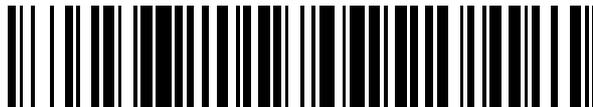


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 810**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C07H 19/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005 E 05790283 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 1755391**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar neuropatías**

30 Prioridad:

04.06.2004 US 577233 P

04.01.2005 US 641330 P

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

28.01.2016

73 Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)

1 BROOKINGS DRIVE

ST. LOUIS, MO 63130, US

72 Inventor/es:

MILBRANDT, JEFFREY;

ARAKI, TOSHIYUKI y

SASAKI, YO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 810 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para tratar neuropatías.

Campo

Esta invención se refiere al uso de un agente para tratar o prevenir axonopatías.

5 Antecedentes

La degeneración de los axones aparece en una diversidad de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, así como después de lesiones traumáticas, tóxicas o isquémicas en las neuronas. Estas enfermedades y trastornos están asociados con axonopatías que incluyen la disfunción axonal. Un ejemplo de axonopatía es la degeneración walleriana (Waller, Philos. Trans. R. Soc. Lond., 140:423-429, 1850), que aparece cuando la porción distal del axón se separa del cuerpo celular. El axón separado sucumbe con rapidez a la degeneración. Por tanto, la axonopatía puede ser una característica crítica de las enfermedades y trastornos neuropáticos, y los déficits axonales pueden ser un componente importante de la discapacidad de un paciente.

Sumario

Por consiguiente, los presentes inventores han logrado descubrir que la degeneración axonal puede disminuir o prevenirse aumentando la actividad NAD en neuronas enfermas y/o dañadas. Se cree que la mayor actividad NAD puede actuar aumentando la actividad sirtuina que, a su vez, produce una disminución en la degeneración axonal de células neuronales dañadas. Así, una estrategia para prevenir la degeneración axonal puede ser activando las moléculas de sirtuina, concretamente SIRT1, en axones de mamífero dañados. La activación de SIRT1 puede realizarse a través de una acción directa sobre la molécula de SIRT1 o aumentando el suministro de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), que actúa como sustrato para la actividad histona/proteína desacetilasa de SIRT1. La activación de SIRT1 produce una disminución en la gravedad de la degeneración axonal o la prevención de la degeneración axonal. También se cree que es posible que el aumento en la actividad NAD pueda actuar a través de otros mecanismos que no impliquen a la sirtuina. Así, el aumento en la actividad NAD, que puede actuar aumentando la actividad SIRT1 o a través de otro mecanismo o mecanismos, o de ambas formas, puede disminuir o prevenir la degeneración axonal en axones de mamífero dañados.

Así, en diversas realizaciones, la presente invención se dirige al uso de un agente para el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero que lo necesite, en el que el agente es NaMN, NMN, NmR, un ácido nucleico que codifica una NMNAT o resveratrol.

El agente puede aumentar la actividad SIRT1 aumentando la actividad NAD. Se cree que un aumento en la actividad NAD puede aumentar la actividad sirtuina porque el NAD puede actuar como sustrato de SIRT1. Estos agentes pueden incluir NAD o NADH, un precursor de NAD, un intermedio en la vía de reciclaje de NAD o una sustancia que genere NAD, tal como una nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT), o un ácido nucleico que codifique una nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa. La nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa puede ser una proteína NMNAT1.

35 En una realización, el agente puede ser resveratrol.

Este agente puede ser NAD o NADH, nicotinamida mononucleótido, ácido nicotínico mononucleótido o nicotinamida ribósido o sus derivados, o una enzima que genere NAD, tal como nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa, o un ácido nucleico que codifique una enzima que genere NAD, tal como un ácido nucleico que codifique una nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa, o un agente que aumente la expresión de un ácido nucleico que codifica una enzima en la vía que genera NAD, o un agente que aumente la actividad y/o la estabilidad de una enzima en la vía que genera NAD, o un agente que aumente la actividad NAD. La nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa puede ser una proteína NMNAT1 o una proteína NMNAT3.

En la presente invención, la neuropatía asociada con la degradación axonal puede ser cualquiera de una serie de neuropatías tales como, por ejemplo, las que son hereditarias o congénitas o que están asociadas con la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la infección por herpes, la diabetes, la esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad desmielinizante, isquemia o ictus, lesiones químicas, lesiones térmicas, SIDA y similares. Además, otras enfermedades neurodegenerativas que no se han mencionado anteriormente, así como cualquier subconjunto de las enfermedades mencionadas anteriormente, también pueden ser tratadas con el agente de la presente invención. Estos subconjuntos de enfermedades pueden incluir la enfermedad de Parkinson o enfermedades no parkinsonianas, la enfermedad de Alzheimer o enfermedades que no son Alzheimer, etc.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 indica que la actividad NMNAT1 en la proteína de fusión Wld^s produce un retraso en la degeneración de axones dañados, y muestra:

A) Una degeneración walleriana *in vitro* en cultivos de explantes neuronales de ganglios de la raíz dorsal (DRG)

infectados con lentivirus que expresan la proteína Wld^s o EGFP, en la que se muestran las neuritas inmunorreactivas a tubulina β III antes de la transección y 12, 24, 48 y 72 hr después de la transección (escala de las barras = 1 mm, y “*” indica la localización de los cuerpos celulares antes de la extirpación); y

5 B) Una degeneración walleriana *in vitro* en neuronas DRG infectadas con lentivirus que expresan solo EGFP, la proteína Wld^s, la porción Ufd2a (70 restos) de la proteína Wld^s condensada con EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP), Ufd2a(1-70)-EGFP con una señal de localización nuclear C-terminal, la porción NMNAT1 de la proteína Wld^s condensada con EGFP, Ufd2a dominante-negativa (Ufd2a(P1140A)), o una construcción de ARNmc de Ufd2a, en la que se muestran imágenes representativas de neuritas y los datos del análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes (porcentaje de neuritas remanentes con relación a la pretransección \pm D.E.) en el momento indicado con cada construcción (parte inferior izquierda), y “*” indica una diferencia significativa ($p < 0,0001$) con neuronas infectadas con EGFP; también muestra la señal de EGFP antes de la transfección, que confirma la expresión del transgén (fila inferior; escala de las barras = 50 μ m) y un análisis de la inmunotransferencia que confirma la expresión de la proteína por la transferencia génica lentivírica y la infrarregulación del ARNmc de la proteína Ufd2a (paneles en la parte inferior derecha).

15 La figura 2 indica que un mayor suministro de NAD protege a los axones frente a la degeneración después de sufrir daños, y muestra:

A) La actividad enzimática de las proteínas Wld^s y NMNAT1 de tipo salvaje y mutantes, en la que lisados preparados a partir de células HEK293 que expresan la proteína indicada se ensayaron para la producción de NAD utilizando nicotinamida mononucleótido como sustrato; la cantidad de NAD generado en 1 h se convirtió en NADH, se cuantificó mediante la intensidad de fluorescencia y se normalizó a la concentración total de proteínas para demostrar que ambos mutantes fundamentalmente no presentan actividad enzimática; y

20 B) Una degeneración walleriana *in vitro* en neuronas DRG infectadas con lentivirus que expresan la proteína NMNAT1 o Wld^s, los mutantes de estas proteínas que carecen de actividad de síntesis de NAD NMNAT1(W170A) y Wld^s(W258A), o EGFP, en la que el diagrama de barras muestra los datos del análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes en el momento indicado para cada construcción (porcentaje de neuritas remanentes con relación a la pretransección \pm D.E.), y “*” indica una diferencia significativa ($p < 0,0001$) con neuronas infectadas con EGFP;

C) La expresión de proteínas en células infectadas con lentivirus detectadas mediante un análisis de inmunotransferencia empleando anticuerpos contra el marcador 6XHis; y

30 D) Un explante neuronal de DRG que expresa NMNAT1 o EGFP (control) cultivado con vincristina 0,5 μ M, en la que se muestran imágenes representativas de neuritas (por contraste de fase; Barra = 1 mm) en los momentos indicados después de la adición de vincristina y se representa gráficamente la cuantificación del efecto protector en los momentos indicados como el área cubierta por las neuritas con relación a la cubierrra por las neuritas antes del tratamiento.

35 La figura 3 indica que la protección axonal requiere el pretratamiento de las neuronas con NAD antes de los daños, y muestra:

A) Una degeneración walleriana *in vitro* que emplea explantes de DRG cultivados en presencia de diversas concentraciones de NAD añadido 24 hr antes de la transección axonal; y

40 B) Explantes de DRG preincubados con NAD 1 mM durante 4, 8, 12, 24 o 48 hr antes de la transección, en la que el diagrama de barras muestra el número de neuritas remanentes en cada experimento (porcentaje de neuritas remanentes con relación a la pretransección \pm D.E.) en cada uno de los momentos indicados, y “*” indica una protección axonal significativa comparado con el control ($p < 0,0001$).

La figura 4 indica que la protección axonal dependiente de NAD es inducida por la activación de SIRT1, y muestra:

45 A) Una degeneración walleriana *in vitro* que emplea cultivos de explantes de DRG preincubados con NAD 1 mM solo (control) o en presencia de sirtinol 100 μ M (un inhibidor de Sir2) o 3-aminobenzimida 20 mM (3AB, un inhibidor de PARP);

B) Una degeneración walleriana *in vitro* que emplea explantes de DRG incubados con resveratrol (10, 50 o 100 μ M); y

50 C) izquierda: Una degeneración walleriana *in vitro* que emplea cultivos de explantes de DRG infectados con lentivirus que expresan ARNmc específico para cada miembro de la familia SIRT (SIRT1-7), en la que el diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes (porcentaje de neuritas remanentes con relación a la pretransección \pm D.E.) en los momentos indicados para cada condición, y “*” indica puntos significativamente diferentes del control ($<0,0001$);

tabla intermedia: La eficacia de cada ARNmc de SIRT (expresada como el porcentaje del nivel de ARNm de tipo

salvaje) empleando qRT-PCR en células NIH3T3 infectadas; y

derecha: Una inmunotransferencia que emplea anticuerpos contra SIRT1 para demostrar la menor expresión de SIRT1 en presencia de ARNm de SIRT1, que bloquea con eficacia la protección axonal dependiente de NAD.

5 La figura 5 ilustra la vía biosintética de NAD de mamífero, en la que se ilustra la biosíntesis de NAD de mamífero prevista basándose en el análisis de la expresión enzimática y en estudios en levaduras y eucariotas inferiores (abreviaturas utilizadas: QPRT, quinolinato fosforribosiltransferasa; NaPRT, ácido nicotínico fosforribosiltransferasa; NmPRT, nicotinamida fosforribosiltransferasa; Nrk nicotinamida ribósido quinasa; NMNAT, nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa; QNS, NAD sintasa).

10 La figura 6 muestra el análisis de la expresión de las enzimas biosintéticas de NAD en mamíferos, que muestra (A) la determinación de los niveles de ARNm de enzimas biosintéticas de NAD después de 1, 3, 7 y 14 días después de la transección de los nervios en DRG de rata mediante qRT-PCR, en la que el nivel de expresión se normalizó a la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en cada muestra, y se indica con relación al nivel de expresión en DRG no axotomizados; (B) la degeneración de las neuritas introducida incubando DRG en rotenona 1 o 0,1 μ M durante el tiempo indicado, y la determinación de los niveles de ARNm de las enzimas sintéticas de NAD mediante qRT-PCR según se describe en el texto.

15 La figura 7 ilustra la localización subcelular de las enzimas NMNAT y su capacidad para proteger los axones, que muestra (A) un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* empleando cultivos de explantes neuronales DRG infectados con lentivirus que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, en la que se muestran fotografías representativas tomadas a las 12 y 72 horas después de la transección; (B) la localización subcelular de NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3 en células HEK 293T empleando una inmunohistoquímica con un anticuerpo contra el marcador 6xHis para detectar cada una de las proteínas y una tinción de las células con un tinte marcador nuclear (bisbenzimidida) para la comparación, para determinar la localización nuclear o citoplásmica de cada proteína (escala de las barras = 25 μ m); (C) actividad enzimática de NMNAT1 y NMNAT3 de tipo salvaje y mutante, en la que cada proteína marcada con 6xHis se purificó a partir de un lisado de células HEK 293t que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, en la que la cantidad de NAD generado después de 1 hora a 37 °C se convirtió en NADH, se cuantificó y se normalizó a la concentración de proteínas; (D) la expresión de proteínas de NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 y nucNMNAT3 mediante una transferencia génica de lentivirus confirmada mediante un análisis de inmunotransferencia de células HEK 293T infectadas con cada uno de los virus; y (E) un ensayo de la degeneración walleriana *in vitro* que emplea cultivos de explantes neuronales DRG infectados con lentivirus que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, y muestra los datos del análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía.

