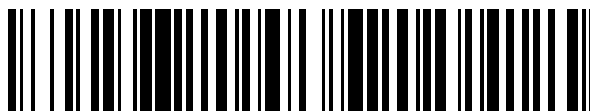


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 782**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2012** **E 12755853 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2750698**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende desPro36Exendina-4(1-39)-Lys6-NH2 para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa**

30 Prioridad:

01.09.2011 EP 11179784

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

22.09.2016

73 Titular/es:

SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH (50.0%)
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE y
UNIVERSITY OF ULSTER (50.0%)

72 Inventor/es:

HESS, SIBYLLE;
HÖLSCHER, CHRISTIAN;
BÖHME, ANDREES;
MENUT, AGNES;
PRADIER, LAURENT y
TAUPIN, VÉRONIQUE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 583 782 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

Composición farmacéutica que comprende desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa

- 5 El objeto de la presente invención es una composición farmacéutica para uso en la prevención o/y el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo la composición desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente un vehículo, adyuvante o/y sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable.

Enfermedad de Alzheimer

- 10 La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo que produce la pérdida de neuronas corticales, especialmente en la neocorteza asociativa y en el hipocampo que a su vez conduce a pérdida lenta y progresiva de las funciones cognitivas, conduciendo en última instancia a demencia y muerte. Los principales indicios de la enfermedad son la agregación y deposición de proteínas mal plegadas (Bertram *et al.* 2010; Mancuso *et al.* 2010): (1) el péptido beta-amiloide (A β) agregado como 'placas' extracelulares seniles o neuríticas, y (2) la proteína tau hiperfosforilada como 'ovillos' neurofibrilares intracelulares (NFT).

- 15 Genéticamente, la AD se divide en dos formas: (1) AD familiar de inicio temprano (<60 años), y (2) AD esporádica de inicio tardío (>60 años). Se sabe que mutaciones poco comunes que causan la enfermedad en los genes de la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2) producen la AD familiar de inicio temprano, mientras que APOE (alelo 4) es el factor de riesgo individual más importante para AD de inicio tardío (Bertram *et al.* 2010).

- 20 La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, demostrados por la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos, son característicos de un cerebro con AD. Un desequilibrio entre la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) y la descomposición de las especies químicamente reactivas por antioxidantes conduce al estrés oxidativo. A β tiene efectos oxidativos directos, pero también puede romper la actividad redox mitocondrial produciendo un incremento de radicales libres. Las neuronas son menos capaces de defenderse contra un incremento en ROS, ya que tienen bajos niveles de antioxidantes en relación con otros tipos de células de mamífero y, por lo tanto, se consideran altamente susceptibles al estrés oxidativo. La adición de A β a cultivos neuronales primarios produce la inhibición de ATPasas, cambios en el potencial celular y entrada de Ca²⁺ (Varadarajan *et al.* 2000; Higgins *et al.* 2010).

- 30 No existe actualmente una cura para esta devastadora enfermedad y los pocos tratamientos aprobados por la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) no detienen el avance de AD, en cambio son solamente parcialmente eficaces en mejorar los síntomas (Wollen 2010, Aderinwale *et al.* 2010). Actualmente, las terapias farmacéuticas autorizadas contra la AD son los inhibidores de acetilcolinesterasa tales como tacrina, donepezilo, rivastigmina, galantamina y el antagonista de los receptores de NMDA memantina. El efecto de estos fármacos es muy limitado, y la acción principal es nuevamente reducir los síntomas en vez de prevenir el desarrollo de la enfermedad. Pueden administrarse otros fármacos de 'uso extraoficial', tales como estatinas (agentes reductores del nivel de colesterol), antihipertensores, fármacos antiinflamatorios u otros. Se ha comprobado que ninguno de estos fármacos reduce la progresión de la AD (Kaduszkiewicz *et al.* 2005; Hölscher, 2005). Otras estrategias para tratar la AD se encuentran en investigación. Se ha descubierto que el factor de crecimiento neuronal α (NGF) puede reducir las placas seniles y mejorar la función cognitiva (De Rosa *et al.* 2005). Como se sabe ahora que la resistencia a insulina es uno de los problemas principales en la AD (Hölscher y Li, 2010), en lugar de la insulina propiamente dicha, otros factores de crecimiento tales como el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) de la hormona incretina están demostrando buenos efectos en estudios preclínicos. El análogo de incretina GLP-1, liraglutida, redujo el número de placas amiloides, redujo los niveles de beta-amiloide, previno el deterioro cognitivo y la disfunción sináptica, redujo la respuesta de inflamación y potenció el crecimiento de sinapsis y la neurogénesis en los cerebros de un modelo de ratón transgénico de AD (McClean *et al.* 2011). Las placas amiloides y la respuesta de inflamación asociada en el cerebro son indicadores clave de AD. Se hallaron efectos protectores similares con otro agonista del receptor del análogo de GLP-1 en un modelo de ratón transgénico de AD (Li *et al.* 2010).

Enfermedad de Parkinson

- 50 La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno neurodegenerativo crónico del movimiento muscular caracterizado normalmente por la degeneración selectiva de neuronas nigroestriales, gran reducción de la capacidad sintética para dopamina y un fallo consecuente de unir los receptores de dopamina estriales (Gandhi *et al.* 2005). Antes de que se presente la enfermedad clínicamente, ocurre silenciosamente la muerte de neuronas nigroestriales en la sustancia negra pars compacta (SNc), probablemente como consecuencia de la aparición de episodios neuroinflamatorios simultáneos apoptóticos, excitotóxicos, mediados por radicales libres. Sigue siendo evasiva una estrategia terapéutica que ofrezca la cura, o un medio para detener la patología de PD. Las terapias con fármacos consolidadas son esencialmente paliativas y no eficaces en todos los pacientes. Como la muerte celular apoptótica es uno de los componentes centrales en la muerte selectiva de neuronas nigroestriales (Schapira 2001), las estrategias terapéuticas futuras podrían implicar el uso dirigido de bio-moléculas con propiedades anti-apoptóticas.

Alternativamente, podría producirse un efecto terapéutico positivo por moléculas con propiedades neurotróficas o con la capacidad de estimular la neurogénesis de células con un fenotipo dopaminérgico. Se ha observado recientemente que el agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) exendina-4 demuestra propiedades neurotróficas (Perry *et al.* 2002) y neuroprotectoras (Perry *et al.* 2002) en cultivos de células PC12 sometidas a estrés excitotóxico. Recientemente se ha demostrado (Harkavyi *et al.* 2008) que la exendina-4 detiene la progresión de, o incluso revierte, las lesiones en la sustancia negra, una vez consolidadas en dos modelos de ratón de PD. Además, se ha demostrado que el tratamiento con exendina-4 protegió a las neuronas dopaminérgicas contra la degeneración, conservó los niveles de dopamina y mejoró la función motora en el modelo de ratón de PD de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Li *et al.* 2009).

Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo heredado tipificado por movimiento corporal involuntario, como también por anomalías psiquiátricas y cognitivas. El defecto genético que subyace a la HD implica la expansión de repeticiones de trinucleótidos CAG en el exón 1 del gen de HD, produciendo la expansión de poliglutamina en la proteína huntingtina (htt). Esto conduce al procesamiento anormal y a la agregación intracelular perjudicial. Se ha demostrado recientemente que el tratamiento con exendina-4 suprime el desarrollo de inclusiones de htt mutante en el páncreas y el cerebro, mejora los efectos metabólicos y la disfunción motora y prolonga la supervivencia de ratones con HD (Martin *et al.* 2009).

Accidente cerebrovascular

La patofisiología del accidente cerebrovascular incluye muerte de neuronas corticales y estriales mediante apoptosis (Mattson, 2007).

Se ha demostrado recientemente que la administración de exendina-4 redujo el daño cerebral y mejoró la evolución funcional en un modelo de ratón de accidente cerebrovascular transitorio de oclusión de la arteria cerebral media (Li *et al.* 2009). En un modelo de isquemia cerebral en el jerbo se demostró además que la estimulación del receptor de GLP-1 con exendina-4 atenuó la muerte neuronal relacionada con isquemia, interfiriendo con la activación microglial contra daño isquémico cerebral transitorio (Lee *et al.* 2011). Teramoto *et al.* (2011) demostraron que la exendina-4 es eficaz en un modelo de ratón de lesión por reperusión de isquemia cerebral. El tratamiento con exendina-4 redujo significativamente el volumen de infarto y mejoró el déficit funcional.

Neuropatía sensorial periférica

Aproximadamente el 60-70 % de los individuos con diabetes tienen algún grado de daño neurológico, específicamente neuropatías que causan alteración de la sensibilidad en las manos y/o los pies, demora de la motilidad gástrica o síndrome del túnel carpiano. Actualmente no existe una terapia comprobada para invertir el daño neurológico causado por la hiperglucemia prolongada y las alteraciones metabólicas asociadas. Se ha identificado la expresión de GLP-1 en neuronas en el ganglio nodoso, sugiriendo una función de GLP-1 en la neurotransmisión periférica (Nakagawa 2004). En un modelo de roedor de neuropatía periférica inducida por piridoxina en roedores no diabéticos se demostró que GLP-1 y exendina-4 s.c. protegen parcialmente contra varios defectos funcionales y morfológicos inducidos por piridoxina y facilitan la normalización del tamaño axonal (Perry *et al.* 2007).

Función cognitiva, estado emocional y memoria:

Los agonistas de los receptores de GLP-1 son capaces de potenciar la función cognitiva en roedores, como se mide en el laberinto de agua de Morris; el ratón con genes inactivados del receptor de GLP-1 tiene un fenotipo caracterizado por una deficiencia en el aprendizaje que se restaura después de la transferencia génica del receptor de GLP-1 en el hipocampo (During *et al.* 2003). Recientemente, Isacson *et al.* (2010) demostraron un efecto del tratamiento de exendina-4 crónico en la conducta cognitiva asociada con el hipocampo y relacionada con el estado emocional en roedores adultos. En otro estudio, la polineuropatía encontrada en el ganglio de la raíz dorsal de un modelo de ratón de diabetes se invirtió mediante exendina-4 (Himeno *et al.* 2011). Otro análogo de GLP-1, liraglutida, ha demostrado que ejerce efectos beneficiosos sobre la función cognitiva y la plasticidad sináptica del hipocampo en ratones con obesidad y resistencia a insulina inducidas por una dieta con alto contenido de grasa (Porter *et al.* 2010).

Péptido 1 similar al glucagón

El péptido 1 similar al glucagón, GLP-1 o GLP-1 (7-36) es una hormona peptídica de 30 aminoácidos que está codificada en el gen de proglucagón. Se produce principalmente en células L enteroendocrinas del intestino y se segrega en la circulación sanguínea cuando entran en el duodeno alimentos que contienen grasa, hidrolizados de proteína y/o glucosa. La célula más ampliamente estudiada activada por GLP-1 es la célula beta secretora de insulina en el páncreas, donde la acción que la define es el aumento de la secreción de insulina inducida por glucosa. Tras la activación del receptor de GLP-1 (GLP-1R) en las células beta, se activa la adenilil ciclasa (AC) y se genera cAMP, conduciendo, a su vez, a la activación dependiente de cAMP de las vías del segundo mensajero, tales como las vías de proteína cinasa A (PKA) y Epac. Además de los efectos a corto plazo de potenciar la secreción de insulina inducida por glucosa, la activación continua de GLP-1R también aumenta la síntesis de insulina, la

proliferación de células beta y la neogénesis (Doyle *et al.* 2007). Asimismo, GLP-1 generalmente regula las concentraciones de glucagones, demora el vaciamiento gástrico, estimula la biosíntesis de (Pro-)insulina, incrementa la sensibilidad hacia la insulina y estimula la biosíntesis de glucógeno dependiente de insulina (Holst (1999); Curr. Med. Chem 6: 1005; Nauck *et al.* (1997) Exp Clin Endocrinol Diabetes 105:187; Lopez-Delgado *et al.* (1998) Endocrinology 139:2811).

Los efectos particulares de GLP-1 sobre la secreción de insulina y de glucagón han generado una actividad de investigación durante los últimos 20 años que ha culminando en un agonista del receptor de GLP-1 natural (GLP-1R), exendina 4, que se usa ahora para tratar la diabetes mellitus de tipo 2 (T2DM) (Doyle *et al.* 2007).

En tejidos distintos del páncreas (cerebro, riñón, pulmón, corazón y los principales vasos sanguíneos), GLP-1 puede activar un receptor acoplado a la proteína de unión al nucleótido guanina específica (proteína G).

GLP-1 ha mostrado tener propiedades de tipo factor de crecimiento como también neuroprotectoras (McClean *et al.* 2010). GLP-1 reduce además la inducción de apoptosis de las neuronas del hipocampo y mejora el aprendizaje espacial y asociativo (During *et al.* 2003). Perry *et al.* (2002) informaron de que GLP-1 podría proteger por completo las neuronas hipocámpicas de rata cultivadas contra la apoptosis inducida por glutamato. Los análogos de GLP-1 (Val8)GLP-1 y N-acetil-GLP-1 han demostrado efectos importantes en la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica (LTP) en el hipocampo (McClean *et al.* 2010). El análogo de GLP-1 liraglutida redujo el número de placas amiloides, redujo los niveles de beta-amiloide, previno el deterioro cognitivo y la depresión de LTP, redujo la respuesta de inflamación y potenció el crecimiento de sinapsis y la neurogénesis en el hipocampo de un modelo de ratón transgénico de AD (McClean *et al.* 2011).

