

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 552**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2009 E 09712319 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2247300**

54 Título: **Composiciones de péptido de MNTF y métodos de uso**

30 Prioridad:

21.02.2008 US 66669

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

11.05.2016

73 Titular/es:

**GENERVON BIOPHARMACEUTICALS LLC
(100.0%)
1055 E. Colorado Blvd., Suite 500
Pasadena, CA 91106, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 569 552 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de péptido de MNTF y métodos de uso

Antecedentes

5 La siguiente incluye información que puede ser útil en la comprensión de la presente descripción. No es una admisión de que cualquier información proporcionada aquí es técnica anterior, o es relevante para la actual descripción, o que cualquier publicación o documento al que se hace referencia específicamente o implícitamente es técnica anterior.

10 Se ha encontrado que la supervivencia de motoneuronas embrionarias es dependiente de sustancias tróficas específicas derivadas de los músculos esqueléticos asociados al desarrollo. Se ha reportado que ciertos músculos esqueléticos producen sustancias que son capaces de mejorar la supervivencia y desarrollo de las motoneuronas al evitar la degeneración de las motoneuronas embrionarias y posterior muerte celular, natural. Estas sustancias se han descrito en términos generales como factores neuronotróficos (NTF), que son un grupo especializado de proteínas que funcionan para promover la supervivencia, crecimiento, mantenimiento y capacidades funcionales de poblaciones de neuronas seleccionadas (por ejemplo, Chau, RMW, et al., 6 Chin. J neuroanatomía 129, 1990).

15 Una variedad de enfermedades, trastornos o afecciones neurodegenerativas, neuromusculares y neuronales que afectan los sistemas nerviosos central y/o periférico se puede caracterizar en su totalidad o en parte por la pérdida aguda o progresiva de los tejidos neuronales funcionales.

Los documentos US6309877, US7183373, US6841531, US6759389 y US20060052299 reportan factores neuronotróficos específicos (NTF) denominados factores motoneuronotróficos (MNTF), que poseen la capacidad de ejercer efectos tróficos sobre motoneuronas.

20 Breve Resumen

En un aspecto, la presente invención proporciona un péptido de MNTF para uso en medicina, que consiste de entre 2 y 5 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, y que exhibe actividad MNTF y comprende por lo menos los residuos de aminoácidos 17 y 18 de la SEQ ID NO: 1.

25 Por consiguiente, en ciertas realizaciones el péptido de MNTF para uso en medicina se puede seleccionar del grupo que consiste de las SEQ ID NOs: 3-12.

En otras realizaciones, el péptido de MNTF para uso en medicina puede consistir de entre 3 y 5 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el péptido de MNTF puede tener una secuencia de aminoácidos de acuerdo con las SEQ ID NOs: 4, 6 o 12. para uso en medicina

30 En realizaciones adicionales, el péptido de MNTF para uso en medicina se puede modificar por un enlace covalente con un mejorador de penetración, mejorando de esta manera la capacidad de penetración de tejido de la composición.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones el péptido de MNTF para uso en medicina se puede modificar terminalmente con N mediante enlace covalente a un mejorador de penetración. Por ejemplo, el mejorador de penetración se puede unir de forma covalente al péptido de MNTF mediante derivación de N-acilo de uno o más grupos amino libres.

35 En algunas realizaciones, el mejorador de penetración puede ser ácido alquil carboxílico opcionalmente sustituido hidroxilatado, no saturado y/o sulfurado de 2 a 22 carbonos. Por consiguiente, en ciertas realizaciones el mejorador de penetración puede ser un ácido graso seleccionado de ácido caprílico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido hexanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido valérico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido lioleico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido erúxico, y ácido nervónico.

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido de MNTF como se describió anteriormente y un portador farmacéuticamente aceptable, para uso en medicina.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de la anterior composición en un método para promover el crecimiento o mantenimiento de neuronas, que comprende administrar la composición a una célula neuronal, y en donde la composición tiene una o más actividades biológicas seleccionadas de promover el crecimiento de neuronas in vivo promover el mantenimiento de neuronas, promover crecimiento de neuritas, promover regeneración axonal de una motoneurona axotomizada, mejorar la función motora, reparar la ruta neuronal dañada, regenerar una ruta neuronal, y aliviar un defecto neuronal.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona el uso de la anterior composición en un método para aliviar un trastorno neuronal en un animal afligido con el trastorno, que comprende administrar al animal la composición en una cantidad suficiente para aliviar el trastorno.

5 En un aspecto adicional, también se proporciona un péptido de MNTF que consiste de la secuencia amino de la SEQ ID NO: 6 o 12.

Secuencias:

LGTFWGDTLN CWMLSAFSRY ARCLAEGHDG PTQ (SEQ ID NO: 1)

FSRYAR (SEQ ID NO: 2)

FS (SEQ ID NO: 3)

10 FSR (SEQ ID NO: 4)

AFS (SEQ ID NO: 5)

FSRY (SEQ ID NO: 6)

SAFS (SEQ ID NO: 7)

AFSR (SEQ ID NO: 8)

15 LSAFS (SEQ ID NO: 9)

SAFSR (SEQ ID NO: 10)

AFSRY (SEQ ID NO: 11)

FSRYA (SEQ ID NO: 12)

MLSAFS (SEQ ID NO: 13)

20 LSAFSR (SEQ ID NO: 14)

SAFSRY (SEQ ID NO: 15)

AFSRYA (SEQ ID NO: 16)

SRYAR (SEQ ID NO: 17)

RYAR (SEQ ID NO: 18)

25 YAR (SEQ ID NO: 19)

SRYA (SEQ ID NO: 20)

RYA (SEQ ID NO: 21)

SRY (SEQ ID NO: 22)

Descripción de las figuras

30 La Figura 1. Ilustra un ensayo de supervivencia de péptidos de MNTF de ejemplo sobre la supervivencia neuronal. Las motoneuronas se cultivan a partir de médulas espinales de rata y se cultivan durante 3 días en la presencia de BDNF, GDNF y CNTF. Después de 3 días, las células se hacen crecer en la ausencia de los factores tróficos convencionales pero con los péptidos de MNTF indicados a 10 microgramo/ml. Después de 48 horas se determina el número de células vivas. La gráfica indica la media +/- SD de cinco muestras (BDNF=Factor neurotrófico derivado de cerebro; 35 GDNF=Factor neurotrófico derivado glial; CNTF=Factor neurotrófico ciliar).

Descripciones detalladas

Se ha encontrado que la supervivencia de motoneuronas embrionarias es dependiente de las sustancias tróficas específicas de músculos esqueléticos derivados asociados al desarrollo. Se ha reportado que los músculos esqueléticos producen sustancias que son capaces de mejorar la supervivencia y desarrollo de motoneuronas al prevenir la degeneración de las motoneuronas embrionarias y posterior muerte celular natural. (O'Brian, R. J. and Fischbach, G. D., 6 J. Neurosci. 3265 (1986); Hollyday, M. and Hamburger, V., 170 J. Comp. Neurol. 311 (1976). McManaman, J. L., et al., 263 J. Biol. Chem. 5890 (1988); Oppenheim, R. W., et al., 240 Science, 919 (1988); and Smith, R. G., et al., 6 J. Neurosci. 439 (1986).

El Factor Motoneurotrófico humano (MNTF) es un NTF específico derivado del tejido de músculo esquelético que se ha demostrado reduce la inflamación en el sitio de la lesión de las motoneuronas, mejora la regeneración de nervios, y promueve la supervivencia de las motoneuronas. El MNTF se ha probado en diversos sistemas nerviosos de rata, que incluyen el nervio periférico ciático (que controla los músculos de las extremidades inferiores), el nervio musculocutáneo periférico (que controla los músculos de las extremidades superiores), el nervio facial craneal (que controla los músculos faciales y de la cabeza), el nervio hipogloso craneal (que controla la lengua), y la porción de la médula espinal que controla los músculos en el cuello, pecho y extremidades superiores. En el modelo de médula espinal, el MNTF se aplicó sobre el injerto de nervio en una médula espinal de hemi-sección en la rata; el MNTF reduce la inflamación, limita la degeneración y mejora la regeneración de los nervios injertados. Una serie de estudios ha demostrado la eficacia de los análogos del MNTF sintetizado o análogos de péptido descritos en los mismos en sistemas de modelos de nervio periférico en rata para efectos tróficos y trópicos cuando se aplica directamente sobre el nervio. Adicionalmente, se ha demostrado que el MNTF promueve la regeneración y supervivencia de las motoneuronas.

La muerte celular neuronal ocurre en el sistema nervioso de vertebrados durante ciertos períodos de crecimiento y desarrollo. Por lo tanto, la adición de factores tróficos neuronales solubles de tejidos objetivo asociados puede servir para mitigar este fenómeno de muerte neuronal.

Por consiguiente, los aspectos y realizaciones de la presente descripción proporcionan métodos y composiciones que comprenden el péptido de MNTF o análogo del mismo para el tratamiento de trastornos neuronales.

Los aspectos y realizaciones de la descripción se dirigen a un dominio de proteína funcional asociado con las acciones de los factores motoneuronotróficos, que se han identificado y mapeado en subsecuencias superpuestas cortas en la molécula de MNTF. Estos dominios de proteínas, que incluyen los dominios de las SEQ ID NOS: 2-22, son suficientes para modular la viabilidad y proliferación de células neuronales. Más aún, los péptidos de MNTF truncados o análogos que abarcan estos dominios son suficientes por sí mismos para demostrar la bioactividad estimuladora en híbridos de células motoneuronas/de neuroblastoma.

Definiciones

Se establecen ciertos términos utilizados en el contexto de la descripción de la tecnología a la que pertenece esta divulgación. A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados cuando se utilizan aquí y en las reivindicaciones adjuntas. Aquellos términos que no se definen a continuación o en otra parte en la especificación tendrán su significado reconocido en la técnica.

Como se utiliza aquí, un "factor motoneuronotrófico o factor trófico de motoneuronas" incluye aquellos factores involucrados en la nutrición o mantenimiento de las motoneuronas. Los términos "factor motoneuronotrófico", "MNTF", "péptido de MNTF", "análogo de factor motoneuronotrófico" y "análogo de MNTF" se refieren a péptidos y análogos de los mismos, respectivamente, como se describe aquí y que tiene las propiedades funcionales definidas aquí. Estos pueden incluir secuencias y homólogos funcionales de secuencia de MNTF de referencia. Los factores motoneuronotróficos adicionalmente pueden promover el desarrollo y diferenciación de las células progenitoras neuronales comprometidas, o pueden inducir o mejorar el crecimiento (por ejemplo, crecimiento de neuritas) y supervivencia celular neuronales diferenciadas. "Actividad MNTF" incluye una o más de las siguientes actividades: promover el crecimiento de neuronas, promover el mantenimiento de neuronas, promover crecimiento de neuritas, promover regeneración axonal de una motoneurona axotomizada, mejorar la función motora, reparar la ruta neuronal dañada, regenerar una ruta neuronal, o aliviar un defecto neuronal. Los factores motoneuronotróficos de la presente descripción se proporcionan normalmente en cantidades efectivas para producir una célula neuronal completamente diferenciada de pleno del SNC o PNS (por ejemplo, una neurona motora). Se proporciona aquí orientación para la cantidad, y se puede determinar fácilmente por el experto común en base a los procedimientos y métodos conocidos descritos aquí.