20 La figura 8 muestra la aplicación exógena de sustratos biosintéticos de NAD y su capacidad para proteger a los axones, que muestra (A) un ensayo de la degeneración walleriana *in vitro* que emplea cultivos de explantes neuronales DRG después de la aplicación exógena de NAD, NmR, en la que se muestran fotografías representativas tomadas a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la transección; (B) un ensayo de la degeneración walleriana *in vitro* que emplea cultivos de explantes neuronales DRG después de la aplicación exógena de Na, Nam, NaMN, NMN, NaAD, NAD y NmR, que muestra los datos del análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía; (C) explantes neuronales DRG infectados con lentivirus que expresan NaPRT e incubados con o sin Na 1 mM durante 24 horas antes de la axotomía, en un ensayo de la degeneración walleriana *in vitro* que muestra los datos del análisis cuantitativo del número de neuritas remanentes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía.

25 La figura 9 ilustra la transección del nervio óptico después de una inyección intravitreal de los sustratos biosintéticos de NAD, NMN, NmR o Nam en el compartimento intravitreal del ojo izquierdo de ratas. Se permitió que se incorporasen a las células ganglionares retinianas durante 24 horas, tras lo cual se transeccionó el nervio óptico izquierdo mediante enucleación del ojo, y los nervios ópticos derecho e izquierdo se recogieron a los 4 días después de la transección y se analizaron mediante una transferencia Western, en la cual se emplearon los nervios ópticos transeccionados de los ratones sin ningún tratamiento anterior a la axotomía como controles negativos; en la figura se muestran los datos del análisis cuantitativo del porcentaje de inmunorreactividad de los neurofilamentos remanentes del nervio óptico transeccionado con relación al no transeccionado \pm D.E.

50 Descripción detallada

La presente invención implica el uso de un agente para el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero que lo necesite, en el que el agente es NaMN, NMN, NmR, un ácido nucleico que codifica una NMNAT o resveratrol. Se cree que un aumento en la actividad NAD puede aumentar la actividad sirtuina que, a su vez, produce una disminución en la degeneración axonal de células neuronales dañadas, comparado con la degeneración axonal que aparece en células neuronales dañadas no tratadas con el agente. Esta disminución en la degeneración axonal puede incluir una mejora completa o parcial de los daños en la neurona. También se cree que es posible que el aumento en la actividad NAD pueda actuar a través de otros mecanismos que no impliquen a moléculas de sirtuina para producir o contribuir a la producción de una disminución en la degeneración axonal.

Siete moléculas de sirtuina conocidas, denominadas SIRT, forman la familia Sir2 de histona/proteína desacetilasas en mamíferos, y todas estas moléculas de sirtuinas se incluyen dentro del alcance de la presente invención. Las siete sirtuinas humanas, SIRT1-SIRT7, son histona/proteína desacetilasas dependientes de NAD que se describen con más detalle en NCBI LocusLink ID NO:23411, 22933, 23410, 23409, 23408, 51548 y 51547, respectivamente (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>).

Las composiciones pueden aumentar la actividad de una o más de las sirtuinas y, en particular, diversos agentes de la presente invención aumentan la actividad de SIRT1.

Cuando se indica la actividad de una sustancia, se hace referencia a la concentración de la sustancia concreta o la eficacia funcional de la sustancia. La concentración de una sustancia puede aumentar por medio de numerosos factores que incluyen, por ejemplo, un aumento de la síntesis, una disminución de la degradación, un aumento de la biodisponibilidad de la sustancia, o una disminución de la unión de la sustancia, o bien un aumento de la cantidad disponible de la sustancia libre. El aumento en la eficacia funcional puede generarse, por ejemplo, a partir de un cambio en la conformación molecular, un cambio en las condiciones en las que actuó la sustancia, un cambio en la sensibilidad a la sustancia, y similares. Un aumento en la actividad con respecto a las moléculas de sirtuina significa un aumento en la concentración o una potenciación de la eficacia funcional o un aumento en la disponibilidad de NAD o un aumento en el flujo a lo largo de una o más vías biosintéticas para el NAD, o cualquiera de sus combinaciones.

Los daños axonales pueden ser provocados por lesiones traumáticas o por lesiones no mecánicas debidas a enfermedades o trastornos, y el resultado de estos daños puede ser la degeneración o la disfunción del axón y la pérdida de la actividad neuronal funcional. Las enfermedades y los trastornos que producen o que están asociados con dichos daños axonales están englobados en un gran número de enfermedades y trastornos neuropáticos. Estas neuropatías pueden incluir neuropatías periféricas, neuropatías centrales, y sus combinaciones. Además, las manifestaciones neuropáticas periféricas pueden ser producidas por enfermedades centradas principalmente en el sistema nervioso central, y las enfermedades fundamentalmente periféricas o sistémicas pueden producir manifestaciones en el sistema nervioso central.

Las neuropatías periféricas implican daños en los nervios periféricos, y estos pueden ser provocados por enfermedades de los nervios o como resultados de enfermedades sistémicas. Algunas de estas enfermedades pueden incluir diabetes, uremia, enfermedades infecciosas, tales como SIDA o lepra, deficiencias nutricionales, trastornos vasculares o del colágeno, tales como aterosclerosis, y enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico, escleroderma, sarcoidosis, artritis reumatoide y poliarteritis nodosa. La degeneración de los nervios periféricos también puede ser el resultado de daños traumáticos, concretamente mecánicos, en los nervios, así como de daños químicos o térmicos en los nervios. Los trastornos que lesionan los nervios periféricos incluyen lesiones de compresión o atrapamiento, tales como glaucoma, síndrome del túnel carpiano, traumatismos directos, lesiones penetrantes, contusiones, fracturas o huesos dislocados; una presión que implique a los nervios superficiales (ulnar, radial o peroneal) que pueden ser el resultado del uso prolongado de muletas o por mantener una posición durante mucho tiempo, o por un tumor; hemorragia intraneural; isquemia; exposición al frío o a radiación o a ciertas medicinas o sustancias tóxicas, tales como herbicidas o plaguicidas. En particular, los daños en los nervios pueden ser el resultado de lesiones químicas debidas a un agente anticáncer citotóxico tal como, por ejemplo, un vinca-alcaloide, tal como vincristina. Los síntomas típicos de estas neuropatías periféricas incluyen debilidad, entumecimiento, parestesia (sensaciones anómalas, tales como quemazón, cosquilleo, pinchazos u hormigueo) y dolor en los brazos, manos, piernas y/o pies. La neuropatía también puede estar asociada con una disfunción mitocondrial. Estas neuropatías pueden mostrar unos menores niveles de energías, es decir, unos menores niveles de NAD y ATP.

La neuropatía periférica también puede ser una neuropatía metabólica y endocrina que incluye un amplio espectro de trastornos de nervios periféricos asociados con enfermedades sistémicas de origen metabólico. Estas enfermedades, algunas de las cuales se han mencionado anteriormente, incluyen diabetes mellitus, hipoglucemia, uremia, hipotiroidismo, insuficiencia hepática, policitemia, amiloidosis, acromegalia, porfiria, trastornos del metabolismo de lípidos/glicolípidos, deficiencias nutricionales/de vitaminas, y trastornos mitocondriales, entre otros. La característica distintiva de estas enfermedades es la implicación de los nervios periféricos por medio de la alteración de la estructura o la función de la mielina y los axones debido a la desregulación de la vía metabólica.

Las neuropatías también incluyen neuropatías ópticas, tales como glaucoma; la degeneración de ganglios retinianos, tal como la asociada con la retinitis pigmentosa y las neuropatías retinianas externas; la degeneración y/o neuritis del nervio óptico, que incluye la asociada con la esclerosis múltiple; lesiones traumáticas en el nervio óptico que pueden incluir, por ejemplo, lesiones durante la retirada de un tumor; neuropatías ópticas hereditarias, tales como la enfermedad de Kjer y la neuropatía óptica hereditaria de Leber; neuropatías ópticas isquémicas, tales como las que aparecen después de una arteritis de células gigantes; neuropatías ópticas metabólicas, tales como enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la neuropatía de Leber mencionada anteriormente, deficiencias nutricionales, tales como deficiencias en la vitamina B12 o ácido fólico, y toxicidades, tales como las debidas a etambutol o cianuro; neuropatías provocadas por reacciones adversas a fármacos y neuropatías provocadas por una deficiencia en vitaminas. Las neuropatías ópticas isquémicas también incluyen la neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica.

Las enfermedades neurodegenerativas que están asociadas con la axonopatía en el sistema nervioso central incluyen una diversidad de enfermedades. Estas enfermedades incluyen las que implican una demencia progresiva tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la demencia senil, la enfermedad de Pick, y la enfermedad de Huntington; enfermedades del sistema nervioso central que afectan a la función muscular tales como, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, enfermedades de neuronas motoras y ataxias progresivas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica; enfermedades desmielinizantes tales como, por ejemplo, esclerosis múltiples; encefalitis víricas tales como, por ejemplo, las provocadas por enterovirus, arbovirus y virus del herpes simplex; y enfermedades priónicas. Las lesiones mecánicas, tales como el glaucoma o lesiones traumáticas en la cabeza y la columna vertebral también pueden provocar lesiones nerviosas y degeneración en el cerebro y la médula espinal. Además, la isquemia y el ictus, además de trastornos tales como una deficiencia nutricional y una toxicidad química, tal como la que producen agentes quimioterapéuticos, pueden provocar neuropatías del sistema nervioso central.

El término "tratamiento", tal como se emplea en la presente, incluye la intervención antes o después de la aparición de las lesiones neuronales. Como tal, un tratamiento puede evitar las lesiones neuronales mediante su administración antes de que se produzca un primer ataque a las neuronas, y también puede mejorar las lesiones neuronales mediante su administración después de que se produzca un primer ataque a las neuronas. Este primer ataque a las neuronas puede incluir o puede ser el resultado de cualquier enfermedad o trastorno asociado con una neuropatía. Un "tratamiento" también incluye la prevención del avance de una lesión neuronal. Un "tratamiento", tal como se emplea en la presente, puede incluir la administración de fármacos y/o sustancias sintéticas, la administración de sustancias biológicas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, vectores víricos y similares, así como la administración de sustancias, tales como neutraceuticos, aditivos alimentarios o alimentos funcionales.

Los agentes de la presente invención son útiles para tratar mamíferos. Estos mamíferos incluyen seres humanos, así como mamíferos no humanos. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, animales de compañía, tales como perros y gatos, animales agrícolas, tales como ganado, que incluye vacas, caballos y similares, y animales exóticos, tales como animales de zoológico.

Las sustancias que pueden aumentar la actividad sirtuina en mamíferos pueden incluir polifenoles, algunos de los cuales han sido descritos anteriormente (véase, por ejemplo, Howitz et al., *Nature*, 425:191-196, 2003, y la información suplementaria incluida en el artículo). Estos compuestos pueden incluir estilbenos, tales como resveratrol, piceatanol, deoxirrapontina, *trans*-estilbeno y rapontina; chalconas, tales como buteína, isoliquiritigeno y 3,4,2',4',6'-pentahidroxichalcona y chalcona; flavonas, tales como fisetina, 5,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona, luteolina, 3,6,3',4'-tetrahidroxiflavona, quercetina, 7,3',4',5'-tetrahidroxiflavona, kaempferol, 6-hidroxiapigenina, apigenina, 3,6,2',4'-tetrahidroxiflavona, 7,4'-dihidroxiflavona, 7,8,3',4'-tetrahidroxiflavona, 3,6,2',3'-tetrahidroxiflavona, 4'-hidroxiflavona, 5,4'-dihidroxiflavona, 5,7-dihidroxiflavona, morina, flavona y 5-hidroxiflavona; isoflavonas, tales como daidzeína y genisteína; flavanonas, tales como naringenina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavanona, y flavanona o catequinas, tales como (-)-epicatequina, (-)-catequina, (-)-gallocatequina, (+)-catequina y (+)-epicatequina.

Pueden identificarse otros polifenoles u otras sustancias que aumenten la actividad sirtuina desacetilasa empleando sistemas de ensayo descritos en la presente, así como en ensayos disponibles en el mercado, tales como ensayos de enzimas fluorescentes (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, Pensilvania). Sinclair et al. también describen sustancias que pueden aumentar la actividad sirtuina (Sinclair et al., documento WO2005/02672).

