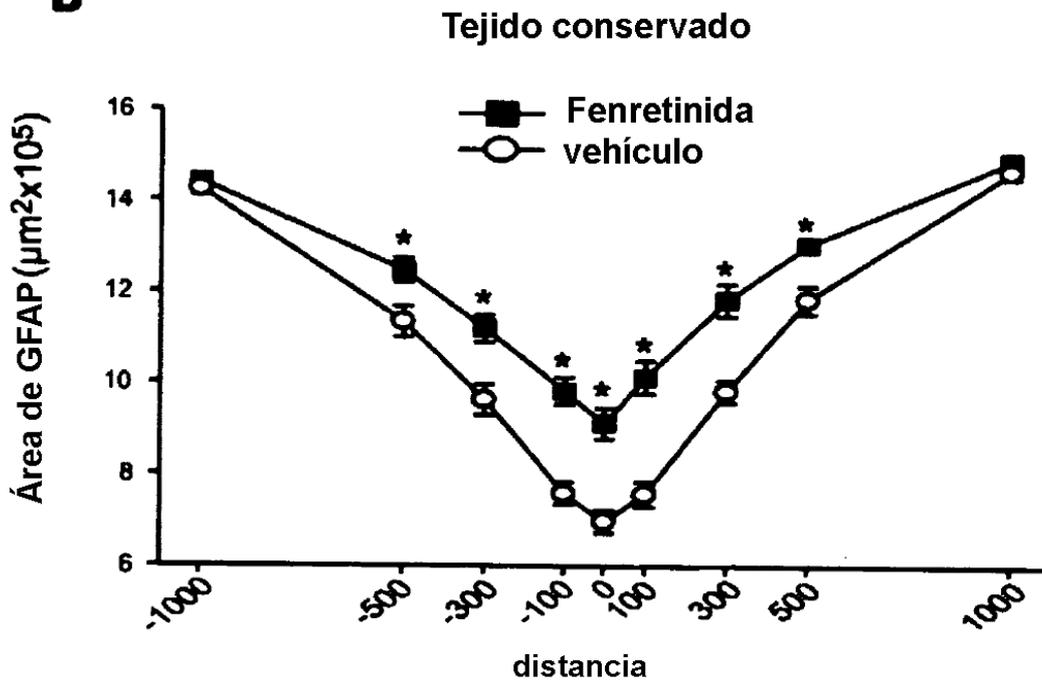


**Fig. 2**

**A** Volumen de tejido conservado

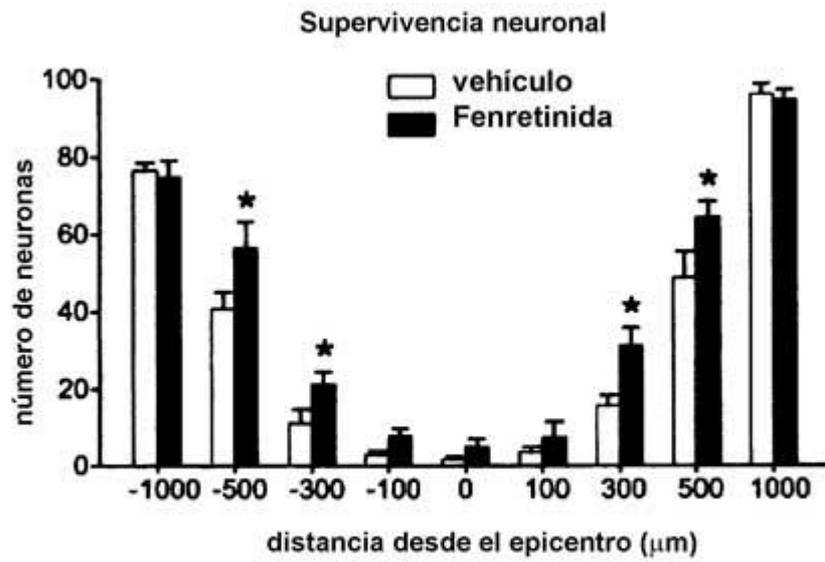


**B**

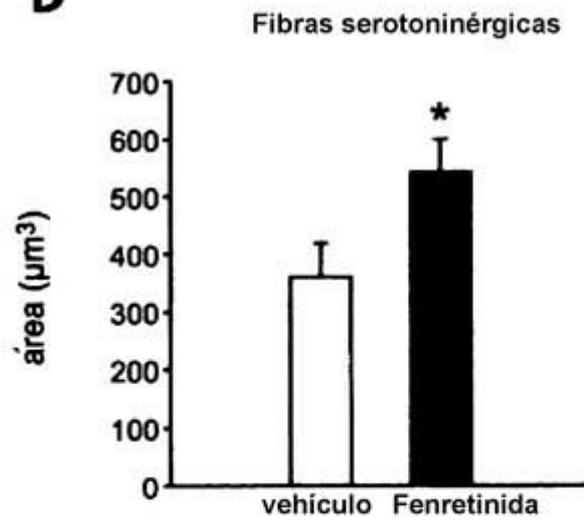


**Fig. 3**

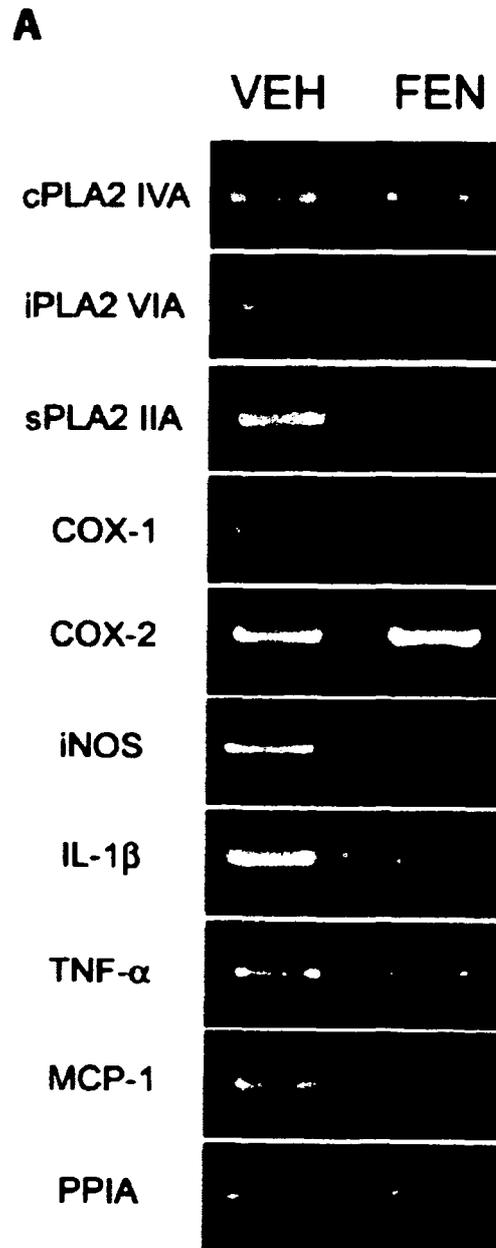
**C**



**D**

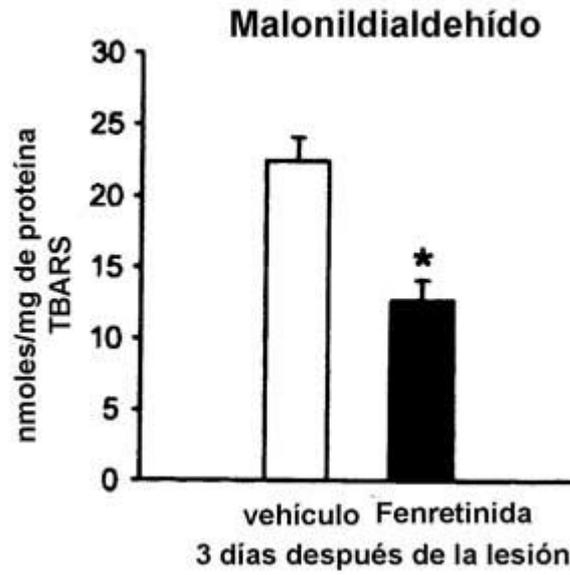


