

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 385**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18	(2006.01)	A61K 45/06	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)		
A61P 25/28	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
C07K 5/02	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
C07K 5/083	(2006.01)		
A61K 38/07	(2006.01)		
A61K 38/06	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2012 PCT/US2012/031815**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138599**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12768043 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017 EP 2709650**

54 Título: **Miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos como agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

02.04.2011 US 201161471124 P
02.04.2011 US 201161471122 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2017

73 Titular/es:

WASHINGTON STATE UNIVERSITY (100.0%)
Lighty 280/286 P.O. Box 641060
Pullman, WA 99164-1060, US

72 Inventor/es:

HARDING, JOSEPH, W.;
WRIGHT, JOHN, W.;
BENOIST, CAROLINE, C.;
KAWAS, LEEN, H. y
WAYMAN, GARY, A.

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

ES 2 622 385 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).

MIMÉTICOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS**DESCRIPCIÓN****5 Declaración respecto a investigación o desarrollo patrocinado federalmente**

Esta invención se realizó, en parte, con apoyo gubernamental con la subvención n.º MH086032 otorgada por los NIH. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

10 Lista de secuencias

Esta solicitud incluye como lista de secuencias el contenido completo del archivo de texto adjunto "Sequence.txt", creado el 2 de abril de 2012, que contiene 1022 bytes, incorporado por el presente documento por referencia.

15 Descripción**Sumario***Campo de la invención*

20 La invención se refiere en general al desarrollo de miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que pueden actuar como miméticos (agonistas) o antagonistas. Los miméticos actúan: potenciando la función cognitiva; como agentes neuroprotectores/neurorregenerativos generales; facilitando la reparación de heridas; mejorando el transporte de glucosa y la sensibilidad a la insulina; y disminuyendo la fibrosis de órganos o tejidos con el fin de
25 prevenir o revertir los síntomas de demencia, proteger de o revertir la enfermedad neurodegenerativa, facilitar la reparación de lesión traumática en el sistema nervioso, aumentar la vascularización de tejidos y órganos, mejorar la cicatrización de heridas alterada, y disminuir o revertir cambios fibróticos en órganos como corazón, pulmón, riñón e hígado. Los antagonistas actúan, por ejemplo, como agentes antiangiogénicos y anticancerígenos; tratando diversos tumores malignos y enfermedades como degeneración macular y retinopatía diabética, que se asocian con
30 hipervascularización.

Miméticos:

35 *Demencia:* Sólo en los Estados Unidos hay aproximadamente 10 millones de pacientes con demencia diagnosticados y ese número continúa creciendo cada año a medida que la población envejece. Los costes de tratamiento y cuidado de estos pacientes son superiores a 70 mil millones de dólares anualmente y están aumentando rápidamente. Desafortunadamente, las opciones de tratamiento actuales para la gestión de la demencia son extremadamente limitadas y en gran medida ineficaces. La falta de opciones de tratamiento para un problema de salud creciente de esta magnitud necesita que se desarrollen enfoques terapéuticos nuevos e
40 innovadores tan rápido como sea posible.

En esencia, la demencia es el resultado de una combinación de conectividad sináptica disminuida entre neuronas y muerte neuronal en la corteza entorrinal, el hipocampo y la neocorteza. Por tanto, se esperaría que un tratamiento eficaz aumentara la conectividad sináptica, protegiera a las neuronas de inductores de muerte subyacentes y estimulara el reemplazo de neuronas perdidas a partir de las reservas preexistentes de células madre neurales. Estos criterios de valoración clínicos propugnan el uso terapéutico de factores neurotróficos, que median en el desarrollo neural, la neurogénesis, la neuroprotección y la sinaptogénesis. De manera no inesperada, se han considerado factores neurotróficos como opciones de tratamiento para muchas enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Alzheimer (véanse las revisiones- Nagahara y Tuszynski, 2011; Calissano *et al.*, 2010).
45 Un factor neurotrófico particularmente atractivo pero subestimado habitualmente es HGF, que tiene una capacidad demostrada para estimular tanto la neurogénesis (Shang *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2011) como la sinaptogénesis (véanse los estudios preliminares a continuación). La constatación de que la aplicación de HGF podría representar una opción de tratamiento viable para la demencia no debe ser una sorpresa. HGF es un factor neurotrófico potente en muchas regiones cerebrales (Kato *et al.*, 2009; Ebens *et al.*, 1996), al tiempo que afecta a una variedad de tipos
50 de células neuronales.

Neuroprotección/neurorregeneración: HGF y c-Met se expresan activamente tanto en los cerebros y nervios en desarrollo como adultos. El sistema de Met es esencial para que el sistema nervioso tanto central como periférico funcionen adecuadamente. Un gran número de estudios ha mostrado que el HGF y c-Met se expresan en múltiples
60 zonas del cerebro incluyendo corteza frontal, subependimo, tálamo, corteza cerebelosa, materia gris profunda y el hipocampo, una zona importante para la cognición. Las actividades biológicas descritas anteriormente también caracterizan funciones de Met en el cerebro donde la señalización de HGF/c-Met es neurotrófica (Honda *et al.*, 1995) y protectora (Zhang *et al.*, 2000; Takeo *et al.*, 2007; Tyndall y Walikonis, 2007; Takeuchi *et al.*, 2008). De manera similar a sus actividades en otros tejidos, Met en el cerebro está implicado en el desarrollo, actuando como factor
65 guía durante la diferenciación, motogénesis y neuritogénesis (Ebens *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002; Tyndall y Walikonis, 2007). También se ha mostrado que la señalización de HGF/c-Met promueve la cicatrización de lesiones

5 neuronales (Trapp *et al.*, 2008), especialmente tras lesión cerebral isquémica (Takeo *et al.*, 2007). HGF también presentó efectos neuroprotectores en modelos animales para enfermedades neurodegenerativas incluyendo esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Las diversas funciones de HGF, más sus actividades neurotróficas altamente potentes, promueven HGF como agente terapéutico potencial para el tratamiento de diversas enfermedades del sistema nervioso.

10 Esclerosis lateral amiotrófica: ELA es una enfermedad neurodegenerativa de rápida aparición mortal que se caracteriza por la degeneración de motoneuronas de la médula espinal y neuronas eferentes en la corteza motora y el tronco encefálico. El impacto de esta degeneración da como resultado una pérdida progresiva de la función muscular que culmina en parálisis total. Aproximadamente el 90% de los casos de ELA se clasifican como esporádicos con etiología desconocida, mientras que el 10% restante parecen ser familiares, debidos en parte a defectos en la cobre/zinc superóxido dismutasa 1 (SOD1), lo que conduce a un estrés oxidativo exagerado y una respuesta de proteína desplegada. La única cosa que tienen en común ambas formas de ELA es que actualmente no hay disponible ningún tratamiento eficaz.

15 A pesar de la escasez de opciones de tratamiento eficaces, varios estudios han destacado los beneficios potenciales de usar el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) como agente terapéutico. Estas investigaciones han demostrado que la aplicación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en un modelo de rata o murino de ELA familiar ralentiza significativamente la degeneración de motoneuronas (Aoki *et al.*, 2009); reduce la gliosis (Kadoyama *et al.* 2007), que contribuye al proceso de degeneración; retrasa la aparición de parálisis (Kadayama *et al.*, 2009); y aumenta la esperanza de vida (Sun *et al.*, 2002).

20 La constatación de que la aplicación de HGF podría representar una opción de tratamiento viable para ELA, sin embargo, sería inesperada. HGF junto con su receptor tirosina cinasa de tipo I, c-Met, se han reconocido desde hace tiempo por su papel en el desarrollo de estructuras tubulares (Santos *et al.*, 1993) y sus acciones proliferativas, antiapoptóticas, motogénicas y morfogénicas generales sobre hepatocitos y células de origen epitelial. Sin embargo, lo más relevante, es la constatación más reciente de que HGF es un factor neurotrófico potente (Maina y Klein, 1993; Kato *et al.*, 2009) en muchas regiones cerebrales y que es particularmente eficaz como factor prosupervivencia/regenerativo para motoneuronas (Ebens *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006; Elsen *et al.*, 2009).