Otras sustancias pueden aumentar la actividad sirtuina de modo indirecto aumentando la actividad NAD como resultado de que la sirtuina concreta actúe a través de una actividad histona/proteína desacetilasa dependiente de NAD. La actividad NAD puede aumentar mediante la administración de NAD o NADH, así como por la síntesis de NAD. El NAD puede sintetizarse por medio de tres vías principales: la vía *de novo*, en la que el NAD se sintetiza a partir del triptófano; la vía de reciclaje del NAD, en la que el NAD se genera recirculando productos de NAD degradados, tales como nicotinamida (Lin et al., *Current Opin. Cell Biol.*, 15:241-246, 2003; Magni et al., *Cell Mol. Life. Sci.*, 61:19-34, 2004); y la vía de la nicotinamida ribósido quinasa, en la que la nicotinamida ribósido es convertida en nicotinamida mononucleótido por la nicotinamida ribósido quinasa (Bieganowski et al., *Cell*, 117:495-502, 2004). Así, la administración a neuronas dañadas de un precursor de NAD en la vía *de novo* tal como, por ejemplo, triptófano o nicotinato y/o sustancias en la vía de reciclaje del NAD tales como, por ejemplo, nicotinamida, ácido nicotínico, ácido nicotínico mononucleótido o desamido-NAD y/o sustancias en la vía de la nicotinamida ribósido quinasa tales como, por ejemplo, nicotinamida ribósido o nicotinamida mononucleótido, puede aumentar potencialmente la actividad NAD. Tal como se muestra a continuación, la nicotinamida mononucleótido, el ácido nicotínico mononucleótido o la nicotinamida ribósido, además del NAD, protegen frente a la degeneración axonal en un grado similar al NAD, pero el ácido nicotínico y la nicotinamida no producen este efecto. La mayor actividad NAD después puede aumentar la actividad histona/proteína desacetilasa de la sirtuina en las neuronas dañadas y disminuir o prevenir la degeneración axonal. Además, se cree que otras sustancias pueden actuar aumentando la actividad enzimática o aumentando los niveles de NAD, nicotinamida mononucleótido, ácido nicotínico mononucleótido, nicotinamida ribósido o enzimas de sirtuina, o disminuyendo la degradación de NAD, nicotinamida mononucleótido, ácido nicotínico mononucleótido, nicotinamida ribósido o enzimas de sirtuina.

El NAD puede aumentar en las neuronas dañadas mediante la administración de enzimas que sintetizan NAD, o ácidos nucleicos que comprenden enzimas que sintetizan NAD. Estas enzimas pueden incluir una enzima en la vía *de novo* para sintetizar NAD, una enzima de la vía de reciclaje del NAD, o una enzima de la vía de la nicotinamida

ribósido quinasa, o un ácido nucleico que codifique una enzima en la vía *de novo* para sintetizar NAD, una enzima de la vía de reciclaje del NAD o una enzima de la vía de la nicotinamida ribósido quinasa y, en concreto, una enzima de la vía de reciclaje del NAD tal como, por ejemplo, una nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (NMNAT), tal como NMNAT1. Así, en un ejemplo no limitante, la administración de una NMNAT, tal como NMNAT1 o NMNAT3, o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una NMNAT, tal como NMNAT1 o NMNAT3, puede disminuir o prevenir la degeneración axonal en neuronas dañadas.

La enzima NMNAT1 humana (E.C.2.7.7.18) está representada por el número de registro de GenBank para el gen/proteína NMNAT1 humano: NP_073624; NM_022787; AAL76934; AF459819; y NP_073624; AF314163. Un variante de este gen es NMNAT-2 (KIAA0479), cuya versión humana puede encontrarse en los números de registro de GenBank NP_055854 y NM_015039.

Tal como se emplean en la presente, las expresiones “porcentaje idéntico”, “porcentaje de identidad” o “% de identidad” se refieren a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. La identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede ser alineada para la comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo resto aminoácido u otro similar (por ejemplo, similar según su naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas se pueden denominar homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología, similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden utilizarse diversos programas y/o algoritmos de alineamiento, que incluyen FASTA, BLAST, o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.) y pueden utilizarse, por ejemplo, con los parámetros por defecto. ENTREZ está disponible en the National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. El porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse mediante el programa GCG con una ponderación de hueco de 1, por ejemplo, cada hueco de aminoácido se pondera como si fuera un único desapareamiento de aminoácido o nucleótido entre las dos secuencias. Otras técnicas para el alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., EEUU. Preferiblemente, se utiliza un programa de alineamiento que permita huecos en la secuencia para alinear las secuencias. El algoritmo de Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en los alineamientos de las secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.*, 70: 173-187 (1997). Además puede utilizarse el programa GAP que emplea el método de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa emplea el software MPSRCH, que se desarrolla en un ordenador MASPAR. MPSRCH emplea un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar las secuencias en un ordenador masivamente en paralelo. Esta estrategia mejora la capacidad para detectar apareamientos lejanamente relacionados, y es especialmente tolerante con huecos pequeños y errores en la secuencia de nucleótidos. Las secuencias de aminoácidos codificados por ácidos nucleicos pueden emplearse para buscar en bases de datos de proteínas y de ADN. Las bases de datos con secuencias individuales se describen en *Methods in Enzymology*, ed. Doolittle, *supra*. Las bases de datos incluyen Genbank, EMBL, y las bases de datos de ADN de Japón (DNA Database of Japan, DDBJ).

Un “variante” de un polipéptido se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del polipéptido pero está alterada en uno o más restos aminoácidos. El variante puede presentar cambios “conservativos”, en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina). Un variante puede presentar cambios “no conservativos” (por ejemplo, la sustitución de glicina por triptófano). Otras variaciones pequeñas análogas pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambos. Pueden encontrarse directrices para determinar cuáles son los restos aminoácidos que pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse sin abolir la actividad biológica o inmunológica empleando programas informáticos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, el software LASERGENE (DNASTAR).

El término “variante”, cuando se emplea en el contexto de una secuencia polinucleotídica, puede incluir una secuencia polinucleotídica relacionada con la de un gen concreto o su secuencia codificadora. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes “alélicas”, “de corte y empalme”, “de especie” o “polimórficos”. Un variante de corte y empalme puede presentar una identidad significativa con una molécula de referencia, pero en general presentará un número mayor o menor de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativo de exones durante el procesamiento del ARNm. El correspondiente polipéptido puede presentar dominios funcionales adicionales o pueden faltar dominios. Los variantes de especie son secuencias polinucleotídicas que varían de una especie a otra. Los polipéptidos resultantes generalmente presentarán una significativa identidad de aminoácidos entre sí. Una variación polimórfica es una variación en la secuencia polinucleotídica de un gen concreto entre individuos de una especie concreta. Los variantes polimórficos también pueden incluir los “polimorfismos de un único nucleótido” (SNP), en los que la secuencia polinucleotídica varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa, por ejemplo, de una cierta población, un estado de enfermedad, o una propensión para desarrollar un estado de enfermedad.

Un agente que puede utilizarse para tratar o prevenir una neuropatía según la presente invención puede estar formado por un polinucleótido que codifique una NMNAT. En particular, el agente puede ser una enzima que tenga

actividad NMNAT y al menos 50% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 50% de identidad con una NMNAT3 humana, o al menos 60% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 60% de identidad con una NMNAT3 humana, o al menos 70% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 70% de identidad con una NMNAT3 humana, o al menos 80% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 80% de identidad con una NMNAT3 humana, o al menos 90% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 90% de identidad con una NMNAT3 humana, o al menos 95% de identidad con una NMANT1 humana o al menos 95% de identidad con una NMNAT3 humana. Además, el agente puede estar formado por una NMNAT1 humana, una NMNAT3 humana o uno de sus variantes sustituidos de modo conservativo.

El agente también puede estar formado por un polinucleótido que tenga al menos 50% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 50% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tenga al menos 60% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 60% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tenga al menos 70% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 70% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tenga al menos 80% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 80% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tenga al menos 90% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 90% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tenga al menos 95% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tenga al menos 95% de identidad con un ácido nucleico que codifique una NMNAT3 humana. El agente también puede ser un polinucleótido que codifique una NMNAT1 humana, una NMNAT3 humana o uno de sus variantes.

La administración puede realizarse mediante cualquier vía de administración adecuada, que incluye bucal, dental, endocervical, intramuscular, inhalación, intracraneal, intralinfática, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrapleural, intratecal, intratraqueal, intrauterina, intravascular, intravenosa, intravesical, intranasal, oftálmica, oral, ótica, perfusión biliar, perfusión cardíaca, periodontal, rectal, espinal, subcutánea, sublingual, tópica, intravaginal, transdérmica, ureteral, o uretral. Las formas de dosificación pueden ser aerosoles, que incluyen un aerosol dosimétrico, barras masticables, cápsulas, cápsulas que contienen gránulos revestidos, cápsulas que contienen gránulos de liberación retrasada, cápsulas que contienen gránulos de liberación extendida, concentrados, cremas, cremas aumentadas, cremas de supositorios, discos, vendas, elixires, emulsiones, enemas, fibras de liberación extendida, películas de liberación extendida, gases, geles, geles dosimétricos, gránulos, gránulos de liberación retrasada, gránulos efervescentes, gomas de mascar, implantes, inhalantes, inyectables, complejos de lípidos inyectables, liposomas inyectables, insertos, insertos de liberación extendida, dispositivos intrauterinos, gelatinas, líquidos, líquidos de liberación extendida, lociones, lociones aumentadas, lociones de champú, aceites, ungüentos, ungüentos aumentados, pastas, pastillas, gránulos, polvos, polvos de liberación extendida, polvos dosimétricos, anillos, champús, disoluciones de jabón, disoluciones para barros, disoluciones/gotas, disoluciones concentradas, disoluciones/gotas formadoras de gel, esponjas, pulverizados, pulverizados dosimétricos, supositorios, suspensiones, suspensiones/gotas, suspensiones de liberación extendida, torundas, jarabes, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos que contienen partículas revestidas, comprimidos de liberación retrasada, comprimidos dispersables, comprimidos efervescentes, comprimidos de liberación extendida, comprimidos de disgregación oral, tampónes, cintas o trociscos/pastillas para chupar.

La administración intraocular puede incluir la administración mediante inyección, que incluye una inyección intravitreal, mediante colirio y mediante administración transescleral.

La administración también puede realizarse mediante la inclusión en la dieta del mamífero, tal como en un alimento funcional para seres humanos o animales de compañía.

También se contempla que ciertas formulaciones que contienen las composiciones que aumentan la actividad sirtuina se administren por vía oral. Estas formulaciones preferiblemente se encapsulan y se formulan con vehículos adecuados en formas de dosificación sólidas. Algunos ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, gelatina, jarabe, metilcelulosa, metil- y propilhidroxibenzoatos, talco, estearato de magnesio, agua, aceite mineral, y similares. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulgentes y suspensorios, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retrasada de los ingredientes activos después de su administración al paciente empleando procedimientos muy conocidos en la técnica. Las formulaciones también pueden contener sustancias que disminuyan la degradación proteolítica y estimulen la absorción tales como, por ejemplo, agentes tensioactivos.

La dosis específica puede calcularse según el peso corporal aproximado o la superficie específica corporal del paciente o el volumen del espacio corporal que va a ser ocupado. La dosis también dependerá de la vía de administración concreta seleccionada. Los expertos en la técnica normalmente pueden refinar aún más los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento. Los expertos en la técnica pueden realizar

estos cálculos sin experimentación innecesaria a la luz de la actividad en las preparaciones de ensayo, tal como se se ha descrito en otros documentos para ciertos compuestos (véase, por ejemplo, Howitz et al., *Nature*, 425:191-196, 2003, y la información suplementaria que acompaña al artículo). Las dosificaciones exactas pueden determinarse junto con estudios de respuesta a la dosis convencionales. Se entenderá que la cantidad de composición que realmente se administra será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, que incluyen el trastorno o trastornos que se van a tratar, la composición elegida para ser administrada, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente, y la vía de administración elegida.

La invención se entenderá más a fondo haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

10 Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que axones transeccionados de neuronas transfectadas con un vector que expresa la proteína Wld^s muestran una degeneración retrasada, comparado con neuronas control.

En ratones *wld^f*, se ha demostrado que la degeneración walleriana en respuesta a daños axonales se retrasa (Gillingwater, et al., *J. Physiol.*, 534:627-639, 2001). Los análisis genéticos han demostrado que la mutación *wld^f* comprende una triplicación en tándem de 85 kb, que resulta en la sobreexpresión de una molécula nuclear quimérica (proteína Wld^s). Esta proteína está compuesta por 70 aa N-terminales de Ufd(proteína de degradación de fusión de ubiquitina)2a, un factor de ensamblaje de la cadena de ubiquitina, condensado con la secuencia completa de la nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa-1 (NMNAT1), una enzima en la vía de reciclaje del NAD que genera NAD dentro del núcleo. La proteína Wld^s tiene actividad NMNAT, pero carece de función ubiquitina ligasa, lo cual sugiere que la protección axonal se deriva de una mayor actividad NMNAT1 o de una inhibición "dominante negativa" de la función Ufd2a.

Para identificar el mecanismo de la degeneración axonal retrasada mediada por la proteína Wld^s, los inventores emplearon un modelo de degeneración walleriana *in vitro*. Se infectaron neuronas de explantes de DRG primarios con lentivirus que expresan las proteínas apropiadas, y los axones se dañaron mediante la eliminación del cuerpo celular neuronal (transección) o mediante el crecimiento en vincristina (tóxica).