GLP-1, liraglutida y exendina-4 han demostrado atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) (Kastin *et al.* 2001; McClean *et al.* 2011). Perry *et al.* (2003) descubrieron que GLP-1 y exendina-4 redujeron los niveles de beta amiloide en el cerebro y la proteína precursora de amiloide en las neuronas. El tratamiento crónico con exendina-4 o liraglutida afecta la proliferación celular y la diferenciación de neuroblastos en el giro dentado hipocámpico de ratón adulto (Li *et al.* 2010; Hamilton *et al.* 2011).

La liraglutida es un análogo de GLP-1 que tiene la fórmula $\text{Arg}^{34}, \text{Lys}^{26}(\text{N}^{\epsilon}(\gamma\text{-glutamyl}(\text{N}^{\alpha}\text{-hexadecanoyl})))\text{GLP-1}(7\text{-}37)$. La liraglutida por lo general se administra normalmente por vía parenteral.

El compuesto desPro³⁶-Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ (AVE0010, lixisenatida) es un análogo de la exendina-4. En el documento WO 01/04156 la lixisenatida se desvela como la SEQ ID NO: 93:

SEQ ID NO: 1: Lixisenatida (44 AS)

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-
G-G-P-S-S-G-A-P-P-S-K-K-K-K-K-K-NH₂

SEQ ID NO: 2: Exendina-4 (39 AS)

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-
G-G-P-S-S-G-A-P-P-S-NH₂

SEQ ID NO: 3: GLP-1(7-36) (30 AS)

H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-K-E-F-I-A-W-L-V-K-
G-R

Las exendinas son un grupo de péptidos que pueden reducir la concentración de glucosa en sangre. Las exendinas tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de solo aproximadamente el 50 % con GLP-1 (7-36). Por lo tanto, las exendinas no se consideran en general análogos de GLP-1.

La lixisenatida se caracteriza por el truncamiento del extremo C de la secuencia de exendina-4 nativa. La lixisenatida comprende seis residuos de lisina en el extremo C que no están presentes en la exendina-4. Hasta el momento, la lixisenatida no se ha considerado un fármaco adecuado para el tratamiento de trastornos del SNC, en particular de enfermedades neurodegenerativas, ya que los residuos de lisina del extremo C pueden prevenir que el fármaco atraviese la barrera hematoencefálica. En la actualidad, no existe una indicación de que la lixisenatida pueda ser transportada a través de la barrera hematoencefálica por un mecanismo específico o/y regulado.

En el Ejemplo 1 de la presente invención se ha demostrado que la lixisenatida tiene propiedades superiores en comparación con el análogo de GLP-1 liraglutida y con la exendina-4, ambos actualmente usados como tratamientos para la diabetes de tipo 2:

(a) Sorprendentemente, la lixisenatida puede atravesar la barrera hematoencefálica. Los datos de la presente invención indican que el transporte es regulado, ya que la velocidad de transporte a altas concentraciones

se limita a un nivel máximo. Además, la lixisenatida se absorbe en el cerebro con una dosis parenteral más baja en comparación con la liraglutida.

(b) La lixisenatida activa los receptores de GLP-1 en el cerebro e induce la producción de cAMP. Sorprendentemente, la lixisenatida produce niveles más altos de cAMP que la liraglutida, demostrando eficacia superior en la activación del receptor de GLP-1 a la misma dosis.

(c) La lixisenatida puede inducir la proliferación de células progenitoras en el giro dentado. En comparación con la exendina-4 o con la liraglutida, la lixisenatida proporciona efectos potenciados cuando se administra a la misma dosis. En enfermedades neurodegenerativas, estos efectos pueden constituir un efecto modificador de la enfermedad.

(d) La lixisenatida demostró efectos neuroprotectores superiores (contra el estrés celular) en el giro dentado cuando se compara con la liraglutida.

(e) Sorprendentemente, un pretratamiento con una dosis de lixisenatida 10 nM fue suficiente para proteger las células de neuroblastoma SH-SY5Y del estrés por metilglioxal 1200 μ M. Fue necesaria una dosis de 200 nM de liraglutida para proteger a las células del estrés por metilglioxal 1200 μ M, indicando que una dosis inferior de lixisenatida es suficiente para inducir la protección (véanse también los datos del Ejemplo 2 obtenido por pretratamiento con agonistas de GLP-1).

El Ejemplo 2 demuestra que un tratamiento posterior con lixisenatida fue suficiente para proteger a las células de neuroblastoma SH-SY5Y del estrés por metilglioxal 2 mM o H_2O_2 1 mM. Por el contrario, la liraglutida no protegió a las células del estrés provocado por MG o H_2O_2 .

En el Ejemplo 3, la lixisenatida presentó efectos neuroprotectores significativos en células LUHMES tratadas con rotenona contra la neurodegeneración. La lixisenatida ofrece ventajas en comparación con otros agonistas de los receptores de GLP-1 (GLP-1R). En células LUHMES tratadas con rotenona, la lixisenatida es significativamente activa a concentraciones 3 veces menores que la liraglutida, un resultado que consolida el inesperado efecto de actividad superior observado en el modelo de metilglioxal del Ejemplo 1. La exenatida no produjo un efecto significativo a concentraciones de 0,3 y 1 μ M. Por el contrario, la lixisenatida proporciona una mejoría de la viabilidad dependiente de dosis a esas concentraciones.

En el Ejemplo 4 se demuestra que el tratamiento con lixisenatida *in vivo* conduce a una reducción de la carga de placa amiloide en el cerebro de ratones transgénicos, modelos de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, además de sus propiedades neuroprotectoras, la lixisenatida puede reducir lesiones patológicas cerebrales tales como placas amiloides y representa, por lo tanto, una prevención atractiva y/o tratamiento atractivo para la enfermedad de Alzheimer. Se observa actividad a dosis más baja (10 nmol/kg) que aquellas descritas previamente para la liraglutida (25 nmol/kg) por McLean *et al.* (2011).

Por lo tanto, la lixisenatida es adecuada para el tratamiento o/y la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, como se describe en el presente documento, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o/y accidente cerebrovascular.

Un primer aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica para uso en la prevención o/y el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo la composición desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente un vehículo, adyuvante y/o sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo la composición desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente un vehículo, adyuvante o/y sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable.

La enfermedad neurodegenerativa puede ser cualquier enfermedad neurodegenerativa, en particular una enfermedad neurodegenerativa que está asociada a estrés oxidativo, pérdida de integridad de los axones, apoptosis, pérdida neuronal o/y respuesta inflamatoria.

En la presente invención, la pérdida de integridad de los axones incluye pérdida espinal dendrítica, pérdida de plasticidad sináptica o/y pérdida de nuevos brotes de neuritas compensatorios.

La enfermedad neurodegenerativa puede estar asociada a deterioro cognitivo.

En particular, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson, epilepsia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, hipoxia cerebral, esclerosis múltiple y neuropatía periférica. La neuropatía periférica puede estar asociada a diabetes mellitus.

Se prefiere que la enfermedad neurodegenerativa se seleccione del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular.

5 También se prefiere que la enfermedad neurodegenerativa se seleccione del grupo que consiste en parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y demencia por enfermedad de Parkinson. Cualquiera de estas enfermedades puede estar asociada a parkinsonismo.

La parálisis supranuclear progresiva y la atrofia multisistémica se conocen en conjunto como síndromes de Parkinson Plus.

En la presente invención, el parkinsonismo es un síndrome neurológico que se caracteriza por una combinación de síntomas específicos tales como temblores, hipocinesia, rigidez o/y inestabilidad postural.

10 En una realización, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer puede estar asociada a estrés oxidativo y pérdida neuronal.

15 En otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson puede estar asociada a estrés oxidativo, respuesta inflamatoria, apoptosis, pérdida neuronal, en particular pérdida de neuronas dopaminérgicas, por ejemplo, pérdida neuronal en la sustancia negra que resulta en una falta de dopamina.

La pérdida neuronal puede estar causada por apoptosis.

En otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es parálisis supranuclear progresiva. La parálisis supranuclear progresiva puede estar asociada a pérdida neuronal, en particular pérdida de neuronas dopaminérgicas.

20 En otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es atrofia multisistémica. La atrofia multisistémica puede estar asociada a pérdida neuronal, en particular pérdida de neuronas dopaminérgicas.

En otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es demencia de cuerpos de Lewy. La demencia de cuerpos de Lewy puede estar asociada a pérdida neuronal, en particular pérdida de neuronas dopaminérgicas. La demencia de cuerpos de Lewy puede estar asociada a enfermedad de Parkinson.

25 En otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es demencia por enfermedad de Parkinson. La demencia por enfermedad de Parkinson puede estar asociada a pérdida neuronal, en particular pérdida de neuronas dopaminérgicas. En particular, la demencia por enfermedad de Parkinson se asocia a enfermedad de Parkinson.

Incluso en otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es accidente cerebrovascular. El accidente cerebrovascular puede estar asociado a pérdida neuronal causada por isquemia, en el que la isquemia puede estar causada por bloqueo (tal como trombosis o embolia arterial) o hemorragia.

30 Incluso en otra realización, la enfermedad neurodegenerativa es esclerosis múltiple, que puede estar asociada a procesos inflamatorios en el SNC.

35 Los datos de la presente invención demuestran que (a) la lixisenatida proporciona efectos neuroprotectores o/y neurogenerativos, y (b) la lixisenatida es superior en comparación con otros agonistas de GLP-1, tales como exendina-4 o liraglutida. Por lo tanto, la lixisenatida puede proporcionar un efecto modificador de la enfermedad en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular. En particular, la administración de lixisenatida es adecuada para el tratamiento en una etapa temprana de una enfermedad neurodegenerativa, ya que la neuroprotección y la neurogeneración podrían demorar la progresión de la enfermedad y mejorar así la calidad de vida.

40 Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, la enfermedad neurodegenerativa está en una etapa temprana. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer puede ser una enfermedad de Alzheimer en etapa temprana. La enfermedad de Alzheimer (AD) en etapa temprana también se denomina enfermedad prodrómica o enfermedad de Alzheimer con predemencia (Dubois et al. 2010). La enfermedad de Alzheimer en etapa temprana puede definirse como: pacientes que presentan síntomas de memoria objetiva asociados a datos de un biomarcador de soporte o patología de la enfermedad de Alzheimer: en líquido cefalorraquídeo (CSF) se encuentran niveles bajos de la relación de péptido β -amiloide 42 (Ab42) con respecto a la proteína Tau, o se detecta placa amiloide en el cerebro mediante agente de PET (tomografía por emisión de positrones) amiloide tal como AmyVid™ de E. Lilly (Avid).

45 En otro ejemplo, la enfermedad de Parkinson puede ser una enfermedad de Parkinson en etapa temprana. Incluso en otro ejemplo, la parálisis supranuclear progresiva puede ser una parálisis supranuclear progresiva en etapa temprana. Incluso en otro ejemplo, la atrofia multisistémica puede ser una atrofia multisistémica en etapa temprana.
50 En otro ejemplo, la demencia de cuerpos de Lewy puede ser una demencia de cuerpos de Lewy en etapa temprana. En otro ejemplo, la demencia por enfermedad de Parkinson puede ser una demencia por enfermedad de Parkinson en etapa temprana.

Además, la lixisenatida es adecuada en la prevención de una enfermedad neurodegenerativa, en particular en aquellos pacientes que se sospecha que padecen una enfermedad neurodegenerativa sin tener un diagnóstico certero. En otro aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, es para uso en la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

5 En el contexto de la presente invención, desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ (lixisenatida) incluye sales farmacéuticamente aceptables de la misma. El experto en la técnica conoce sales de lixisenatida farmacéuticamente aceptables. Una sal preferida de lixisenatida farmacéuticamente aceptable empleada en la presente invención es el acetato.

10 En la presente invención, desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y la sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden administrarse a un paciente en necesidad de la misma, en una cantidad suficiente para inducir un efecto terapéutico.

En la presente invención, desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y la sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden formularse con excipientes, adyuvantes o/y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables adecuadas.

15 La composición farmacéutica para uso de la presente invención proporciona un efecto modificador de la enfermedad mediante sus efectos neuroprotectores y neurorregenerativos, como se describe en el presente documento, en una enfermedad neurodegenerativa, como se describe en el presente documento. En particular, puede obtenerse una respuesta modificadora de la enfermedad en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa como se describe en el presente documento, por ejemplo, en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson, epilepsia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, hipoxia cerebral, esclerosis múltiple y neuropatía periférica, como se describe en el presente documento.