25 Enfermedad de Parkinson: Una opción de tratamiento considerada durante mucho tiempo para muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Parkinson (EP), ha sido la aplicación de factores de crecimiento con la intención de detener la progresión de la enfermedad, restaurar la función perdida, o con suerte ambas (revisión, Rangasamy *et al.*, 2010). Sin embargo, este sueño no se ha cumplido en gran medida a nivel de la medicina clínica debido a las limitaciones en relación con la administración al cerebro y los costes. Los factores de crecimiento son proteínas universalmente grandes que son tanto metabólicamente lábiles como demasiado grandes para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Como tal, la mayoría de los enfoques para la administración han utilizado métodos de terapia génica con la esperanza de que el factor de crecimiento se expresara en la ubicación correcta a una concentración suficientemente alta y durante un periodo suficientemente prolongado como para proporcionar alivio clínico. Aunque se han empleado varios enfoques creativos y satisfactorios en modelos animales para administrar factores de crecimiento como GDNF (Wang *et al.*, 2011) al cerebro, estas metodologías son técnicamente complejas y extremadamente difíciles de llevar a la práctica con grandes números de pacientes.

30 Aunque se han examinado muchos sistemas de factores de crecimiento como dianas terapéuticas potenciales para EP, uno que se ha subestimado en gran medida, se piensa que de manera errónea, es el sistema de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/c-Met (su receptor de tirosina cinasa de tipo I). No obstante, la utilidad potencial de HGF como tratamiento para EP se ha destacado en un estudio por Koike *et al.* (2006) en el que un plásmido de HGF inyectado directamente en la sustancia negra (SN) dio como resultado sobreexpresión localizada de HGF, y actuó drásticamente evitando la muerte de células neuronales y preservando la función motora normal en el modelo de rata para EP de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Este efecto neuroprotector observado de HGF sobre neuronas dopaminérgicas (DA) concuerda con su capacidad para aumentar la proliferación y migración de células progenitoras dopaminérgicas (Lan *et al.*, 2008)

35 Sin embargo, el efecto neuroprotector del HGF sobre la ruta nigroestriatal no debe ser una sorpresa dado su papel reconocido en la regulación de células madre, el desarrollo de estructuras tubulares (Santos *et al.*, 1993) y sus acciones proliferativas, antiapoptóticas, motogénicas y morfogénicas generales sobre muchos tipos de células incluyendo hepatocitos y células de origen epitelial (Gherardi *et al.*, 1993). Maina *et al.*, particularmente relevante es la demostración de que el HGF es un factor neurotrófico potente para muchos tipos de células neuronales (Kato *et al.*, 2009) incluyendo motoneuronas (Elsen *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2006), neuronas del hipocampo Lim *et al.*, 2008), células granulares cerebelosas (Ieraci *et al.*, 2002) y neuronas simpáticas (1999). Además, HGF parece ser un regulador crítico de la diferenciación y expansión de células madre neurales (Nicoleau *et al.*, 2009) sugiriendo que tipos neurales así como muchos tipos de células madre periféricas están bajo el control del sistema de HGF/c-Met.

65 Lesión cerebral traumática/lesión de la médula espinal: A menudo la LCT tiene un impacto negativo sobre la función

cognitiva y puede provocar efectos que oscilan entre leves, con disminuciones temporales en las capacidades mentales, hasta graves, con disfunción cognitiva debilitante y prolongada (Kane *et al.*, 2011). Dificultades cognitivas junto con otras deficiencias neurológicas incluyendo: ansiedad, agresividad y depresión dan como resultado una calidad de vida significativamente reducida (Masel y DeWitt, 2010). Con las operaciones militares concluidas en Iraq y que continúan en Afganistán, la LCT ha llegado a ser la principal lesión de combate representando el 28% de todas las bajas en combate (Okie, 2005; U.S. Medicine, mayo de 2006, vol. 42). Las estimaciones totales de los miembros del servicio militar que padecieron LCT entre 2001 y 2010 oscilan entre 180.000 y 320.000 (USA Defense and Veterans Brain Injury Center).

La LCT subyacente es una lesión física en el cerebro que da como resultado una conectividad sináptica disminuida entre neuronas, pérdida y muerte de neuronas, daño a los vasos sanguíneos cerebrales dando como resultado daño inducido isquémico/hipóxico, y cicatrización glial secundaria. Esta pérdida de neuronas y conectividad sináptica disminuida es particularmente evidente en el hipocampo (Gao *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2011b) dando como resultado potenciación a largo plazo defectuosa (Schwarzbach *et al.*, 2006) y deficiencias cognitivas (por ejemplo Dikmen *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010). La prevalencia de lesiones asociadas con LCT que dan como resultado pérdida neuronal y conectividad sináptica disminuida indican la necesidad de terapias que respalden el reemplazo y/o la reparación neuronal. Estos criterios de valoración clínicos propugnan el uso terapéutico de factores neurotróficos que median en el desarrollo neural, la neurogénesis, neuroprotección y sinaptogénesis, para tratar la LCT. De manera no inesperada, se han considerado los factores neurotróficos como opciones de tratamiento para la LCT (Kaplan *et al.*, 2010; Richardson *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2011). Un factor neurotrófico particularmente atractivo pero subestimado habitualmente es HGF, que tiene una capacidad demostrada para estimular tanto la neurogénesis (Shang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011) como la sinaptogénesis (véanse los estudios preliminares a continuación). El hecho de que la aplicación de HGF podría representar una opción de tratamiento viable para la LCT proviene de la reciente constatación de que el HGF es un factor neurotrófico potente en muchas regiones cerebrales (Kato *et al.*, 2009; Ebens *et al.*, 1997), al tiempo que afecta a una variedad de tipos de células neuronales (Yamamoto *et al.*, 1997; Hayashi *et al.*, 2006; Elsen *et al.*, 2009).

HGF y cicatrización de heridas: La formación de cicatrices excesiva se caracteriza por la acumulación innecesaria de componentes de la ECM en la herida, debido a un equilibrio inadecuado entre síntesis y degradación. La terapia para la formación de cicatrices patológica puede dirigirse a inhibir la síntesis y a promover la degradación de la ECM. El HGF en la piel promueve eficazmente la cicatrización de heridas de diversas maneras: motivando la proliferación y motilidad de células endoteliales vasculares dérmicas; estimulando la motilidad de queratinocitos epidérmicos; potenciando el suministro de sangre local; y acelerando la reepitelización de la herida (Nakanishi *et al.*, 2002). La reepitelización inhibe la formación de cicatrices. Estudios han mostrado que la transferencia génica de HGF acelera la cicatrización de heridas dérmicas estimulando la angiogénesis y la reepitelización (Nakanishi *et al.*, 2002). Se esperaría que enfoques terapéuticos que aumentan HGF/SF promoviesen la cicatrización de heridas y evitasen la formación de cicatrices.

HGF como opción de tratamiento para síndrome metabólico y diabetes: Varios estudios recientes han implicado el papel crítico del sistema de HGF/c-Met en la regulación del manejo de glucosa, secreción de insulina y sensibilidad tisular a la insulina. Conjuntamente estas investigaciones han destacado el potencial terapéutico de aumentar el sistema de HGF/c-Met para el tratamiento de diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico (Fafalios *et al.*, 2011; Flaquer *et al.*, 2012)). Estos investigadores han mostrado que: 1) c-Met, el receptor de HGF se compleja con el receptor de insulina; 2) c-Met está implicado de manera crítica en la homeostasis de glucosa hepática; 3) HGF restaura la receptividad a la insulina en un modelo de ratón diabético murino; 4) esta terapia génica de HGF puede evitar el daño renal que normalmente acompaña a la diabetes y 5) HGF mejora la complicación vascular de la diabetes (Peng *et al.*, 2011).

La ruta de señalización de HGF/c-Met que potencia la angiogénesis: La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de lechos vasculares existentes. Es un requisito primordial en procesos fisiológicos tales como la cicatrización de heridas y el ciclo menstrual, por otro lado, es una etapa esencial para múltiples estados patológicos, como cáncer, degeneración macular, aterosclerosis, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, psoriasis y artritis reumatoide. Por consiguiente, la modulación de la angiogénesis, ya sea a través del fomento de la angiogénesis terapéutica o deteniendo la angiogénesis patológica, es una perspectiva estimulante para la medicina moderna. El equilibrio entre angiogénesis fisiológica y patológica está mediado por la comunicación de numerosos moduladores angiogénicos y antiangiogénicos endógenos.