Las construcciones de expresión lentivíricas fueron un amable regalo de D. Baltimore (Lois, et al., *Science*, 295:868-72, 2002). Los inventores modificaron el vector FUGW para generar un vector lanzadera de expresión general FUIV (YFP potenciado con IRES-gen de interés-promotor de ubiquitina (Venus)) que permite la expresión potenciada de YFP en células que expresan el gen de interés. Se clonaron las siguientes proteínas, cada una con un marcador de hexahistidina en el C-terminal, en el vector FUIV: proteína mutante quimérica Wld^s; Ufd2a que contiene una mutación puntual (P1140A), que previamente ha demostrado inhibir la función de Ufd2a de tipo salvaje como un "dominante-negativo" (Ufd2a(P1140)). Los siguientes genes se clonaron en el vector FUGW: 1) los primeros 70 aa de Ufd2a (la porción contenida en la proteína Wld^s) condensados con el N-terminal de EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP) o EGFP con una señal de localización nuclear en el C-terminal (Ufd2a(1-70)-nucEGFP); 2) la porción NMNAT1 de la proteína Wld^s condensada con el C-terminal de EGFP (EGFP-NMNAT1).

El ADNc murino para Ufd2a/Ube4b (mKIAA0684) fue proporcionado por Kazusa DNA Research Institute. Los ADNc murinos para NMNAT1 (n.º de registro: BC038133) se adquirieron en ATCC. Se empleó una mutagénesis mediada por PCR para generar mutaciones puntuales en Ufd2a, NMNAT1 y Wld^s.

Los inventores generaron construcciones de ARNmc en el vector FSP-si generado a partir del esqueleto de FUGW mediante la sustitución del promotor de ubiquitina y el ADNc de GFP por el promotor U6 humano y la señal de terminación Po1 I, seguido del promotor de SV40-gen de la puromicina-N-acetiltransferasa. La clonación de la construcción de ARNsi se realizó como se ha sido descrito previamente, de modo que el ARNmc se transcribe a partir del promotor U6 (Castanotto, et al., *RNA*, 8:1454-60, 2002). Las secuencias utilizadas para la infrarregulación del ARNmc de la expresión de proteínas fueron 1692-1710 de SIRT1, 1032-1050 de SIRT2, 538-556 de SIRT3, 1231-1249 de SIRT4, 37-55 de SIRT5, 1390-1408 de SIRT6, y 450-468 de SIRT7. La integridad de cada construcción de expresión lentivírico y de ARNmc se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Se cultivaron explantes de DRG de ratón a partir de embriones E12.5 en presencia del factor de crecimiento nervioso 1 nM. Las células no neuronales se retiraron de los cultivos añadiendo 5-fluorouracilo al medio de cultivo. La transección de las neuritas se realizó a 10-20 DIV utilizando una aguja de calibre 18 para retirar los cuerpos celulares neuronales. Se realizó una incubación con β -nicotinamida adenina dinucleótido (Sigma) o sirtinol (Calbiochem) utilizando las condiciones indicadas en el texto o en las figuras.

Se generaron vectores de expresión lentivíricos utilizando células HEK293T según se describió anteriormente. Para la confirmación de la expresión de proteínas derivadas de lentivirus, las células HEK293T se infectaron con lentivirus y las células se lisaron 3 días después de la infección. Estos lisados se analizaron mediante una inmunotransferencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-marcador de His (Qiagen) para detectar la expresión de las respectivas proteínas marcadas con hexahistidina. La infección lentivírica de las neuronas DRG se realizó incubando aproximadamente 10^6 - 10^7 pfu/ml de virus con el explante de DRG durante 24 h, comenzando 3-7 días antes de la transección axonal. Las neuronas infectadas se estudiaron en un microscopio fluorescente invertido para

asegurar la expresión del transgén mediada por lentivirus detectable en >95% de las neuronas.

Se realizó un análisis cuantitativo de la degeneración axonal como se ha descrito previamente (Zhai, et al., *Neuron*, 39:217-25, 2003). Brevemente, los cultivos se estudiaron utilizando microscopía de contraste de fase en los momentos indicados. Los axones con aspecto fragmentado, no refractantes, se denominaron “degenerados”. En cada uno de los momentos, al menos 200 axones distinguibles individualmente fueron puntuados de modo ciego a partir de varias imágenes tomadas aleatoriamente de cada cultivo. Cada condición se ensayó en explantes por triplicado en cada experimento. Se obtuvieron resultados de 2-4 experimentos independientes para cada condición. Se realizó un análisis estadístico mediante un ensayo de la t de Student. Para los cálculos del área cubierta por neuritas, se analizaron imágenes capturadas de modo digital procedentes de muestras por cuadruplicado de dos experimentos independientes utilizando un software de análisis 3.1 (Soft Imaging System, Lakewood, CO).

Los inventores descubrieron que los axones transfectados de neuronas que expresan la proteína *Wld^s* se degeneraron con la cinética retrasada característica de las neuronas derivadas de ratones *wld^s* (Buckmaster, et al., *Eur. J. Neurosci.*, 7:1596-602, 1995), según se muestra en la figura 1A.

Después, los inventores compararon la degeneración axonal después de la transección en neuronas que sobreexpresan la proteína *Wld^s*, con las que expresan las porciones *Ufd2a* o *NMNAT1* que forman la proteína *Wld^s* unida a EGFP. Los resultados se muestran en la figura 1B.

Los inventores descubrieron que la expresión de EGFP-NMNAT1 retrasa la degeneración axonal de una manera comparable a la propia proteína *Wld^s*, mientras que los 70 aa N-terminales de *Ufd2a* (condensados con EGFP), dirigidos al núcleo o al citoplasma, no afectaron a la degeneración axonal. La cuantificación de estos efectos se realizó contando el porcentaje de neuritas remanentes en diversos momentos después de la retirada de los cuerpos celulares neuronales. Este análisis muestra que EGFP-NMNAT1, al igual que la propia proteína *Wld^s*, produce un aumento en más de 10 veces en las neuritas intactas 72 h después del daño. Para excluir también la implicación directa de UPS en la protección axonal mediada por la proteína *Wld^s*, los inventores estudiaron el efecto de la inhibición de *Ufd2a* utilizando un mutante *Ufd2a* dominante-negativo o una construcción de ARNm de *Ufd2a*. Sin embargo, ninguno de estos métodos produce una degradación axonal retrasada en respuesta a una axotomía. Juntos, estos experimentos demuestran que la porción NMNAT1 de la proteína *Wld^s* es responsable de la degeneración axonal retrasada observada en ratones *wld^s*.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que las mutaciones en la proteína NMNAT1 de longitud completa y en *Wld^s* abolen los efectos protectores axonales de las proteínas.

La NMNAT1 es una enzima en la vía de reciclaje del NAD nuclear que cataliza la conversión de nicotinamida mononucleótido (NMN) y nicotinato mononucleótido (NaMN) en NAD y nicotinato adenina mononucleótido (NaAD), respectivamente. La protección axonal observada en neuronas que sobreexpresan NMNAT1 puede estar inducida por su capacidad para sintetizar NAD (es decir, su actividad enzimática) o quizá por otras funciones desconocidas de esta proteína. Para tratar esta cuestión, los inventores utilizaron la estructura cristalina de NMNAT1 para identificar varios restos que se piensa que participan en la unión al sustrato. Se introdujo una mutación en uno de estos restos (W170A) en la proteína NMNAT1 de longitud completa y en *Wld^s*. Los ensayos enzimáticos *in vitro* confirmaron que en ambas proteínas mutantes se limitó enormemente su capacidad para sintetizar NAD (figura 2A). Cada uno de estos mutantes y sus respectivos homólogos de tipo salvaje se introdujeron en neuronas para evaluar su capacidad para proteger a los axones frente a la degradación. Los inventores descubrieron que las neuronas que expresan estos mutantes enzimáticamente inactivos no presentaban efectos protectores axonales (figura 2A), lo cual indica que la producción de NAD/NaAD es responsable de la capacidad de NMNAT1 para prevenir la degradación axonal.

Ejemplo 3

Este ejemplo muestra que una mayor actividad NMNAT en neuronas dañadas con vincristina también produce una degradación axonal retrasada.

Además de la transección mecánica, también se observó protección axonal en ratones *wld^s* frente a otros agentes causantes de daño, tales como isquemia y toxinas (Coleman, et al., *Trends Neurosci.*, 25:532-37, 2002; Gillingwater, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 24:62-66, 2004). Los inventores intentaron determinar si una mayor actividad NMNAT también retrasaría la degradación axonal en respuesta a otros tipos de lesiones axonales, tales como vincristina, un reactivo quimioterapéutico del cáncer con toxicidad axonal bien caracterizada. Se cultivaron neuronas que expresaban NMNAT1 o EGFP (control) en vincristina 0,5 μ M hasta 9 días. Los inventores descubrieron que los axones de las neuronas que expresan NMNAT1 mantienen su longitud y refractibilidad original, mientras que los axones que emanan de neuronas que expresan EGFP gradualmente se retrajeron y en gran parte se habían degenerado para el día 9 (figura 2B). Estos resultados indican que la actividad NMNAT por sí sola puede proteger a los axones frente a una serie de ataques e induce los efectos protectores observados en ratones *wld^s*.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra que el NAD administrado de forma exógena puede proteger a las neuronas dañadas frente a la degeneración axonal.

5 Experimentos previos han demostrado que las células neuronales expresan proteínas de membrana que se pueden unir a NAD y transportar el NAD extracelular hacia el interior de la célula (Bruzzone, et al., Faseb J., 15:10-12, 2001). Esto animó a los inventores a investigar si el NAD administrado de forma exógena podría prevenir la degeneración axonal. Se añadieron diversas concentraciones de NAD a cultivos neuronales antes de la transección axonal y se estudió el grado de degradación axonal. Se descubrió que NAD 0,1-1 mM añadido 24 horas antes de la axotomía retrasa significativamente la degeneración axonal, aunque el NAD aplicado de forma exógena resultaba ligeramente menos eficaz para proteger a los axones que la expresión de NMNAT1 inducida por lentivirus (figura 3A). Estos resultados proporcionan un apoyo directo a la idea de que un mayor suministro de NAD puede prevenir la degradación axonal.

Ejemplo 5

15 Este ejemplo demuestra que es necesario NAD antes de la eliminación de los cuerpos celulares neuronales para proteger a las neuronas dañadas frente a la degeneración axonal.

Para aumentar la comprensión del mecanismo de la protección axonal dependiente de NAD (NDAP), los inventores indagaron en si era necesario el NAD antes de la eliminación de los cuerpos celulares neuronales, o si la exposición directa de los axones seccionados a unos niveles altos de NAD resultaba suficiente para proporcionar protección (figura 3B). Se prepararon cultivos neuronales y se añadió NAD 1 mM al medio de cultivo en el momento de la transección axonal o en diversos momentos (4 a 48 hr) antes de producir los daños.

Los inventores descubrieron que la administración de NAD en el momento de la transección axonal o hasta 8 hr antes de los daños no tenía efectos protectores sobre los axones. Sin embargo, se observó una significativa protección de los axones cuando las neuronas fueron incubadas con NAD durante periodos de tiempo más largos antes de los daños, produciéndose los mayores efectos después de al menos 24 h de pretratamiento con NAD. Estos resultados indican que la protección axonal dependiente de NAD no es inducida por una modificación postraduccional rápida dentro de los propios axones.

La necesidad de una exposición prolongada a NAD de las neuronas intactas para prevenir la degradación axonal en respuesta a daños sugiere que el proceso protector requiere acontecimientos transcripcionales y/o traduccionales *de novo*. De modo interesante, tanto la proteína Wld^s como NMNAT1 están localizadas dentro del núcleo (los datos no se muestran). De modo similar, la mayoría de las enzimas que forman la vía de reciclaje del NAD en levaduras también están compartimentalizadas en el núcleo. Los inventores compararon los niveles de NAD en neuronas DRG que expresan NMNAT1 y el tipo salvaje utilizando ensayos enzimáticos a microescala sensibles (Szabo, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:1753-58, 1996), aunque no se descubrieron cambios en los niveles globales de NAD celular (los datos no se muestran). Esto resulta similar a las observaciones en levaduras, en las que la activación de esta vía nuclear no cambia los niveles globales de NAD (Anderson, et al., J. Biol. Chem., 277:18881-90, 2002; Huh, et al., Nature, 425:686-91, 2003). Además, los niveles del NAD tisular en el cerebro de ratones de tipo salvaje y *wld^s* son similares a pesar de los mayores niveles de actividad NMNAT en ratones *wld^s* (Mack, et al., Nat. Neurosci., 4:1199-206, 2001). Estos datos sugieren que es probable que una actividad enzimática dependiente de NAD en el núcleo, en oposición a procesos dependientes del NAD citoplásmicos, induzca la protección axonal observada en respuesta a una mayor actividad NMNAT.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que la inhibición de Sir2 está implicada en la protección axonal dependiente de NAD.