25 La composición farmacéutica para uso de la presente invención puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por inyección (tal como por inyección intramuscular o subcutánea). Son conocidos dispositivos de inyección adecuados, por ejemplo, las llamadas "plumas", que comprenden un cartucho que comprende el principio activo, y una aguja para inyección. El compuesto desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden administrarse en una cantidad adecuada, por ejemplo, en una cantidad en el intervalo de 1 a 50 µg por dosis, 5 a 40 µg por dosis, 10 a 30 µg por dosis, 10 a 15 µg por dosis o 15 a 20 µg por dosis.

30 En la presente invención, el compuesto desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma pueden administrarse en una dosis diaria en el intervalo de 1 a 50 µg, en el intervalo de 5 a 40 µg, en el intervalo de 10 a 30 µg, en el intervalo de 10 a 20 µg, en el intervalo de 10 a 15 µg, o en el intervalo de 15 a 20 µg. La composición puede administrarse mediante una inyección diaria.

35 En la presente invención, la composición puede proporcionarse como una composición líquida. El experto conoce composiciones líquidas de lixisenatida adecuadas para administración parenteral. Una composición líquida puede tener un pH ácido o fisiológico. Un pH ácido está preferiblemente en el intervalo de pH 1-6,8, pH 3,5-6,8, o pH 3,5-5. Un pH fisiológico está preferiblemente en el intervalo de pH 2,5-8,5, pH 4,0-8,5 o pH 6,0-8,5. El pH puede ajustarse mediante un ácido diluido farmacéuticamente aceptable (normalmente HCl) o una base diluida farmacéuticamente aceptable (normalmente NaOH).

40 La composición líquida puede comprender un conservante adecuado. Un conservante adecuado puede seleccionarse de fenol, m-cresol, alcohol bencílico y un éster del ácido p-hidroxibenzoico. Un conservante preferido es el m-cresol.

La composición líquida puede comprender un agente de tonicidad. Un agente de tonicidad adecuado puede seleccionarse de glicerol, lactosa, sorbitol, manitol, glucosa, NaCl, compuestos que contienen calcio o magnesio tales como CaCl₂. La concentración de glicerol, lactosa, sorbitol, manitol y glucosa puede estar en el intervalo de 100 - 250 mM. La concentración de NaCl puede ser de hasta 150 mM. Un agente de tonicidad preferido es el glicerol.

45 La composición líquida puede comprender metionina de 0,5 µg/ml a 20 µg/ml, preferiblemente de 1 µg/ml a 5 µg/ml. Preferiblemente, la composición líquida comprende L-metionina.

50 También se describe un método para la prevención o/y el tratamiento de una indicación médica, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el método puede comprender la administración de la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. El método puede ser un método para la prevención o/y el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, como se describe en el presente documento.

En particular, el método, como se describe en el presente documento, provoca una respuesta modificadora de la enfermedad, por ejemplo, por neuroprotección o/y neurogeneración.

55 En el método, como se describe en el presente documento, se proporciona una terapia modificadora de la enfermedad mediante sus efectos neuroprotectores y neurorregenerativos por administración de la composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, en una enfermedad neurodegenerativa, como se

describe en el presente documento. En particular, puede obtenerse una respuesta modificadora de la enfermedad en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, como se describe en el presente documento, por ejemplo, en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson, epilepsia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, hipoxia cerebral, esclerosis múltiple y neuropatía periférica, como se describe en el presente documento.

En el método, como se describe en el presente documento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica, como se describe en el presente documento.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos y figuras.

Leyendas de las figuras

Figura 1. (A) Concentración de lixisenatida total (pmol/l) medida en los cerebros de ratones hembra no mutantes (n=5, edad promedio 24 semanas) 30 min tras la inyección de vehículo salino i.p. (0,9 % p,v de NaCl) o lixisenatida i.p. (2,5, 25 o 250 nmol/kg de peso corporal). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05, **p<0,01. **(B)** Concentración de lixisenatida total (pmol/l) medida en los cerebros de ratones hembra no mutantes (n=5, edad promedio 24 semanas) 3 h tras la inyección de vehículo salino i.p. (0,9 % p,v de NaCl) o lixisenatida i.p. (2,5, 25 o 250 nmol/kg de peso corporal). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05.

Figura 2. (A) Concentración de liraglutida total (pmol/l) medida en los cerebros de ratones hembra no mutantes (n=5) 30 min tras la inyección de vehículo salino i.p. (0,9 % p,v de NaCl) o liraglutida i.p. (2,5, 25 o 250 nmol/kg de peso corporal). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05, **p<0,01. **(B)** Concentración de liraglutida total (pmol/l) medida en los cerebros de ratones hembra no mutantes 3 h tras la inyección de vehículo salino i.p. (0,9 % p,v de NaCl) o liraglutida i.p. (2,5, 25 o 250 nmol/kg de peso corporal). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05.

Figura 3. (A) La inyección de 25 nmol/kg de bw de liraglutida i.p. 30 min antes del análisis demostró un incremento significativo de cAMP en el cerebro en comparación con los controles (p<0,05; prueba de la t). **(B)** La inyección de 25 nmol/kg de bw de lixisenatida i.p. 30 min antes del análisis demostró un incremento significativo de cAMP en el cerebro en comparación con los controles (p<0,01; prueba de la t). **(C)** Cuando se comparan directamente los efectos de la liraglutida con la lixisenatida, se encuentra una diferencia significativa entre los fármacos (p<0,05; prueba de la t).

Figura 4. Efecto de la inyección diaria o bien de exendina-4, liraglutida o lixisenatida de 25 nmol/kg de bw durante 3 semanas sobre la proliferación celular en el giro dentado (tinción BrdU). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05, **p<0,01. La lixisenatida demuestra un aumento de la actividad proliferativa de las células en comparación con la exendina-4 y la liraglutida (p<0,05) y los controles (p<0,01).

Figura 5. Análisis histológico de inyección crónica de lixisenatida i.p. una vez al día durante 3 semanas (25 nmol/kg de bw i.p.). En un análisis inmunohistológico BrdU, se encontraron más células nuevas en el área del cerebro del giro dentado. Además, se encontraron más neuronas jóvenes (tinción de doblecortina). Los valores son la media $\pm$ E.E.M. *p<0,05, **p<0,01.

Figura 6. (A) Ensayo de LDH. Pretratamiento de células SH-SY5Y con lixisenatida seguido de estrés por metilglioxal. (**p<0,0001). Una dosis de 10 nM de lixisenatida fue suficiente para proteger a las células del estrés por metilglioxal 1200 μ M. **(B)** Ensayo de LDH. Pretratamiento de células SH-SY5Y con liraglutida seguido de estrés por metilglioxal. *p<0,05. ***p<0,001, ***p<0,0001). Una dosis de 200 nM de liraglutida fue suficiente para proteger a las células del estrés por metilglioxal 1200 μ M. Las dosis inferiores de 10 nM o 100 nM no demostraron ningún efecto.

Figuras 7. Tratamiento post-estrés con lixisenatida o liraglutida después del tratamiento con metilglioxal (MG) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El eje X se refiere a diversas condiciones de ensayo y el eje Y representa la absorbancia. *p<0,05, **p<0,01. **(A)** Post-tratamiento de lixisenatida, **(B)** Post-tratamiento de liraglutida.

Figuras 8. Pretratamiento con lixisenatida o liraglutida seguido de estrés por metilglioxal (MG). El eje X se refiere a diversas condiciones de ensayo y el eje Y representa la absorbancia. *p<0,05, ***p<0,001. Efecto del pretratamiento de **(A)** lixisenatida, **(B)** Liraglutida y **(C)** exendina-4.

Figura 9. Neuroprotección de células LUHMES (expresada como la inversa del porcentaje de la reducción de la viabilidad celular normalizada inducida por exposición a rotenona) en presencia de diversas concentraciones de lixisenatida. Rot. = rotenona. NS = no significativo; *p<0,05, ***p<0,001.

Figura 10. Neuroprotección de células LUHMES (expresada como la inversa del porcentaje de la reducción de la viabilidad celular normalizada inducida por exposición a rotenona) en presencia de diversas concentraciones de exendina-4/exenatida. Rot. = rotenona. NS = no significativo; *p<0,05.

Figura 11. Neuroprotección de células LUHMES (expresada como la inversa del porcentaje de la reducción de la viabilidad celular normalizada inducida por exposición a rotenona) en presencia de diversas concentraciones de liraglutida. Rot. = rotenona. NS = no significativo; ***=p<0,001.

Figura 12. El tratamiento con lixisenatida reduce la carga de placa amiloide en el cerebro de ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer. El tratamiento con lixisenatida en ratones transgénicos APP/PS1 de 7 meses de edad durante 70 días (10 nmol/kg, i.p. diario) reduce la carga de placa amiloide en el cerebro, como se cuantifica por inmunohistoquímica de beta amiloide y determinación del % de área positiva para β amiloide en secciones transversales de la corteza cerebral. Los valores son media $\pm$ EEM (**=p<0,01)

Figura 13. El tratamiento con Lixisenatida reduce la carga de placa amiloide en el cerebro de ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer. El tratamiento con lixisenatida en ratones transgénicos APP/PS1 (modelos de enfermedad de Alzheimer) de 7 meses de edad durante 70 días (10 nmol/kg, i.p. diario) reduce la carga de placa amiloide madura en el cerebro, como se cuantifica por tinción histológica con rojo Congo y determinación del % de área positiva para rojo Congo en secciones transversales de la corteza cerebral. Los valores son media $\pm$ EEM (*=p<0.05).

Ejemplo 1

La lixisenatida es un fármaco peptídico que normalmente se administra por vía parenteral. Para producir una actividad contra enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson o accidente cerebrovascular, la lixisenatida debe atravesar la barrera hematoencefálica. La lixisenatida, en particular cuando se administra por vía parenteral, es adecuada para el tratamiento o/y la prevención de enfermedades neurodegenerativas si la lixisenatida proporciona una o más de las siguientes características:

- (a) la lixisenatida puede atravesar la barrera hematoencefálica,
- (b) la lixisenatida activa los receptores de GLP-1 en el cerebro e induce efectos fisiológicos por activación de los receptores,
- (c) la lixisenatida proporciona efectos modificadores de la enfermedad en modelos adecuados,
- (d) la lixisenatida es neuroprotectora en modelos adecuados, y,
- (e) la lixisenatida ofrece ventajas con respecto a otros agonistas de los receptores de GLP-1, como liraglutida o exenatida.

Absorción de lixisenatida por el cerebro

En el presente ejemplo se describe si el agonista de los receptores de GLP-1, lixisenatida, atravesó la barrera hematoencefálica (BBB). Se probaron 3 dosis (2,5 nmol/kg de bw, 25 nmol/kg de bw y 250 nmol/kg de bw, i.p.), y se examinaron los niveles encontrados en tejido cerebral de ratón 30 min y 3 h después de la inyección. Los niveles de lixisenatida aumentaron 30 min después de la administración con todas las dosis, y también se detectaron tanto con el nivel bajo (2,5 nmol/kg de bw) como con el nivel medio (25 nmol/kg de bw), pero no con la dosis alta de 250 nmol/kg de bw de lixisenatida. Esta diferencia sugiere que el transporte de lixisenatida hacia el cerebro está regulado, lo que limita la entrada de las altas concentraciones de lixisenatida aquí probadas (Figura 1).

Comparación de la absorción de lixisenatida con la absorción de liraglutida en el cerebro

Los resultados anteriores para lixisenatida se compararon con aquellos para el agonista de GLP-1, liraglutida (Victoza por Novo Nordisk). Como se trató anteriormente y se mostró en las Figuras 1 y 2, los niveles de lixisenatida demostraron un incremento significativo en el cerebro a la dosis más baja de 2,5 nmol/kg de bw i.p., mientras que la liraglutida no demostró un incremento a esta dosis (Figura 2), sugiriendo que la lixisenatida es absorbida dentro del cerebro a concentraciones más bajas que la liraglutida.

A partir de este hallazgo se concluye que la lixisenatida requiere que una dosis inferior de lixisenatida atraviese la barrera hematoencefálica, en comparación con liraglutida, de modo que puede ejercer un efecto terapéutico sobre las enfermedades neurodegenerativas, como se describe en el presente documento, a una dosis inferior, en comparación con la liraglutida.

Activación de los receptores de GLP-1 en el cerebro/producción de cAMP

Los estudios preliminares han demostrado que la lixisenatida activa el receptor de GLP-1 en el páncreas que se asocia con la potenciación de los niveles de cAMP (para una revisión véase, por ejemplo, Doyle *et al.*, 2007)

En el presente ejemplo se ha demostrado por primera vez que inyectar lixisenatida i.p. aumentó la cantidad de cAMP en el cerebro, indicando que la lixisenatida activa los receptores de GLP-1 en el cerebro (Figura 3b). Una

comparación directa de los efectos de lixisenatida (25 nmol/kg de bw i.p.) y liraglutida (25 nmol/kg de bw i.p., para resultados véase la Figura 3a) sobre el receptor de GLP-1 se muestra en la Figura 3c. La lixisenatida produce niveles significativamente más altos de cAMP que la liraglutida (* $p < 0,05$) a la misma dosis, lo que demuestra una efectividad superior de la lixisenatida.