Numerosos estudios han mostrado que el HGF es un inductor poderoso de la formación de neovasculatura. Además los inhibidores de HGF/c-Met son agentes antiangiogénicos clínicamente relevantes. (Gherardi *et al.*, 2012). Probablemente esto se logra a través de múltiples rutas, conseguidas por acción o bien directa o bien indirecta sobre células endoteliales.

HGF como agente antifibrótico: La enfermedad fibrótica adopta muchas formas y es un contribuidor principal a la función degradada en el corazón, riñón e hígado secundaria a muchos estados patológicos incluyendo infarto de miocardio, diabetes y alcoholismo. El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) muestra un fuerte efecto antifibrótico con eficacia notable en la mejora de la fibrosis tisular en un amplio intervalo de modelos animales, HGF

5 presenta un efecto antifibrótico notablemente poderoso que mejora la fibrosis tisular en un amplio intervalo de tejidos y modelos animales (Liu y Yang, 2006). Se han documentado pruebas del efecto terapéutico de HGF exógeno en ratas nefropáticas con aloinjertos crónicas, un modelo de inflamación crónica y formación de cicatrices tisular progresiva. La administración intramuscular del gen de HGF humano redujo la tasa de mortalidad, restringió la inflamación e infiltración, y redujo la fibrosis renal (Liu y Yang, 2006).

10 Los acontecimientos isquémicos de arteriopatía coronaria (APC) e infarto de miocardio son las principales causas de insuficiencia cardíaca en el mundo occidental. La única opción para el bloqueo coronario grave y la aterosclerosis es la cirugía de derivación. Dos acontecimientos patológicos en la APC desempeñan los principales papeles en la pérdida de la función cardíaca observada en APC: 1) bloqueo de las arterias coronarias dando como resultado perfusión sanguínea disminuida al corazón; y 2) la formación de tejido fibrótico tras ataque cardíaco dando como resultado distensión disminuida y remodelación ventricular. Se han notificado niveles aumentados de HGF en la circulación tras infarto de miocardio agudo (Zhu *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2003). Este aumento de HGF circulante puede usarse como marcador biológico para lesiones de corazón y da una idea con respecto a su papel protector (Ueda *et al.*, 2001). Potencialmente podrían usarse fármacos que potencian la señalización de HGF/Met en el tratamiento de infarto de miocardio, proporcionando protección frente al estrés oxidativo y la muerte celular debida a apoptosis así como reduciendo la formación de tejido fibrótico (Ahmet *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2004; Pietronave *et al.*, 2010). Además, otro efecto beneficioso de HGF tras el infarto de miocardio podría radicar en su capacidad para inducir neovascularización, que podría respaldar la formación de nueva vasculatura cardíaca que mejoraría la reperfusión del miocardio.

20 Aunque se sabe que el HGF protege al hígado frente a ataques externos, la generación de HGF también se ha asociado con varias enfermedades extrahepáticas y del hígado. Pruebas experimentales y clínicas indican que el HGF desempeña un papel crucial en la regeneración del hígado. La cirrosis hepática es el resultado final irreversible de la formación de cicatrices fibrosas y la regeneración hepatocelular y es una causa principal de morbimortalidad en todo el mundo sin terapia eficaz. Aunque no existe etiología específica para esta enfermedad, la cirrosis se ha definido como una enfermedad crónica del hígado en la que han tenido lugar dado disperso y regeneración de células parenquimatosas hepáticas y en la que la diseminación de tejido conjuntivo ha dado como resultado una organización inadecuada de las estructuras lobulares y vasculares (Fujimoto y Kaneda, 1999; Kaibori *et al.*, 2002). Idealmente, los enfoques para el tratamiento de cirrosis hepática deben incluir atenuación de la fibrogénesis, fomento de la mitosis de hepatocitos y reformación de la arquitectura tisular.

25 Estudios han mostrado que la administración exógena de HGF recombinante aumenta el potencial de regeneración del hígado tras hepatectomía especialmente en los casos de hígado cirrótico (Boros y Miller, 1995; Kaibori *et al.*, 2002; Borowiak *et al.*, 2004). A la inversa, estudios han mostrado que los compuestos relacionados con clofibrato, que aumentan los niveles de HGF/SF, pueden inducir hepatomegalia, proliferación de perixomas hepáticos y carcinoma hepático (Xu y Wu, 1999). El vínculo de HGF/SF tanto positiva como negativamente con las enfermedades hepáticas ha hecho de las opciones terapéuticas relacionadas con HGF un área candente para el desarrollo farmacéutico.

30 *Limitaciones al uso directo de HGF:* El uso directo de HGF o cualquier otro factor neurotrófico proteico como agente terapéutico tiene dos limitaciones serias: 1) tamaño grande y carácter hidrófilo que impiden la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE); y 2) la necesidad de fabricarse mediante métodos recombinantes a alto coste, limitando por tanto su uso generalizado. Estos impedimentos pueden superarse usando uno o más de una biblioteca extensa de miméticos de HGF de molécula pequeña que se describen en el presente documento, algunos de los cuales son activos por vía oral, presentan una actividad procognitiva/antidemencia/neuroprotectora profunda y son económicos de sintetizar.

35 *Antagonistas:* Puede fomentarse la activación inapropiada del receptor c-Met mediante mutaciones genéticas activantes, regulación por incremento transcripcional o mediante mecanismos autocrinos o paracrinos dependientes de ligando.

40 *Activación de c-Met en cáncer:* El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades que resultan de la acumulación de mutaciones genéticas. Estas mutaciones provocan una función alterada en protooncogenes conduciendo a la desregulación de la señalización apoptótica, proliferación y reparación del ADN (Tannock, 2005). La desregulación en las señales dentro de un grupo de células conduce al crecimiento incontrolado, y la invasión que o bien molesta directamente y destruye tejido adyacente o bien se metastatiza y se propaga a otra ubicación en el organismo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo.

45 Un sistema de Met y HGF disfuncional parece ser un rasgo crítico de numerosos tumores malignos humanos. La sobreexpresión ectópica de HGF y/o c-Met en líneas celulares humanas y de ratón les llevan a desarrollar fenotipos tumorigénicos y metastásicos en ratones desnudos atímicos (Rong *et al.*, 1994). Un gran número de estudios ha mostrado que la ruta de HGF/c-Met es una de las rutas más desreguladas en tumores malignos humanos, que incluyen, pero no se limitan a: cánceres de vejiga, de mama, de cuello uterino, colorrectal, de endometrio, de esófago, gástrico, de cabeza y cuello, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de ovarios, de páncreas, de próstata y tiroideo (<http://www.vai.org/met/>). Por último, se han descubierto mutaciones activantes de c-Met en

formas esporádicas y heredadas de carcinomas papilares renales humanos (Danilkovitch-Miagkova y Zbar, 2002). Estas mutaciones, que alteran secuencias dentro del dominio de cinasa, también se han encontrado en otros tipos de tumores sólidos y lesiones metastásicas. En este punto merece la pena mencionar que la sobreexpresión o falta de expresión de HGF a menudo se correlaciona con un mal pronóstico y que la regulación por disminución de la expresión de c-Met o HGF en células tumorales humanas redujo su tumorigenicidad (Abounader *et al.*, 2002). La activación de Met en cáncer se produce lo más a menudo a través de activación autocrina o paracrina con ligando. Osteosarcomas y glioblastoma multiforme, que expresan tanto c-Met como HGF, son ejemplos de control autocrino disfuncional. En otros casos en donde el control paracrino es fundamental, se ha notificado la sobreexpresión de c-Met en tumores primarios humanos mientras que el HGF lo proporcionan células estromales y no el propio tumor (Houldsworth *et al.*, 1990; Kuniyasu *et al.*, 1992; Hara *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006; Bean *et al.*, 2007).