La familia Sir2 de proteína desacetilasas y poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) desarrolla la principal actividad enzimática nuclear dependiente de NAD. Sir2 es una desacetilasa de histonas y otras proteínas dependiente de NAD, y su activación es fundamental para estimular una mayor longevidad en levaduras y *C. elegans* (Bitterman, et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67:376-99, 2003; Hekimi, et al., Science, 299: 1351-54, 2003). PARP es activada por daños en el ADN y está implicada en la reparación del ADN (S.D. Skaper, Ann. NY Acad. Sci., 993:217-28 y 287-88, 2003). Estas enzimas, en particular las proteínas Sir2, han generado un gran interés en años recientes, puesto que proporcionan una conexión potencial entre la restricción calórica y sus efectos sobre el proceso de envejecimiento. La importancia de estas enzimas dependientes de NAD en la regulación de la actividad génica empujó a los inventores a investigar su papel en el proceso autodestructivo de la degradación axonal. Por tanto, los inventores estudiaron si los inhibidores de Sir2 (sirtinol) y PARP (3-aminobenzamida (3AB)) podrían afectar a la protección axonal dependiente de NAD (NDAP) (figura 4A). Se cultivaron neuronas en presencia de NAD 1 mM y sirtinol (100 μM) o 3AB (20 mM). Se realizó la transección axonal mediante la eliminación de los cuerpos celulares neuronales y se evaluó el grado de degradación axonal de 12 a 72 horas después. Se descubrió que el sirtinol bloqueaba la NDAP con eficacia, lo cual indica que es probable que las proteínas Sir2 sean efectores de este proceso. Por contraste, 3AB no produjo ningún efecto sobre NDAP, lo cual indica que PARP no desempeña un papel en la protección axonal. Para estudiar más a fondo el papel de las proteínas Sir2 en NDAP, los inventores ensayaron los

efectos de resveratrol (10-100 μ M), un compuesto de polifenol que potencia la actividad Sir2 (Howitz, et al., Nature, 425:191-96, 2003). Se descubrió que las neuronas tratadas con resveratrol antes de la axotomía mostraban una disminución en la degradación axonal que era comparable a la obtenida utilizando NAD (figura 4A), lo cual proporciona aún más apoyo a la idea de que las proteínas Sir2 son efectores de la protección axonal inducida por una mayor actividad NMNAT.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que SIRT1 está implicada en la protección axonal dependiente de NAD.

En seres humanos y roedores se han identificado siete moléculas que comparten el dominio conservado Sir2 (sirtuina(SIRT)1 a 7), aunque algunas de estas proteínas no parecen tener actividad histona/proteína desacetilasa (Buck, et al., J. Leukoc. Biol., S0741-5400, 2004). SIRT1 está localizada en el núcleo y está implicada en la remodelación de la cromatina y en la regulación de factores de la transcripción, tales como p53 (J. Smith, Trends Cell. Biol., 12:404-406, 2002). La localización celular de otras proteínas SIRT no está tan clara, pero se han encontrado algunas en el citoplasma y en mitocondrias. Para determinar cuáles de las proteínas SIRT están implicadas en la protección axonal dependiente de NAD, los inventores realizaron experimentos de inactivación empleando construcciones de ARNmc dirigidas específicamente a cada miembro de la familia SIRT. Se infectaron neuronas con lentivirus que expresaban construcciones de ARNmc de SIRT específicas que suprimen con eficacia la expresión de su diana prevista (figura 4B). Las neuronas infectadas se cultivaron en NAD 1 mM y se realizó la transección axonal eliminando los cuerpos celulares. Se descubrió que la construcción de ARNmc de SIRT1 era tan eficaz para bloquear los efectos protectores axonales de NAD como el inhibidor sirtinol. Por contraste, la inhibición de las otras proteínas SIRT no produjo efectos significativos sobre NDAP (figura 4B). Estos resultados indican que SIRT1 es el principal efector del mayor suministro de NAD que evita, de modo eficaz, la autodestrucción axonal. Aunque SIRT1 puede desacetilar las proteínas directamente implicadas en la estabilidad axonal, su localización predominantemente nuclear, junto con la necesidad de la presencia de NAD aproximadamente 24 horas antes de los daños para lograr una protección eficaz, sugiere que SIRT1 regula un programa genético que conduce a la protección axonal.

La degeneración axonal es un fenómeno autodestructivo activo observado no solo después de los daños y en respuesta a la quimioterapia, sino también asociado con el envejecimiento, enfermedades metabólicas tales como la neuropatía diabética, y enfermedades neurodegenerativas. Los resultados de los inventores indican que el mecanismo molecular de la protección axonal en ratones *wld^s* es debido al mayor suministro de NAD que resulta de una mayor actividad de la vía de reciclaje del NAD y la consecuente activación de la histona/proteína desacetilasa SIRT1.

Ejemplos 8-11

En los ejemplos 8-11 se emplearon los siguientes materiales y métodos.

Construcción de los plásmidos de expresión y mutagénesis. Las regiones codificadoras de las enzimas biosintéticas de NAD se amplificaron con PCR a partir de clones EST BC038133 para la NMNAT1 murina, y BC005737 para la nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa-3 (NMNAT3) murina, utilizando herculasa (Stratagene). El ADNc de la NAD sintetasa humana (QNS) marcado con hexahistidina fue proporcionado amablemente por Dr. N. Hara (Shimane University, Shimane, Japón). El marcador de hexahistidina se añadió al extremo 3' de cada ADNc. El mutante citosólico de NMNAT1 (cytNMNAT1) se generó mediante una mutagénesis específica dirigida a sitio por medio de PCR. La forma nuclear de NMNAT3 (nucNMNAT3) se generó añadiendo una señal de localización nuclear al extremo C-terminal de NMNAT3. Cada fragmento de la enzima sintética de NAD amplificado por PCR se clonó en un vector lanzadera lentivírico FCIV según se describió previamente. La totalidad de las construcciones se secuenció utilizando kits de secuenciación de ciclos *Taq* DyeDeoxy Terminator (Applied Biosystems) y un secuenciador de ADN Applied Biosystems 373.

Sustratos biosintéticos de NAD. Todos los sustratos para las enzimas biosintéticas de NAD se obtuvieron en Sigma (Na, Nam, NMN, NaMN, ácido nicotínico adenina dinucleótido (NaAD) y NAD). Se sintetizó NmR a partir de NMN. La conversión de NMN a NmR fue confirmada mediante HPLC (Waters) utilizando una columna de fase inversa LC-18T (Supelco). NmR eluye en 260 ± 10 segundos, y NMN eluye en 150 ± 10 segundos con un caudal de 1 ml/min de tampón que contiene K_2HPO_4 50 mM y KH_2PO_4 50 mM (pH 7,0). Se evaluó la actividad biológica de NmR tal como se describió previamente utilizando cepas de levadura proporcionadas amablemente por el Dr. Charles Brenner (Dartmouth Medical School, New Hampshire, EEUU).

Análisis de PCR de transcripción inversa cuantitativo a tiempo real. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron según las directrices de the National Institute of Health para el cuidado y el uso de animales de laboratorio en Washington University. Para los análisis de expresión después de los daños nerviosos, los nervios ciáticos de un ratón C57BL/6 se cortaron y L4 a L5. Se recogieron los DRG en los momentos indicados y se reunieron para extraer el ARN. Se cultivaron explantes de DRG de rata a partir de un embrión E14.5 durante 14 días según el método descrito y se cultivaron con medio que contenía vincristina 10 nM durante el periodo indicado y se extrajo el ARN. Se preparó el ARN total de la fuente de tejidos reunidos o de los cultivos de explantes de DRG. Se

prepararon moldes de ADNc de primera hebra a partir de 1 µg de cada ARN utilizando métodos convencionales. Se realizaron dos síntesis de ADNc independientes para cada muestra de ARN. Se realizó una PCR-(RT) de transcripción inversa cuantitativa controlando a tiempo real el aumento en la fluorescencia del tinte SYBR-GREEN en un sistema de detección de secuencias TaqMan 7700 (Applied Biosystems).

5 *Cultivo celular, axotomía in vitro, y cuantificación de la degeneración axonal.* Se cultivaron explantes de DRG de ratón a partir de embriones E12.5 en DMEM que contenía FCS al 10% y factor de crecimiento nervioso 1 nM. Se retiraron las células no neuronales de los cultivos añadiendo 5-fluorouracilo al medio de cultivo. La transección de las neuritas se realizó en 14-21 DIV utilizando una aguja de calibre 18 para eliminar los cuerpos celulares neuronales. Se generaron vectores de expresión lentivíricos. La infección lentivírica se realizó de 3-7 días antes de la transección axonal durante 24 horas. Se realizó un análisis cuantitativo de la degeneración de las neuritas.

10 *Determinación de la expresión de proteínas y localización.* Para la confirmación de la expresión de las proteínas se infectaron células HEK293T con un virus que expresa cada una de las enzimas biosintéticas de NAD. Las células se lisaron 5 días después de la inyección para ser analizadas mediante una inmunotransferencia para detectar la expresión de cada proteína con un marcador de hexahistidina por medio de un anticuerpo monoclonal anti-marcador de 6xHis (R&D Systems). Se analizó la localización subcelular de cada proteína utilizando células HEK293T transfectadas provisionalmente con un vector lanzadera vírico para cada enzima biosintética de NAD. Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS que contenía Tween-20 al 0,1% (PBS-T) y se incubaron con PBS-T que contenía BSA al 5% durante 1 hora, y después se cubrieron con anticuerpo anti-marcador de 6xHis diluido 1:1000 (R&D Systems) en PBS-T que contenía BSA al 1% y durante 16 horas a 4 °C. Las células se lavaron con PBS-T y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) en TBS-T durante 1 hora y se estudiaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon).

15 *Sobreexpresión de la proteína NMNAT, purificación por afinidad y ensayo enzimático.* Se transfectaron células HEK293T con un plásmido de expresión para cada enzima utilizando una precipitación con fosfato de calcio. Tres días después, las células se lavaron con PBS dos veces y después se suspendieron en el tampón que contenía fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0) y NaCl 300 mM (tampón A). Las células después se homogeneizaron en un SONIFIRE 450 (BRANSON) y el sobrenadante se recogió mediante centrifugación a 10.000 g durante 10 min. Un gel de afinidad de níquel de selección de His (Sigma) se lavó con el tampón A y se añadió 0,1 ml de la suspensión del gel al 50% a 1 ml del sobrenadante y se incubó durante 10 min a 4 °C y después las esferas que se unieron a las proteínas marcadas con hexahistidina se lavaron a fondo con el tampón A. Las proteínas se eluyeron añadiendo 100 µl de la disolución que contenía fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM, e imidazol 250 mM. Se midió la actividad enzimática NMNAT relativa empleando proteínas purificadas por afinidad según se describió anteriormente, se restó el valor obtenido de células transfectadas de modo simulado, y se normalizó a la cantidad de proteína recombinante determinada mediante densitometría.

20 *Administración de sustratos biosintéticos de NAD y transección del nervio óptico.* Se disolvió Nam, NMN, NmR o NAD en PBS a la concentración de 100 mM o 1 M. Se inyectaron 5 µl de cada disolución en el componente intravitreal izquierdo bajo anestesia a una velocidad de 0,5 µl/ml por segundo. El nervio óptico izquierdo se transeccionó 24 horas después de la inyección intravitreal y el nervio óptico se recuperó en el momento indicado. El tejido del nervio óptico se homogeneizó en 100 µl de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), SDS al 1% y DTT 1 mM. Se analizaron 50 µg de proteína para cada muestra mediante una transferencia Western empleando el anticuerpo anti-neurofilamentos 2H3 (Developmental Studies Hybridoma Center) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch). Se calculó la velocidad de degeneración a partir de la proporción de inmunorreactividad de los neurofilamentos de los nervios transeccionados frente a los nervios contralaterales.

Ejemplo 8

45 Este ejemplo ilustra la vía biosintética de NAD y el análisis de la expresión de enzimas biosintéticas de NAD de mamífero.