5 Efectos neurodegenerativos/efectos modificadores de la enfermedad de lixisenatida en el cerebro

Se investigaron los efectos de la inyección crónica de lixisenatida i.p., exendina-4 i.p. y liraglutida i.p. durante 3 semanas tras la proliferación de células madre progenitoras neuronales. Se descubrió una proliferación potenciada de células madre en el giro dentado (tinción BrdU, Figuras 4 y 5). Sorprendentemente, la lixisenatida tuvo una proliferación celular significativamente potenciada (* $p < 0,05$) cuando se compara con la exendina-4 o la liraglutida, indicando que la lixisenatida es más eficaz en el cerebro que la exendina-4 y la liraglutida cuando se inyectan a la misma dosis.

Además, el número de neuronas jóvenes en el giro dentado aumentó después de la inyección de lixisenatida cuando se compara con liraglutida (tinción de doblecortina, datos no mostrados), indicando que las células progenitoras se diferencian en neuronas. Esto demuestra que la lixisenatida induce mejoras duraderas.

Estos efectos de la lixisenatida sobre las células madre (proliferación y diferenciación) son un aspecto importante para la reparación cerebral, de modo que estos efectos pueden proporcionar un efecto modificador de la enfermedad en enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular.

Efectos neuroprotectores de la lixisenatida en el cerebro

En estudios de cultivo celular neuronal se ha probado la lixisenatida para investigar si tiene efectos neuroprotectores en condiciones de estrés celular. Se usó el fármaco tóxico metilglioxal para reducir la viabilidad celular. La adición de lixisenatida demostró efectos neuroprotectores en un modo dependiente de la dosis (Figura 6a), proporcionando el 100 % de protección a todas las dosis con la concentración más baja de metilglioxal y manteniendo la protección incluso con la concentración más alta de metilglioxal probada. Una dosis de 10 nM de lixisenatida fue suficiente para proteger a las células de estrés por metilglioxal 1200 μ M.

Además, la lixisenatida demostró protección superior en comparación con la liraglutida. En la Figura 6b se demuestra que la liraglutida no fue capaz de proteger a las células a una dosis de 10 nM. Se requirió una dosis de 200 nM de liraglutida con el fin de proteger a las células del estrés por metilglioxal 1200 μ M, las dosis inferiores de 10 o 100 nM no mostraron ningún efecto.

30 Materiales y métodos

Medición de cAMP en el cerebro

Animales

Se usaron ratones hembra no mutantes (fondo C57BL/6), 5 por grupo. Para la medición de cAMP, los ratones recibieron inyecciones i.p. de 25 nmol/kg de peso corporal (bw) de liraglutida, lixisenatida o solución salina (0,9 % p.v.) como control en dos experimentos por separado. 30 min después de la inyección, los cerebros de los ratones se extrajeron inmediatamente y se congelaron instantáneamente.

Extracción de tejido de cAMP

Cada cerebro se extrajo usando HCl 0,1 M. Se añadieron 10 ml de HCl 0,1 M por g de tejido. Las muestras se sonicaron, luego se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se vertió y se usó directamente para medición por el kit de ELISA de cAMP (Enzo Life Sciences). Las diluciones se realizaron usando el HCl 0,1 M provisto en el kit.

Inmunohistoquímica

A los animales se les administró BrdU (180 mg/kg de bw; i.p.) 18 h antes de ser anestesiados con pentobarbitona (0,3 ml; Euthanal, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y se perfundieron transcardíacamente con PBS, seguido por paraformaldehído al 4 %. Se extrajeron los cerebros y se dispusieron en sacarosa al 30 % en PBS durante la noche. La inmunohistoquímica para BrdU o doblecortina (DCX) se realizó en secciones flotando libremente de 45 μ m. Se inactivó la actividad de peroxidasa endógena por incubación de secciones en 3 % de peróxido de hidrógeno. La desnaturalización del ADN implicó la incubación en HCl 2 N, seguida de bórax 0,1 M durante 10 min. Las secciones se incubaron en un anticuerpo primario para BrdU (1:200, anti-BrdU monoclonal de ratón, Sigma) o para anti-doblecortina policlonal de cabra DCX (1:200, Santa Cruz, EE.UU., sc-710) durante una noche a 4 °C. Luego se aplicó anticuerpo secundario (1:200, anti-ratón de caballo, Vector elite ABC kit, ratón, Vector laboratories). Las secciones se incubaron en un reactivo enzimático de avidina-biotina y se incubaron en el cromógeno de sustrato Vector SG (véase Gengler et al. 2010) para más detalles.

Microscopia

Las secciones se analizaron usando un microscopio Olympus CX 40, usando técnicas estereológicas. Esto implica comenzar a seccionar aleatoriamente y recoger cada 5ª sección a través de la capa celular granular (GCL) del giro dentado (DG). El análisis se realizó usando un objetivo x40 y se tomaron imágenes representativas usando una cámara digital de 5,1 MPix. Para cada grupo de fármaco se analizaron 4-6 cerebros de ratón. Se tomaron entre 8 y 12 secciones por cada cerebro. Las regiones del cerebro analizadas oscilaron entre -1,3 y -2,5 mm del bregma. Todas las células positivas en el DG se contaron usando el software ImageJ (software gratuito de NIH, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). En el GCL, se contaron las células positivas para BrdU o DCX.

Línea celular SH-SY5Y

SH-SY5Y es una línea celular de neuroblastoma humano clonada tres veces que fue establecida en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea de un sitio de neuroblastoma metastásico en una niña de cuatro años. Estas células son dopamina beta hidroxilasa activas, acetilcolinérgicas, glutamatérgicas y adenosinérgicas. Las células SH-SY5Y se desarrollan como una mezcla de células flotantes y adherentes, además de formar racimos de células neuroblásticas con múltiples procesos celulares finos y cortos. El tratamiento con ácido retinoico y colesterol puede forzar a estas células a desarrollar dendritas y a diferenciarse.

Pretratamiento de células SH-SY5Y con lixisenatida o liraglutida seguido de estrés por metilglioxal

Se cultivaron células SH-SY5Y en medio esencial mínimo de Dulbecco con F12 (1:1) y Glutamax enriquecido con suero bovino fetal inactivado con calor al 10 % (calentado a 56 °C durante 20 min) y penicilina y estreptomycin, y se incubaron en una estufa de incubación humidificada, 5% de CO₂, 37 °C. Las células se tripsinaron al 80 % de confluencia y después de contar las células por el método de exclusión con azul de tripano (Countess, Invitrogen), 2 x 10⁴ células se dispusieron en una placa de 96 pocillos recubierta con laminina (Nunc, Inc) al 95 % de viabilidad celular. Después de 12 horas de fijación celular, las células se pretrataron con lixisenatida o liraglutida a diferentes dosis como a 10 nM, 100 nM y 200 nM, seguido de la adición del agente estresante metilglioxal en el medio libre de suero a concentraciones de 300 µM, 600 µM (y 1200 µM (Figuras 6A y 6B). Los datos se analizaron con PRISM 5.0C (GraphPad Software, Inc.) y se definió la significación como valores *p* de <0,05 o más pequeños.

Efecto del pretratamiento de lixisenatida o liraglutida sobre células SH-SY5Y estresadas con peróxido de hidrógeno

Las células se pretrataron con liraglutida o lixisenatida 10 nM y 100 nM, seguido de la adición del agente estresante peróxido de hidrógeno en el medio libre de suero a concentraciones de 200 µM, 400 µM y 800 µM.

Ensayo de LDH

Se analizaron los medios de cultivo celular usando un ensayo de lactato-deshidrogenasa (LDH) sensible (de Sigma). El ensayo de LDH proporciona una medición del número de células muertas mediante LDH citoplásmica total o por integridad de la membrana como una función de la cantidad de LDH citoplásmica liberada en el medio. La medición de LDH liberada se basa en la reducción de NAD por la acción de LDH. La NAD reducida resultante (NADH) se usa en la conversión estequiométrica de un tinte de tetrazolio. El compuesto coloreado final se mide por colorimetría.

Sumario

Los datos del presente ejemplo demuestran que la lixisenatida es adecuada para el tratamiento o/y la prevención de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson o accidente cerebrovascular. Asimismo, la lixisenatida tiene propiedades superiores en comparación con el análogo de GLP-1 liraglutida y con exendina-4, ambas actualmente usadas como tratamientos para la diabetes de tipo 2.

En particular, los datos del presente ejemplo demuestran que

- (a) Sorprendentemente, la lixisenatida puede atravesar la barrera hematoencefálica. Los datos de la presente invención indican que el transporte es regulado, ya que la velocidad de transporte a altas concentraciones se limita a un nivel máximo. Además, la lixisenatida se absorbe en el cerebro con una dosis parenteral más baja en comparación con la liraglutida.
- (b) La lixisenatida activa los receptores de GLP-1 en el cerebro e induce la producción de cAMP. Sorprendentemente, la lixisenatida produce niveles más altos de cAMP que la liraglutida, demostrando eficacia superior en la activación del receptor de GLP-1 a la misma dosis.
- (c) La lixisenatida puede inducir la proliferación de células progenitoras en el giro dentado. En comparación con la exendina-4 o con la liraglutida, la lixisenatida proporciona sorprendentemente efectos potenciados cuando se administra a la misma dosis. En enfermedades neurodegenerativas, estos efectos pueden constituir un efecto modificador de la enfermedad.

- (d) Sorprendentemente, la lixisenatida demostró efectos neuroprotectores superiores (contra el estrés celular) en el giro dentado cuando se compara con la liraglutida.
- (e) Sorprendentemente, un pretratamiento con una dosis de lixisenatida 10 nM fue suficiente para proteger las células de neuroblastoma SH-SY5Y del estrés por metilglioxal 1200 μ M. Fue necesaria una dosis de 200 nM de liraglutida para proteger a las células del estrés por metilglioxal 1200 μ M, indicando que una dosis inferior de lixisenatida es suficiente para inducir la protección.

Ejemplo 2

Tratamiento post-estrés con lixisenatida o liraglutida después del tratamiento con metilglioxal (MG) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

- Se sembraron células SHSY-5Y en placas de 96 pocillos y después de 12 horas de privación de suero, se estresaron con 600 μ M y 1 mM de H_2O_2 y 1 mM y 2 mM de MG durante 3 h. Las células se trataron con 0, 1, 10, 50 y 100 nM de lixisenatida y 0, 10, 50, 100 y 200 nM de liraglutida. Después de 24 h se añadieron 50 μ l de reactivo XTT y se incubó durante 8 h. El volumen de ensayo fue 100 μ l.

- La Figura 7 demuestra que el post-tratamiento con lixisenatida aumentó significativamente el número de células supervivientes después del estrés con MG o H_2O_2 en un modo dependiente de la dosis (véanse en particular los datos obtenidos con H_2O_2 600 μ M y MG 2 mM en la Figura 7A). La liraglutida no protegió a las células del estrés por MG o H_2O_2 (Figura 7B).

Pretratamiento con lixisenatida o liraglutida seguido de estrés por metilglioxal (MG)

- Se sembraron células SHSY-5Y en placas de 96 pocillos y después de 12 horas de privación de suero se trataron con 0, 1, 10, 50 y 100 nM de lixisenatida y 0, 10, 50, 100 y 200 nM de liraglutida y exendina-4 durante 4 horas, después de someterse a estrés con 400 μ M y 600 μ M de MG durante 14 h. Se añadieron 50 μ l de reactivo XTT y las placas se incubaron durante 8 h.

- La Figura 8 demuestra que el pretratamiento con lixisenatida antes del estrés con MG o H_2O_2 aumentó significativamente el número de células supervivientes en un modo dependiente de la dosis, comenzando con la dosis más baja de 1 nM con los mejores resultados a 50 nM (Figura 8A). La liraglutida también protegió a las células, pero solamente en una dosis superior de 100 nM (Figura 8B). La exendina-4 no protegió a las células del estrés por MG o H_2O_2 (Figura 8C).

Material y métodos

Ensayo de pretratamiento con células SHSY-5Y usando metilglioxal como agente estresante

- Se mantuvieron células SHSY-5Y en medio DMEM+F12 Glutamax (Cat No. 313310, Invitrogen Inc.) con FBS al 10 % (Cat No. 10437, Invitrogen Inc.) y pen-estrep al 1 % (Cat No. 15070063, Invitrogen Inc.).
- Se tripsinaron cultivos con 80-90 % de confluencia usando disolución de 0,25x tripsina EDTA, y se sembraron en placas de 96 pocillos (Cat No. 55301, Orange Scientific) que previamente se recubrieron con laminina (L2020, Sigma) a una concentración de 1 μ g/cm² durante 2 horas a 37 °C en una estufa de incubación de CO₂ y se lavaron 2 veces con agua destilada estéril doble.
- Después de 12-15 horas, el medio se cambió de FBS al 10 % a medio libre de suero (SFM) durante las siguientes 12 horas.
- Las células se pretrataron con incretinas durante 4 horas, el ensayo se realizó en un formato de 150 μ l de volumen de diferentes concentraciones y se añadió SFM nuevo a los controles respectivamente, durante 4 h.
- Los pocillos se lavaron con 1x HBSS y 150 μ l de metilglioxal 600 μ M (Cat No. M0252, Sigma) y se añadió SFM a los pocillos de ensayo y a los controles respectivamente durante 12 h.
- Se recogió el sobrenadante para realizar el ensayo LDH y se guardó a -20 °C.
- Se añadieron 75 μ l de disolución XTT (Cat No. 11465015001, Roche Inc.) (que contenía el reactivo de acoplamiento) al resto de las células y se incubó a 37 °C durante 4 horas. El ensayo se basó en la capacidad de las células activas metabólicas de reducir de la sal de tetrazolio XTT a compuestos coloreados, que pueden determinarse por medición de la absorbancia. Un aumento en la absorbancia indica un aumento en el número de células activas metabólicas.
- La absorbancia se obtuvo midiendo a 492 nm y 690 nm para cada pocillo y restando A₆₉₀ de A₄₉₂.