La lista de neoplasias en las que se ha detectado sobreexpresión de c-Met está creciendo sin cesar. En el caso de carcinomas, se han encontrado niveles excesivos de expresión de c-Met prácticamente en cada tumor maligno (Danilkovitch-Miagkova y Zbar, 2002). La sobreexpresión de receptor puede conducir a la oligomerización del receptor local generando células reactivas a concentraciones de ligando subumbral. El propio HGF puede desencadenar la transcripción de c-Met (Boccaccio *et al.*, 1994), y es por tanto HGF, el que se expresa universalmente por células estromales en todo el organismo el que dirige normalmente la sobreexpresión tumoral de c-Met (Aguirre Ghiso *et al.*, 1999; Parr *et al.*, 2004). Esta singularidad de HGF le permite desempeñar un papel crítico, que establece bucles de retroalimentación positiva paracrinos que apoyan el crecimiento y la metástasis de células cancerosas. De manera interesante, esta noción está en consonancia con la observación de que las mutaciones activantes de c-Met requieren HGF para potenciar su eficacia catalítica (Michieli *et al.*, 1999). HGF también puede estimular de manera anómala c-Met de una manera autocrina, como se representa en glioblastomas (Weidner *et al.*, 1990), carcinomas de mama (Potempa y Ridley, 1998), rhabdomyosarcomas (Hartmann *et al.*, 1994) y osteosarcomas (Ridley *et al.*, 1995). Con múltiples mecanismos de activación, está claro que tanto Met como HGF son los principales contribuidores a la progresión de la mayoría de cánceres humanos. Adicionalmente, las actividades demostradas de c-Met y HGF en la proliferación, invasión, angiogénesis y antiapoptosis (Weidner *et al.*, 1990; Rong *et al.*, 1994; Kitamura *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Derksen *et al.*, 2003) delimitan las diferentes etapas en las que estas moléculas pueden participar en el desarrollo tumoral.

Aunque se usa c-Met como marcador general para el cáncer, también es un indicador de significación biológica con respecto al tumor maligno y el pronóstico del paciente, correlacionándose altos niveles con un mal pronóstico. Por tanto, puede esperarse que moléculas que inhiben c-Met y HGF interfieran con las causas moleculares de muchos cánceres, y deben ayudar significativamente a la atenuación. Estudios recientes del laboratorio Harding han confirmado el uso potencial de antagonistas de HGF como agentes anticancerosos/antiangiogénicos eficaces (Yamamoto *et al.*, 2010, Kawas *et al.*, 2011; Kawas *et al.*, 2012).

Degeneración macular/retinopatía diabética: La degeneración macular asociada con la edad (DMAE) es la causa más común de pérdida de visión irreversible en estadounidenses por encima de 60 años de edad. Se predice que 10 millones de americanos padecerán algún nivel de este daño visual asociado con la edad durante sus años de jubilación. En los ojos sanos normales, las células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) forman una monocapa polarizada adyacente a los fotorreceptores y están implicadas en diversas actividades que son esenciales para la homeostasis retinal y la función visual. En el caso de la degeneración macular, desafortunadamente, las adhesiones y la comunicación entre células EPR se pierden debido a la inflamación. Cuando se produce la inflamación, las células EPR secretan muchos factores de crecimiento incluyendo HGF/SF, que estimula la división y migración de EPR y la formación de nueva vasculatura a partir de vasos sanguíneos existentes (angiogénesis). HGF también estimula la producción de otros factores de crecimiento (por ejemplo VEGF), que promueven además la formación de nuevos vasos sanguíneos que invaden la matriz vecina (Jun *et al.*, 2007). Por eso el uso de bloqueantes de HGF puede usarse o bien de manera profiláctica, o bien como tratamiento para ralentizar la progresión de la enfermedad y la posterior pérdida de visión.

La retinopatía diabética proliferativa (RDP), que conlleva una neovascularización distintiva de la retina que se caracteriza por la invasión de vasos en la cavidad vítrea, está acompañada de hemorragias y formación de cicatrices alrededor del canal proliferativo (Katsura *et al.*, 1998). Existe una prueba sustancial de que están implicados múltiples factores de crecimiento en la aparición y progresión del proceso de neovascularización en general y en la RDP específicamente. Estos incluyen factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y HGF. De éstos, HGF tiene los efectos más pronunciados sobre el crecimiento endotelial y la actividad mitogénica (Boulton, 1999). Estudios han encontrado que los niveles de HGF en el fluido vítreo de pacientes con RDP son considerablemente más altos que en pacientes no diabéticos, y que los niveles de HGF son especialmente altos en la fase activa de RDP (Katsura *et al.*, 1998). Esto sugiere que HGF estimula o perpetúa la neovascularización en RDP. Por tanto, es plausible pensar que un antagonista de HGF sería una opción prometedora como tratamiento profiláctico o para mejorar la progresión de la RDP.

HARDING J W; *et al.* SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACT VIEWER AND ITINERARY, enero de 2009-20 de octubre de 2009, página 529.15, dan a conocer el desarrollo de análogos de angiotensina IV activos por vía oral

como fármacos antidemencia.

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

5 Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A, B y C. Efecto de Dihexa sobre el aprendizaje espacial en el laberinto de agua. A: 30 minutos antes de comenzar las pruebas, se les administró a las ratas escopolamina directamente en el cerebro por vía intracerebroventricular (ICV) y 10 minutos más tarde se les administró Dihexa ICV a 10 pmoles (dosis baja) o 100 pmoles (dosis alta). Se realizó esto diariamente antes del primer ensayo de entrenamiento. Hubo 5 ensayos al día durante 8 días. La demora hasta encontrar el pedestal se consideró una medida de aprendizaje y memoria. Las ratas que recibieron alta dosis de Dihexa pudieron superar completamente los déficits de escopolamina y no fueron diferentes de los controles. B. 30 minutos antes de comenzar las pruebas, se les administró a las ratas escopolamina directamente en el cerebro por vía intracerebroventricular (ICV) y 10 minutos más tarde se les administró Dihexa por vía 1,25 mg/kg/día (dosis baja) y 2 mg/kg/día (dosis alta). Se realizó esto diariamente antes del primer ensayo de entrenamiento. Hubo 5 ensayos al día durante 8 días. La demora hasta encontrar el pedestal se consideró una medida de aprendizaje y memoria. Las ratas que recibieron dosis alta de Dihexa pudieron superar completamente los déficits de escopolamina y no fueron diferentes de los controles. B: Se asignaron aleatoriamente ratas ancianas de sexo y edad mixtos (22-26 meses) a un grupo de control/no tratado o un grupo tratado con Dihexa (2 mg/kg/día). Las ratas no se examinaron previamente. Obsérvese que normalmente ~el 50% de las ratas ancianas muestran déficits, de ahí los errores de grupo grandes. El grupo de Dihexa tuvo un rendimiento significativamente mejor que los controles no tratados.

Figuras 2A y B. Dihexa y Nle¹-AngIV estimulan de manera dependiente de la dosis la espinogénesis. A) Dihexa y B) Nle¹-AngIV aumentan la densidad de espinas en neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina de una manera dependiente de la dosis. Se estimularon las neuronas con Dihexa o Nle¹-AngIV a lo largo de un periodo de 5 días en un amplio intervalo de concentraciones. Datos obtenidos de cultivos separados; los cultivos tenían 12 días en el momento de la fijación. Se contó a mano el número de espinas dendríticas en segmentos de dendritas de 50 μ m. ** = $p < 0,05$ y *** = $p < 0,001$; n = 50; media \pm EEM; ζ = significativamente diferente del control.

Figura 3A-E. Efectos dependientes del tiempo de neuronas tratadas con Nle¹-AngIV y Dihexa sobre la espinogénesis. Se trataron neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina con Dihexa o Nle¹-Ang IV 10⁻¹² M durante 5 días en cultivo o durante 30 minutos antes de la fijación en el día *in vitro* 12 (DIV12), promueven la espinogénesis. A) Imagen representativa del árbol dendrítico de una neurona del hipocampo tratada con vehículo 5 días. B) Imagen representativa de un árbol dendrítico de una neurona estimulada durante 5 días con Dihexa 10⁻¹² M. C) Imagen representativa del árbol dendrítico de una neurona estimulada con Nle¹-Ang IV 10⁻¹² M durante 5 días. D) Gráfico de barras que representa el número de espinas por longitud de dendrita de 50 μ m por condición de tratamiento tras un tratamiento *in vitro* de 5 días. *** P < 0,001; n = 200. E) Gráfico de barras que representa el número de espinas por longitud de dendrita de 50 μ m por condición de tratamiento tras un tratamiento de 30 minutos agudo. *** P < 0,001; n = 60. *Datos obtenidos de cultivos separados; los cultivos tenían 12 días en el momento de la fijación. Media \pm EEM mediante ANOVA de una vía y prueba a posteriori de Tukey.