**Fig. 3 (continuación)**

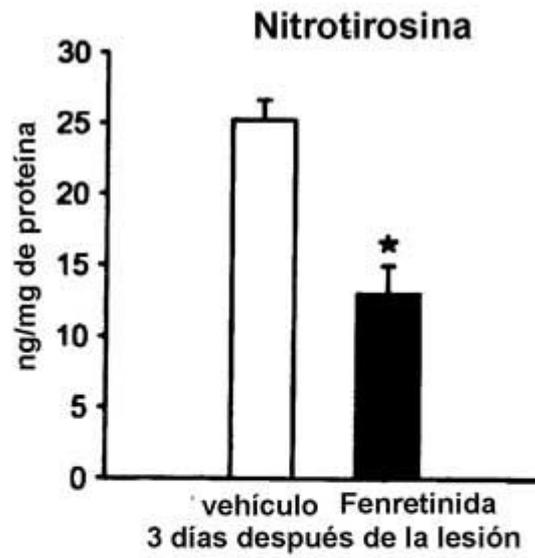


**Fig. 4**

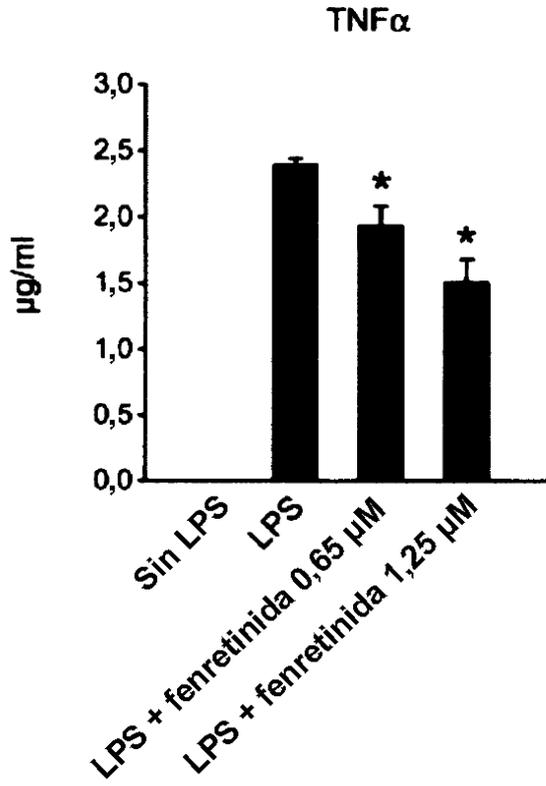
**B**



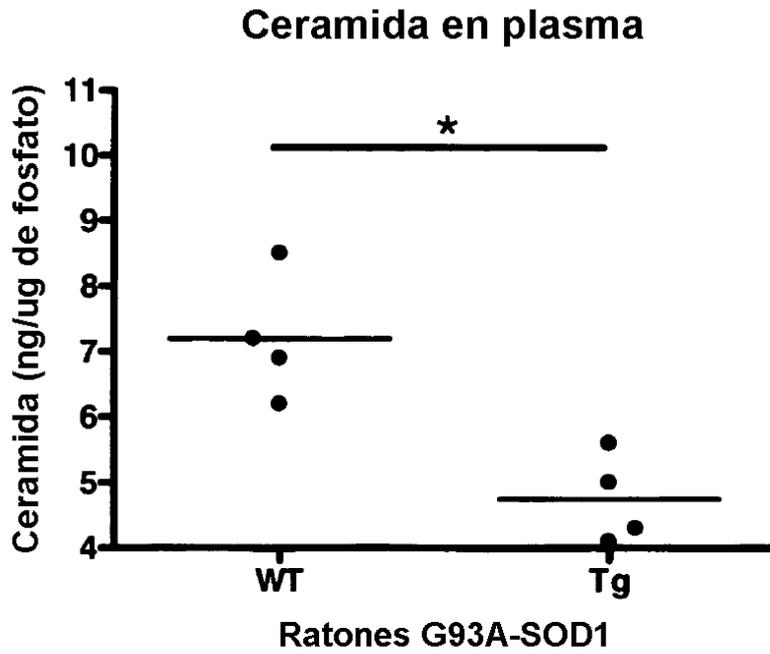
**C**



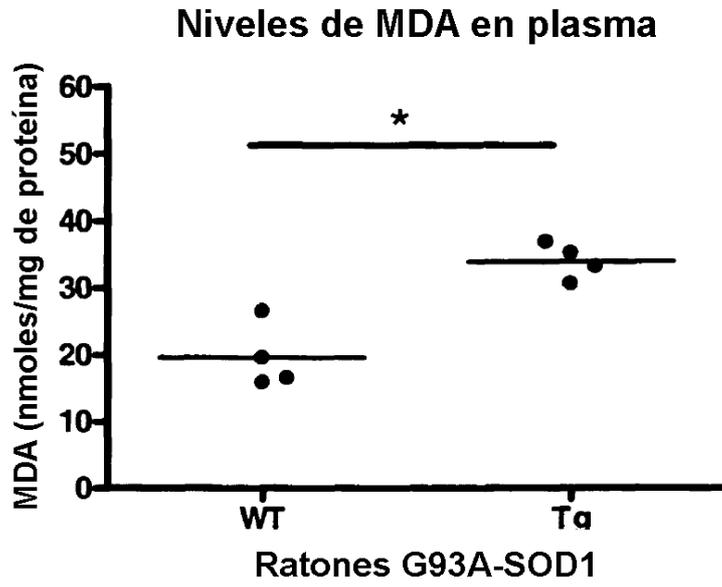
**Fig. 4** (continuación)



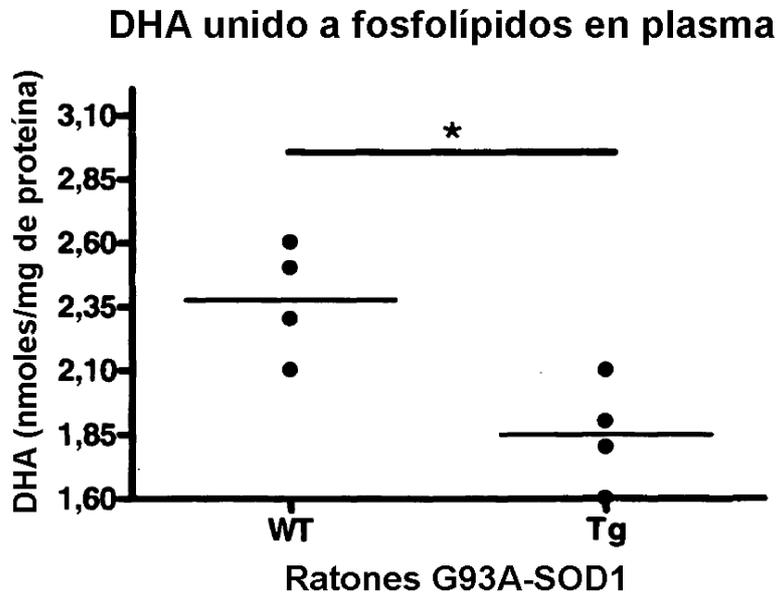
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