9. Para el ensayo de LDH (Cat No. G1780, Promega), los 50 µl del sobrenadante se añadieron a una placa de 96 pocillos junto con 50 µl del sustrato y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 60 minutos.
10. Se añadieron 50 µl de disolución de parada y se midió la absorbancia a 490 nm.
- 5 11. Los datos para los ensayos de XTT y LDH se analizaron usando Prism V.

Sumario

Los datos del Ejemplo 2 demuestran que la lixisenatida es adecuada para el tratamiento o/y la prevención de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson o accidente cerebrovascular. Asimismo, la lixisenatida posee propiedades superiores en comparación con los análogos de GLP-1 liraglutida y exenatida.

Un pretratamiento con una dosis de 10 nM de lixisenatida fue suficiente para proteger a las células de neuroblastoma SH-SY5Y del estrés por metilglioxal 600 µM. Una dosis de 100-200 nM de liraglutida fue suficiente para proteger a las células del estrés por metilglioxal 600 µM, indicando que una dosis inferior de lixisenatida es suficiente para inducir protección. La lixisenatida es, por lo tanto, adecuada para la prevención de las enfermedades anteriormente indicadas. Estos datos concuerdan con los datos obtenidos en el Ejemplo 1 (Figura 6A y B), demostrando que la lixisenatida demostró efectos neuroprotectores superiores (contra el estrés celular) en células de neuroblastoma SH-SY5Y cuando se compara con la liraglutida.

Asimismo, un post-tratamiento con lixisenatida fue suficiente para proteger a las células de neuroblastoma SH-SY5Y después del estrés por metilglioxal 2 mM o estrés por H₂O₂ 1 mM. Por el contrario, la liraglutida no protegió a las células del estrés por MG o H₂O₂.

Ejemplo 3

El tratamiento con el agonista de los receptores del péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1R) lixisenatida protege a las células neuronales humanas contra toxicidad por rotenona

En este ejemplo, los experimentos de neuroprotección en modelos celulares se describen dando soporte al uso de lixisenatida en el tratamiento de enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica y demencia de cuerpos de Lewy. El ejemplo demuestra que la lixisenatida podría demorar, detener o invertir la progresión de la enfermedad de Parkinson, demencia por enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica y demencia de cuerpos de Lewy protegiendo a las neuronas vulnerables en esta enfermedad. Estas enfermedades se asocian a pérdida de neuronas, utilizando la dopamina como neurotransmisor.

El ejemplo se refiere a ensayos de cultivo *in vitro* que usan la línea celular humana que es dopaminérgica por naturaleza llamada neuronas mesencefálicas humanas Lund (células LUHMES). Estas células se describen en Lotharius et al. (2002). Los cultivos de estas células se expusieron *in vitro* a rotenona conocida por exterminar las células dopaminérgicas y por estar asociada a la enfermedad de Parkinson tras la exposición accidental o ambiental a seres humanos. La asociación de rotenona con la enfermedad de Parkinson se describe en Sherer et al., 2003 y Tanner et al., 2011. La rotenona puede causar parkinsonismo, exterminando las neuronas que producen la dopamina y, por lo tanto, reproduciendo experimentalmente las principales características de la enfermedad de Parkinson humana.

En el presente ejemplo, el agonista de los receptores del péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1R) lixisenatida presenta efectos neuroprotectores significativos en células LUHMES contra la neurodegeneración inducida por rotenona (Figura 9). La lixisenatida ofrece ventajas en comparación con otros agonistas de los receptores de GLP-1 (GLP-1R). El efecto neuroprotector de la lixisenatida contra la rotenona en células LUHMES es significativamente activo a concentraciones 3 veces inferiores a las de la liraglutida (Figuras 9 y 11), un resultado reconfortante para el efecto de actividad superior inesperada de la lixisenatida observado previamente en el modelo de metilglioxal del Ejemplo 1.

La exenatida no induce una mejor viabilidad a una concentración de 0,3 µM o 1 µM. Por el contrario, la lixisenatida proporciona una mejora significativa de la viabilidad a estas concentraciones (Figuras 9 y 10).

Material y métodos

Para evaluar la neuroprotección contra rotenona, se desarrollaron células LUHMES a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂, 95 % de aire en medio de cultivo celular estándar. Después de 2 días, al cultivo en matraces de plástico se les añadió medio de diferenciación que contenía factores de crecimiento, y las células se incubaron durante otros 2 días. Las células se disociaron y sembraron en placas de múltiples pocillos recubiertas y se añadió medio de diferenciación nuevo durante otros 4 días. En el día 6 de diferenciación, las células se trataron

con diversas concentraciones de lixisenatida, exenatida (exendina-4) o liraglutida 1 hora antes del tratamiento con rotenona (0,75 μ M). La neuroprotección se midió después de 72 h con un ensayo basado en resazurina, un indicador de células metabólicamente activas, generando un producto fluorescente a través de la oxidación-reducción celular. La fluorescencia producida es proporcional al número de células viables en los cultivos y, por lo tanto, mide el grado de protección de las células LUHMES neuronales proporcionadas por los tratamientos. Se compararon los datos de n=12 mediciones tras la normalización de las lecturas de viabilidad celular con respecto a los controles sin rotenona. Se usó un análisis unilateral de la varianza, seguido de una prueba de Dunnett para comparaciones estadísticas entre grupos experimentales. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos y se indican en los gráficos con asteriscos de la siguiente manera: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; NS=no significativo. La neuroprotección se expresó como la inversa del porcentaje de disminución de la viabilidad inducida por rotenona.

Sumario

Los datos del ejemplo 3 demuestran que la lixisenatida es adecuada para el tratamiento o/y la prevención de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson o accidente cerebrovascular. Asimismo, la lixisenatida tiene propiedades superiores en comparación con el análogo de GLP-1 liraglutida y con exendina-4.

En el presente Ejemplo, la lixisenatida presenta efectos neuroprotectores significativos en células LUHMES contra la neurodegeneración inducida por rotenona (Figura 9). La lixisenatida proporciona ventajas en comparación con otros agonistas de los receptores de GLP-1 (GLP-1R). En células LUHMES tratadas con rotenona, la lixisenatida es significativamente activa a concentraciones 3 veces inferiores a las de la liraglutida. A una concentración de 0,3 μ M o 1 μ M de exenatida, no pudo observarse ningún efecto significativo. Por el contrario, la lixisenatida proporciona una mejora de la viabilidad dependiente de la dosis a estas concentraciones.

Ejemplo 4: El efecto de la lixisenatida en ratones transgénicos APP_{swE}/PS1 Δ E9.

Para demostrar adicionalmente el interés de la lixisenatida para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, en el presente ejemplo, se describe el efecto del tratamiento con lixisenatida en ratones transgénicos que portan placas amiloides en su cerebro. Los ratones transgénicos APP_{swE}/PS1 Δ E9 son un modelo bien caracterizado de enfermedad de Alzheimer que muestran una patología de cerebro amiloide. El tratamiento con lixisenatida (10 nmol/kg, i.p., diario) se inició en ratones transgénicos APP/PS1 de 7 meses de edad, a una edad a la que ya se han desarrollado placas amiloides en el cerebro, y duró 70 días.

Animales transgénicos

Se obtuvieron ratones APP_{swE}/PS1 Δ E9 con un fondo de C57Bl/6 del laboratorio Jackson (<http://research.jax.org/repository/alzheimers.html>). Se cruzaron machos heterocigóticos con hembras no mutantes C57/Bl6 adquiridas localmente (Harlan, RU). Se punzó la oreja de las crías y se definió su genotipo usando PCR con cebadores específicos para la secuencia de APP (Directo "GAATTCCGACATGACTCAGG, SEC ID NO: 4", Inverso: "GTTCTGCTGCATCTTGGACA, SEC ID NO: 5"). Los ratones que no expresaban el transgén se usaron como controles no mutantes. Se usaron machos en todos los estudios. Los animales se dispusieron en jaulas individualmente y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (luces encendidas a las 08h00, apagadas a las 20h00), en sala de temperatura controlada (T: 21,5 °C $\pm$ 1). El alimento y el agua estuvieron disponibles a voluntad. Los animales fueron manipulados diariamente durante dos semanas antes del comienzo del estudio.

Tratamiento con lixisenatida

Los ratones tenían 7 meses de edad cuando comenzó el tratamiento. En ese momento, los ratones ya presentaban patología de cerebro amiloide. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) una vez al día de lixisenatida (10 nmol/kg de peso corporal) o solución salina (0,9 % p/v) durante 70 días. Los experimentos fueron autorizados por el Ministerio del Interior del RU de acuerdo con la Ley de Animales (procedimientos científicos) de 1986.

La lixisenatida fue suministrada por Sanofi. Se reconstituyó el péptido liofilizado en agua Milli-Q a una concentración de 1 mg/ml. Las alícuotas se guardaron en el congelador y se reconstituyeron en solución salina al 0,9 % para inyección.

Preparación histológica

Los animales fueron perfundidos transcardíacamente con tampón PBS, seguido de paraformaldehído al 4 % enfriado con hielo en PBS. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante al menos 24 h antes de transferirse a disolución al 30 % de sacarosa durante la noche. Los cerebros se congelaron luego inmediatamente usando Envirofreeze™ y se cortaron secciones coronales de 40 micrómetros de espesor a una profundidad de -2 a -3 del bregma usando un crióstato de Leica. Las secciones se eligieron según las reglas estereológicas tomándose la primera sección aleatoriamente y después cada 6ª sección.

Usando métodos convencionales (ver Mclean *et al.* 2011 para detalles), se tiñó beta amiloide usando el péptido anti-beta amiloide policlonal de conejo (1:200, Invitrogen, RU, 71-5800), y placas de núcleo denso se tiñeron usando rojo Congo. El beta amiloide y el rojo Congo se analizaron tomando 2 imágenes (usando un objetivo de 10x) de corteza por sección (con 7-10 secciones por cerebro; n=6 para lixisenatida 10 nmol/kg de bw, n=12 para solución salina). Toda la tinción se visualizó con Axio Scope 1 (Zeiss, Alemania) y se analizó usando un programa adicional de umbral múltiple con Image J (NIH, EE.UU.).

Resultados

En ratones transgénicos APP_{swe}/PS1_{ΔE9} que ya presentan la patología de cerebro amiloide al inicio del tratamiento, el tratamiento con lixisenatida durante 70 días condujo a una reducción de la carga de placa beta amiloide como se mide por inmunorreactividad de beta amiloide del 62 % (p<0,0039; medidas repetidas con la prueba de la t), en comparación con los ratones tratados con solución salina (Figura 12).

Similarmente, el tratamiento con lixisenatida redujo la placa de amiloide de núcleo denso como se cuantifica por tinción histológica con rojo Congo del 52% (p=0,0419; mediciones repetidas con la prueba de la t) en comparación con los respectivos ratones APP/PS1 tratados con solución salina (Figura 13).

La actividad se observó a dosis más bajas (10 nmol/kg) de las previamente descritas para la liraglutida (25 nmol/kg, McClean *et al.* 2011).

Sumario

Estos datos usando dos técnicas independientes demuestran que la lixisenatida puede reducir la patología amiloide del cerebro en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer. Los datos demuestran que la lixisenatida es adecuada en la prevención o/y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, mediante la reducción de la patología de placa amiloide del cerebro. Por lo tanto, además de sus propiedades neuroprotectoras, la lixisenatida puede reducir las lesiones patológicas tales como las placas amiloides y representar, por lo tanto, un tratamiento atractivo o/y prevención de la enfermedad de Alzheimer. Además, se alcanza actividad a dosis más bajas de las previamente descritas para el análogo de GLP-1 liraglutida, como se deriva de los datos del Ejemplo 1.