Los péptidos de MNTF se han reportado en Chau, R. M. W., et al., Muscle Neurotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord. In: Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pp. 89-94 (1992), así como aquellos que se encuentran en, por ejemplo, los documentos US6309877, US7183373, US6841531, US6759389 y US20060052299. En ciertas realizaciones, ejemplos incluyen péptidos de

MNTF sintéticos y/o purificados o análogos de los mismos que comprenden una porción de los dominios de las SEQ ID NOS: 2-22 y moléculas que imitan la estructura y/o función de los mismos, que incluyen homólogos y análogos de secuencia truncada, útiles para inducir o modular la viabilidad y crecimiento de una célula neuronal.

5 Adicionalmente, los péptidos de MNTF también puede incluir aquellos descritos en Chau, R. M. W., et al., The Effect of a 30 kD Protein from Tectal Extract of Rat on Cultured Retinal Neurons, 34 Science in China, Series B, 908 (1991); Chau, R. M. W., et al., Muscle-Neuronotrophic Factors Specific for Anterior Horn Motoneurons of Rat Spinal Cord. In: Recent Advances in Cellular and Molecular Biology, Vol. 5, Peeters Press, Leuven, Belgium, pp. 89-94 (1992); Chau, R. M. W., et al., The Effect of a 30 kD Protein from Tectal Extract of Rat on Cultured Retinal Neurons, 34 Science in China, Series B, 908 (1991); Chau, R. M. W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrophic Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (abstract) 19 Soc. for Neurosci. part 1,252 (1993), Chau, R. M. W., et al., Cloning of Genes for Muscle-Derived Motoneuronotrophic Factor 1 (MNTF1) and Its Receptor by Monoclonal Antibody Probes, (abstract) 19 Soc. for Neurosci, parte 1, 252 (1993).

En ciertas realizaciones, un péptido de MNTF o análogo del mismo puede incluir secuencias de uno de los sitios activos del dominio de MNTF (por ejemplo un péptido de MNTF de dos aminoácidos, tales como SEQ ID NO: 3).

15 En ciertas realizaciones, el péptido de MNTF consiste de una secuencia descrita en las SEQ ID NOS: 2-22. En otras realizaciones, el péptido de MNTF incluye derivados funcionales de los péptidos de MNTF representados en las SEQ ID NOS: 2-22.

20 Los péptidos de MNTF y análogos de los mismos descritos aquí incluyen péptidos derivados de MNTF (es decir, de la SEQ ID NO: 1), y derivados funcionales de los mismos. Estos compuestos incluyen péptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de una de las SEQ ID NOS: 2-22, y derivados funcionales de péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos proporcionadas en las SEQ ID NOS: 2-22.

25 "Análogos" como se utiliza en la presente solicitud incluyen péptidos que se han modificado pero retienen actividad de MNTF (por ejemplo mediante truncamiento, sustitución, adhesión covalente a otra unidad estructural, etc. relativa a un MNTF de 33 mer, SEQ ID NO: 1). Los análogos de péptido de MNTF incluyen, por ejemplo, ésteres, amidas, profármacos, y formas de sal de péptidos de MNTF. Los análogos de péptido de MNTF incluyen péptidos de MNTF que se han modificado de forma covalente mediante adhesión a otra unidad estructural, tal como por ejemplo un péptido de MNTF ligado de forma covalente a una unidad estructural lipófila (por ejemplo un ácido graso), una molécula portadora, o un polipéptido heterólogo para producir una proteína de fusión. En ciertas realizaciones, los análogos de acuerdo con la presente descripción incluyen sustituciones "conservadoras" (por ejemplo relacionadas con la SEQ ID NO: 1). Las sustituciones conservadoras de aminoácidos que incluyen reemplazos de aminoácidos con aminoácidos sinónimos dentro del mismo grupo, que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre miembros del grupo preservarán la función biológica de la molécula, Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974). Los análogos de MNTF abarcan adicionalmente derivados funcionales de MNTF de los péptidos o análogos descritos aquí. En algunas realizaciones, los análogos de MNTF puede incluir 20%, 25%, 30%, 35% o hasta 40% de sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o versiones truncadas de la misma, que incluyen las SEQ ID NOS: 2-22.

40 Como se utiliza aquí "derivados funcionales" de MNTF se refiere a derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de las unidades estructurales de aminoácidos o en los grupos de terminal N o C de acuerdo con métodos conocidos y están comprendidos en la descripción cuando son farmacéuticamente aceptables es decir, cuando no destruyen la actividad de la proteína/péptido o no imparten toxicidad inaceptable a la composición farmacéutica que los contiene. Dichos derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados N-acilo de grupos amino libres, así como los derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres y se forman con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanilo o arilo, profármacos, sales de grupos funcionales, o que tienen una combinación de los mismos.

45 Los grupos de aminoácidos sinónimos incluyen aquellos definidos en las Tablas I, II, y III.

Tabla I

Grupos más amplios de Aminoácidos sinónimos

Aminoácido --- grupo sinónimo

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

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

Pro ---Gly, Ala, Thr, Pro

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

Ala ---Gly, Thr, Pro, Ala

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

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

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

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

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

Cys --- Ser, Thr, Cys

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

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

Asn ---Gln, Asp, Ser, Asn

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

Asp ---Glu, Asn, Asp

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

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

Trp --- Trp

Tabla II

Grupos Intermedios de Aminoácidos sinónimos

Aminoácido --- grupo sinónimo

Ser --- Ser

Arg --- His, Lys, Arg

Leu ---Ile, Phe, Met, Leu

Pro --- Ala, Pro

Thr --- Thr

Ala ---Pro, Ala

Val --- Met, Ile, Val

Gly --- Gly

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

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

Tyr --- Phe, Tyr

Cys --- Ser, Cys

His --- Arg, Gln, His

Gln ---Glu, His, Gln

Asn --- Asp, Asn

Lys --- Arg, Lys

Asp --- Asn, Asp

Glu ---Gln, Glu

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

Trp --- Trp

Tabla III

Grupos más estrechos de Aminoácidos sinónimos

Aminoácido --- grupo sinónimo

Ser --- Ser

Arg --- Arg

Leu ---Ile, Met, Leu

Pro --- Pro

Thr --- Thr

Ala --- Ala

Val --- Val

Gly --- Gly

Ile ---Ile, Met, Leu

Phe --- Phe

Tyr --- Tyr

Cys ---Ser, Cys

His --- His

Gln --- Gln

Asn ---Asn

Lys --- Lys

Asp --- Asp

Glu --- Glu

Met --- Ile, Leu, Met

Trp --- Trp

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

10 Ciertos aminoácidos comúnmente encontrados que no son codificados genéticamente y que pueden estar presentes en los compuestos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, β -alanina (b-Ala) y otros omega-aminoácidos tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr, Z), ácido 4-aminobutírico y así sucesivamente; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava); metilglicina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg);
 15 ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle, J); 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic); beta.-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH₂)); N-metil valina (MeVal); homocisteína (hCys); 3-benzotiazol-2-il-alanina (BztAla, B); y homoserina (hSer).
 20 Los análogos de aminoácidos adicionales contemplados incluyen fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato, ácido hipúrico, ácido octahidroindol -2- carboxílico, estatina, α -metil-alanina, para-benzoil-fenilalanina, propargilglicina, y sarcosina. Los péptidos descritos aquí pueden tener cualquiera de los siguientes aminoácidos en la configuración L o D, o cualquier otro aminoácido descrito aquí o conocido en la técnica, ya sea actualmente o en el futuro.

25 Los aminoácidos que son sustituibles entre sí de manera general residen dentro de las clases similares o subclases. Como lo sabe un experto en la técnica, los aminoácidos se pueden colocar en diferentes clases dependiendo principalmente de las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral de aminoácido. Por ejemplo, algunos aminoácidos de manera general se consideran aminoácidos hidrófilos o polares y otros se consideran que son aminoácidos hidrófobos o no polares. Los aminoácidos polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales
 30 ácidas, básicas o hidrófilas y los aminoácidos no polares incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas o hidrófobas. Los aminoácidos no polares adicionalmente se pueden dividir adicionalmente para incluir, entre otros, aminoácidos alifáticos. Las definiciones de las clases de aminoácidos como se utiliza aquí son como sigue:

35 "Aminoácido no polar" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, que no es polar y que de manera general se repele por solución acuosa. Ejemplos de aminoácidos hidrófobos codificados genéticamente incluyen Ala, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr y Val. Ejemplos de aminoácidos no polares no codificados genéticamente incluyen t-BuA, Cha y Nle.

40 "Aminoácido Aromático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena lateral que contiene por lo menos un anillo que tiene un sistema de electrones π conjugado (grupo aromático). El grupo aromático se puede sustituir adicionalmente con grupos sustituyentes tales como grupos alquilo, alquenoilo, alquínilo, hidroxilo, sulfonilo, nitro y aminos, así como también otros. Ejemplos de aminoácidos aromáticos genéticamente codificados incluyen fenilalanina, tirosina y triptofano. Los aminoácidos aromáticos no genéticamente codificados encontrados comúnmente fenilglicina, 2-naftilalanina, β -2-tienilalanina, 3-benzotiazol-2-il-alanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3- carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.

45 "Aminoácido Alifático" se refiere a un aminoácido no polar que tiene una cadena recta saturada o no saturada, ramificada o cadena lateral de hidrocarburo cíclico. Ejemplos de aminoácidos alifáticos genéticamente codificados incluyen Ala, Leu, Val y Ile. Ejemplos de aminoácidos alifáticos no codificados incluyen Nle.

5 “Aminoácido Polar” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o no cargada a pH fisiológico y que tiene un enlace en el que el par de electrones compartido en común por dos átomos se mantiene más cerca por uno de los átomos. Los aminoácidos polares de manera general son hidrófilos, lo que significa que tienen un aminoácido que tiene una cadena lateral que es atraída por una solución acuosa. Ejemplos de aminoácidos polares genéticamente modificados incluyen asparagina, cisteína, glutamina, lisina y serina. Ejemplos de aminoácidos polares no codificados genéticamente incluyen citrulina, homocisteína, N-acetil lisina y sulfóxido de metionina.