Figura 4. Nle¹-AngIV y Dihexa aumentan la anchura de la cabeza de espina. Se midió la anchura de la cabeza de espina como una indicación de la resistencia sináptica. Las cabezas de espina con una mayor área de superficie pueden alojar más receptores de neurotransmisores y es más probable que formen sinapsis funcionales. El aumento inducido por el tratamiento con análogo de AngIV en la anchura de la cabeza de espina sugiere una neurotransmisión facilitada. *** = $p < 0,001$; media \pm EEM; n = 100.

Figura 5A-G. Patrones de neurotransmisores para neuronas estimuladas con Nle¹-AngIV y Dihexa. Se inmunotifieron neuronas tratadas con Dihexa y Nle¹-AngIV para detectar el marcador presináptico universal sinapsina y el marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1. Se midió el porcentaje de correlación entre las espinas postsinápticas (rojo) y los puntos presinápticos (verde) como una indicación de sinapsis funcionales. A) Gráfico de barras que representa un aumento en el número de espinas tras el tratamiento con vehículo, Nle¹-AngIV o Dihexa. Esto garantiza un fenotipo activo en las neuronas (** = $P < 0,001$; media \pm EEM; n = 25). B) Gráfico de barras que representa el porcentaje de correlación de espinas postsinápticas inducidas por el tratamiento con el marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1. Un alto porcentaje de correlación entre el marcador presináptico y las espinas postsinápticas sugiere que se forman conexiones funcionales ($P > 0,05$; media \pm EEM; n = 25). C) Gráfico de barras que representa un aumento en el número de espinas tras el tratamiento con vehículo, Nle¹-AngIV o Dihexa, que garantiza la salud de las neuronas (** = $P < 0,001$; media \pm EEM; n = 25). D) Gráfico de barras que representa el porcentaje de correlación de espinas postsinápticas inducidas por el tratamiento con el marcador presináptico general sinapsina. No se observaron diferencias significativas entre las neuronas estimuladas y neuronas tratadas con control de vehículo ($P > 0,05$; media \pm EEM; n = 25) lo que sugiere que la mayoría de la entrada presináptica es glutamatérgica. E) Gráfico de barras que representa un aumento en el número de espinas tras el tratamiento con vehículo, Nle¹-AngIV o Dihexa, que garantiza un fenotipo activo (** = $P < 0,001$; media \pm EEM; n = 25). F) Gráfico de barras que representa el porcentaje de correlación de espinas postsinápticas inducidas

por el tratamiento con el marcador postsináptico PSD-95. G) El gráfico de barras no muestra diferencias significativas ($P > 0,05$; media \pm EEM; $n = 25$) entre el marcador postsináptico PSD-95 y las espinas postsinápticas, lo que sugiere que las espinas recién formadas tienen un elemento postsináptico funcional.

5 Figuras 6A y B. Corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC) en neuronas del hipocampo disociadas. El tratamiento con Nle1-AngIV y Dihexa aumenta la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura (mEPSC). Se realizaron registros en neuronas del hipocampo disociadas tratadas con vehículo, Nle1-AngIV o Dihexa 10^{-12} M durante 5 días antes del registro. Las corrientes registradas eran ráfagas espontáneas de transmisión sináptica mediada por AMPA en ausencia de potenciales de acción portados en presencia de estricnina, picrotoxina y tetrodotoxina. A) Perfiles representativos de registros de mEPSC de neuronas del hipocampo tratadas con Nle1-AngIV o Dihexa. B) Gráfico de barras que representa el aumento en las frecuencias mediadas por AMPA de neuronas del hipocampo tratadas con Nle1-AngIV o Dihexa. Las frecuencias aumentadas indican que las espinas inducidas por Nle1-AngIV o Dihexa soportan sinapsis funcionales. *** = $p < 0,001$; \pm EEM; $n = 25$.

15 Figura 7A y B. Evaluación de la espinogénesis dependiente de Nle1-AngIV y Dihexa en neuronas del hipocampo CA1 de cultivos de cortes del hipocampo organotípicos de rata. Se encontró que Nle1-AngIV y Dihexa soportaban la espinogénesis en neuronas del hipocampo CA1. Cultivos de cortes del hipocampo organotípicos (grosos de $400 \mu\text{m}$), que representan un entorno más intacto, se transfectaron de manera biolística con la proteína fluorescente roja soluble Tomato. Se seleccionaron neuronas del hipocampo CA1 para su evaluación debido a su respuesta plástica conocida durante el aprendizaje. Se obtuvieron cortes de ratas en el día postnatal 5. A) Imágenes representativas de dendritas de neuronas CA1 de cortes del hipocampo transfectados con Tomato. Las imágenes representan un tratamiento de 2 días con Nle1-AngIV o Dihexa 10^{-12} M. B) Se observa espinogénesis inducida por el tratamiento en neuronas del hipocampo piramidales CA1. Los números de espinas medidos para cortes de control fueron de 7 por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$ frente a 11 espinas por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$ para neuronas tratadas con tanto Nle1-AngIV como Dihexa; media \pm EEM, $n = 17$; ** = $P < 0,01$ significación estadística mediante ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparaciones múltiples de Tukey; se repitieron los experimentos al menos tres veces.

30 Figura 8. HGF potencia la espinogénesis de manera dependiente de la dosis. Efecto de HGF sobre la espinogénesis en neuronas del hipocampo disociadas. Se transfectaron neuronas del hipocampo disociadas de ratas de 1 ó 2 días de edad con mRFP- β -actina y se estimularon con HGF durante 5 días. El tratamiento con HGF 2,5 ng/ml no afectó a los números de espinas basales y se consideró un subumbral. Dosis de 5, 10 y 20 ng/ml aumentaron significativamente el número de espinas por longitudes de dendrita de $50 \mu\text{m}$ en comparación con neuronas tratadas con control de vehículo. *** $P < 0,001$; media \pm EEM; $n = 50$ por grupo tratamiento.

35 Figuras 9A y B. Efectos de Dihexa y HGF sobre la espinogénesis en cultivos de cortes del hipocampo organotípicos. Se transfectaron de manera biolística cultivos de cortes del hipocampo con la proteína soluble roja Tomato el DIV3 y se estimularon con Dihexa o HGF el DIV5. Los cultivos de cortes del hipocampo organotípicos mantienen una trayectoria perforante más intacta y por tanto representan un entorno más intacto. A) Imágenes representativas de neuronas CA1, el tipo de neurona en el hipocampo que presenta plasticidad sináptica asociada al aprendizaje. Se estimularon cortes del hipocampo con vehículo, Dihexa 10^{-12} M o HGF 10 ng/ml durante 2 días. B) Gráfico de barras que representa el número de espinas por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$ para cada grupo de tratamiento. Dihexa y HGF aumentan significativamente el número de espinas en neuronas del hipocampo CA en comparación con neuronas tratadas con control. *** = $P < 0,001$; media \pm EEM; $n = 20$ para neuronas estimuladas con control, 26 para neuronas estimuladas con Dihexa y 38 para neuronas estimuladas con HGF.