El NAD se sintetiza mediante tres vías principales en procariotas y eucariotas. En la vía *de novo*, el NAD se sintetiza a partir del triptófano (figura 5). En la vía de reciclaje, el NAD se genera a partir de vitaminas que incluyen el ácido nicotínico y la nicotinamida. Recientemente se ha descubierto una tercera vía a partir de la nicotinamida ribósido, denominada vía independiente de Preiss-Handler. La última reacción enzimática de la vía *de novo* implica la conversión de quinolinato a NaMN por QPRT (EC 2.4.2.19). En este punto, la vía *de novo* converge con la vía de reciclaje. NaPRT (EC 2.4.2.11) convierte Na en NaMN, que después es convertido en NaAD por NMNAT (EC 2.7.7.1). QNS1 (EC 6.3.5.1) convierte NaAD en NAD. NmPRT (EC 2.4.2.12; también denominado visfatina) convierte Nam en NMN. NMN también es convertido en NAD por NMNAT. La nicotinamidasa (PNC, EC 3.5.1.19), que convierte Nam en Na en la vía de reciclaje de levaduras y bacterias, aún no ha sido identificada en mamíferos. En la vía independiente de Preiss-Handler, Nrk (EC 2.7.1.22) convierte NmR en NMN y converge con la vía de reciclaje. La mayoría de estas enzimas de mamífero, que incluyen QPRT, NmPRT, QNS1, Nrk1/2 y NMNAT1/2/3, han sido previamente clonadas y caracterizadas. También se ha identificado un homólogo de mamífero de NaPRT como una EST indicada como un homólogo de mamífero de una NaPRT bacteriana.

Para investigar la expresión de las enzimas biosintéticas de NAD de mamífero en el sistema nervioso, se realizó una RT-PCR cuantitativa empleando ARN procedente de cerebro, retina, médula espinal y DRG de ratón a la edad de E14, P0, P7, P14 y P21. Todas las enzimas se expresan de forma ubicua en el sistema nervioso a lo largo del desarrollo y durante la etapa adulta, con la excepción de Nr2k2, cuya expresión sigue siendo muy baja en todos los tejidos estudiados (los datos no se muestran). Para identificar la inducibilidad de las enzimas que sintetizan NAD en respuesta a ataques neuronales, se comparó la expresión del ARN de cada enzima en DRG a 1, 3, 7 y 14 días después de la transección del nervio ciático frente a DRG no dañados. Tal como se muestra en la figura 6A, la mayoría de las enzimas se encontraban sobrerreguladas en 2 a 8 veces después de los daños. Entre estas, la expresión de Nr2k2 está excepcionalmente inducida (en más de 20 veces) a los 14 días después de la axotomía. También se analizó la expresión de las enzimas sintéticas de NAD durante la degeneración axonal provocada por neurotoxinas en neuronas DRG de rata cultivadas. Las neuronas DRG se trataron con rotenona 0,1 μ M y 1 μ M para provocar la degeneración axonal y se recogió el ARN 24 horas después de la adición de rotenona. La expresión de Nr2k2 había aumentado en más de 6 veces después del tratamiento con rotenona (figura 6B). Estos resultados sugieren que, aunque todas las actividades enzimáticas en la vía de síntesis del NAD están presentes de forma ubicua, Nr2k2 puede ser responsable de suministrar el sustrato sintetizador de NAD después que se hayan producido ataques neuronales.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que ambas enzimas Nmat nuclear y citoplásmica salvan a los axones de la degeneración.

Para determinar si la localización nuclear de NMNAT1 es fundamental para proporcionar la protección axonal, se analizó el efecto de la distribución subcelular de la enzima NMNAT en el ensayo de degeneración walleriana *in vitro* y se comparó el grado de protección axonal entre la sobreexpresión de NMNAT citoplásmica y nuclear. NMNAT1 tiene una señal de localización putativa PGRKRKW en los 211-217 aminoácidos de la proteína NMNAT1. Los inventores generaron una NMNAT1 mutante denominada cytNMNAT1, en la que esta señal de localización nuclear se altera como PGAAAW y estudiaron la distribución subcelular. Tal como se muestra en la figura 7B, la mayoría de cytNMNAT1 se localiza en citosol, tal como se esperaba.

Después se confirmó la actividad enzimática de cytNMNAT1. NMNAT1 y su mutante cytNMNAT1 se purificaron de los lisado celulares que expresan cualquiera de las proteínas empleando un gel de afinidad. La actividad enzimática de las proteínas purificadas por afinidad se midió según se describió anteriormente y se descubrió que la actividad de cytNMNAT1 no resultó alterada por su mutación (figura 7C). Después de la sobreexpresión de cytNMNAT1 en neuronas DRG, se observó una fuerte protección de las neuritas, como la NMNAT1 nuclear salvaje (figura 7A, E). Este resultado también fue confirmado utilizando la isoenzima NMNAT1 que carece de la señal de localización nuclear. Entre las dos isoenzimas de NMNAT, previamente se había informado de que NMNAT3 se localizaba fuera del núcleo y las mitocondrias, y que tendría una actividad enzimática comparable a NMNAT1. Los inventores añadieron la señal de localización nuclear KPKKIKTED de la topoisomerasa I humana al C-terminal de NMNAT3 para generar NMNAT3 nuclear. Se expresó NMNAT3 marcada con hexahistidina o nucNMNAT3 en células HEK293T y se analizó la localización subcelular y su actividad enzimática. La NMNAT3 que se distribuye fuera del núcleo muestra una tinción de puntos brillantes, tal como se ha descrito anteriormente, y nucNMNAT3 se localizó principalmente en el núcleo, con algunos puntos teñidos en el citosol (figura 7B). La actividad enzimática de NMNAT3 y nucNMNAT3 se midió y se determinó que ambas proteínas presentaban una actividad enzimática comparable, comparado con NMNAT1 (figura 7C). Después se realizó el ensayo de degeneración walleriana *in vitro* tras la sobreexpresión de estas dos enzimas NMNAT3, y se descubrió que la sobreexpresión de NMNAT3 y nucNMNAT3 mostraba el mismo grado de retraso en la degeneración de las neuritas que NMNAT1 (figura 7A, E). La expresión mediada por lentivirus de cada enzima fue confirmada mediante un análisis de la transferencia Western (figura 7D). Estos experimentos confirmaron que la NMNAT dirigida al núcleo o al citosol protege a las neuritas frente a la degeneración.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que la aplicación exógena de sustratos para las enzimas biosintéticas de NAD protege a los axones frente a la degeneración.

Los inventores demostraron previamente que el NAD aplicado de forma exógena en el medio de cultivo muestra un efecto salvador axonal *in vitro*. En este ejemplo se demuestra que la expresión de NmPRT también produce protección axonal, lo cual sugiere que Nam se emplea como sustrato para la síntesis de NAD en neuronas. Para determinar cuál de los sustratos mostrados en la figura 5 se emplea para la síntesis de NAD en neuronas y para identificar si cualquiera de los precursores de NAD puede salvar a los axones de modo similar o quizá mejor que el NAD, se aplicó Na, Nam, NmR, NaMN, NMN o NaAD al medio de cultivo y se realizó un ensayo de degeneración walleriana *in vitro*. Una aplicación de NMN 1 mM durante 24 horas antes de la transección de las neuritas salvó a las neuritas de la degeneración. Un análisis cuantitativo reveló que el tratamiento con NMN logra la protección de las neuritas en un grado similar al alcanzado por el NAD aplicado de modo exógeno (figura 8B). Estos resultados también sugieren la posibilidad de que un mayor suministro de otros sustratos biosintéticos de NAD tendría la capacidad de salvar a las neuritas de la degeneración. Después se aplicó de forma exógena 1 mM de sustratos biosintéticos de NAD que incluyen Na, Nam, NaMN, NaAD, y NmR a las neuronas DRG durante 24 horas y se

realizó la transección de las neuritas. Tal como se muestra en la figura 8A y B, el tratamiento con NaMN o NmR también salvó a las neuritas, como el NAD. NaAD muestra una ligera protección pero Na no salva a las neuritas, mientras que Na y Nam no tienen efecto. Un análisis cuantitativo reveló que la aplicación exógena de NaMN, NMN, NmR o NAD 1 mM provoca un aumento comparable en las neuritas intactas a las 48 horas después de la transección (figura 8B). Debido a que el efecto protector de NaMN es igual a NMN, una etapa de síntesis de NAD a partir de NaAD por QNS sería lo suficientemente activa como para salvar a las neuritas bajo un mayor suministro de NaAD. No obstante, la aplicación exógena de NaAD muestra un aumento menor en las neuritas intactas a las 48 horas, comparado con NAD (figura 8B). Esto indica una incorporación insuficiente a la célula o la inestabilidad del NaAD en esta condición de ensayo. Estos experimentos sugieren que existen varias formas diferentes de salvar a las neuritas, que incluyen la aplicación exógena de NMN, NaMN y NmR. Todos estos tratamientos parecen provocar un aumento en el suministro de NAD y esto resulta coherente con los experimentos previos que demuestran que la aplicación de NAD o la sobreexpresión de NMNAT1 salva a las neuritas de la degeneración.

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra que la aplicación intravitreal de sustratos biosintéticos de NAD retrasa la degeneración axonal en células de ganglios retinianos.

La transección del nervio óptico es un modelo *in vivo* que puede emplearse para investigar los mecanismos que conducen a la degeneración walleriana y que aparecen después de la muerte de células ganglionares retinianas (RGC) observada en enfermedades humanas, tales como el glaucoma. En la raza de ratones C57BL/6, la degeneración del nervio óptico durante la degeneración walleriana después de una axotomía es notablemente lenta. Además, se emplea una inyección intravitreal para la selección de compuestos que protegen a los axones de RGC de la degeneración *in vivo* y, por tanto, se puede evaluar el efecto protector de axones de cada uno de los sustratos biosintéticos de NAD *in vivo* mediante la inyección intraocular de compuestos, que incluyen NAD, NMN, NmR y Nam. A partir del ensayo de degeneración walleriana *in vitro* se observa que 1 mM de NAD, NMN y NmR en el medio de cultivo es suficiente para proteger frente a la degeneración. En principio se inyectaron 5 μ l de una disolución de NAD 100 mM o 1 M en el compartimento intravitreal izquierdo. Después de una incubación durante 24 horas, el nervio óptico izquierdo se transeccionó, y se recogió el nervio óptico control (derecho) y axotomizado (izquierdo) a los 3, 4 y 5 días después de la transección. Se midió la inmunorreactividad de los neurofilamentos procedentes del nervio óptico axotomizado y se normalizó frente al valor obtenido del lado derecho del nervio óptico. Se descubrió que la inmunorreactividad a los 4 días después de la transección era de $77 \pm 27\%$ y $78 \pm 22\%$ del nervio óptico no axotomizado en ratas inyectadas con NAD 1 M y 100 mM, respectivamente, mientras que el animal control mostró solo $7 \pm 16\%$ (figura 9).

Después se inyectaron 5 μ l de NMN, NmR y Nam 100 mM en el compartimento intravitreal izquierdo y se recogieron los nervios ópticos 4 días después de la transección del nervio óptico izquierdo. La inmunorreactividad obtenida a partir del nervio óptico inyectado con NMN y NmR fue de $60 \pm 25\%$ y $72 \pm 19\%$ del nervio no axotomizado. Los animales inyectados con Nam no mostraron ninguna diferencia con los animales control. Estos resultados son coherentes con el estudio *in vitro* que demuestra que NAD, NMN y NmR tienen actividad salvadora de axones, pero Nam no. El estudio *in vivo* de los inventores reveló que estas moléculas pequeñas que están implicadas en la vía biosintética de NAD son herramientas útiles para salvar a los axones de la degradación.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de un agente para el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero que lo necesite, en el que el agente es NaMN, NMN, NmR, un ácido nucleico que codifica una NMNAT o resveratrol.
- 2.- El uso de la reivindicación 1, en el que el agente es un ácido nucleico que codifica una NMNAT.
- 5 3.- El uso de la reivindicación 1, en el que el agente es un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o una NMNAT3 humana.
- 10 4.- El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que la axonopatía es hereditaria o congénita o está asociada con enfermedades neurodegenerativas, enfermedades de neuronas motoras, neoplasia, trastornos endocrinos, enfermedades metabólicas, deficiencias nutricionales, aterosclerosis, enfermedades autoinmunitarias, lesiones mecánicas, lesiones inducidas por productos químicos o fármacos, lesiones térmicas, lesiones por radiación, compresión de nervios, trastornos retinianos o del nervio óptico, disfunción mitocondrial, demencia progresiva, enfermedades desmielinizantes, isquemia y/o ictus, enfermedades infecciosas, o enfermedades inflamatorias.