10 “Aminoácido ácido” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor pK de cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos ácidos normalmente tienen cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ión de hidrógeno. Ejemplos de aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato).

15 “Aminoácido básico” se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor pK de cadena lateral de más de 7. Los aminoácidos básicos normalmente tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a asociación con ión hidronio. Ejemplos de aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen arginina, lisina y histidina. Ejemplos de aminoácidos básicos no codificados genéticamente incluyen ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.

“Aminoácido ionizable” se refiere a un aminoácido que se puede cargar a un pH fisiológico. Dichos aminoácidos ionizables incluyen aminoácidos ácidos y básicos, por ejemplo, D-ácido aspártico, D-ácido glutámico, D-histidina, D-arginina, D-lisina, D-hidroxilisina, D-ornitina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico, L-histidina, L-arginina, L-lisina, L-hidroxilisina o L-ornitina.

20 Como se apreciará por aquellos que tienen experticia en la técnica, las anteriores clasificaciones no son absolutas. Diversos aminoácidos exhiben más de una propiedad característica, y por lo tanto se pueden incluir en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene tanto un anillo aromático no polar y un grupo hidroxilo polar. De este modo, la tirosina tiene varias características que podrían ser descritas como no polares, aromáticas y polares. Sin embargo, el anillo no polar es dominante y de esta manera la tirosina generalmente se considera que es no polar. Del mismo modo, además de ser capaz de formar enlaces disulfuro, la cisteína también tiene carácter no polar. Por lo tanto, mientras que no se clasifica estrictamente como un aminoácido hidrófobo no polar, en muchos casos, la cisteína se puede utilizar para conferir hidrofobicidad o no polaridad a un péptido.

30 En algunas realizaciones, como se contempla aquí los aminoácidos polares pueden incluir, por ejemplo, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, histidina, homocisteína, lisina, hidroxilisina, ornitina, serina, treonina, y aminoácidos estructuralmente relacionados. En una realización el amino polar es un aminoácido ionizable tal como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, hidroxilisina, lisina, u ornitina.

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

35 El término “sales” aquí se refiere a ambas sales de los grupos carboxilo y a sales de grupos aminos de adición ácida de los péptidos descritos aquí o análogos de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y similares, y sales con bases orgánicas como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales ácidas incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales debe retener la actividad de los péptidos descrita aquí o sus análogos.

Los “precursores” son compuestos que se convierten en los péptidos descritos aquí en el cuerpo humano o animal.

45 Los péptidos de la presente descripción se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, tal como síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida. Como una síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido que corresponde al terminal C del péptido que se va a sintetizar se une a un soporte que es insoluble en solventes orgánicos, y mediante repetición alterna de reacciones, una en donde los aminoácidos con su grupos α -amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos con grupos protectores adecuados se condensan uno a uno en el orden desde el terminal C hasta el terminal N, y uno donde los aminoácidos unidos a la resina o el grupo protector de los grupos α -amino de los péptidos se liberan, por lo tanto la cadena de péptidos se extiende de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican en gran medida por el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector utilizado.

Normalmente los grupos protectores utilizados incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrido), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (trilito), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl2 Bzl (2,6-diclorobencilo) para

los grupos amino; NO₂ (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilchromane-6-sulfonilo) para los grupos guanidino); y tBu (t-butilo) para los hidroxilo).

5 Después de síntesis del péptido deseado, este se somete a reacción de desprotección y corte del soporte sólido. Dichas reacciones de corte de péptido se pueden llevar a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.

10 El péptido crudo obtenido de esta manera se somete luego a purificación. La purificación se lleva a cabo por cualquiera de los métodos conocidos para este propósito, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o similares. Por ejemplo, se puede utilizar HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño). La elución se puede llevar a cabo utilizando un solvente a base de agua-acetonitrilo comúnmente empleado para la purificación de proteínas.

El péptido descrito aquí se puede proporcionar en forma sustancialmente purificada, con el fin de ser adecuado para uso en composiciones farmacéuticas, como ingrediente activo, en patologías que requieren de ese modo actividad MNTF y/o modulación.

15 Como se utiliza aquí, los términos “péptido biológicamente activo” y “fragmento biológicamente activo” se refieren a un péptido o polipéptido de acuerdo con la descripción anterior de factores de diferenciación de motoneuronas (MNDF) y/o factores motoneuronotróficos (MNTF) en donde el MNDF diferencia las células madre en las motoneuronas y el MNTF en donde este exhibe protección neuronal, reparación y funciones terapéuticas.

Como se utiliza aquí, los péptidos de MNTF de ejemplo y análogos de los mismos incluyen aquellos demostrados aquí que son suficientes para diferenciación de las células madre en motoneuronas.

20 Como se utiliza aquí, “prevenir” significa prevenir en todo o en parte, o mejorar o controlar.

Como se utiliza aquí, el término “tratar” se refiere a ambos tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como también aquellos propensos a tener el trastorno o ser diagnosticados con el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

25 Como se utiliza aquí, una “cantidad efectiva” en referencia a los compuestos o composiciones descritos aquí se refiere a la cantidad suficiente para inducir un resultado biológico, farmacéutico o terapéutico este resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad o trastorno o afección, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico.

30 La frase “porcentaje (%) de identidad” se refiere al porcentaje de similitud de secuencia encontrado en una comparación de dos o más secuencias. El porcentaje de identidad se puede determinar electrónicamente utilizando cualquier software adecuado. Del mismo modo, la “similitud” entre dos secuencias (o una o más porciones de cualquiera o ambos de ellas) se determina al comparar la secuencia de una secuencia con una segunda secuencia.

35 Como se describe aquí, los términos “homología y homólogos” pueden incluir péptidos que contienen homologías de secuencia de aminoácidos con la secuencia de proteínas de interés. Dichos péptidos normalmente tienen por lo menos aproximadamente 70% de homología, y pueden tener por lo menos aproximadamente 80%, 90%, 95%, 97% o 99% de homología con la secuencia pertinente, por ejemplo sobre una región de por lo menos aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 100 o más aminoácidos/ polipéptidos contiguos de la secuencia homóloga. Pueden comprender adicionalmente hasta aproximadamente 25%, 30%, 40% o 50% de cambios de aminoácidos conservadores relacionados con una secuencia de referencia (por ejemplo SEQ ID NO: 1), dependiendo de la longitud del péptido y la secuencia de referencia.

40 Aspectos generales del tratamiento

Se proporcionan métodos para tratar un sujeto con un trastorno neuronal que comprende administrar al sujeto un péptido de factor motoneuronotrófico (MNTF) o análogo del mismo.

Como se utiliza aquí, trastorno neuronal puede incluir enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con o caracterizadas en todo o en parte por pérdida aguda, progresiva o gradual de tejido neuronal funcional.

45 Una “enfermedad neurodegenerativa” se refiere a una afección asociada con el sistema nervioso central o periférico caracterizado por pérdida progresiva, gradual del tejido neuronal funcional.

Descripción general

El aislamiento y caracterización de dos factores motoneuronotróficos (MNTF1 y MNTF2) de los tejidos musculares de rata, así como posterior clonación de un gen MNTF1-F6 recombinante derivado de una colección de cADN de retinoblastoma humano, se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,309,877, 6,759,389 y 6,841,531. La secuencia del gen MNTF1-F6 codifica polipéptidos de MNTF1 de 33 aminoácidos que se encontró en el mapa dentro de cromosoma humano 22q22, como se describe en el documento WO/2005/047487.

Se identifican dos dominios que se superponen dentro de la molécula de MNTF1-F6 parecen ser suficiente para las actividades biológicas conocidas de MNTF1. Véase el documento WO/2004/065410 o solicitud de Patente Estadounidense No. de Ser. 10/541,343, emitida como Patente Estadounidense No 7,183,373. Cada uno de estos dominios, designados aquí como los dominios "WMLSAFS" y "FSRYAR", fueron suficientes para estimular la proliferación de estirpes celulares derivadas de motoneuronas de una manera similar a la MNTF1-F6 de 33-mer. Del mismo modo, el dominio "FSRYAR" es suficiente para dirigir reenergización selectiva de objetivos musculares por motoneuronas in vivo de una manera similar a la MNTF1-F6 de 33 mer. Además, el dominio "FSRYAR" proporciona un epítipo de antígeno que, cuando se utiliza para provocar una respuesta inmune, es suficiente para generar un anticuerpo que reconoce péptidos de MNTF que contienen la secuencia "FSRYAR", que incluye el MNTF1-F6 de 33-mer.

Adicionalmente, como se describe aquí, los péptidos de MNTF que incluyen por lo menos dos residuos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 se pueden utilizar como se describe aquí, dado que los péptidos incluyen por lo menos los residuos de fenilalanina y serina presentes en las posiciones 17 y 18, respectivamente, de la SEQ ID NO: 1.

Los factores motoneuronotrófico (MNTF) se maximizan en la expresión durante la semana 9 en periodo de gestación del feto humano (Di, X. et al., Acta Anatomica Sinica 29:86-89, 1998). Con base en la expresión de MNTF en el humano en desarrollo, razonamos que el MNTF puede promover la diferenciación y/o supervivencia de las motoneuronas.

Métodos de uso

El MNTF1 y/o sus análogos de péptido promueven la supervivencia de las motoneuronas de mamífero in vitro. Por consiguiente, la tecnología descrita aquí proporciona el uso de un péptido de MNTF o análogo del mismo como un factor de crecimiento/suplemento para cultivos celulares neuronales, que incluyen un método para promover la supervivencia de células madre derivada de estirpes celulares neuronales, al cultivar células madre derivada de células neuronales in vitro con una cantidad efectiva de un péptido de MNTF o análogo del mismo.

Otros péptidos de MNTF han demostrado eficacia en la diferenciación de las células madre como se describe en los documentos US/2009/0117085, WO/2007/058982. Los péptidos de MNTF proporcionados aquí tienen actividades biológicas similares y por lo tanto modulan la diferenciación de las células madre embrionarias pluripotentes en motoneuronas y mejoran la supervivencia de las motoneuronas derivadas de células ES. La exposición de las células ES a ácido retinoico (RA) y análogos de MNTF dirige estas células para generar neuronas motoras.