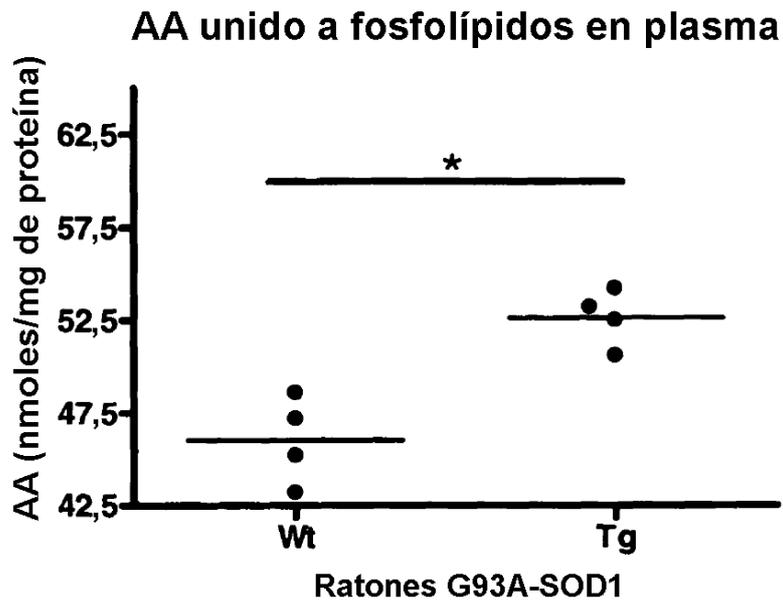


Fig. 9

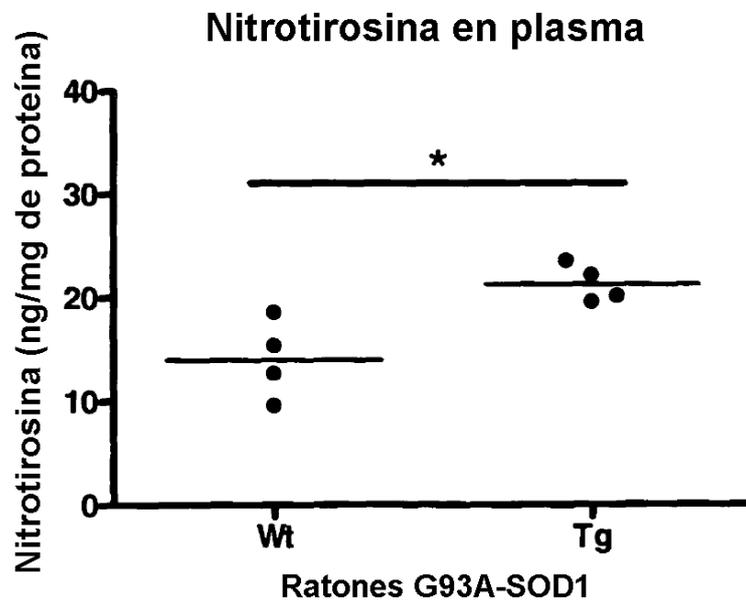


Fig. 10

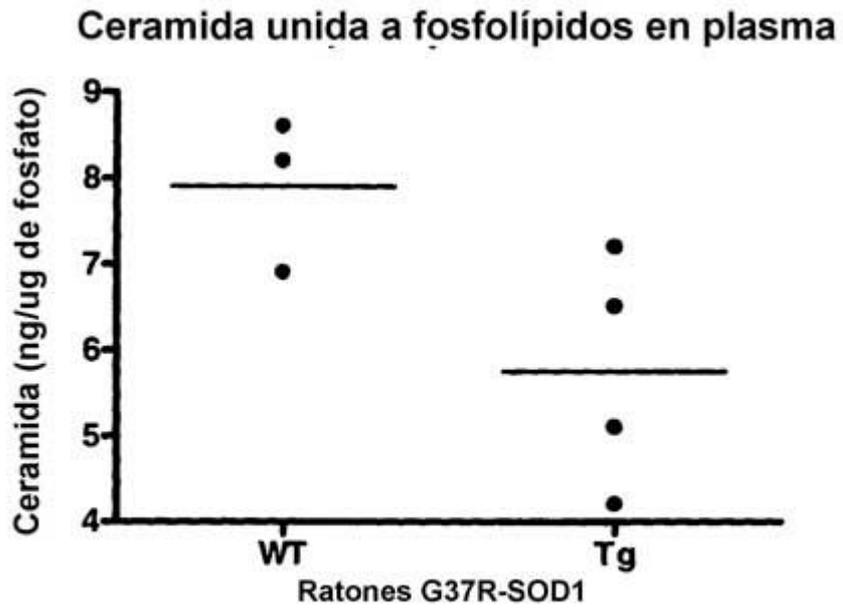


Fig. 11

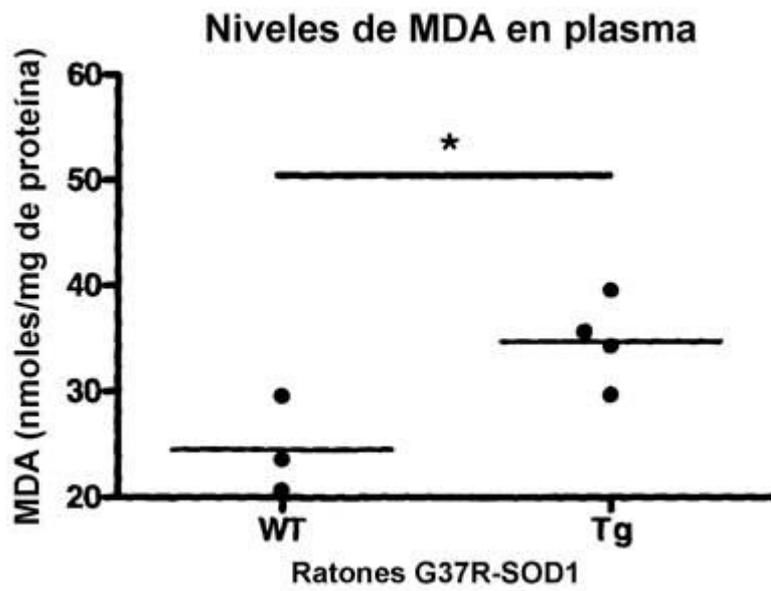


Fig. 12