50 Figuras 10A-D. Efecto del tratamiento con HGF sobre la sinaptogénesis en neuronas del hipocampo disociadas. Tratamiento con HGF apoya la formación de sinapsis funcionales tal como se indica por una alta correlación entre espinas postsinápticas (rojo) y marcadores de zonas activas presinápticas (verde). A) Imágenes representativas de neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina el DIV6 y tratadas con 10 ng/ml de HGF o vehículo durante 5 días *in vitro*. Se tiñeron las neuronas para detectar el marcador presináptico general sinapsina y el marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1. B) Gráfico de barras que representa un fenotipo activo tal como se indica mediante un aumento significativo en el número de espinas por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$ tras estimulación con HGF (10 ng/ml). Número medio de espinas = 33 frente al control = 23; *** = $P < 0,001$ mediante ANOVA de una vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey; media \pm EEM; $n = 25$). C) Porcentaje de correlación de espinas postsinápticas enriquecidas en actina (rojo) yuxtapuestas al marcador presináptico universal sinapsina (verde). Un alto porcentaje de correlación sugiere que se forman sinapsis funcionales. D) Porcentaje de correlación de espinas enriquecidas en actina (rojo) yuxtapuestas al marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1 (verde). Una correlación mayor del 95% sugiere que muchas de estas entradas son glutamatérgicas.

60 Figura 11. Efecto de Dihexa y el tratamiento con HGF sobre la frecuencia de mEPSC en neuronas del hipocampo disociadas. Se estimularon neuronas del hipocampo disociadas transfectadas con mRFP- β -actina con Dihexa 10^{-12} M o 10 ng/ml durante 5 días antes de registrar las mEPSC. Se trataron las neuronas con tetrodotoxina, picrotoxina y estricnina para suprimir el potencial de acción, la inhibición dependiente de GABA y la inhibición dependiente de glicina. El tratamiento con ambos agonistas potenció significativamente las corrientes mediadas por

AMPA en comparación con neuronas tratadas con vehículo (** P < 0,002; \pm EEM mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Newman-Keuls; n = 9, 9 y 11 respectivamente).

5 Figuras 12A y B. Efecto de dosis máximas y subumbral de análogos de angiotensina IV y HGF sobre la espinogénesis. A) Niveles subumbral de HGF, Dihexa o Nle1-AngIV no afectan a los números de espinas basales. Niveles subumbral combinados de Dihexa (10^{-13} M) y HGF (2,5 ng/ml) copian fenotípicamente los efectos de Dihexa a su dosis biológicamente eficaz sola; # = 10^{-13} M y \$ = 2,5 ng/ml. B) Una dosis subumbral del compuesto original Nle1-Ang IV (10^{-13} M) tampoco afecta a los niveles de espinas basales. Niveles subumbral combinados de Dihexa (10^{-13} M) y HGF (2,5 ng/ml) copian fenotípicamente los efectos de Nle1-AngIV a su dosis biológicamente eficaz sola; # = 10^{-13} M y \$ = 2,5 ng/ml. La capacidad de los agonistas combinados a dosis subumbral para generar respuestas máximas sugiere una coincidencia de rutas de receptores. *** P < 0,001; media \pm EEM; n=50.

15 Figura 13A-D. El efecto del antagonista de HGF Hinge novedoso sobre la espinogénesis mediada por HGF y ligando de angiotensina IV. A) Se evaluaron los efectos del antagonista de HGF Hinge (10^{-12} M) sobre la espinogénesis. Hinge no afecta a la espinogénesis en neuronas a lo largo de un amplio intervalo de dosis; se incluyó Dihexa para garantizar que las neuronas eran sensibles al tratamiento. B) Hinge inhibe la espinogénesis inducida por HGF. C) Hinge inhibe la espinogénesis inducida por Nle1-AngIV. D) Hinge inhibe la espinogénesis inducida por Dihexa. # = 10^{-12} M y \$ = 10 ng/ml. Los datos anteriores indican además que las acciones de Nle1-AngIV y Dihexa están mediadas por el sistema de HGF/c-Met. *** P < 0,001; media \pm EEM; n = 50.

20 Figura 14A-D. Efecto del antagonista de HGF Hinge sobre la potenciación mediada por HGF y Dihexa de mEPSC en neuronas del hipocampo disociadas. Se trataron neuronas del hipocampo disociadas con Hinge (10^{-12} M), HGF, Dihexa (10^{-12} M) o HGF (10 ng/ml) durante 5 días, tiempo tras el cual se registraron las mEPSC en ausencia de potenciales de acción. A) Perfiles representativos de una neurona tratada con Hinge. B) Perfil representativo de una neurona tratada con vehículo. C) HGF aumenta significativamente las frecuencias mediadas por AMPA en comparación con neuronas tratadas con control. Este efecto se atenúa por Hinge mientras que Hinge solo no tiene efecto. D) Las frecuencias mediadas por AMPA espontáneas aumentan significativamente tras el tratamiento con Dihexa y se reducen significativamente tras el tratamiento previo con Hinge, que solo no tiene efecto sobre las frecuencias de línea base. * P < 0,001; media \pm EEM mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Newman-Keuls.

35 Figura 15A-B. Distribución de proteína c-Met en el cerebro de rata adulta. Se obtuvieron regiones cerebrales macroscópicas de ratas Sprague-Dawley adultas y se congelaron completamente en nitrógeno líquido. Se homogeneizaron las muestras, se separaron mediante electroforesis y se sometieron a inmunotransferencia para determinar la proteína c-Met y actina. A) El gráfico de barras representa la cantidad de c-Met (unidades no especificadas) en distintas regiones cerebrales de importancia para la cognición. Las muestras de cerebro eran en comparación con hígado en donde se produce HGF. B) Una inmunotransferencia de tipo Western representativa de las muestras estudiadas con sonda frente a proteína c-Met (las bandas están a 145 kDa) y sirviendo la actina como control de carga. Se cargaron cantidades iguales de proteína en cada carril basándose en las determinaciones de proteína por BCA.

45 Figura 16. Estimulación de la fosforilación de c-Met por HGF y Dihexa en cortes de hipocampo de rata. Para someter a prueba si Dihexa podría activar el receptor c-Met en el cerebro de rata adulta, se estimularon completamente cortes del hipocampo durante 30 minutos con HGF, Dihexa o vehículo (aCSF). Se midió la activación del receptor mediante fosforilación del receptor c-Met mediante inmunotransferencia de tipo Western. Dosis de saturación de HGF (100 ng/ml) y Dihexa (10^{-10} M) aumentan eficazmente la fosforilación de c-Met en cortes del hipocampo adultos estimulados completamente en comparación con cortes tratados con vehículo. Dosis subumbral de HGF (50 ng/ml) y Dihexa (10^{-12} M) no aumentaron significativamente la fosforilación del receptor c-Met en comparación con el control. Sin embargo, dosis subumbral combinadas de HGF y Dihexa copiaron fenotípicamente la dosis de saturación de HGF y Dihexa.

55 Figura 17. Efecto del mimético de HGF, Dihexa, sobre la activación de c-Met. Se trataron células HEK 293 con HGF +/- Dihexa a diversas dosis, se incubaron a 37°C durante 30 minutos y luego se analizaron para detectar c-Met fosforilado (activado) mediante inmunotransferencia. Los resultados demostraron claramente la capacidad de HGF y Dihexa para funcionar de manera sinérgica activando c-Met.

60 Figura 18. Efecto del mimético de HGF, Dihexa, sobre la dispersión de células dependiente de HGF. Se evaluó la dispersión de células en células MDCK. Se hicieron crecer las células hasta la confluencia sobre cubreobjetos, que entonces se transfirieron a una placa limpia. Tras el tratamiento durante cuatro días, se cuantificó el número de células que se habían retirado por dispersión del cubreobjetos. HEX=Dihexa a 10^{-10} M.

65 Figura 19. Verificación de la inactivación del receptor c-Met. Se confirmó la inactivación del receptor transfectando células HEK con mRFP- β -actina (no transfectada), un producto génico de cMet etiquetado con 6Myc que servía para verificar la presencia de proteína, secuencias de ARNhp (c-Met) (sólo se empleó sh1 para el experimento de inactivación) y se ambos ARNhp combinados. Se cultivaron las células transfectadas durante 24 horas adicionales,

luego se lisaron con tampón RIPA y se prepararon para la electroforesis en gel. Se estudiaron con sonda las muestras frente a Myc mediante inmunotransferencia de tipo Western. Las células no transfectadas que servían como control negativo no mostraban señal, el producto génico de cMet etiquetado con 6-Myc era el control positivo y tenía una señal fuerte. Las secuencias de tanto shMet1 como shMet2 atenuaron considerablemente la señal y combinadas no tenían una señal, lo que indica inactivación eficaz del receptor.