Las moléculas de MNTF y MNTF truncado, incluyen, pero no se limitan aquellas que comprende el dominio MLSAFSRYAR, conocido como factor de diferenciación de neuronas motoras (MDNF), se demuestran en los documentos US/2009/0117085, WO/2007/058982 para inducir diferenciación de células madre células neuronales parcialmente diferenciadas en motoneuronas motoras. Dichos agentes proporcionan un nuevo método generar y/o aislar una población de motoneuronas motoras de cultivos de células madre.

El método comprende poner en contacto una célula madre embrionaria con ácido retinoico (RA) y un factor de diferenciación de neurona motora (MNDF). En una realización descrita aquí, la célula madre embrionaria se pone en contacto con RA de forma concomitante con el factor de diferenciación de neurona motora. Alternativamente, el método comprende poner en contacto una célula neuronal parcialmente diferenciada con un factor de diferenciación de neurona motora. Los factores se proporcionan en cantidades efectivas para producir una célula neuronal diferenciada. Estas cantidades se pueden determinar fácilmente por el experto común en la técnica, con en base en los procedimientos y métodos conocidos descritos aquí.

Las motoneuronas diferenciadas se pueden aislar o enriquecer, por ejemplo, mediante clasificación FACS. Por ejemplo el uso de un método de marcado de neuronas motoras con base en GFP permite la caracterización de poblaciones puras de las neuronas motoras derivadas de células ES. Hemos empleado este protocolo para el aislamiento de la población de células de motoneuronas puras a partir de una población mixta de células de cuerpos embrioides. Los cuerpos embrioides se desagregan a células individuales utilizando colagenasa y dispasa. Estas células individuales luego se clasifican FACS por GFP, ya que las células que expresan GFP controlado por un promotor HB9 son las verdaderas motoneuronas en la población.

Por consiguiente, otro aspecto de la tecnología de la presente descripción se dirige a un método para aislar y/o purificar una población de células neuronales diferenciadas al: (a) obtener o generar un cultivo de células madre embrionarias que expresan proteína fluorescente mejorada verde (eGFP) bajo el control de un promotor específico de neurona

motora; (b) poner en contacto el cultivo de células madre embrionarias con una cantidad de un RA y MNTF efectiva para producir células neuronales diferenciadas que expresan eGFP; (d) detectar la expresión de eGFP en las células neuronales diferenciadas; y (f) aislar las células neuronales diferenciadas que expresan eGFP.

Péptidos de MNTF y análogos de los mismos

5 Como aquellos expertos están familiarizados con la técnica y la descripción apreciará, las secuencias que comprenden el dominio activo de MNTF y los análogos de péptido del mismo pueden conferir protección neuronal, reparación y funciones terapéuticas sobre motoneuronas in vitro e in vivo. Los factores MNTF descritos aquí pueden ser producidos de forma sintética o recombinante, o aislados de células nativas.

10 La secuencia de residuos de aminoácidos en una proteína o péptido que comprende el péptido de MNTF o análogo del mismo de la presente descripción se designa aquí ya sea mediante el uso de sus designaciones de tres letras empleadas comúnmente o por sus designaciones de una sola letra. Una lista de estas designaciones de tres letras y de una letra se puede encontrar en los libros de texto tales como Biochemistry, Second Edition, Lehninger, A., Worth Publishers, New York, N.Y. (1975). Cuando la secuencia de aminoácidos se enumera de forma horizontal, el terminal amino está destinado a estar en el extremo izquierdo, mientras que el terminal carboxi está destinado a estar en el extremo derecho.

15 Se apreciará por aquellos expertos que la estructura química exacta de los péptidos que comprenden los diversos péptidos de MNTF o análogo de los mismos variará dependiendo de una serie de factores. Por ejemplo, un polipéptido dado se puede obtener como una sal ácida o básica, o en forma neutra, ya que los grupos carboxilo y amino ionizables se encuentran en la molécula. Para propósitos de la descripción, entonces, cualquier forma de los péptidos que comprenden las secuencias/dominios enumerados en la SEQ ID NOS: 2-22, que conserva una actividad biológica del péptido de MNTF, se pretende que esté dentro del alcance de la tecnología descrita aquí. En ciertas realizaciones, la descripción incluye composiciones de péptidos que consisten esencialmente en las secuencias/dominios enumerados en las SEQ ID NOS: 2-22, que conserva una actividad biológica del péptido de MNTF.

20 La presente descripción incluye el uso de análogos de péptidos de MNTF que conservan la capacidad del MNTF para ejercer neuroprotección, promover supervivencia, mantenimiento y/o reparación de motoneuronas; o en ciertos casos, diferenciar las células madre en neuronas motoras.

25 Para comparar una secuencia de polipéptidos con el correspondiente fragmento de SEQ ID NO: 1, se puede realizar un alineamiento global de las secuencias utilizando los programas BLAST disponibles al público a través del Centro Nacional de Información sobre Biotecnológica (en la World Wide Web en ncbi.nlm.nih.gov). Antes de realizar una alineación global, la SEQ ID NO: 1 se puede someter a GenBank. Los parámetros predeterminados proporcionados por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología se pueden utilizar para un alineamiento global.

30 Se debe entender que la tecnología descrita aquí incluye el uso de análogos de péptido en los que se puede sustituir uno o más aminoácidos con otros aminoácidos. En algunas realizaciones, el análogo de péptido del factor motoneuronotrófico contiene una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos en un fragmento de por lo menos 2 residuos de aminoácidos conservadores de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los 2 residuos de aminoácidos conservadores son F-S.

35 El diseño racional de MNTF y otros imitadores del dominio análogo o moléculas de unión, basado en la estructura de péptido modelo (o determinado experimentalmente), se puede llevar a cabo por aquellos expertos, utilizando métodos conocidos de diseño racional de fármacos. El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos o compuestos objetivo. Al crear dichos análogos, es posible formar fármacos, que son más activos o estables que las moléculas naturales, que tienen diferente susceptibilidad a alteración o que pueden afectar la función de varias otras diversas moléculas. En un método, se podría generar una estructura tridimensional de una molécula objetivo, o un fragmento de la misma. Esto se podría lograr mediante cristalografía de rayos x, modelización por ordenador o por una combinación de ambos métodos.

40 La molécula de MNTF tridimensional y las estructuras relacionadas descritas aquí se pueden ser utilizar en métodos de diseño de fármaco racional computarizado (es decir, el modelado molecular y el modelado de interacción molécula-molécula) para identificar compuestos candidatos que se unen con una parte activa del MNTF. Una variedad de programas de diseño de fármacos computarizados capaces de modelar la interacción de un compuesto candidato con, por ejemplo, coordenadas atómicas se describe aquí, son conocidos en la técnica, y el funcionamiento de dichos programas está dentro del conocimiento del experto común en el campo del diseño racional de fármacos.

Métodos de fabricación

Se entiende que una composición que comprende un péptido de MNTF o análogo del mismo de la presente descripción se puede elaborar por un método que es bien conocido en la técnica, que incluye pero no se limita a síntesis química

mediante síntesis en fase sólida y purificación a distancia de otros productos de las reacciones químicas mediante HPLC, o producción por la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, una secuencia de ADN) que codifica un péptido o polipéptido que comprende un péptido de MNTF o análogo del mismo descrito aquí en un sistema de traducción *in vitro* o en una célula viva. El péptido de MNTF o análogo del mismo de la composición se puede aislar y dializar ampliamente para eliminar una o más moléculas pequeñas no deseadas de peso molecular y/o liofilizar para formulación más fácil en un vehículo deseado. Adicionalmente, se entiende que los aminoácidos adicionales, mutaciones, modificación química y tal como, si lo hay, que se realizan en un componente de péptido de MNTF no deben interferir sustancialmente con el reconocimiento del receptor de la secuencia de acoplamiento de MNTF.

Un péptido o polipéptido que corresponde a uno o más fragmentos de MNTF de manera general debe tener por lo menos dos residuos de aminoácidos en longitud, y puede contener 2, 3, 4, o 5 residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, el análogo de péptido de MNTF comprende 6 residuos de aminoácidos y una derivación funcional, por ejemplo una palmitilación. Una secuencia de péptidos se puede sintetizar mediante métodos conocidos por aquellos por aquellos expertos comunes en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis de péptido utilizando máquinas de síntesis de péptido automáticas, tales como aquellas disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA). La tecnología descrita aquí incluye síntesis y uso de péptidos cíclicos derivados de las SEQ ID NOs: 1-22.

Se pueden introducir modificaciones covalentes en un péptido al hacer reaccionar los residuos aminoácidos objetivo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. La modificación covalente de polipéptidos utilizando agentes de derivación orgánicos es bien conocida por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los residuos de cisteinilo se pueden hacer reaccionar con α -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar carboximetilo o derivados de carboximetilo. Los residuos de histidina se pueden derivar por reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5.5-7.0, o con bromuro de para-bromofenacilo a pH 6 en de cacodilato de sodio 1 M. El lisinilo y los residuos terminales amino se pueden hacer reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. Los residuos de arginilo se pueden modificar por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. Las marcas espectrales se pueden introducir en los residuos tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano; se utilizan más comúnmente, N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de tirosilo O-acetilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se pueden modificar selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (R'-NCN-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia 4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se pueden desaminar a residuos glutamilo y aspartilo correspondientes. Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina, y histidina (T. E. Creighton, 1983, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86), acetilación de la amina de terminal N, y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo de terminal C.

Los péptidos de MNTF o análogos de los mismos descritos aquí se pueden utilizar en ensayos y equipos para ensayos, ya sea en la forma libre o unidos a una molécula portadora tal como una proteína o una partícula sólida, así como péptidos modificados unidos a una marca o trazador por ejemplo, biotina o isotiocianato de fluoresceína.

El entrecruzamiento de un péptido de MNTF o análogo del mismo a una matriz de soporte insoluble en agua se puede realizar con agentes bifuncionales bien conocidos en la técnica que incluyen 1,1 bis (diazoacetil) 2 feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes bifuncionales tales como propioimidato de metil-3 - [(p-azidofenil) ditio] producen intermediarios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua tales como hidratos de carbono activados con bromuro cianógeno se pueden emplear para inmovilización de proteínas.

El entrecruzamiento de un péptido de MNTF o análogo del mismo a una segunda proteína, que incluye un segundo péptido de MNTF o análogo del mismo, se puede realizar utilizando los reactivos bifuncionales descritos aquí. En algunas realizaciones, se inserta un separador, por ejemplo un grupo ditiol o un grupo diamino, o múltiples de residuos de aminoácidos, por ejemplo, glicina. El separador también puede ser un agente de entrecruzamiento homo o heterobifuncionales, por ejemplo, el agente de entrecruzamiento heterobifuncional N-(4-carboxi-ciclohexilmetil) maleimida.