### DHA unido a fosfolípidos en plasma

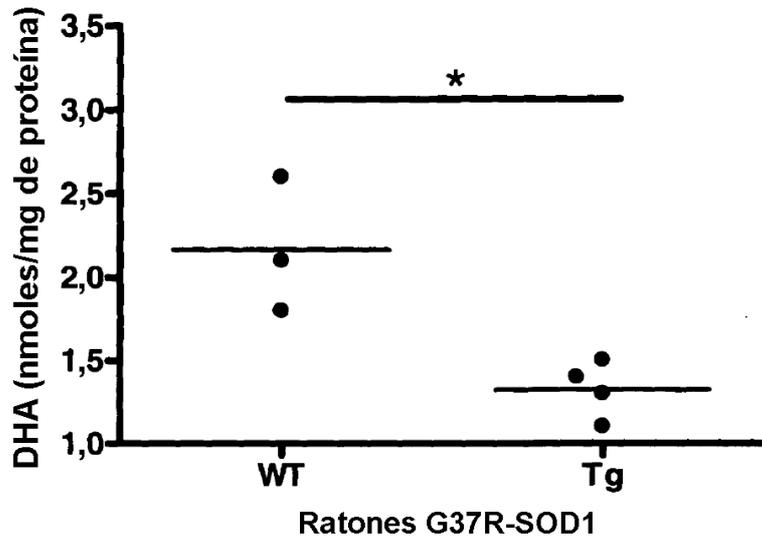


Fig. 13

### AA unido a fosfolípidos en plasma

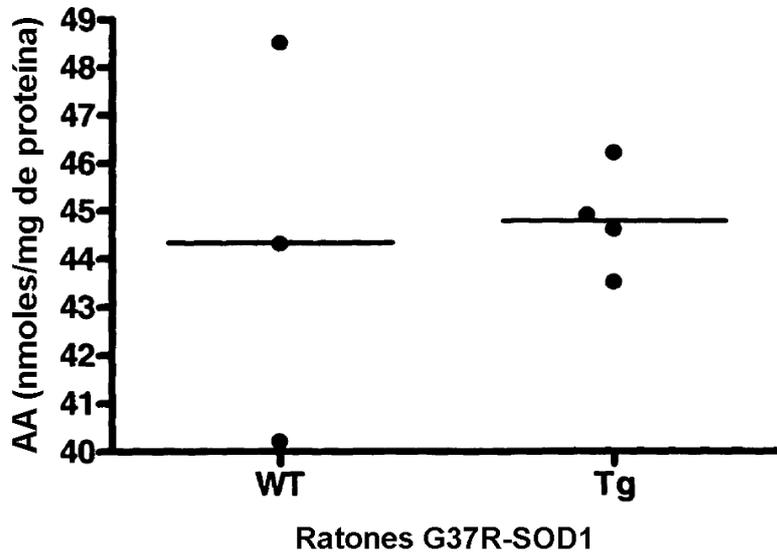
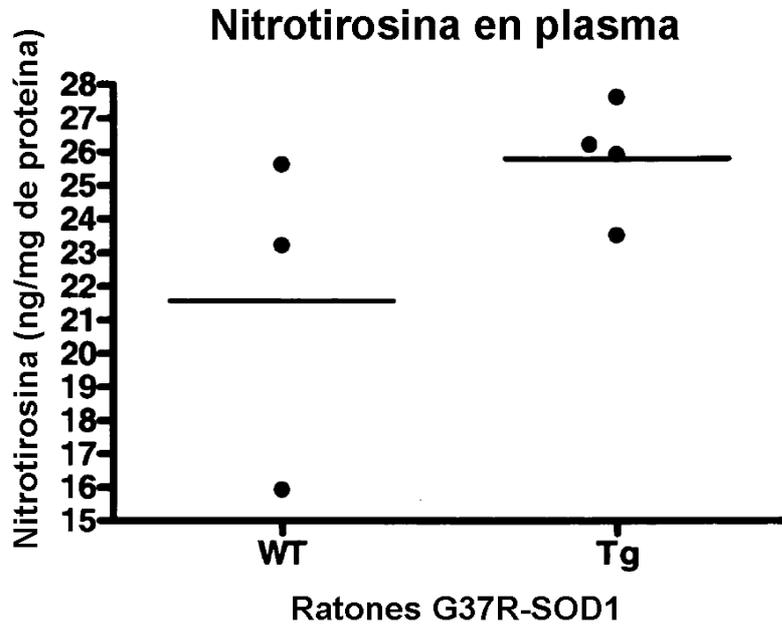
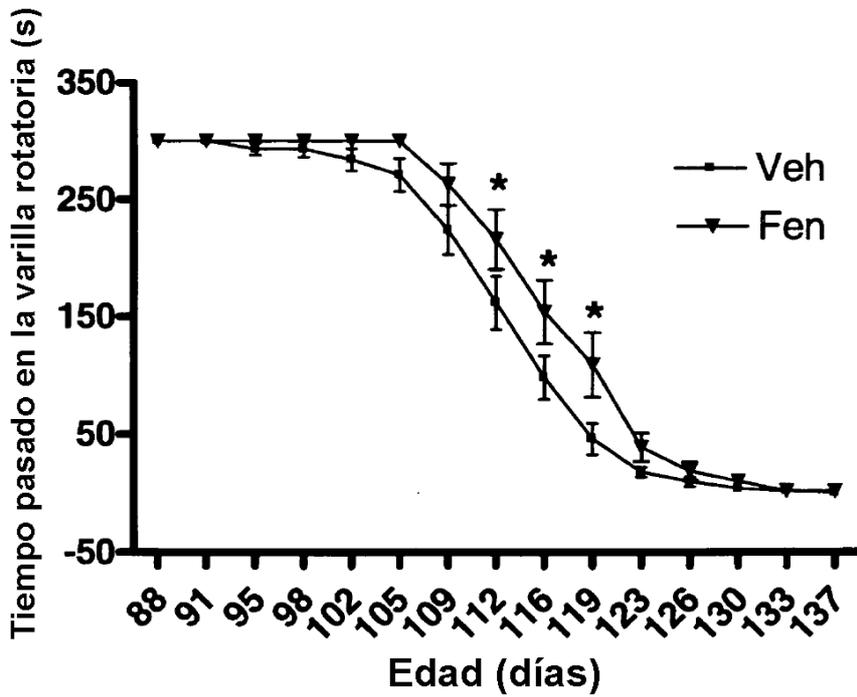