Referencias

1. Bertram L, Lill CM, and Tanzi RE, 2010. The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future, *Neuron*, 68, 270-281.
2. Mancuso M, Orsucci D, LoGerfo A, Calsolaro V, Siciliano G, 2010, Clinical features and pathogenesis of Alzheimer's disease: involvement of mitochondria and mitochondrial DNA, *Adv Exp Med Biol.*, 685, 34-44.
3. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, and Butterfield DA, 2000, Review: Alzheimer's Amyloid b-Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity, *Journal of Structural Biology*, 130, 184-208.
4. Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chene MJ, Cheunge NS and Nagley P, 2010, Oxidative Stress: Emerging Mitochondrial and Cellular Themes and Variations in Neuronal Injury, *Journal of Alzheimer's Disease*, 20, S453 - S473.
5. Wollen KA, 2010, Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners, *Alfern Med Rev.*, 15(3), 223-44.
6. Aderinwale OG, Ernst HW, Mousa SA, 2010, Current therapies and new strategies for the management of Alzheimer's disease, *Am J Alzheimers Dis Other Dement.*, 25(5), 414-24.
7. Kaduszkiewicz, H., Zimmermann T, Beck-Bornholdt HP, van den Bussche H (2005). Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. *BMJ* 331 : 321 doi: 10.1136/bmj.331.7512.321
8. Holscher C, 2005, Development of Beta-Amyloid-induced neurodegeneration in Alzheimer's disease and novel neuroprotective strategies, *Reviews in Neuroscience*, 16, 181-212.
9. De Rosa, Garcia R, Braschi AA, Capsoni C, Maffei S, Berardi L, Cattaneo N, 2005, Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.*, 102, 3811-3816.
10. Holscher C, Li L, 2010, New roles for insulin-like hormones in neuronal signaling and protection: New hopes for novel treatments of Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging*, 31, 1495-1502.

11. Holscher C, (2010b), The role of GLP-1 in neuronal activity and neurodegeneration, *Vitamins and hormones*, 84, 331-54.
12. McClean PL, Parthasarathy V, Faivre E, Holscher C (2011): The diabetes drug Liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 31: 6587-6594.
- 5 13. Li H, Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Yan BC, Byun K, Lee B, Hwang JK, Won MH (2010) Chronic treatment of exendin-4 affects cell proliferation and neuroblast differentiation in the adult mouse hippocampal dentate gyrus. *Neurosci Lett* 19: 1205-1219.
- 10 14. Li Y, Duffy K, Ottinger M, Ray B, Bailey J, Holloway H, Tweedie D, Perry T, Mattson M, Kapogiannis D, Sambamurti K, Lahiri D, Greig N (2010) GLP-1 Receptor Stimulation Reduces Amyloid-beta Peptide Accumulation and Cytotoxicity in Cellular and Animal Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 19:1205-1219.
- 15 15. Gandhi S, Wood NW (2005) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 2749-2755.
16. Schapira AH (2001) Causes of neuronal death in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86: 155-162.
17. Perry T, Lahiri DK, Chen D, Zhou J, Shaw KTY, Egan JM, Grieg NH (2002) A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve cell growth factor mediated differentiation on PC12 cells. *J Pharmacol exp* 300: 958-966.
18. Perry TA, Haughey NJ, Mattson MP, Egan JM, Grieg NN (2002) Protection and reversal of excitotoxic neuronal damage by glucagon-like peptide -1 and exendin-4. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 881-888.
- 20 19. Harkavyi A, Abuirmeileh A, Lever R, Kingsbury AE, Biggs CS, Whitton PS. (2008) Glucagon-like peptide I receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease. *J Neuroinflamm* 5: 19, 1-9.
- 25 20. Li A, Perry TA, Kindy MS, Harvey BK, Tweedie D, Holloway HW, Powers K, Shen H, Egan JM, Sambamurti K, Brossi A, Lahiri DK, Mattson MP, Hoffer BJ, Wang Y, Greig NH (2009) GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsons. *PNAS* 106: 4 1285-1290.
- 30 21. Martin B, Golden E, Carlson OD, Pistell P, Zhou J, Kim W, Frank BP, Thomas S, Chadwick A, Greig NH, Bates GP, Sathasivam K, Bernier M, Maudsley S, Mattson MP, Egan JM (2009) Exendin-4 improves glycemic control, ameliorates brain and pancreatic pathologies and extends survival in a mouse model of Huntington's Disease. *Diabetes* 58: 2, 318-328.
22. Mattson MP (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6: 337-350
23. Lee CH, Yan B, Yo KY, Choi JH, Kwon SH, Her S, Hwang IK, Cho JH, Kim YM, Won MH (2011) Ischemia-induced changes in glucagon-like peptide-1 receptor and neuroprotective effect of its agonist exendin-4, in experimental transient cerebral ischemia. *J Neurosc Res* 89: 1103-1113.
- 35 24. Teramoto S, Miyamoto N, Yatomi K, Tanaka Y, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T (2011) Exendin-4, a glucagon-like peptide -1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab* 31:8, 1696-1705.
25. Nakagawa A, Satake H, Nakabayashi H (2004) Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not of glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells. *Auton Neurosci* 110: 36-43.
- 40 26. Perry TA, Holloway H, Weerasuriya A, Mouton PR, Duffy K, Mattison JA, Greig NH (2007) Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy. *Exp Neurol* 203: 2, 293-301.
27. During MH, Cao L, Zuzga DS, Francis JS, Fitzsimons HL, Jiao X, Bland RJ, Klugmann M, Banks WA, Drucker DJ, Haile CN (2003) Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection. *Nat Med* 9: 1173-1179.
- 45 28. Isacson R, Nielsen E, Dannaus K, Bertilsson G, Patrine C, Zachrisson O, Wikstrom L (2009) The glucagon-like peptide 1 receptor agonist exendin-4 improves reference memory performance and decreases immobility in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 10: 650, 249-55.
- 50 29. Himeno T, Kamiya H, Naruse K, Harada N, Ozaki N, Seino Y, Shibata T, Kondo M, Kato J, Okawa T, Fukami A, Hamada Y, Inagaki N, Drucker DJ, Oiso Y, Nakamura J (2011) Beneficial effects of exendin-4 on experimental polyneuropathy in diabetic mice. *Diabetes* 60:2397-2406.

30. Porter DW, Kerr BD, Flatt PR, Hölscher C, Gault VA (2010) Four weeks administration of Liraglutide improves memory and learning as well as glycemic control in mice with high fat dietary-induced obesity and insulin resistance. *Diab Obes Metab* 12: 891-899, 2010.
31. Doyle ME, Egan JM., Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther.* 2007 Mar;113(3):546-93. Epub 2006 Dec 28.
32. Holst (1999), *Curr. Med. Chem* 6: 1005
33. Nauck et al. (1997) *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 105: 187
34. Lopez-Delgado et al. (1998) *Endocrinology* 139:2811.
35. McClean PL, Gault VA, Harriott P, Holscher C, 2010, Glucagon-like peptide-1 analogues enhance synaptic plasticity in the brain: A link between diabetes and Alzheimer's disease, *European Journal of Pharmacology*, 630, 158-162.
36. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W, 2001, Interactions of Glucagon-like peptide (GLP-1) with blood brain barrier, *Journal of Molecular Neuroscience*, 18(2), 7-14.
37. Perry T and Greig N, 2003, The glucagon-like peptides: a double-edged therapeutic sword? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 377-383.
38. Li H, Lee CH, Yoo KY, Choi JH, Park OK, Yan BC. Byun K, Lee B, Hwang JK, Won MH (2010) Chronic treatment of exendin-4 affects cell proliferation and neuroblast differentiation in the adult mouse hippocampal dentate gyrus. *Neurosci Lett* 19: 1205-1219.
39. Hamilton A., S. Patterson, D. Porter, V. A. Gault and C. Hölscher (2011): Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain. *J Neurosci Res*, 89:481-489.
40. Gengler S, McClean P, McCurtin R, Gault V, Holscher C (2012) Val(8)GLP-1 rescues synaptic plasticity and reduces dense core plaques in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 33:265-276.
41. Sherer, T.B. Kim, J.-H, Betarbet, R. and Greenamyre, J.T., Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and α -Synuclein Aggregation, 2003, *Experimental Neurology*, 179: 9-16.
42. Lotharius, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H.K., and Brundin, P., Effect of Mutant α -Synuclein on Dopamine Homeostasis in a New Human Mesencephalic Cell Line, 2002, *Journal of Biological Chemistry*, 277: 38884-38894.
43. Lotharius, J., Falsig, J., van Beek, J., Payne, S., Dringen, R., Brundin, P., and Leist, M., Progressive Degeneration of Human Mesencephalic Neuron-Derived Cells Triggered by Dopamine-Dependent Oxidative Stress Is Dependent on the Mixed-Lineage Kinase Pathway, 2005, *Journal of Neuroscience*, 25: 6329-6342.
44. Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W. Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R. Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., and Langston, J.W., Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease, 2011, *Environmental Health Perspectives*, 119: 866-872.
45. Kim, S., Moon, M. and Park, S., Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease, 2009, *J. Endocrinology*, 202: 431-439.
46. Dubois B. et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 1118-27.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

<120> Composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa

<130> 51246PWO

<150> EP 11 179 784.1

<151> 01-09-2011

<160> 5

5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 44

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> desPro36-Exendina-4(1-39)-Lys6-NH2

15

<400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 2

<211> 39

20

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 2

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

25

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> GLP-1(7-36)

5

<400> 3

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10				15		

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25				30	

<210> 4

<211> 20

10

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador directo

15

<400> 4

gaattccgac atgactcagg 20

<210> 5

20

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

25

<223> cebador inverso

<400> 5

gttctgctgc atcttgaca 20

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o/y el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo la composición desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente un vehículo, adyuvante o/y sustancia auxiliar farmacéuticamente aceptable.
2. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 1, en la que la desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se prepara para administración parenteral.
3. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enfermedad neurodegenerativa implica estrés oxidativo, pérdida de integridad de los axones, apoptosis, pérdida neuronal o/y respuesta inflamatoria.
4. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enfermedad neurodegenerativa se asocia a deterioro cognitivo.
5. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), demencia de cuerpos de Lewy, demencia por enfermedad de Parkinson, epilepsia, accidente cerebrovascular, enfermedad de Huntington, hipoxia cerebral, esclerosis múltiple y neuropatía periférica.
6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que la neuropatía periférica se asocia a diabetes mellitus.
7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y accidente cerebrovascular.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en la que la enfermedad de Alzheimer es una enfermedad de Alzheimer en etapa temprana.
9. La composición para uso según la reivindicación 5, en la que la enfermedad de Parkinson es una enfermedad de Parkinson en etapa temprana.
10. La composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la desPro³⁶Exendina-4(1-39)-Lys₆-NH₂ o/y la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se prepara para administración en una dosis diaria seleccionada del intervalo de 10 µg a 20 µg.