Los péptidos o polipéptidos más largos, por ejemplo una proteína de fusión, se pueden producir por técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, un fragmento de ADN que codifica un fragmento de péptido de MNTF1 se puede clonar en un vector de expresión comercialmente disponible que ya contiene una proteína heteróloga, el resultado es un armazón interno del fragmento de péptido de MNTF1 fusionado a la proteína heteróloga.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un péptido de MNTF1 y/o un componente descrito aquí se pueden utilizar, por ejemplo, para producir un péptido in vitro o in vivo para las diversas composiciones y métodos descritos aquí. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un péptido de MNTF1 es un componente de, por ejemplo, un vector en una célula recombinante. El ácido nucleico se puede expresar para producir un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de péptidos de MNTF1. El péptido o polipéptido puede ser secretado por la célula, o como parte de o dentro de la célula.

Cribado de compuestos

Los compuestos identificados por los procedimientos de cribado descritos aquí se pueden distinguir adicionalmente, y la eficacia del compuesto se puede evaluar, en base a su capacidad para tratar trastornos neuronales en sistemas de modelo de enfermedad y trastorno de cultivo de células animales aceptadas en la técnica. En muchos ensayos de cribado de fármacos en los que prueban colecciones de compuestos y extractos naturales, son deseables ensayos de alto rendimiento con el fin de maximizar el número de compuestos estudiados en un determinado periodo de tiempo. Los ensayos que se realizan en sistemas libres de células, tales como se pueden derivar con proteínas purificadas o parcialmente purificadas, se utilizan a menudo como cribado "primario" que se pueden generar para permitir el rápido desarrollo y detección relativamente fácil de una alteración en un objetivo molecular que está mediado por un compuesto de prueba. Adicionalmente, los efectos de la toxicidad y/o biodisponibilidad del compuesto de prueba celular pueden ser generalmente ignorados en el sistema in vitro, el ensayo en cambio se centra principalmente sobre el efecto del fármaco sobre el objetivo molecular que se puede manifestar en una alteración de la unión de4 afinidad con las proteínas receptoras.

Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona un método para identificar un compuesto útil para promover el crecimiento o supervivencia de las motoneuronas. En una realización, el método comprende las etapas de i) preparar una muestra que comprende un compuesto candidato, ii) poner en contacto una célula con dicha muestra, iii) determinar si se modula la expresión o actividad de un compuesto implicado en las rutas de transducción de señal, y iv) determinar si la muestra es capaz de promover el crecimiento o supervivencia de las motoneuronas. En otras realizaciones, el método comprende adicionalmente la determinación de si una muestra que contiene un compuesto candidato se regula por un péptido de MNTF o análogo del mismo, o, alternativamente, regula por un péptido de MNTF o análogo del mismo (por ejemplo, actividad, expresión, etc.). En otro aspecto, la tecnología descrita aquí incluye métodos para promover el crecimiento o supervivencia de las motoneuronas o para el tratamiento de un trastorno neuronal al administrar un compuesto identificado por los procedimientos de cribado descritos aquí.

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

La formación de complejos entre la proteína de unión de péptido de MNTF y un péptido de MNTF se puede detectar por una variedad de técnicas. Por ejemplo, la modulación de la formación de complejos se puede cuantificar utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de forma detectable tales como péptidos de MNTF radiomarcados, marcados por fluorescencia, o marcados enzimáticamente, por inmunoensayo o por detección cromatográfica. Para los ensayos libres de células, normalmente será deseable inmovilizar ya sea el péptido de MNTF o la proteína de unión de péptido de MNTF para facilitar la separación de los complejos de receptor /péptido de MNTF a partir de formas sin formación de complejos de una de las proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. Por ejemplo, una proteína de fusión se puede proporcionar lo que agrega un dominio que permite que la proteína se una a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/receptor (GST/receptor) se pueden adsorber sobre perlas de Sepharose de glutatión (Sigma Chemical, St. Louis; Mo.) o placas de microtitulación derivadas de glutatión 35, que luego se combinan con el péptido de MNTF, por ejemplo, un péptido de MNTF marcado con S, y el compuesto de prueba y se incuban bajo condiciones que conducen a la formación de complejos, por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH, aunque se pueden desear condiciones ligeramente más rigurosas. Después de incubación, las perlas se lavan para eliminar cualquier péptido de MNTF no unido, y el radiomarcador se determina directamente unido a perla de matriz (por ejemplo, perlas colocadas en escintilante), o en el sobrenadante después que los complejos se disocian. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la perla, separados por gel de SDS-PAGE, y el nivel de péptido de MNTF encontrado en la fracción de perlas se cuantifica del gel utilizando técnicas electroforéticas estándar.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices también están disponibles para uso en el ensayo objeto. Por ejemplo, las porciones solubles de la proteína de péptido de MNTF se pueden inmovilizar utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Por ejemplo, las moléculas receptoras biotiniladas se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas bien conocidas en el arte (por ejemplo, equipo de biotinilación, Pierce

Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizarse en los pozos de placas recubiertas con estreptavidina de 96 pozos (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reactivos con la proteína de unión de péptido de MNTF pero que no interfieren con la unión de ligando se pueden derivar a los pozos de la placa, y el receptor atrapado en los pozos mediante conjugación de anticuerpos. Como anteriormente, las preparaciones de un péptido de MNTF y un compuesto de prueba se incuban en los pozos que presentan receptores de placa, y se puede cuantificar la cantidad de receptor/complejo hedgehog atrapado en el pozo. Los métodos de ejemplo para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos utilizando anticuerpos reactivos con el péptido de MNTF, o que son reactivos con la proteína receptora y compiten por la unión con el péptido de MNTF; así como ensayos unidos a enzimas que dependen de la detección de una actividad enzimática asociada con el péptido de MNTF. En el caso de esto último, la enzima se puede conjugar o proporcionar de forma química como una proteína de fusión con el péptido de MNTF. Para ilustrar, el péptido de MNTF se puede entrecruzar químicamente o fusionar genéticamente con fosfatasa alcalina, y la cantidad de péptido de MNTF atrapado en el complejo se puede evaluar con un sustrato cromogénico de la enzima, por ejemplo, paranitrofenilfosfato. Del mismo modo, se puede proporcionar una proteína de fusión que comprende el péptido de MNTF y glutatión-S-transferasa, y la formación de complejos se cuantifica al detectar la actividad de GST utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (Habig et al., J Biol Chem, 249:7130 (1974)). Para la inmunodetección para cuantificar una de las proteínas atrapadas en el complejo, se pueden utilizar los anticuerpos contra la proteína, tales como los anticuerpos de péptido de anti-MNTF. Alternativamente, la proteína que se va a detectar en el complejo puede ser "etiquetada con epítipo" en forma de una proteína de fusión que incluye, además del péptido de MNTF o secuencia de péptidos de MNTF, un segundo polipéptido para el que los anticuerpos son fácilmente asequibles (por ejemplo, desde fuentes comerciales). Por ejemplo, las proteínas de fusión GST descritas anteriormente también se pueden utilizar para la cuantificación de la unión utilizando anticuerpos contra la unidad estructura de GST. Otros marcadores de epítipo útiles incluyen myc-epítipos (por ejemplo, véase Ellison et al., J Biol Chem. 266: 21150-21157 (1991)), que incluye una secuencia de 10 residuos de c-myc, así como también el sistema pFLAG (International Biotechnologies, Inc.) o el sistema A de proteína pEZZ (Pharmacia, NJ).

25 Composiciones

Las composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más de los péptidos de MNTF o análogos de los mismos se describen aquí junto con un diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores /diluyentes adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen solución salina u otro medio acuoso estéril, incluyendo opcionalmente componentes adicionales, tales como sales reguladoras y conservantes, o azúcares, almidones, sales o mezclas de los mismos.

Las composiciones que contienen péptidos de MNTF se pueden proporcionar para uso en cualquier forma apropiada adecuada para el protocolo de administración y/o las necesidades de un paciente.

La tecnología descrita aquí incluye los medios de cultivo que son útiles para el establecimiento y propagación de células madre, células progenitoras neuronales, células neuronales diferenciadas y células madre derivadas de neuronas motoras. Los medios son particularmente adecuados para la diferenciación de células madre y el cultivo a largo plazo de células madre derivadas de neuronas motoras.

El medio de cultivo celular está deseablemente suplementado con morfógenos y/o factores de crecimiento, y se optimiza de acuerdo con el tipo de célula individual deseada para ser cultivada. Dicha suplementación y optimización están dentro de la experiencia común en la técnica. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular puede ser suplementado con cualquiera o todos de los siguientes morfógenos y/o factores de crecimiento en los siguientes niveles aproximados (o dentro de un dígito significativo): RA en 0.001 a 1 μM , Shh o agonista Shh, a 0.001-1 μM , y/o uno o más péptidos de MNTF o análogos de los mismos en 0.01- 250 $\mu\text{g/ml}$.

Las formulaciones farmacéuticas descritas aquí pueden incluir, como ingredientes opcionales, portadores farmacéuticamente aceptables, diluyentes, agentes solubilizantes o emulsionantes, y sales del tipo que estén disponibles en la técnica. Ejemplos de dichas sustancias incluyen soluciones salinas normales, tales como soluciones salinas reguladas fisiológicamente y agua. Ejemplos específicos no limitantes de portadores y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas incluyen agua y soluciones salinas reguladas fisiológicamente aceptables tales como soluciones salinas reguladas con fosfato a pH 7.0-8.0. Los portadores farmacéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a agua estéril, soluciones de sal (por ejemplo, solución de Ringer), alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsificadores, sales para influir en la presión osmótica, reguladores, colorantes, y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. También se pueden combinar cuando se desee con otras sustancias activas, por ejemplo, inhibidores de enzimas, para reducir la degradación metabólica.

Los compuestos proporcionados aquí se pueden formular en una composición farmacéutica, que puede incluir portadores farmacéuticamente aceptables, espesantes, diluyentes, reguladores, conservantes, agentes de superficie

activa, lípidos neutros o catiónicos, complejos de lípidos, liposomas, mejoradores de penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables y similares además del péptido.

Las composiciones farmacéuticas de manera general se formulan para ser administradas para un propósito terapéutico. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos tales como interferones, agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, y similares. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener reguladores, liposomas, diluyentes y otros aditivos adecuados. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos proporcionados aquí pueden incluir mejoradores de penetración con el fin de mejorar el suministro alimentario de los péptidos. Los mejoradores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, es decir, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes, surfactantes y no surfactantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 8, 91-192 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990)). Se puede incluir o más mejoradores de penetración de una o más de estas amplias categorías.