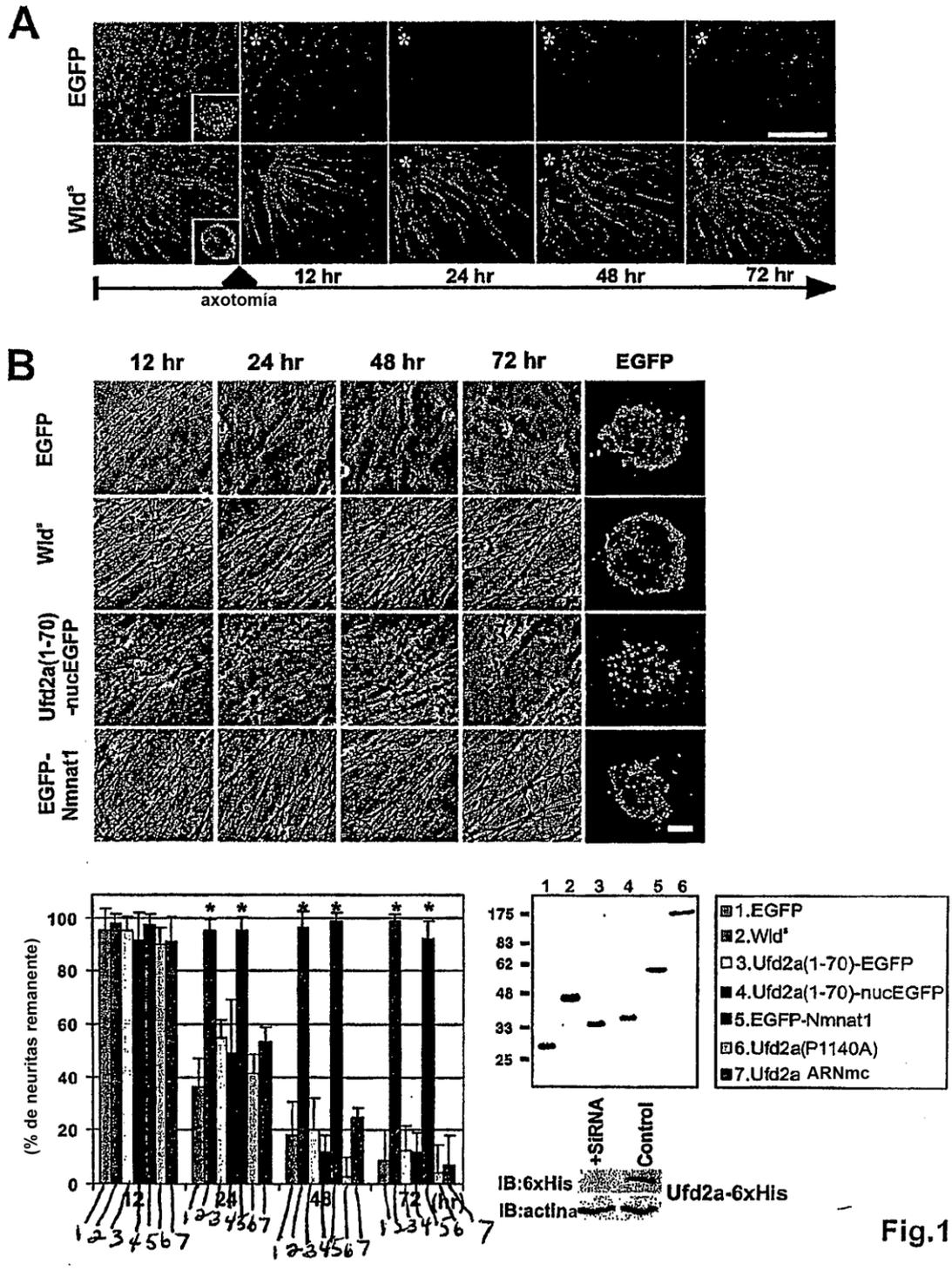
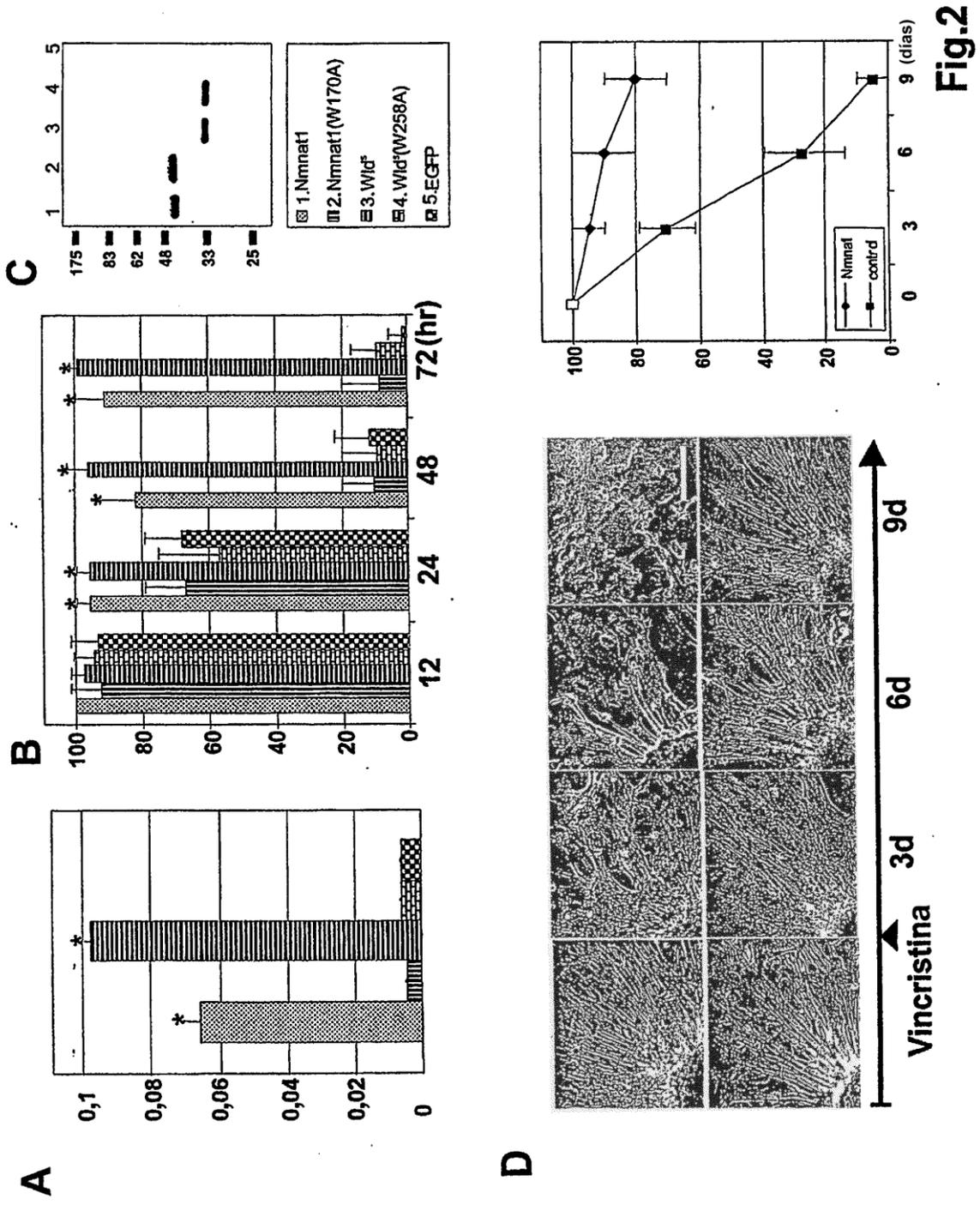