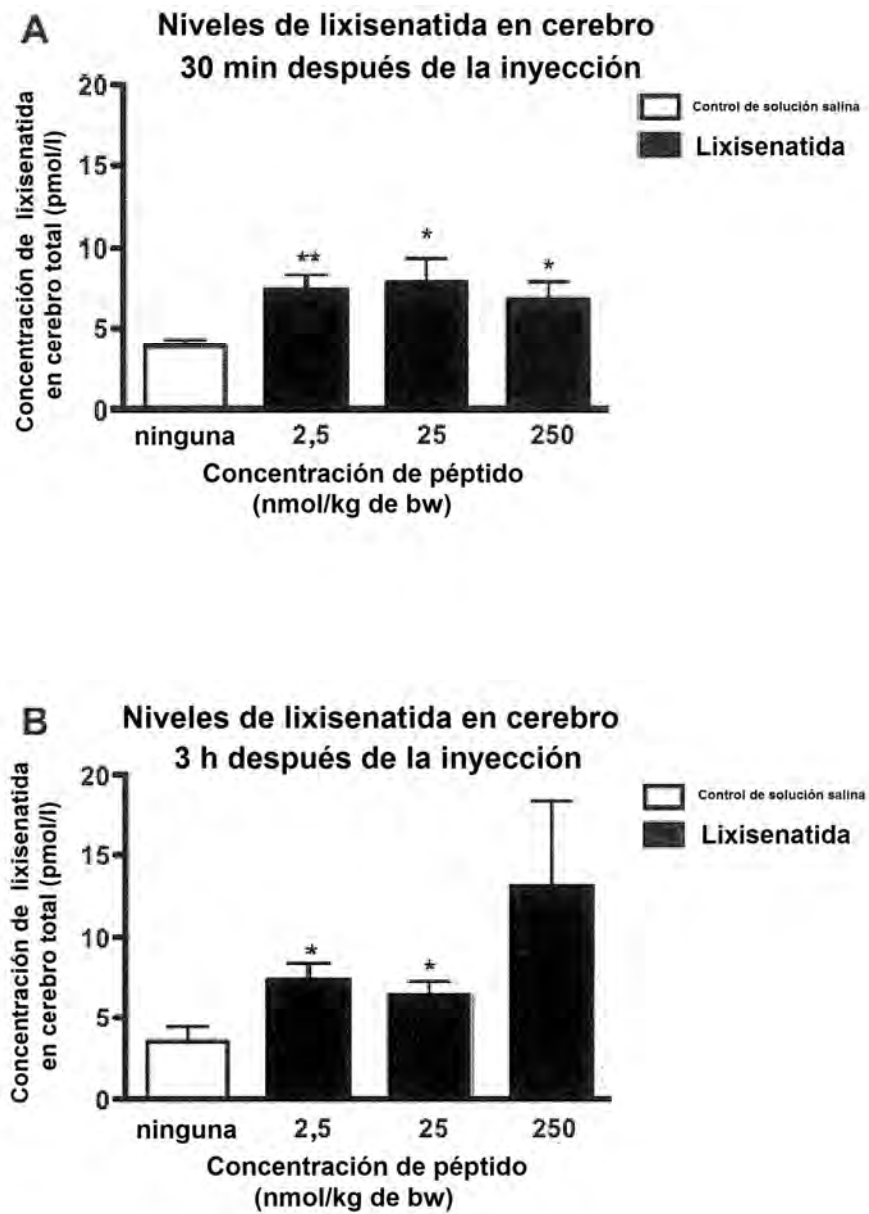


Figura 1

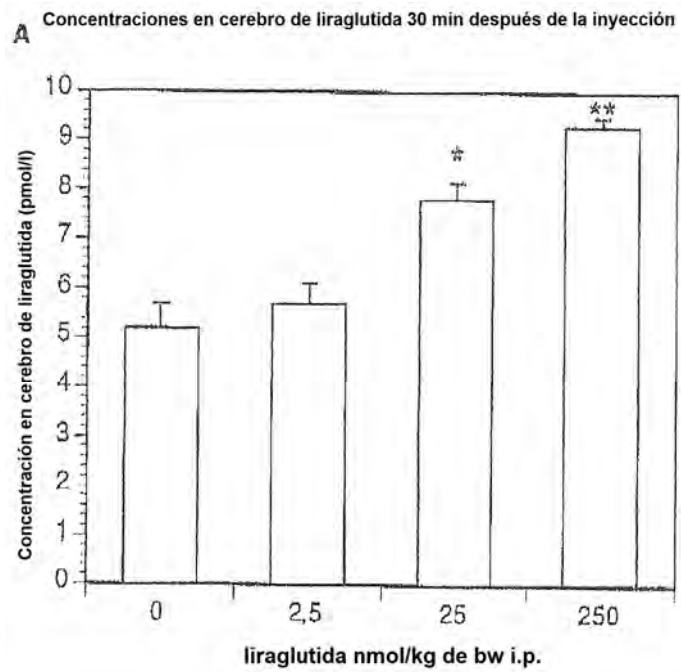


Figura 2A

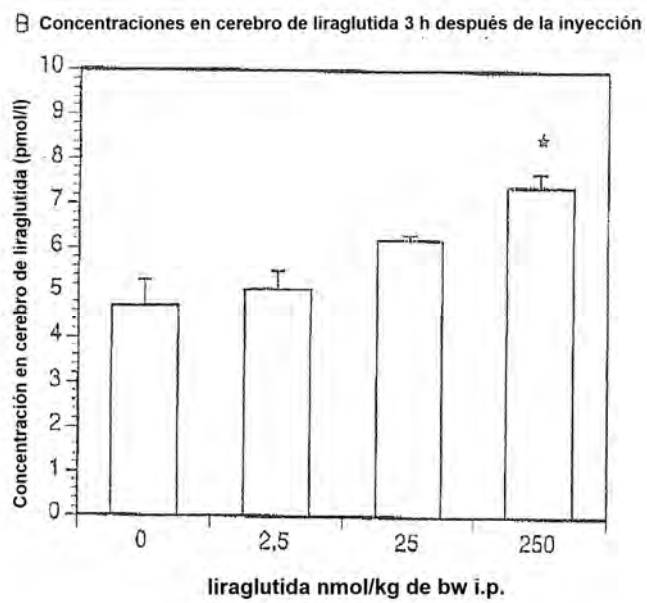


Figura 2B

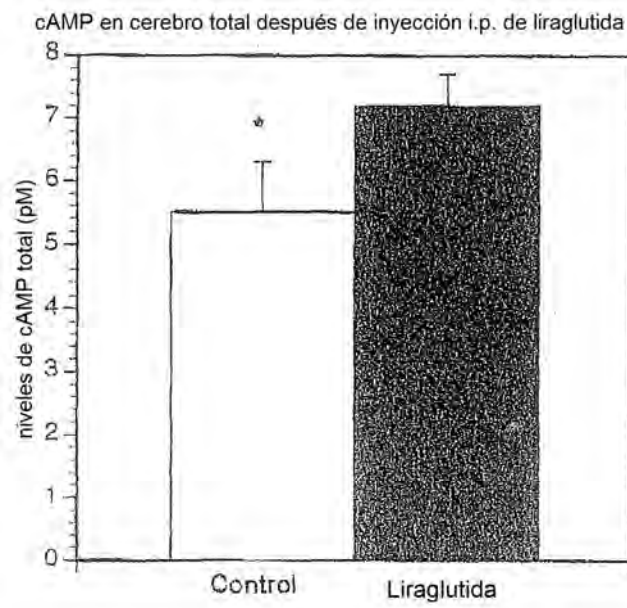


Figura 3A

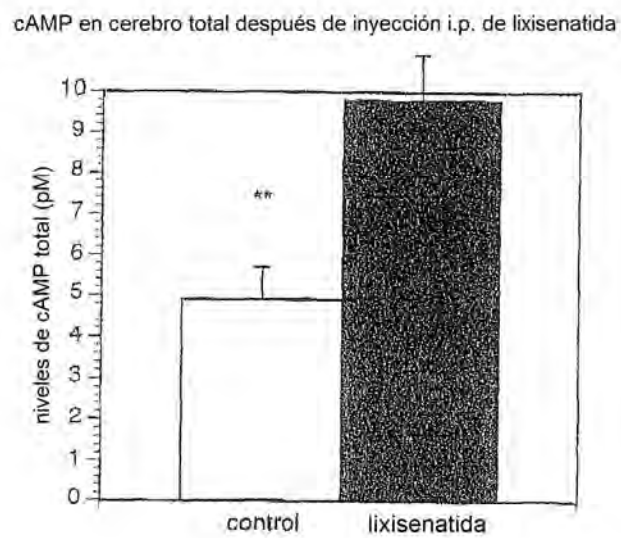


Figura 3B

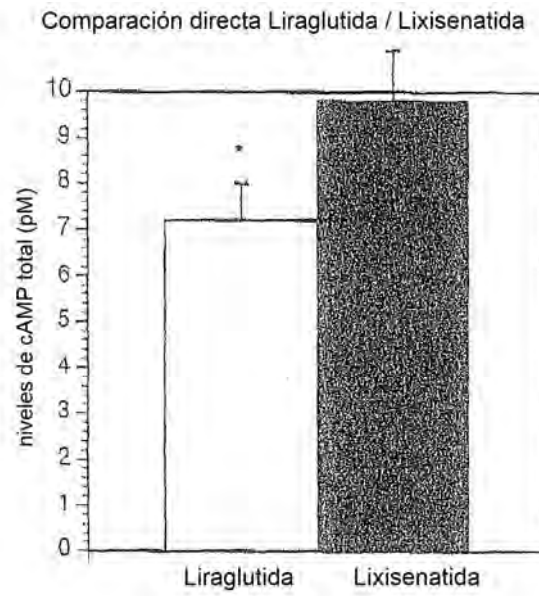


Figura 3C

Proliferación celular en el giro dentado después de 3 semanas de tratamiento

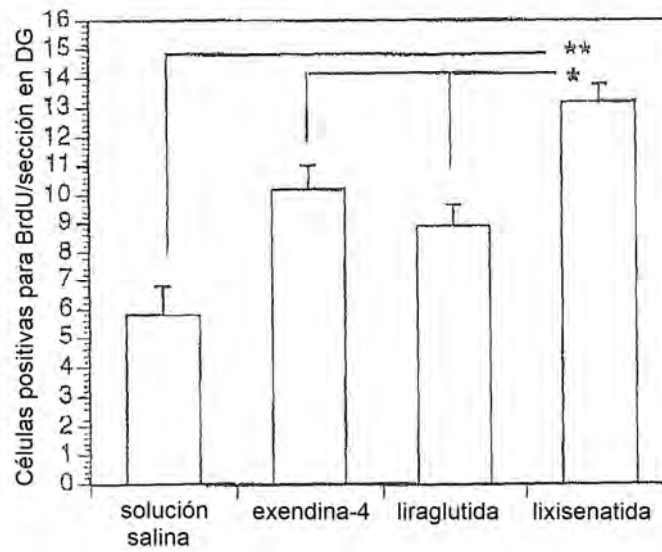


Figura 4

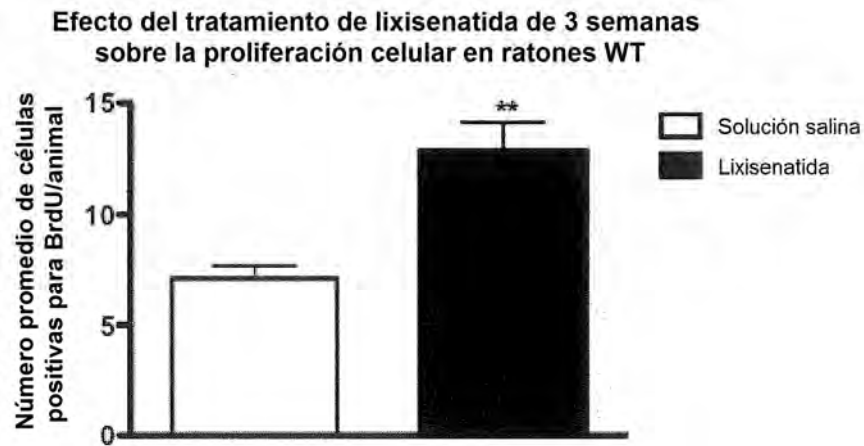


Figura 5

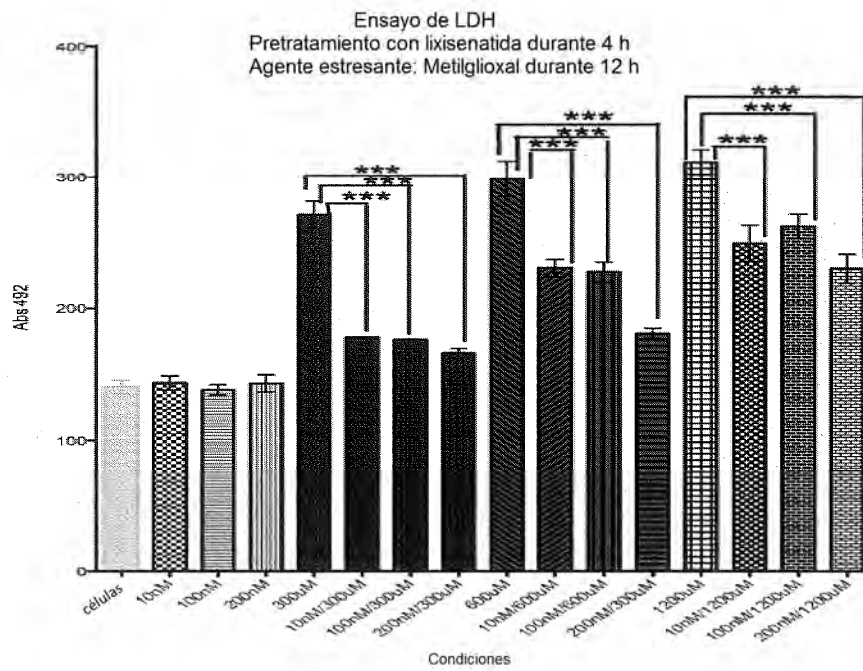


Figura 6A

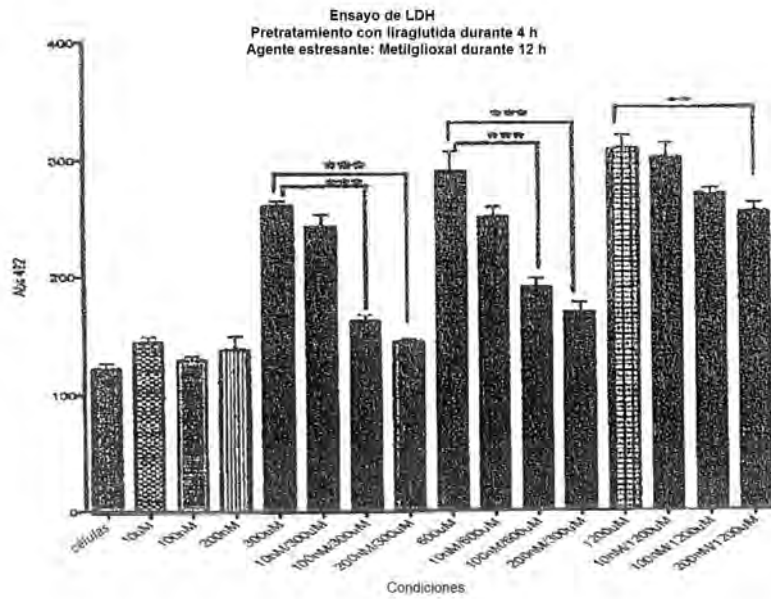


Figura 6B