Los diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como mejoradores de penetración incluyen, por ejemplo, ácido caprílico, ácido valérico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, ricinleato, monooleína (a.k.a. 1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono- y di-glicéridos y sales fisiológicamente aceptables de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.). Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1 (1990); El-Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 651-654 (1992).

En ciertas realizaciones, análogos de péptido de MNTF de ejemplo incluyen derivados funcionales de un péptido de MNTF con un mejorador de penetración, por ejemplo uno o más ácidos grasos adheridos de forma covalente a uno o más grupos funcionales sobre el péptido. En algunas realizaciones, los análogos de péptido de MNTF incluyen péptidos representados en las SEQ ID NOs:1-22 que adicionalmente tienen una modificación de terminal N con un mejorador de penetración, por ejemplo un ácido graso y/o alquilcarbonilo (Alqu-C(O)-) desde 2 hasta aproximadamente 22 átomos de carbono, y/o derivados funcionales de un péptido de MNTF con un grupo protector seleccionado del grupo que consiste de benciloxicarbonilo, tert-butiloxicarbonilo, fluorenil-metoxicarbonilo y aliloxicarbonilo, y Y es OH o NH₂. En algunas realizaciones, el alquilcarbonilo contiene 10 a 20, 12 a 18, o 2-22 carbonos. En ciertas realizaciones, la modificación de terminal N adecuada sobre los análogos de péptido de MNTF es mediante palmitilación (por ejemplo ácido palmítico).

Las funciones fisiológicas de la bilis incluyen la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. McGraw-Hill, New York, N.Y., pages 934-935 (1996)). Las diversas sales biliares naturales y sus derivados sintéticos, actúan como mejoradores de penetración. Por lo tanto, el término "sal biliar" incluye cualquiera de los componentes de origen natural de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos.

Se pueden utilizar formulaciones complejas que comprenden uno o más mejoradores de penetración. Por ejemplo, las sales biliares se pueden utilizar en combinación con ácidos grasos para hacer formulaciones complejas. Los agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminetetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, salicilato de 5-metil y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, laureth-9 y derivados N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas) [Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* pagina 92 (1991); Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 7, 1-33 (1990); Buur et al., *J. Control Rel.* 14, 43-51 (1990)). Los agentes quelantes tienen la ventaja agregada de también servir como inhibidores de la DNasa.

Los surfactantes incluyen, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, éter de polioxietileno-9-laurilo y éter de polioxietileno 20-cetilo (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991)); y emulsiones de productos químicos perfluorados, tales como FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 252-257 (1988)). Los no surfactantes incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkil- y 1-alkenilazaciclo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* page 92 (1991)); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.* 39, 621-626 (1987)).

Los portadores farmacéuticamente aceptables típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa, etc.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, glicolato de almidón sodio, etc.); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

Las composiciones descritas aquí pueden contener adicionalmente otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles establecidos por la técnica de uso. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de la composición descrita aquí, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se agregan, no deberán interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones proporcionadas aquí.

Independientemente del método por el cual los compuestos se introducen en un paciente, se pueden utilizar sistemas de dispersión coloidal como vehículos de administración para mejorar la estabilidad in vivo de los péptidos y/o para dirigir los péptidos a un tipo de órgano, tejido o célula particular. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen, pero no se limitan a, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas con base en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, liposomas y complejos de lípido: péptido de estructura no caracterizada. Un ejemplo de un sistema de dispersión coloidal es una pluralidad de liposomas. Los liposomas son esferas microscópicas que tienen un núcleo acuoso rodeado por una o más capas externas hechas de lípidos dispuestos en una configuración de bicapa (véase, en general, Chonn et al., *Current Op. Biotech.* 6, 698-708 (1995)).

En ciertas realizaciones, los péptidos de MNTF y análogos de MNTF se pueden incorporar en o utilizar en conjunto con una biodistribución que dirige la unidad estructural, que incluye uno o más polímeros, para dirigir la biodistribución del péptido de MNTF o análogo de MNTF u otro compuesto proporcionado aquí a la proximidad de un objetivo deseado o para permitir la liberación continua del mismo. Los agentes activos incluyen, por ejemplo, compuestos útiles para aumentar la eficacia terapéutica, para optimizar la biodistribución y biodisponibilidad, para reducir los daños en los tejidos, para promover la curación, o para aumentar la comodidad del paciente; agentes activos de ejemplo incluyen agentes vasoactivos, anestésicos, agentes terapéuticos para isquemia, factores de crecimiento y citoquinas. Alternativamente, las formas de dosificación de perlas poliméricas de micropartículas o nanopartículas se pueden utilizar para las composiciones proporcionadas aquí. Los compuestos proporcionados aquí se pueden utilizar en combinación con un agente activo y encapsular en una forma de dosificación de partículas con una serie de moléculas de ligando o anti-ligando unidas a los mismos.

De esta manera, los péptidos de MNTF y análogos de MNTF, y otros compuestos proporcionados aquí, solos o en combinación con otros agentes activos, se liberan en ese sitio con el tiempo para proporcionar un beneficio terapéutico sostenido. Las formas de dosificación de liberación sostenida también son útiles en relación con otros agentes activos útiles en los métodos descritos aquí, tales como factores de crecimiento, citoquinas, y similares. La liberación del agente activo a partir de las formas de dosificación de partículas puede ocurrir como resultado de la difusión y erosión de la matriz de partículas. El índice de biodegradación impacta directamente la cinética de liberación del agente activo.

En ciertas realizaciones, las formulaciones parenterales de liberación controlada de péptidos de MNTF, análogos de MNTF, y compuestos descritos aquí se pueden hacer como implantes, inyecciones oleosas, o como sistemas de partículas. Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica como un núcleo central. En las microesferas el producto terapéutico se dispersa en toda la partícula. Se pueden utilizar liposomas para liberación controlada, así como fármaco que específico del fármaco atrapado.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica descrita aquí, que incluye péptidos de MNTF y análogos de MNTF, se puede administrar por vía local, tópica, nasal, oral, gastrointestinal, intrabronquial, intravesical, intravaginal, en el útero, por vía subcutánea, intramuscular, periarticular, intraarticular, en el líquido cefalorraquídeo (ICFS), en el tejido cerebral (por ejemplo, administración intracraneal), en la médula espinal, en heridas, intraperitoneal o intrapleural, o de forma sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraportal o directamente en el órgano.

Una variedad de catéteres y rutas de suministro se pueden utilizar para conseguir administración intracoronaria, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, una variedad de catéteres de uso general, así como catéteres modificados, adecuados para uso como se describe aquí están disponibles en proveedores comerciales tales como Advanced Cardiovascular Systems (ACS), Target Therapeutics and Cordis. También, cuando se logra el suministro al miocardio por inyección directamente en una arteria coronaria, una serie de métodos se puede utilizar para introducir un catéter en la arteria coronaria, como se conoce en la técnica. A modo de ilustración, un catéter se puede introducir convenientemente en una arteria femoral y se enrosca retrógrado a través de la arteria iliaca y la aorta abdominal y en una arteria coronaria. Alternativamente primero, se puede introducir un catéter en una arteria braquial o carótida y se enrosca retrógrado a una arteria coronaria. Descripciones detalladas de estas y otras técnicas se pueden encontrar en el arte (véase, por ejemplo, Topol, E J (ed.), *The Textbook of Interventional Cardiology*, 2nd Ed. (W.B. Saunders Co. 1994); Rutherford, R B, *Vascular Surgery*, 3rd Ed. (W.B. Saunders Co. 1989); Wyngaarden J B et al. (eds.), *The Cecil Textbook of Medicine*, 19th Ed. (W. B. Saunders, 1992); and Sabiston, D, *The Textbook of Surgery*, 14th Ed. (W.B. Saunders Co. 1991)).

Los compuestos proporcionados aquí se pueden administrar de forma parenteral. Ciertos compuestos se combinan con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Los portadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina regulada con fosfato. La composición se puede formular para administración parenteral, intramuscular, intracerebral, intravenosa, subcutánea, o transdérmica. La formulación que se administra puede contener dichos agentes. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos (por ejemplo fosfato de calcio y DEAE-dextrano) y lipofectantes (por ejemplo lipofectamTM y TransfectamTM).

Las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. También pueden ser útiles guantes recubiertos, condones, y similares. Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes. Las composiciones para administración parenteral pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados. En algunos casos, puede ser más eficaz tratar a un paciente con un péptido en conjunto con otras modalidades terapéuticas tradicionales con el fin de aumentar la eficacia de un régimen de tratamiento. Como se utiliza aquí, el término "régimen de tratamiento" pretende abarcar modalidades terapéuticas, paliativas y profilácticas.

La dosificación puede depender de una serie de factores, que incluyen gravedad y capacidad de respuesta del estado de enfermedad que se va a tratar, y con el transcurso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúa una cura o se logra una disminución del estado de enfermedad. La toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos proporcionados aquí se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales. Por ejemplo, al determinar la LD₅₀ (la dosis letal al 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD₅₀/ED₅₀. Los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos son útiles. Aunque se pueden utilizar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado para diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio de los tejidos afectados con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Se pueden utilizar los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales para formular un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos debe estar dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado como se describe aquí, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un rango de concentración en plasma circulante que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. El programa de dosificación se puede calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosificaciones pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los compuestos individuales que incluyendo péptidos de MNTF y análogos de MNTF, y generalmente se pueden estimar con base en EC₅₀ encontrado para ser efectivo in vitro y en modelos animales in vivo. Un experto en la técnica reconocerá que las dosificaciones pueden variar dependiendo de cómo y dónde se administra un péptido de MNTF o análogo (por ejemplo, in vitro, in vivo, por vía tópica, sistémica, etc.).

Por ejemplo, en un aspecto, los péptidos de MNTF y análogos de MNTF se pueden administrar para lograr desde aproximadamente 0.01 microgramos por ml ($\mu\text{g}/\text{mL}$) hasta aproximadamente 1 mg por ml, desde aproximadamente 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, desde aproximadamente 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, desde aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y desde aproximadamente 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incluyendo cualquier rango dentro de estos rangos, las concentraciones finales en un sitio objetivo (por ejemplo en células madre de un cultivo celular de ES).