Figura 20. Efecto de la inactivación de c-Met sobre la espinogénesis usando un ARNhp. La imagen muestra una inmunotransferencia de tipo Western estudiada con sonda para detectar Myc. Se estimularon neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina sola o con shMet para desactivar el receptor c-Met con HGF (10 ng/ml), Dihexa (10^{-12} M) o Nle1-AngIV (10^{-12} M) durante 48 horas. Neuronas transfectadas con mRFP- β -actina y estimuladas con HGF, Dihexa o Nle1-AngIV aumentaron significativamente la espinogénesis (* $P < 0,05$; media \pm EEM; $n = 100$). Las neuronas transfectadas con mRFP- β -actina y shMet no respondieron a la estimulación con tratamiento con HGF, Dihexa o Nle1-AngIV, confirmando que HGF y c-Met son la diana ($P > 0,05$; media \pm EEM; $n = 100$).

Figura 21. HGF y c-Met tienen una función en el aprendizaje espacial y la memoria. Se sometió a prueba en ratas la demora hasta ubicar un pedestal sumergido en la tarea de laberinto de agua de Morris de aprendizaje espacial y memoria para determinar los efectos de HGF/c-Met sobre el aprendizaje y la memoria. Las ratas recibieron inyecciones i.c.v. de fármacos amnésicos o agonistas de receptor c-Met/HGF. Las ratas tratadas con la escopolamina \rightarrow escopolamina no pueden aprender la tarea tal como se mide mediante la demora en escapar. Las demoras de grupo para ratas tratadas con aCSF \rightarrow aCSF fueron significativamente más cortas que las del grupo tratado con escopolamina en el día uno de entrenamiento. Las ratas tratadas con escopolamina \rightarrow Dihexa y las ratas tratadas con Hinge \rightarrow Hinge, aunque no eran significativamente diferentes del grupo tratado con escopolamina en el día uno de entrenamiento, muestran una agilización rápida de la tarea. El grupo que recibió escopolamina + Hinge \rightarrow Dihexa no era significativamente diferente de los animales tratados con escopolamina y tiene largas demoras en escapar. Demoras de grupo hasta ubicar un pedestal sumergido en la tarea de laberinto de agua de Morris de aprendizaje espacial y memoria. Hinge solo no tiene ningún efecto sobre el aprendizaje; sin embargo Hinge además de escopolamina impide la agilización de la tarea.

Figura 22. Estabilidad de Norleual en sangre de rata en comparación con D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. Se incubaron \blacktriangle - Norleual y \blacksquare -D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ en sangre de rata heparinizada a 37°C; la figura muestra el porcentaje de recuperación a lo largo del tiempo (media \pm DE). El $t_{1/2}$ de estabilidad calculado basándose en una descomposición exponencial de una única fase para Norleual fue de 4,6 min y para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ el $t_{1/2}$ de estabilidad fue de 79,97 min.

Figura 23. Unión de análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ a HGF. Curvas representativas que ilustran la competencia de análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ por la unión de ³H-Hinge a HGF. Se incubaron los análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ y ³H-Hinge ($13,3 \times 10^{-12}$ M) con 1,25 ng de HGF durante 40 min a 37°C en 0,25 ml de tampón. Se eluyó Hinge unido a HGF de las columnas de Bio-Gel P6 tras la adición de diferentes concentraciones de los análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (10^{-13} - 10^{-7} M). Se cuantificó la radioactividad de las disoluciones eluidas usando recuento de centelleo. Estos datos demuestran que los análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ presentan una gama de afinidades por HGF. Se determinó que las K_d para los análogos de Met, Trp, Cys y Tyr eran respectivamente: $1,375 \times 10^{07}$ M, $3,372 \times 10^{09}$ M, $1,330 \times 10^{10}$ M y $2,426 \times 10^{10}$ M; N=9. \blacktriangle - D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, \bullet - D-Nle-Met-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, \blacksquare - D-Nle-Trp-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, \blacktriangledown - D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂.

Figura 24. Inhibición de la dimerización de HGF por análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. HGF se dimeriza espontáneamente cuando se incuba en PBS en presencia de heparina. Se incubó HGF sin (control) o con diversos candidatos a fármaco a 10^{-10} M. Estos incluyen los derivados de D-Nle-X-Ile-amida del ácido (6)-amino-hexanoico, una familia de análogos basados en AngIV, en donde X= Tyr, Cys, Trp y Met. Tras 30 minutos de incubación, se reticularon las muestras con BS3, se separaron mediante electroforesis en gel y se tiñeron con plata. Se cuantificó la densidad de bandas y se usó para determinar el nivel de dimerización de HGF en cada grupo. Los grupos de tratamiento (Tyr, Cys, Trp) eran estadísticamente diferentes del grupo tratado con HGF ($P < 0,05$; N=8). (A) Gel representativo. (B) Datos agrupados y cuantificados.

Figura 25. Inhibición de la fosforilación de Met por análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. Se trataron células HEK293 durante 10 min con análogos de HGF +/- Nle-X-Ile-amida del ácido (6)-amino-hexanoico a las concentraciones indicadas. Se sometieron a inmunotransferencia lisados de células HEK293 con anticuerpos anti-fosfo-Met y anti-Met. Las diferencias en los valores medios para la fosforilación de Met entre los grupos de tratamiento indicados (análogos de Nle-X-Ile-amida del ácido (6)-amino-hexanoico) en comparación con el grupo tratado con HGF eran mayores de los que se esperaría por casualidad ($P < 0,05$; N=6). El grupo de Met no era diferente del grupo de HGF ($P > 0,05$; N=6).

Figura 26. Efectos de análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ sobre la proliferación de células MDCK. Se trataron células MDCK con un vehículo de PBS (control negativo), HGF o HGF en combinación con análogos de Nle-

un aminoácido (D o L) tal como, por ejemplo, lisina, arginina, norvalina, ornitina o residuos de aminoácido de S-bencilcisteína;

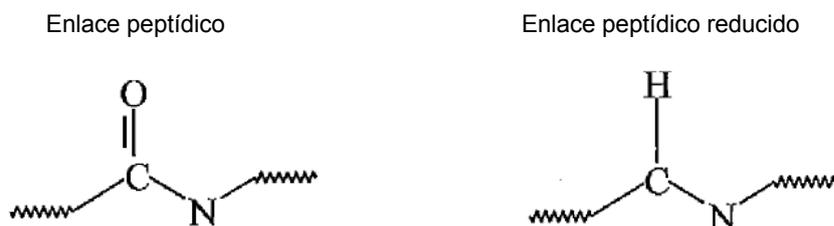
R₂ es un aminoácido (D o L), tal como, por ejemplo, tirosina, cisteína, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, triptófano, lisina, homocisteína, homoserina, homofenilalanina;

R₃ es un residuo de aminoácido de D o L isoleucina, leucina o valina; y

n oscila entre 3-6;

y en la que los enlaces covalentes 1, 2 y 3 son o bien enlaces peptídicos (por ejemplo -CO-NH-) o enlaces peptídicos reducidos (CH₂-NH₂).

A continuación se representan un enlace peptídico y un enlace peptídico reducido a modo de ejemplo:



Se han sintetizado compuestos dentro de la fórmula estructural general y se han analizado según los siguientes procedimientos.

Métodos de síntesis convencionales:

Se sintetizaron todos los compuestos mediante métodos en fase sólida usando un sintetizador peptídico AAPPTC Endeavor 90 usando aminoácidos protegidos con Fmoc. Se sintetizaron todas las amidas peptídicas sobre una resina Rink. Se hinchó previamente la resina en dimetilformamida (DMF) y se desprotegió con piperidina al 20%/DMF durante 30 minutos. Entonces se eliminó la piperidina/DMF mediante filtración. Tras la desprotección, se añadió el aminoácido protegido con N- α Fmoc al recipiente de reacción como un polvo seco (3 equivalentes). Entonces se llenó el recipiente con 2/3 del total con DMF y diisopropiletilamina seca (DIPEA; 3,5-4 equivalentes). A continuación, se añadió N-óxido de hexafluorofosfato de N-[(1H-benzotriazol-1-il)(dimetilamino)metileno]-N-metilmetanaminio (HBTU; 2,9 equivalentes) y se mezcló la suspensión durante 30 minutos. Entonces se retiró la disolución mediante filtración. Entonces se lavó la resina dos veces con DMF, dos veces con metanol, dos veces con diclorometano y finalmente dos veces más con DMF. Se retiraron las disoluciones mediante filtración tras cada lavado. Se monitorizó la eficacia de acoplamiento usando una prueba Kaiser para aminas libres. Si la prueba era positiva el aminoácido volvía a acoplarse a la resina o a la cadena de péptido en crecimiento. Si la prueba indicaba una buena unión, se lavó una vez más la resina con DMF, se desprotegió con piperidina al 20%/ DMF durante 30 minutos tal como se indicó anteriormente y se lavó de nuevo con DMF. Entonces se realizó el acoplamiento tal como se indicó anteriormente.