Ensayo de XTT: Lixisenatida después del tratamiento de 24 h
3 h de pre-estrés

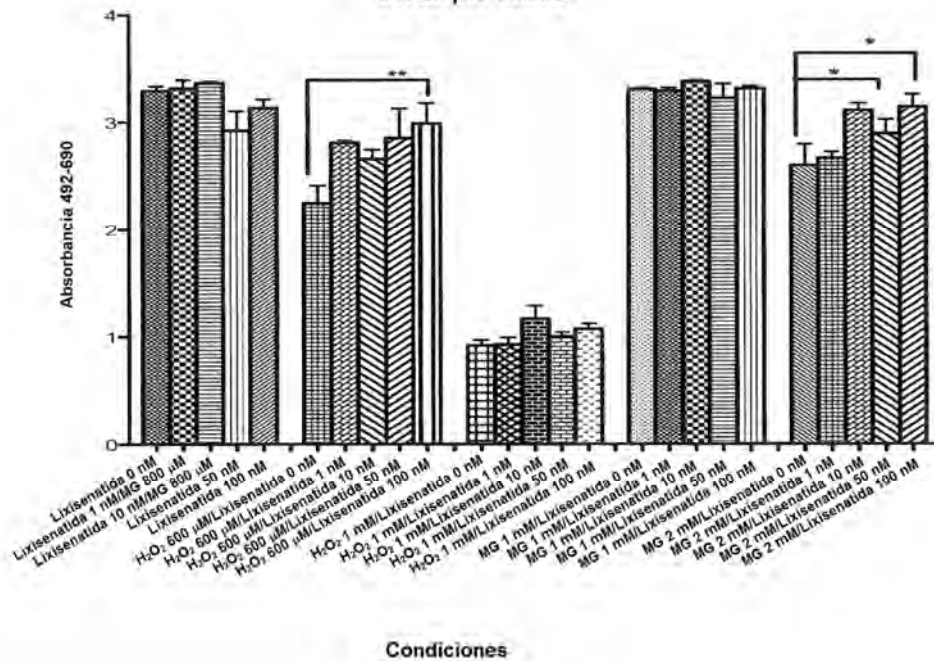


Figura 7A

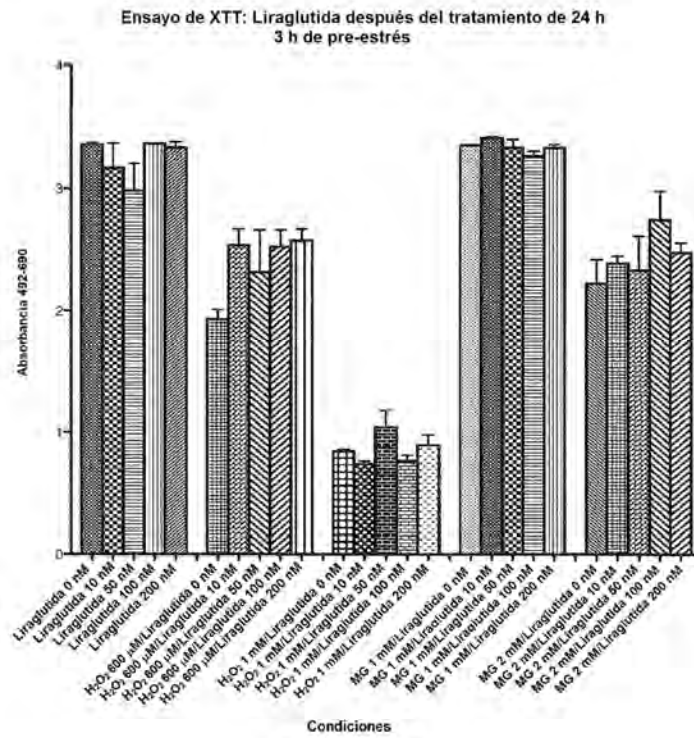


Figura 7B

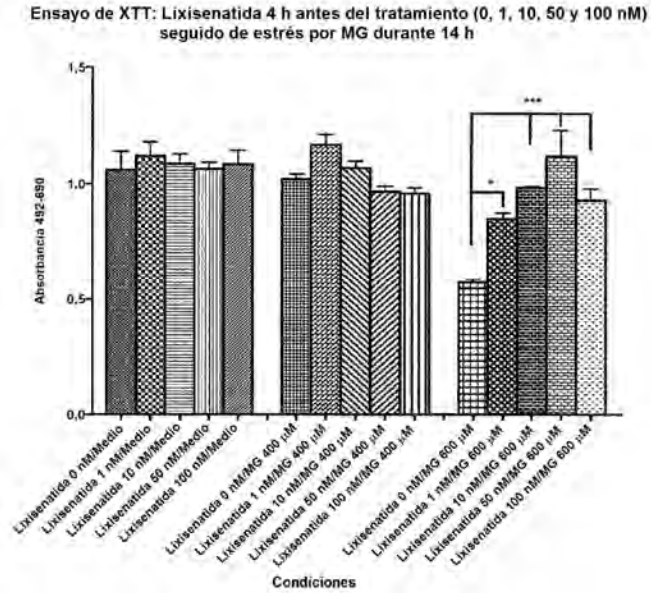


Figura 8A

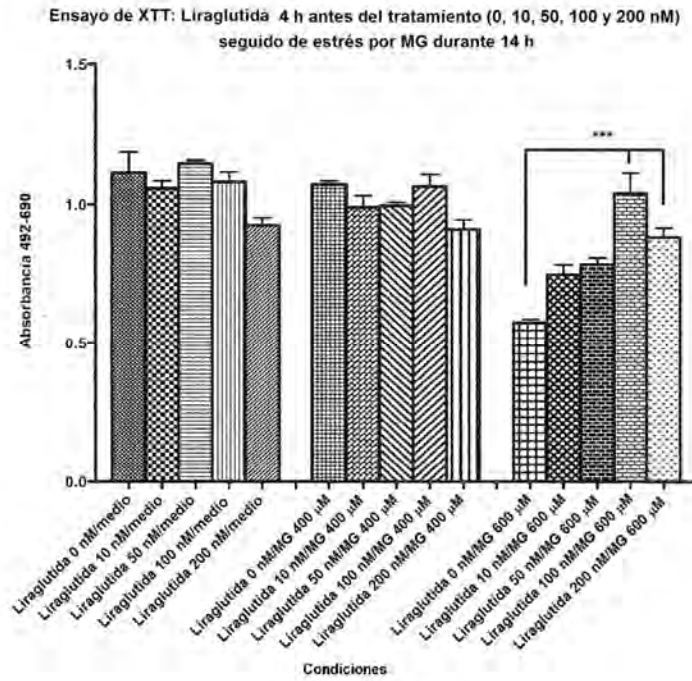


Figura 8b

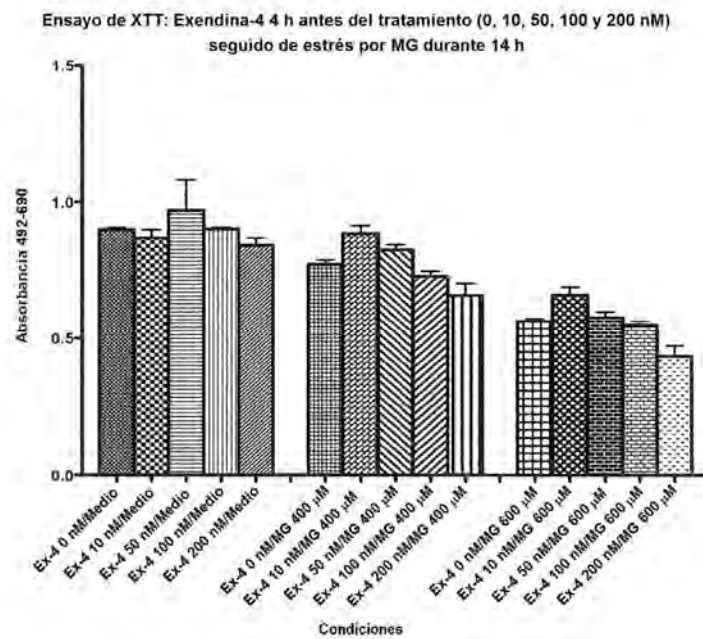


Figura 8C

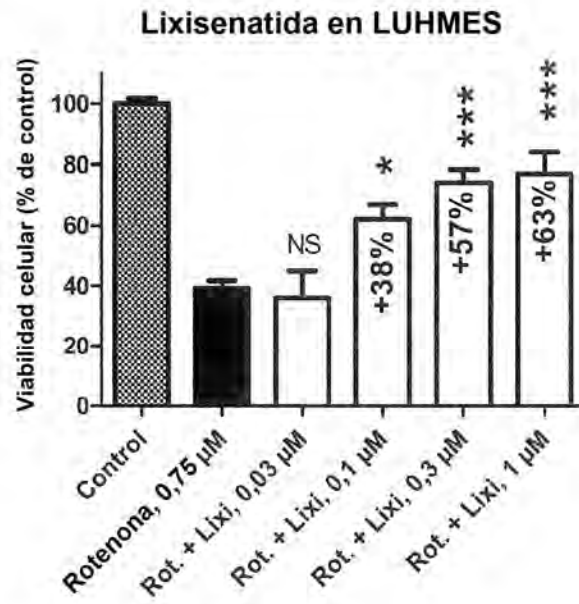


Figura 9

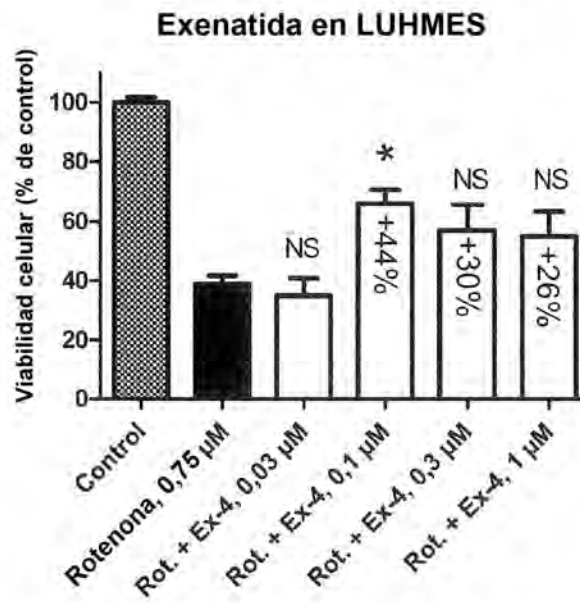


Figura 10

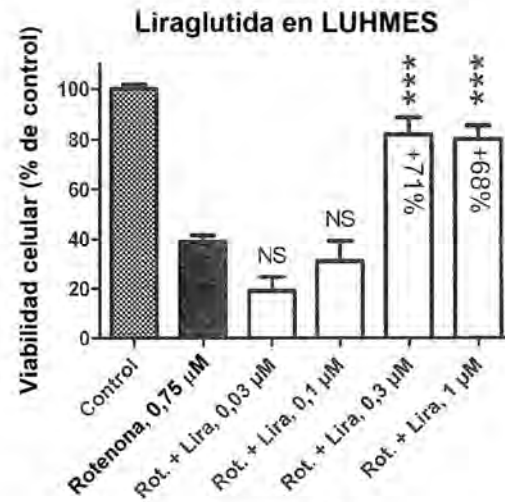


Figura 11

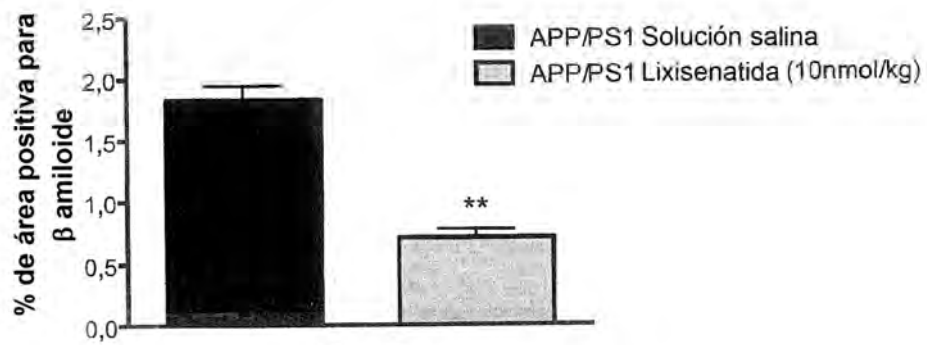


Figura 12

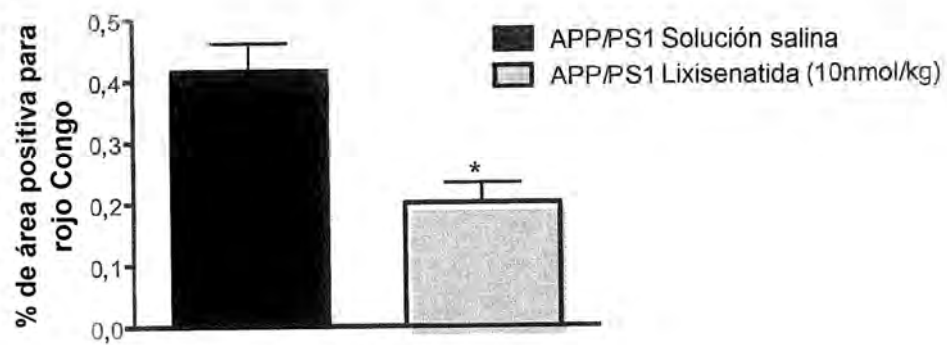


Figura 13