Cantidades de dosificación alternativas adecuadas pueden, por ejemplo, variar desde aproximadamente 0.1 μg hasta una dosis total de aproximadamente 1 gramo, dependiendo de la ruta de administración. Se proporciona guía para las dosificaciones y procedimientos de suministro particulares en la bibliografía y en general disponibles para los practicantes en la técnica. Aquellos expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para nucleótidos que para proteínas o sus inhibidores. Del mismo modo, la administración de polinucleótidos, polipéptidos, y los compuestos proporcionados aquí se especificará para células, condiciones y lugares particulares. En general, la dosificación generalmente varía 0.01 mg/kg hasta 1000 mg por kg de peso corporal, y más normalmente, por ejemplo, desde 0.1 mg/kg hasta 300 mg por kg de peso corporal, y se puede administrar una o más veces al día, semanal, mensual o anualmente, o incluso una vez o más durante un período de tiempo de 2 a 20 años. En ciertas realizaciones, la dosificación se puede administrar desde inmediatamente después de cirugía hasta 24 horas, en otra realización; la

5 dosificación se desde 2 horas y hasta 24 horas. Las composiciones de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, cada semana, o cada dos semanas dependiendo del índice de media vida y de depuración de la formulación particular. Las personas de experiencia común en la técnica pueden estimar fácilmente los índices de repetición para la dosificación en base a los tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, en donde se administra un compuesto seleccionado en dosis de mantenimiento, que varían desde 0.01 mg/kg hasta 100 mg por kg de peso corporal, una vez o más al día, a una vez cada 20 años. En el tratamiento o prevención de ciertas afecciones, un nivel de dosificación apropiado será generalmente de aproximadamente 0.001 a 100 mg por kg de peso corporal del paciente por día que se puede administrar en dosis únicas o múltiples. Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 mg/kg por día. En ciertas realizaciones, los compuestos proporcionados aquí, incluyendo péptidos de MNTF y análogos de los mismos, se administran en una cantidad para lograr las concentraciones in vivo desde aproximadamente 1 micromolar hasta aproximadamente 1 milimolar, desde aproximadamente 10 micromolar hasta aproximadamente 500 micromolar, o desde aproximadamente 30 micromolar hasta aproximadamente 300 micromolar, y desde aproximadamente 25 micromolar hasta aproximadamente 300 micromolar de concentración final sobre el sitio dañado, y que incluye, aproximadamente 25 micromolar, o aproximadamente 220 micromolar, o aproximadamente 300 micromolar de concentración final sobre el sitio dañado, y aún más normalmente entre aproximadamente 1 micromolar hasta aproximadamente 100 micromolar..

En ciertas realizaciones, se puede administrar dosificación de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 150, o 200 mg/kg.

20 Los compuestos descritos aquí se pueden utilizar en reactivos diagnósticos, terapéuticos, de profilaxis y como reactivos de investigación y en equipos. La provisión de medios para la detección de compuestos de interés (por ejemplo, péptidos de MNTF y análogos de MNTF) se puede llevar a cabo de forma rutinaria. Dicha provisión puede incluir la conjugación de la enzima, radiomarcado o cualesquier otros sistemas de detección adecuados. También se pueden preparar equipos para detección de la presencia o ausencia de compuestos de interés.

25 Como se utiliza aquí, las lesiones de la médula espinal pueden incluir lesiones derivadas de un tumor, trauma mecánico, y trauma químico.

30 En ciertos aspectos, se proporcionan composiciones y métodos de tratamiento terapéutico comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido MNTF o análogo del mismo como se define aquí, después de lesión de una ruta neuronal, o en anticipación de dicha lesión, durante un tiempo y a una concentración suficiente para mantener la ruta neuronal, que incluye la reparación de las rutas dañadas, o inhibir el daño adicional a las mismas.

En otro aspecto, la tecnología descrita aquí incluye composiciones para uso en métodos de tratamiento terapéuticos para mantener las rutas neuronales. Dichos métodos de tratamiento incluyen administración al sujeto, después de lesión de una ruta neuronal o en anticipación de dicha lesión, un compuesto que estimula una concentración terapéuticamente eficaz de un MNTF endógeno.

35 Los aspectos y realizaciones descritas aquí proporcionan métodos para proteger las neuronas de efectos destructivos de tejidos asociados con la respuesta inmunitaria e inflamatoria del cuerpo a la lesión del nervio.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos, composiciones y dispositivos para estimular la reparación celular de las neuronas dañadas y rutas neuronales, incluyen regeneración de las dendritas o axones dañados.

40 En un aspecto, los péptidos de MNTF y análogos de los mismos descritos aquí son útiles en la reparación de las rutas neuronales dañadas del sistema nervioso periférico. En particular, los MNTF son útiles para la reparación de las rutas neuronales dañadas, que incluyen fibras nerviosas seccionadas o de otra forma dañadas. Específicamente, los MNTF descritos aquí son capaces de estimular una regeneración completa del nervio axonal, que incluye vascularización y reformación de la vaina de mielina. El MNTF se puede proporcionar al sitio de la lesión en un portador biocompatible, bioabsorbible capaz de mantener el MNTF en el sitio y, donde sea necesario, medios para dirigir el crecimiento axonal desde el extremo proximal hasta el extremo distal de una neurona cortada. Por ejemplo, los medios para dirigir el crecimiento axonal pueden ser requeridos donde la regeneración del nervio es para ser inducida a través de una distancia extendida, tal como mayor de 10 mm. Se contemplan muchos portadores capaces de proporcionar estas funciones. Por ejemplo, los portadores útiles incluyen materiales sustancialmente insolubles o soluciones viscosas preparadas como se describe aquí que comprenden laminina, ácido hialurónico o colágeno, u otros materiales sintéticoa, poliméricos biocompatibles adecuado tales como ácidos polibutírico poliláctico, o poliglicólico y/o copolímeros de los mismos.

55 En ciertas realizaciones, un péptido de MNTF o análogo del mismo se dispone en un canal de guía del nervio que abarca la distancia de la ruta dañada. El canal actúa como una cubierta protectora y un medio físico para guiar el crecimiento de las neuritas. Los canales útiles comprenden una membrana biocompatible, que puede ser tubular en su estructura, que tiene una dimensión suficiente para abarcar el espacio en el nervio que se va a reparar, y que tiene

aberturas adaptadas para recibir extremos de nervio cortado. La membrana puede estar hecha de cualquier material biocompatible, no irritante, tal como silicona o un polímero biocompatible, tal como polietileno o polietileno de acetato de vinilo. La carcasa también se puede componer de polímeros biocompatibles, bioabsorbibles, que incluyen, por ejemplo, colágeno, ácido hialurónico, ácidos poliláctico, polibutírico, y poliglicólico. En una realización, la superficie externa del canal es sustancialmente impermeable.

En otro aspecto, los péptidos de MNTF y análogos de los mismos descritos aquí son útiles para proteger contra el daño asociado con la respuesta inmunitaria/inflamatoria del cuerpo a una lesión inicial en el tejido nervioso. Dicha respuesta puede seguir a un traumatismo en el tejido nervioso, causado, por ejemplo, por una disfunción autoinmunitaria, lesión neoplásica, infección, trauma químico o mecánico, enfermedad, por interrupción del flujo de sangre a las neuronas o células gliales, o mediante otro trauma en el nervio o material circundante. Por ejemplo, el daño primario que resulta de hipoxia o isquemia-reperusión después de oclusión de un suministro de sangre neuronal, como en una apoplejía embólica, se considera que es inmunológicamente asociada. Además, por lo menos parte del daño asociado con un número de tumores cerebrales primarios también parece estar inmunológicamente relacionado. La aplicación de un péptido MNTF o análogo del mismo, ya sea directamente o por vía sistémica puede aliviar y/o inhibir la respuesta inmunológicamente relacionada con una lesión neuronal.

En otra realización, la tecnología descrita aquí abarca el uso de variantes de especies biológicamente activas (filogenéticas) de cualquiera de los factores de MNTF mencionados aquí, que incluyen variantes de la secuencia de aminoácidos conservadores, proteínas codificadas por variantes de secuencia de nucleótidos degeneradas, y factores de MNTF que comparten los dominios de MNTF conservados y codificados por un ADN competente para hibridarse en condiciones de rigurosidad estándar a un ADN que codifica un factor de MNTF descrito aquí.

Los compuestos descritos aquí también se pueden utilizar para propósitos de investigación. Por lo tanto, la hibridación específica exhibida por los péptidos se puede utilizar para ensayos, purificaciones, preparaciones de productos celulares y en otras metodologías que pueden ser apreciadas por las personas de experiencia común en la técnica.

Los términos científicos y técnicos utilizados aquí tienen significados comúnmente entendidos por un experto común en la técnica a la que pertenece la presente descripción, a menos que se defina de otra forma. Se hace referencia aquí a diversas metodologías conocidas por aquellos expertos en la técnica. Los trabajos de referencia estándar que establecen los principios generales de la tecnología del ADN recombinante incluyen Sambrook, J., et. al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989) and *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition (Sambrook and Russel, 2001), juntos e individualmente mencionados aquí como "Sambrook"; McPherson, M. J., Ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991); Jones, J., *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publications, Oxford (1992); Austen, B. M. and Westwood, O. M. R., *Protein Targeting and Secretion*, IRL Press, Oxford (1991); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, including supplements through 2001); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *The Immunoassay Handbook* (D. Wild, ed., Stockton Press NY, 1994); *Bioconjugate Techniques* (Greg T. Hermanson, ed., Academic Press, 1996); *Methods of Immunological Analysis* (R. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds., Weinheim: VCH Verlags gesellschaft mbH, 1993), Harlow and Lane (1988) *Antibodies*, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, and Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (juntas e individualmente mencionadas aquí como Harlow and Lane), Beaucage et al. eds., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* John Wiley & Sons, Inc., New York, 2000); and Agrawal, ed., *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* Humana Press Inc., New Jersey, 1993); *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach* (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. (1987); *Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press (1993); *Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro* (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900 (1993); *Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P.D. Rathjen et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, 10:31 (1998)); *CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances*, M. H. Tuszynski & J. H. Kordower, eds., Academic Press, (1999).

Ciertas técnicas que pueden ser útiles en la práctica de la tecnología descrita aquí se describen en diversas patentes y solicitudes de patentes, que incluyen la Patente Estadounidense No. 5,851,832, que reporta células madre neuronales multipotentes obtenidas de tejido cerebral, la Patente Estadounidense No. 5,766,948 que reporta neuroblastos productores de hemisferios cerebrales de recién nacidos, las Patentes Estadounidenses Nos. 5,654,183 y 5,849,553 que reportan el uso de células madre de la cresta neuronal de mamíferos, Patente Estadounidense No. 6,040,180 que reporta la generación in vitro de neuronas diferenciadas a partir de cultivos de células madre del SNC de mamíferos multipotenciales, documentos WO 98/50526 y WO 99/01159, que reportan la generación y aislamiento de las células madre neuroepiteliales, precursores de astrositos-oligodendrocitos, y precursores neuronales de linaje restringido, y la Patente Estadounidense No. 5,968,829 que reporta células madre neuronales obtenidas de prosencéfalo embrionario y cultivado con un medio que comprende glucosa, transferrina, insulina, selenio, progesterona, y varios otros factores de crecimiento.