Fig. 14



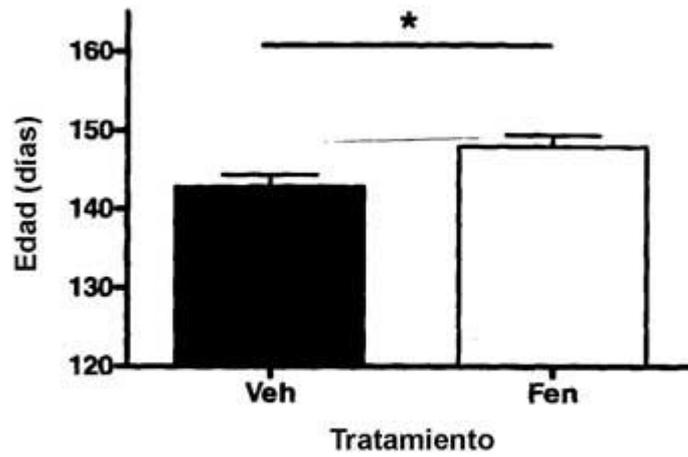
**Fig. 15**



**Fig. 16**

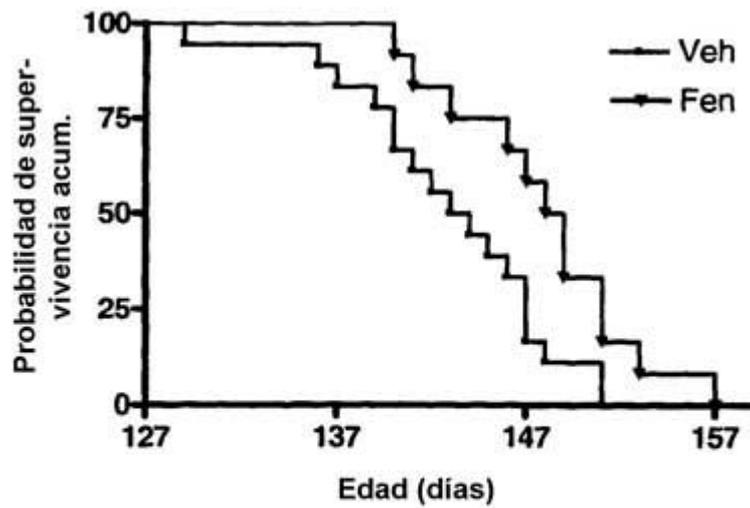
**A.**

Supervivencia media de ratones transgénicos SOD1<sup>G93A</sup>



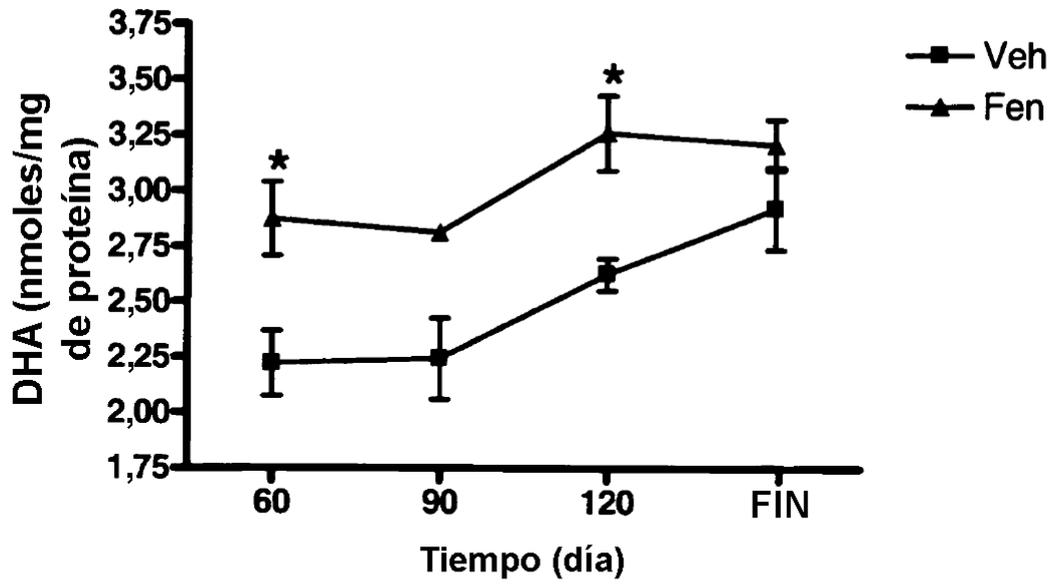
**B.**

Representación gráfica de supervivencia acum. de Kaplan-Meier



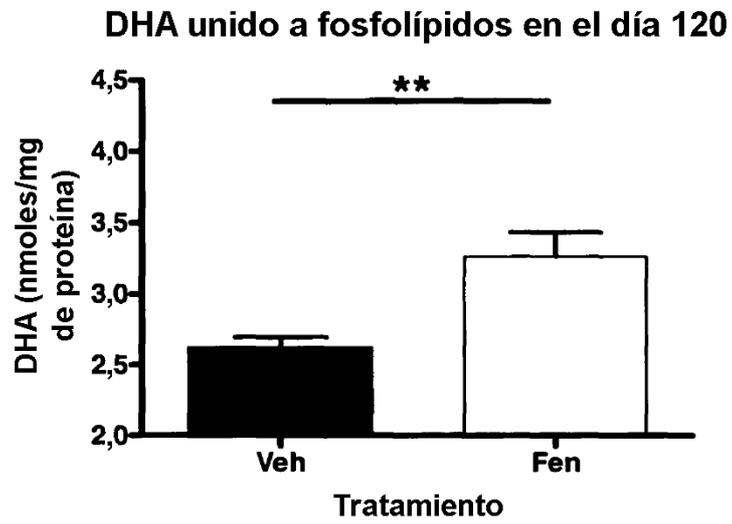