Fig.1



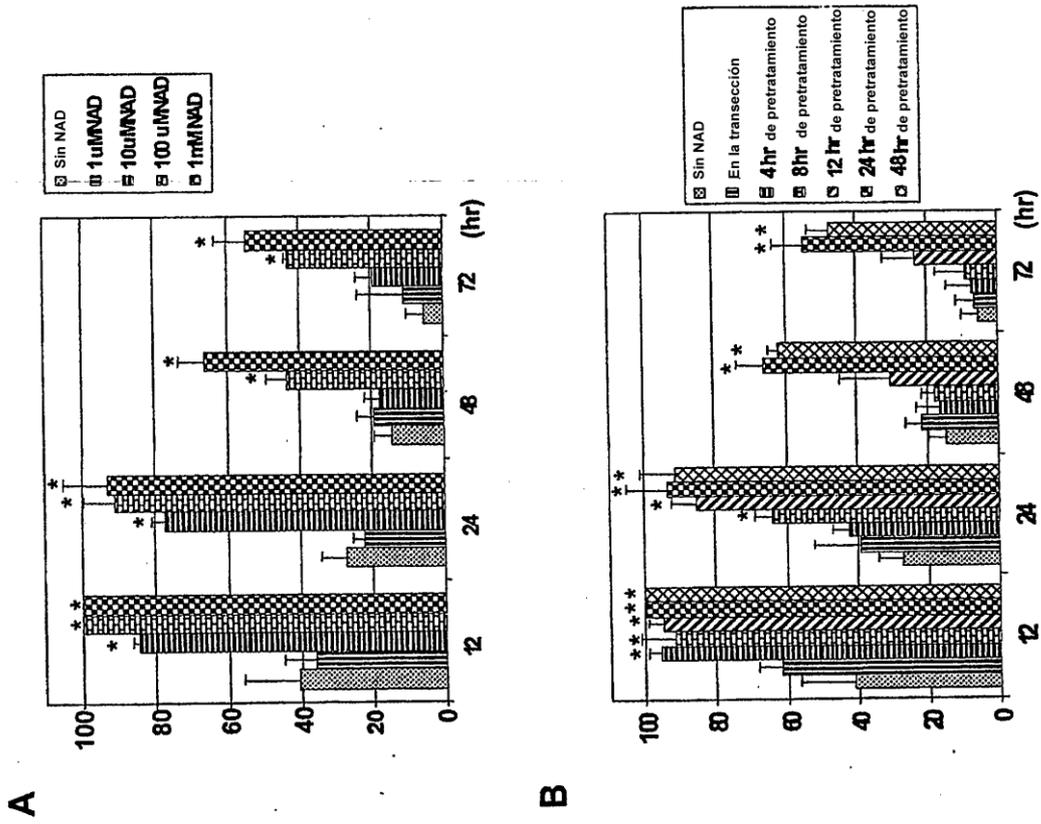


Fig.3

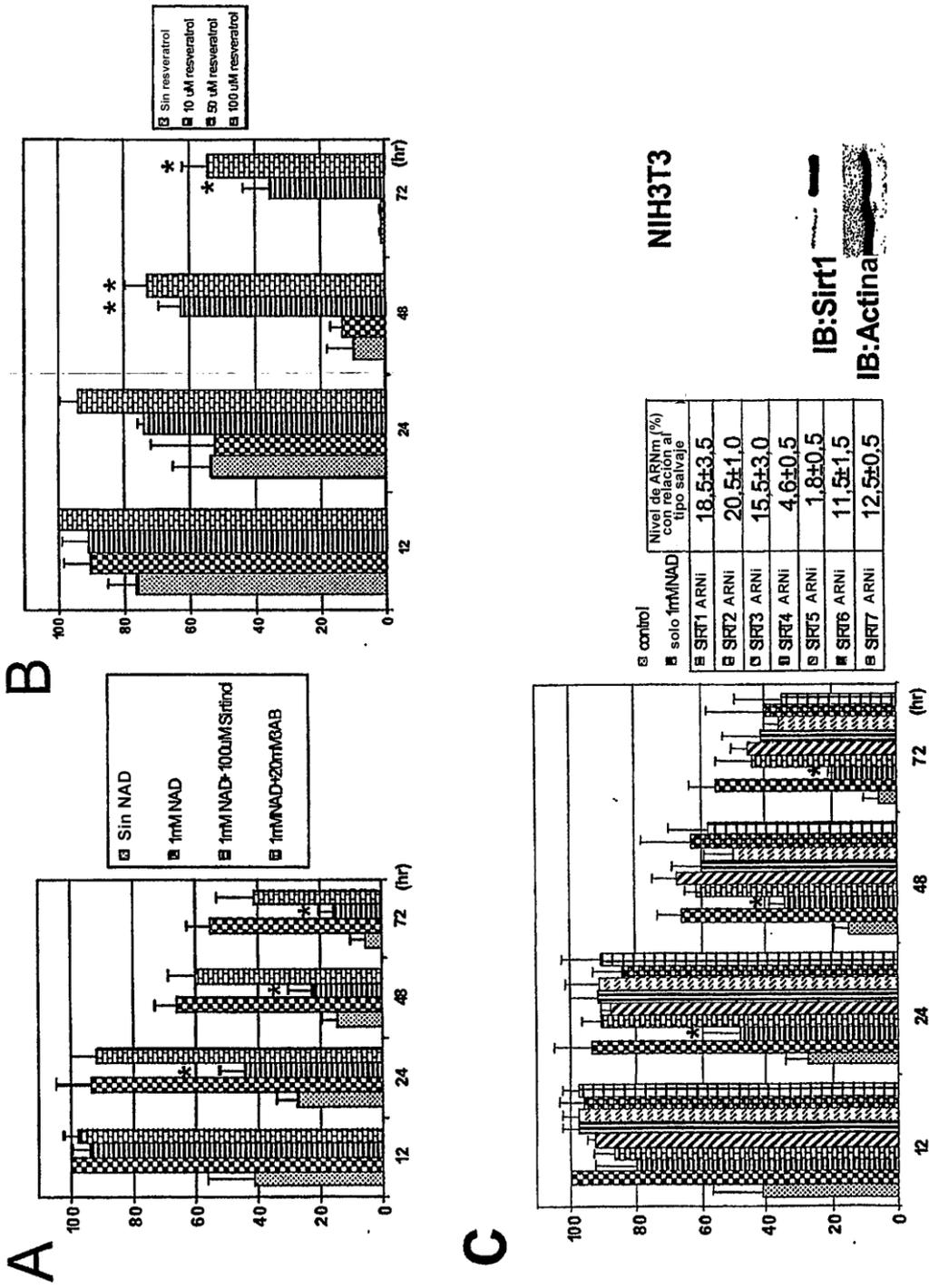


Fig.4

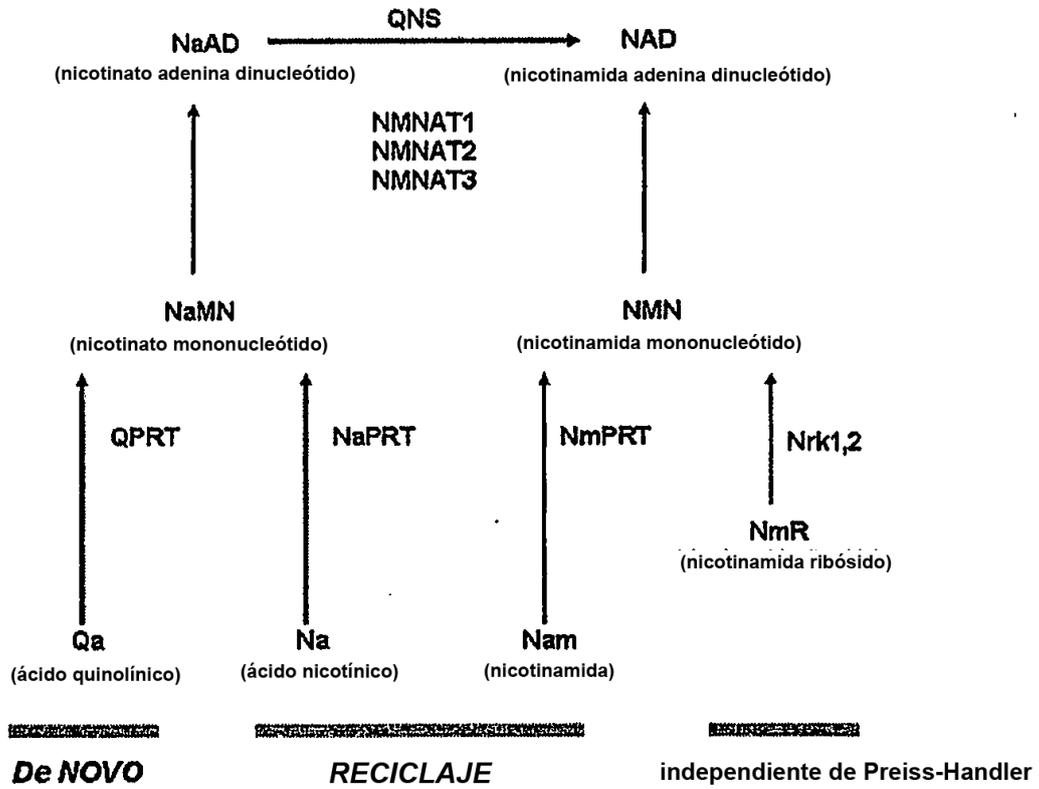


Figura 5

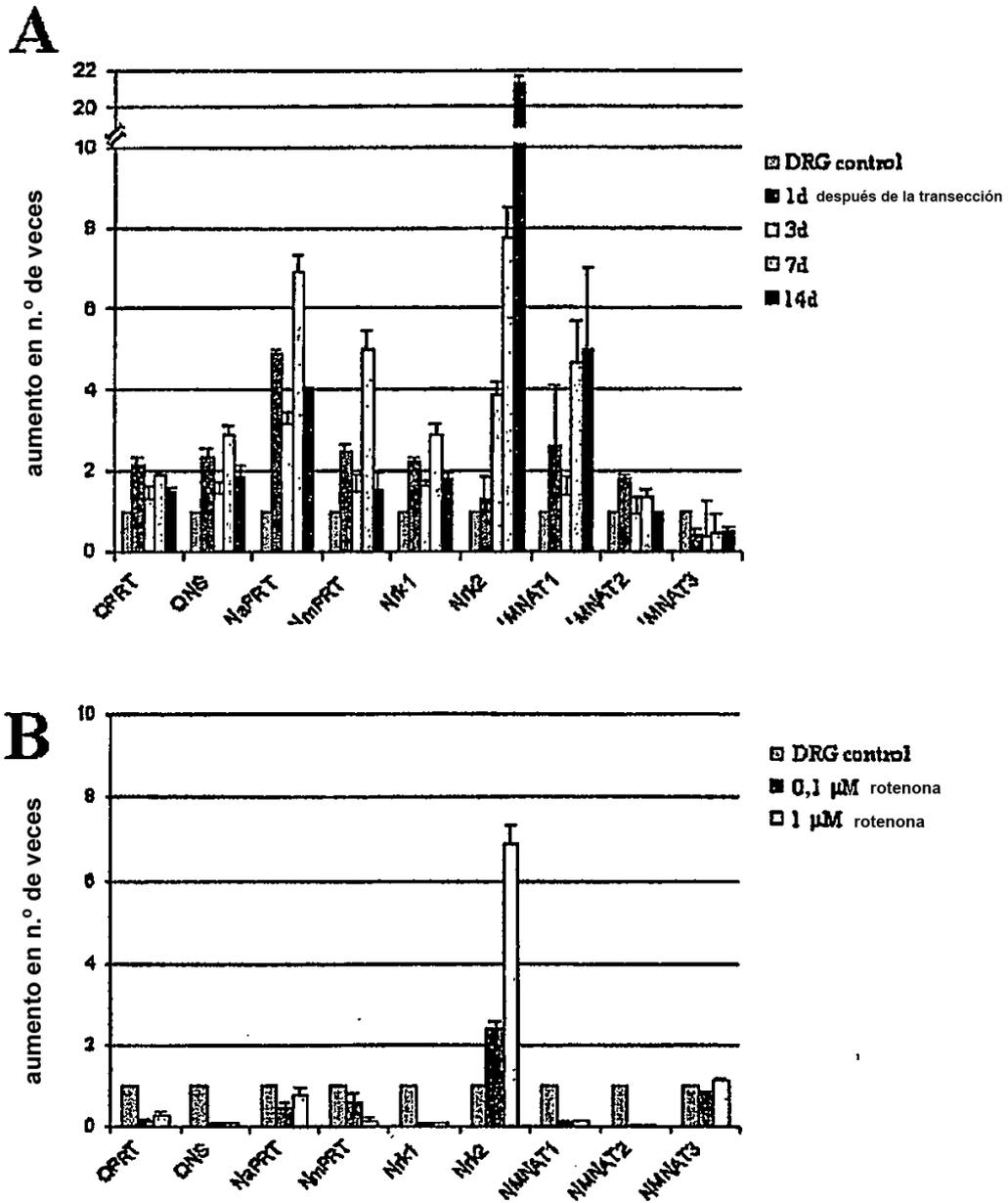


Figura 6

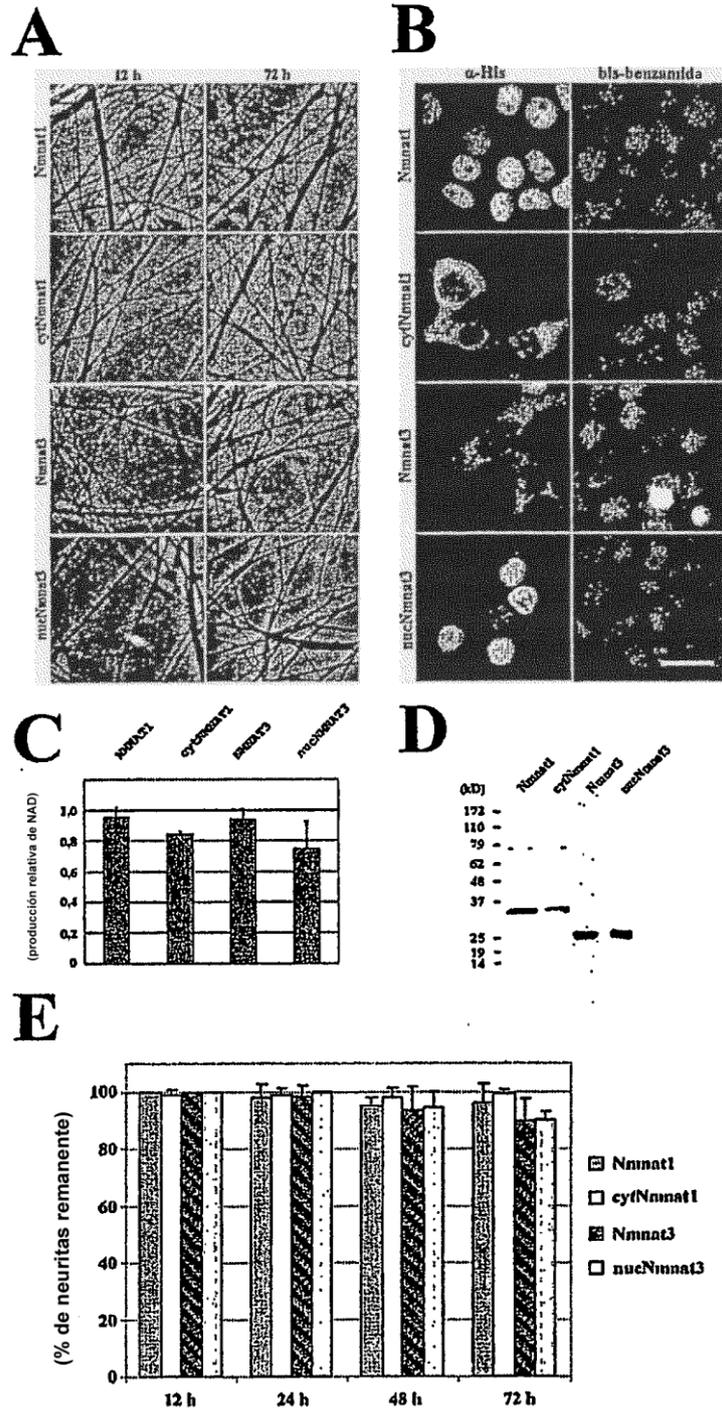


Figura 7

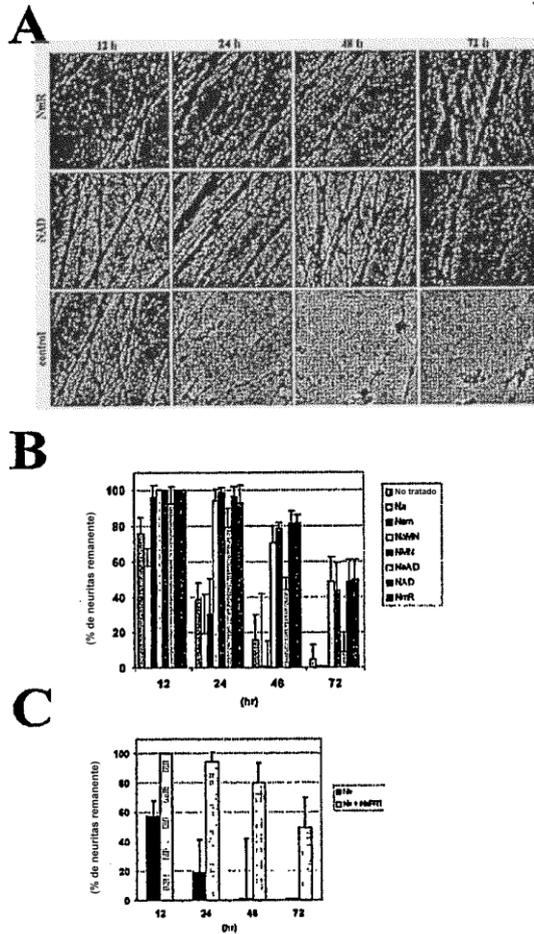


Figura 8

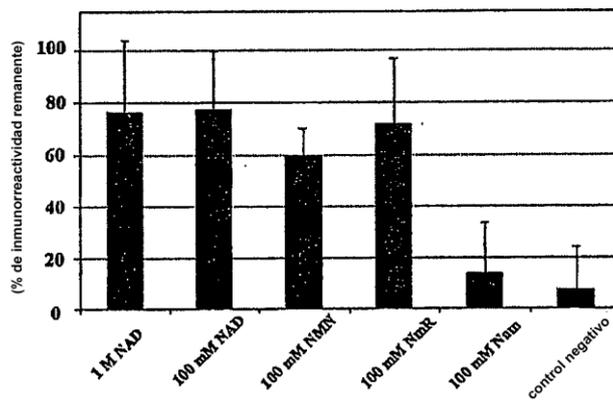


Figura 9