Cualesquier materiales y/o métodos adecuados conocidos por los expertos se pueden utilizar en la realización de la tecnología descrita aquí; sin embargo, se describen aquí ejemplos no limitantes de materiales y/o métodos.

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

10 Como se utiliza aquí, se contempla que la eficacia de los péptidos de MNTF y la secuencia y/o análogos funcionales de los mismos se puede determinar por protocolos idénticos y/o sustancialmente similares como se describe en los siguientes ejemplos. Además, se contempla que la eficacia de cualquiera de los péptidos de MNTF como se establece en las SEQ ID NOs: 1-22, y análogos de las mismas, se puede determinar de acuerdo con las condiciones experimentales que se exponen aquí.

Ejemplo 1

Prueba de eficacia de péptido de MNTF o análogo del mismo para atenuar la muerte celular en un modelo de supervivencia celular de neuronas motoras de rata in vitro.

15 El ejemplo 1 ilustra la capacidad del análogo de 6 aminoácidos (GM6) y varios análogos más cortos de péptidos del factor motoneuronotrófico (MNTF) para atenuar la muerte celular en un modelo de supervivencia celular de neuronas motoras de rata in vitro. La administración de GM6 (SEQ ID NO: 2) y otros análogos de (3-mer, 4-mer, 5-mer) a 10 microgramos/ml, demostró una atenuación de la muerte celular de las neuronas motoras, a las cuales se le especificó el análogo. Los análogos mostraron un patrón único de efectos tróficos que los análogos que contienen el terminal de fenilalanina más eficaz. Estos datos indican que el GM6 y algunos de los análogos son factores tróficos efectivos en el
20 modelo de supervivencia celular de las neuronas motoras.

Abreviaturas/Terminología para este Ejemplo.

“GM6” y “6mer” significa análogo de péptido de MNTF de 6 aminoácidos de ejemplo.

“Genervon” y “GB” significa mean Genervon Biopharmaceuticals, LLC.

“I.V.” significa por vía intravenosa.

25 “NTS” significa Neurological Testing Service, que es una organización de investigación contrato.

El GM6 es un péptido de 6 aminoácidos sintetizado. Se proporciona GM6 como un sólido y la formulación se prepara por NTS (solución almacenada a 4°C). Los análogos de GM6 incluyen homólogos de secuencia de los péptidos de GM6.

“PD” significa enfermedad de Parkinson

30 “BDNF” significa factor neurotrófico derivado del cerebro

“GDNF” significa factor neurotrófico derivado del glial

“CNTF” significa factor neurotrófico ciliar

“Genervon” significa Genervon Biopharmaceuticals

“GB” significa Genervon Biopharmaceuticals, LLC

35

Métodos y materiales

40 Purificación y cultivo de neuronas motoras. Se prepararon cultivos de neuronas motoras espinales de ratas Sprague-Dawley E14.5 (Charles River Labs). Brevemente, las médulas espinales diseccionadas se digirieron en 0.025% de tripsina (Gibco) durante 8 minutos a 37°C. El tejido se transfirió a una solución que contenía L-15 (Gibco) suplementado con 2% de suero de caballo (Gibco), insulina (5 µg/ml); putrescina (1x10⁻⁴ M), conalbúmina (100 µg/ml), selenito de sodio (3x10⁻⁸ M), progesterona (2x10⁻⁸ M), glucosa (3.6 µg/ml), penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml), ADNasa (100 µg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA; 0.4%). El tejido luego se trituró utilizando un Pipetman de 1 ml y la suspensión se dispuso en capas sobre un colchón de 10.4% de Optiprep (Nycomed Pharma) en L-15 en un tubo

- 5 Falcon de 15 ml. La suspensión en capas se centrifugó a 830xg durante 15 min. Las células en la interfase se suspendieron en PBS que contenía BSA al 0.5% y se separaron por inmunoafinidad utilizando el anticuerpo IgG-192 p75 específico seguido por clasificación de células utilizando microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec) para purificar las neuronas motoras. El medio de neuronas motoras consiste en medio neurobasal (Gibco) complementado con suplemento B27 (Gibco), glutamato (25 μ M), 2-mercaptoetanol (25 μ M) y 2% de suero de caballo. Las neuronas motoras se sembraron en cubreobjetos recubiertos con laminina a una densidad de 3000 células/cubreobjetos a menos que se establezca lo contrario. Un cóctel de factores neurotróficos (NTF: 1 ng/ml de BDNF, 100 pg/ml de GDNF, 10 ng/ml de CNTF) se agregó en el momento de la siembra de células. Después de 24 h en cultivo, las neuronas motoras se trataron mediante adición de los diferentes análogos diluidos en medio de neuronas motoras que carecen de NTF.
- 10 Ensayo de supervivencia. Las neuronas motoras espinales se prepararon de embriones de rata E14.5 como se describe. Las células se cultivaron en presencia de NTF durante 24 h y la viabilidad (V1) se estimó al contar el número de células positivas a AM calceína. Para los estudios de viabilidad, las neuronas motoras se cultivaron en ausencia de NTF con adición de los análogos o GM6. El porcentaje de neuronas motoras viables se calculó al contar el número de neuronas.
- 15 Análisis estadístico. El número de neuronas supervivientes de motor para cada tratamiento se expresó como un porcentaje del número de neuronas motoras que sobrevivieron en presencia de solo NTF (control). Cinco platos se utilizaron para cada condición. Se analizaron las diferencias entre los tratamientos para determinar su significación estadística mediante ANOVA de una vía con la prueba de Tukey post hoc.

Grupos de tratamiento. Todos los grupos se sometieron a GM6, análogos o eran controles.

20

GM6	2309	2308	2307	2312	2311	2310	3223	3222	3221	No NTF
-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	--------

Resultados

- 25 Supervivencia celular. La eficacia trófica del GM6 y análogos se evaluó en un modelo de supervivencia celular de neuronas motoras de rata in vitro. El número de neuronas supervivientes de motor para cada tratamiento se expresó como un porcentaje del número de neuronas motoras que sobreviven en presencia de solo NTF (control). Los datos se resumen en la Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 1. Resumen de péptidos de MNTF y su eficacia trófica en supervivencia de neuronas motoras.

# de catálogo CS	SEQ ID NO:	Supervivencia de MN (%Ctrl)	Valor P
GM6(GMP014)	SEQ ID NO: 2	94.02 \pm 3.53	<0.0001
2309	SEQ ID NO:12	81.5 \pm 4.50	<0.0001
2308	SEQ ID NO: 6	66.38 \pm 5.86	0.00012
2307	SEQ ID NO: 4	35.00 \pm 5.28	0.017
2312	SEQ ID NO: 17	12.02 \pm 2.31	0.69
2311	SEQ ID NO: 18	9.66 \pm 2.50	0.39
2310	SEQ ID NO: 19	12.26 \pm 1.70	0.70
3223	SEQ ID NO: 20	15.46 \pm 1.82	0.73
3222	SEQ ID NO: 21	10.64 \pm 1.72	0.46

ES 2 569 552 T3

3221	SEQ ID NO: 22	9.08 ± 2.32	0.33
No NTF		13.92 ± 3.42	N/A

NA = no aplicable

Se utiliza 10 µg/mL de cada solución.

5 Los conjuntos de 3, 4, 5 mers se produjeron por síntesis en fase sólida para representar los metabolitos de 6mer resultantes de la degradación de la secuencia 6mer Phe-Ser-Arg-Tyr-Ala-Arg que tiene lugar a partir del terminal N y terminal C. La cantidad de péptido en el producto final es generalmente de ~80%, el contenido de agua y iones de acetato generalmente representan ~20%.

10 La administración de GM6 (SEQ ID NO: 2) o análogos que contienen una fenilalanina de terminal N a 10 µg/ml de dosis demostró protección contra la pérdida de células neuronales en medio de cultivo que carece de los NTF convencionales. Esto indica que el GM6 y análogos del mismo son efectivos en el mantenimiento de la supervivencia celular en el cultivo celular de neuronas motoras de rata y pueden ser beneficiosos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las neuronas motoras.

Reivindicaciones

1. Un péptido de MNTF que consiste de entre 2 y 5 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en donde dicho péptido de MNTF exhibe actividad MNTF y dicho péptido de MNTF comprende por lo menos los residuos de aminoácidos 17 y 18 de la SEQ ID NO: 1, y en donde dicho péptido de MNTF es para uso en medicina.
- 5 2. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 3 - SEQ ID NO: 12 para uso en medicina.
3. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste de entre 3 y 5 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1 para uso en medicina.
- 10 4. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 3 que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, 6 o 12 para uso en medicina.
5. El péptido de MNTF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en medicina, en donde dicho péptido de MNTF se modifica mediante enlace covalente con un mejorador de penetración, por lo cual se mejora la capacidad de penetración de tejido de la composición.
- 15 6. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina, en donde dicho péptido de MNTF es se modifica terminalmente con N mediante enlace covalente a dicho mejorador de penetración.
7. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 6 para uso en medicina, en donde dicho mejorador de penetración se adhiere de forma covalente a dicho péptido de MNTF mediante derivación de N-acilo de uno o más grupos amino libres.
- 20 8. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina, en donde dicho mejorador de penetración es un ácido alquil carboxílico opcionalmente sustituido de 2 a 22 carbonos, en donde dicho ácido alquil carboxílico es opcionalmente hidroxilatado, insaturado, y/o sulfatado.
- 25 9. El péptido de MNTF de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en medicina, en donde dicho mejorador de penetración es un ácido graso seleccionado de ácido cabrílico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido cáprico, ácido caprílico, ácido hexanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido valérico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido lioleónico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido erúxico, y ácido nervónico.
10. Una composición que comprende un péptido de MNTF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en medicina.
- 30 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en un método para promover el crecimiento o mantenimiento de neuronas in vivo, el método comprende administrar dicha composición a una célula neuronal, en donde la composición tiene una o más actividades biológicas seleccionadas del grupo que consiste de promover el crecimiento de neuronas, promover el mantenimiento de neuronas, promover crecimiento de neuritas, promover regeneración axonal de una motoneurona axotomizada, mejorar la función motora, reparar la ruta neuronal dañada, regenerar una ruta neuronal, o aliviar un defecto neuronal.
- 35 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para uso en un método para aliviar un trastorno neuronal en un animal afligido con el trastorno, el método comprende administrar al animal dicha composición en una cantidad suficiente para aliviar el trastorno.
13. Un péptido de MNTF que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o 12.

Figura 1.