**Fig. 17**

**Cinética plasmática para DHA unido a fosfolípidos**

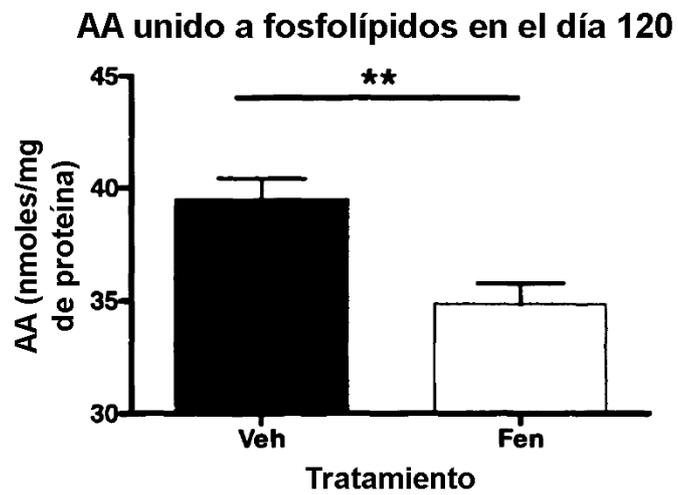


**Fig. 18**

**A.**

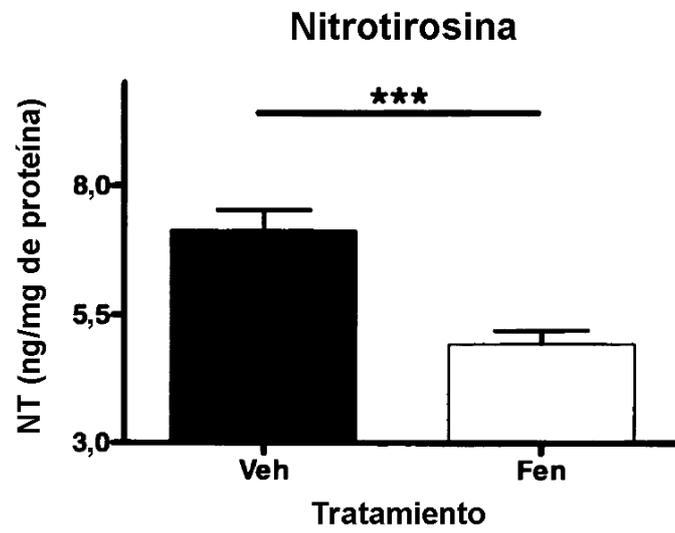


**B.**

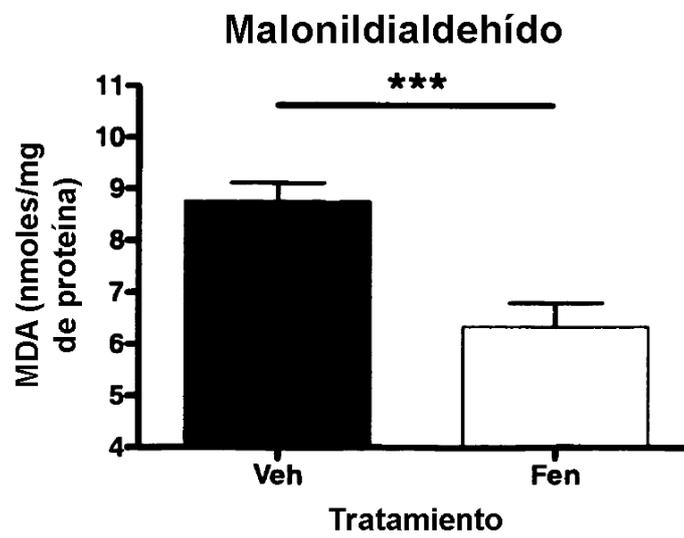


**Fig. 19**

**A.**

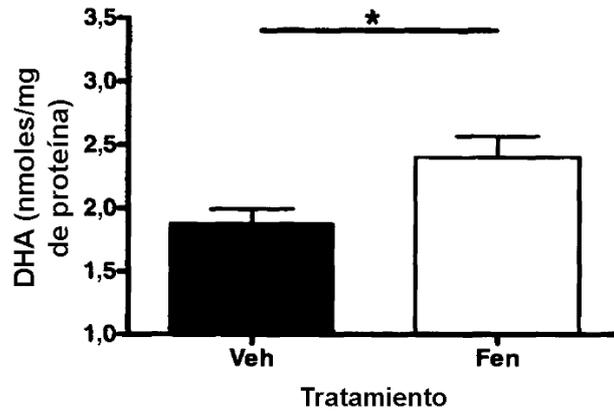


**B.**

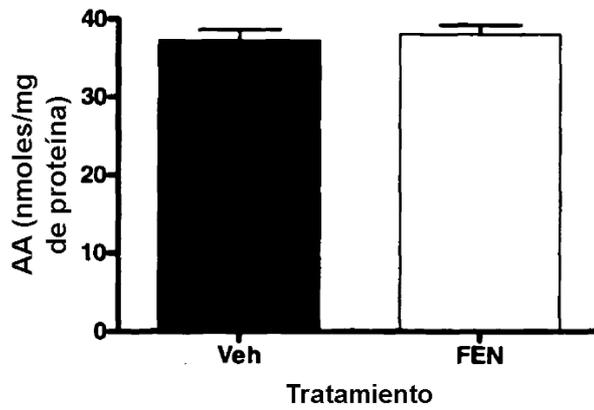


**Fig. 20**

**A.** DHA unido a fosfolípidos en región lumbar de médula espinal

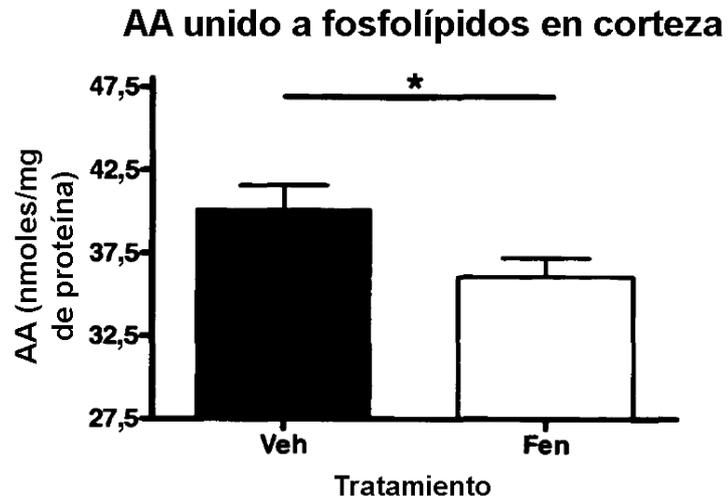


**B.** AA unido a fosfolípidos en región lumbar de médula espinal

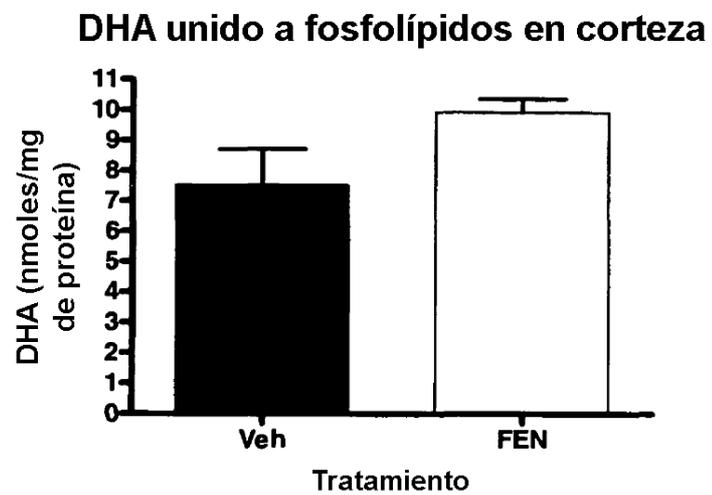


**Fig. 21**

**C.**

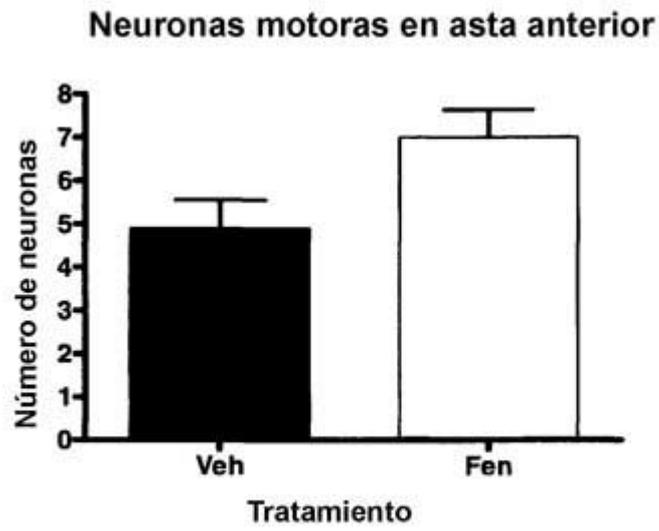


**D.**

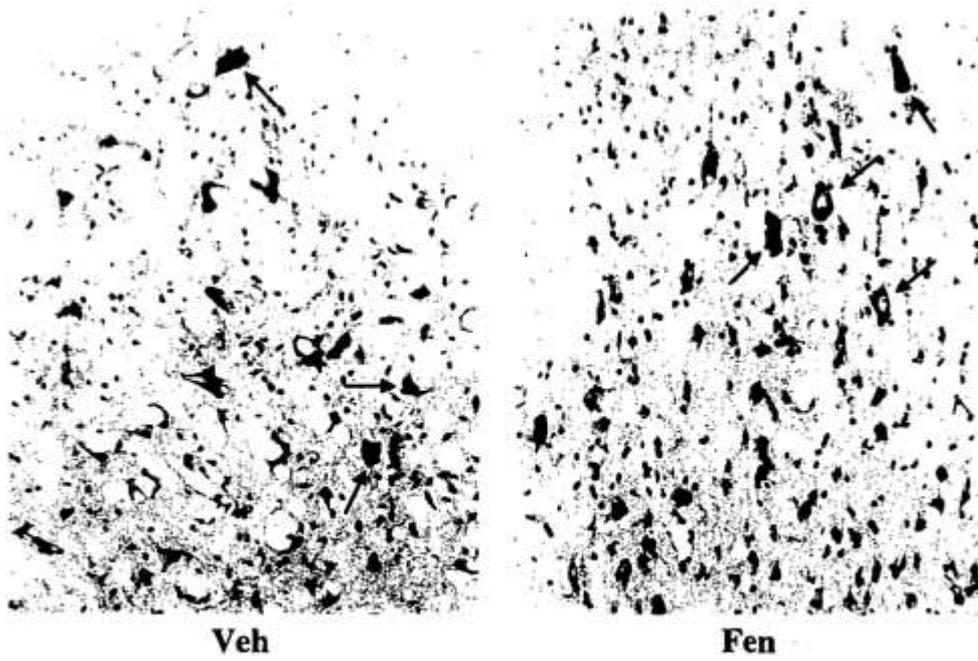


**Fig. 21 (continuación)**

**A.**

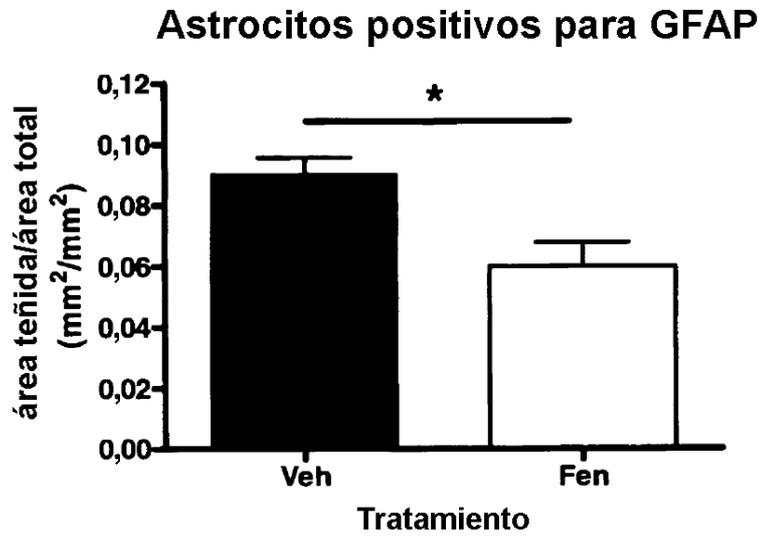


**B.**

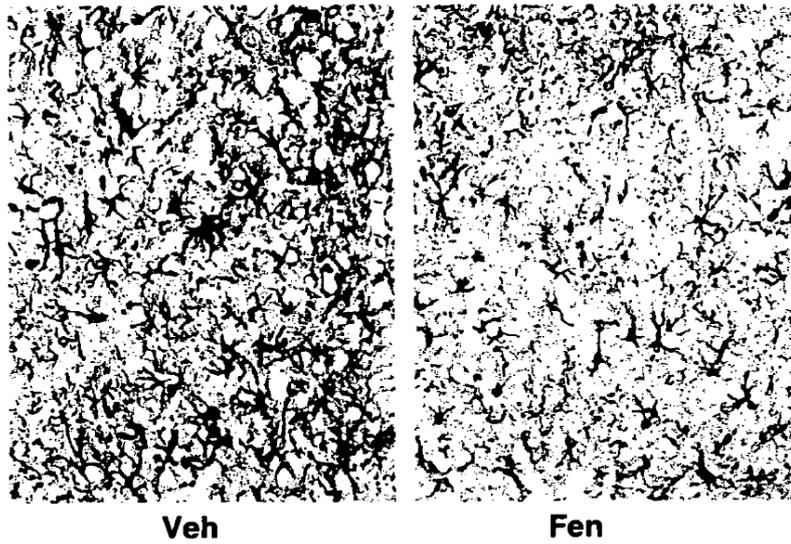


**Fig. 22**

**A.**

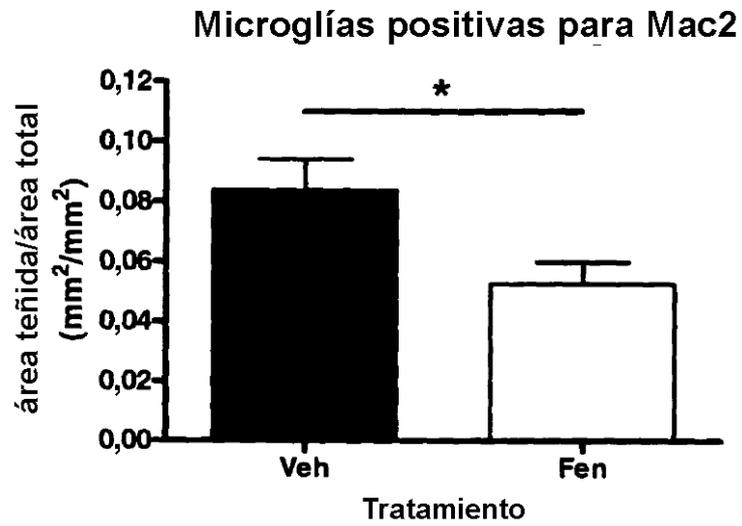


**B.**



**Fig. 23**

C.



D.

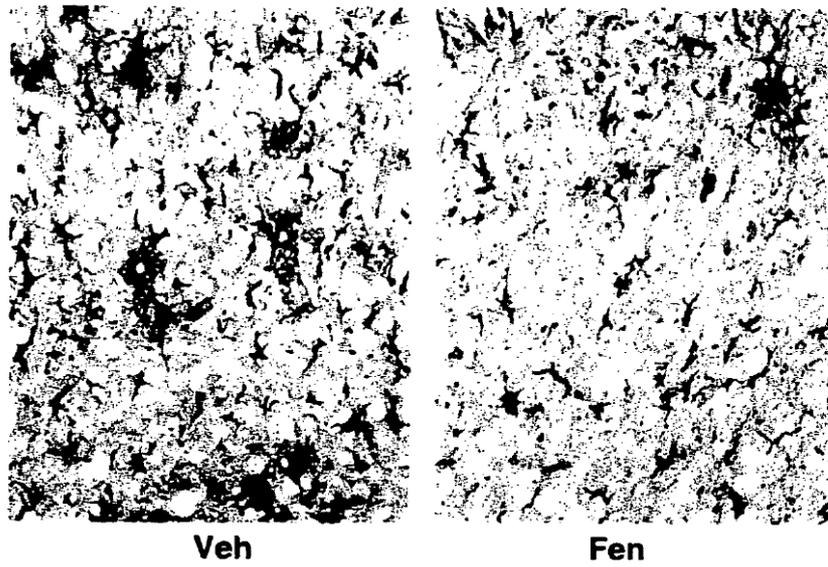


Fig. 23 (continuación)