Acilación del extremo N-terminal del péptido:

Tras la desprotección final, se incubó la resina de péptido con el 20% del anhídrido de acilo apropiado en DMF y DIPEA (1,5 equivalentes) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó ahora la resina dos veces con DMF, dos veces con metanol, dos veces con diclorometano, y finalmente dos veces más con DMF. Se retiró la disolución mediante filtración y se realizó una prueba Kaiser para verificar la finalización de la ocupación de extremos. Si se detectó amina libre, se repitió el procedimiento de ocupación de extremos.

Inserción de un enlace peptídico reducido N-terminal:

Tras la desprotección, se añadió hexanal (3 equivalentes) DMF a la resina y se permitió que se mezclara durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 3 equivalentes de cianoborohidruro de sodio y se mezcló la suspensión durante 2 horas adicionales. Tras realizarse el procedimiento de lavado convencional (véase anteriormente), se usó de nuevo la prueba Kaiser para verificar la finalización de la reacción. Si el acoplamiento se consideraba incompleto, se repitió el procedimiento.

Escisión del péptido de la resina Rink:

Tras desprotegerse el último aminoácido y lavarse se transfirió la resina a un embudo de vidrio sinterizado (porosidad de 4) y se eliminó la DMF mediante vacío. Entonces se suspendió la resina semiseca en ácido

trifluoroacético al 20% (TFA) con triisopropil-silano al 2,5% como eliminador, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se filtró. Se lavó la resina tres veces con DMF adicional y se filtró. Se añadieron diez volúmenes de dietil éter enfriado con hielo a los filtrados combinados y se permitió que la mezcla se endureciera a 4°C durante la noche. Se recuperó el péptido precipitado mediante filtración y se lavó tres veces con éter enfriado con hielo. Para péptidos muy hidrófobos, volvieron a extraerse los lavados con éter combinados con DMF, se permitió que precipitara el péptido y se filtraron para recuperar péptido adicional.

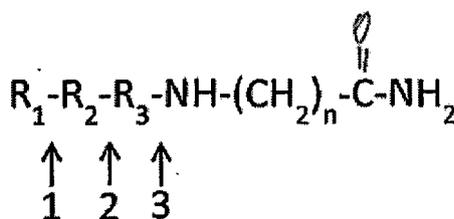
Purificación de péptidos y análisis:

Se purificaron en primer lugar péptidos en bruto mediante HPLC de fase inversa usando una columna C18 usando elución en gradiente. El gradiente típico era del 10% al 40% de componente B a lo largo de 30 minutos a una velocidad de flujo de 1 ml/min a 37°C en donde el componente A era fosfato de trietilamina 80 mM, pH 3,0 y el componente B era acetonitrilo (ACN). En todos los casos sólo se detectó y recogió un único pico con absorción a 215 nm. Se liofilizó el compuesto recogido y se redisolvió en metanol al 20% y se inyectó sobre una segunda columna C18. El sistema de HPLC/EM usado era de Shimadzu (Kyoto, Japón), que consistía en un módulo de bus de comunicaciones CBM-20A, bombas LC-20AD, inyector automático SIL-20AC, detector de red de diodos SPD-M20A y espectrómetro de masas LCMS-2010EV. Se lograron la recogida e integración de datos usando el software de soluciones de CLEM de Shimadzu. La columna analítica usada era una Econosphere C18 (100 mm x 2,1 mm) de Grace Davison Discovery Science (Deerfield, IL, EE.UU.). La fase móvil consistía en metanol de calidad para HPLC y agua con ácido trifluoroacético al 0,1%. Se llevó a cabo la separación usando un método no isocrático (el 20% - 50% de metanol a lo largo de 30 min) a 37°C y una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Para el análisis de EM, se usó un modo de ión positivo (Scan) y se analizaron los picos a la m/z anticipada. El análisis de pureza de pico típico reveló un índice de pureza de pico de >0,95. El racionamiento de la longitud de onda con el detector de red de diodos confirmó adicionalmente la pureza de pico.

La tabla 1 a continuación presenta un listado de compuestos en la familia 1, referida a miméticos, y las familias 2-5, referidas a antagonistas, todos los cuales se han sintetizado y analizado según los procedimientos descritos anteriormente.

TABLA 1

Estructura general de la familia 1 (miméticos) y las familias 2-5 (antagonistas)



Las flechas 1-3 indican pb = enlace peptídico; ψ = enlace de péptido reducido (CH₂-NH₂) n=5

Familia n.º	R1(grupo N-acilo)	R2	R3	1
1	hexanoílo	Tyr	Ile	pb
	heptanoílo	Tyr	Ile	pb
	pentanoílo	Tyr	Ile	pb
	butanoílo	Tyr	Ile	pb
	propanoílo	Tyr	Ile	pb
	acetanoílo	Tyr	Ile	pb
	benzoílo	Tyr	Ile	pb
	hexanoílo	Tyr	Ile	ψ
Familia n.º	R1	R2	R3	
2	D-Nle	Tyr	Ile	
	D-Nle	Phe	Ile	
	D-Nle	Asp	Ile	
	D-Nle	Arg	Ile	
	D-Nle	Ile	Ile	
	D-Nle	Ser	Ile	
	D-Nle	His	Ile	
	D-Nle	Gly	Ile	
	D-Nle	Cys	Ile	

	D-Nle	Met	Ile
	D-Nle	Trp	Ile
	D-Nle	Lys	Ile
	D-Nle	Val	Ile
	D-Nle	Gly	D-Ile
	R1	R2	R3
3	D-Nle	D-Tyr	Ile
	D-Nle	D-Phe	Ile
	D-Nle	D-Asp	Ile
	D-Nle	D-Arg	Ile
	D-Nle	D-Ile	Ile
	D-Nle	D-Ser	Ile
	D-Nle	D-His	Ile
	D-Nle	D-Gly	Ile
	D-Nle	D-Cys	Ile
	D-Nle	D-Met	Ile
	D-Nle	D-Trp	Ile
	D-Nle	D-Lys	Ile
	R1	R2	R3
4	Tyr	Tyr	Ile
	Phe	Tyr	Ile
	Asp	Tyr	Ile
	Arg	Tyr	Ile
	Ile	Tyr	Ile
	Ser	Tyr	Ile
	His	Tyr	Ile
	Gly	Tyr	Ile
	Cys	Tyr	Ile
	Met	Tyr	Ile
	Typ	Tyr	Ile
	Lys	Tyr	Ile
	R1	R2	R3
5	D-Tyr	Tyr	Ile
	D-Phe	Tyr	Ile
	D-Asp	Tyr	Ile
	D-Arg	Tyr	Ile
	D-Ile	Tyr	Ile
	D-Ser	Tyr	Ile
	D-His	Tyr	Ile
	D-Cys	Tyr	Ile
	D-Met	Tyr	Ile
	D-Typ	Tyr	Ile
	D-Lys	Tyr	Ile

Con referencia a la tabla 1, aunque varios compuestos que se han sintetizado incluyen tirosina e isoleucina en R₂ y R₃, respectivamente, un amplio intervalo de aminoácido y otros residuos podría usarse para los miméticos o agonistas (familia 1 y familias 2-5, respectivamente) en la práctica de realizaciones de la invención en estas otras posiciones incluyendo, sin limitación, tirosina, cisteína, metionina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, triptófano, lisina, leucina, valina, homocisteína, homoserina y homofenilalanina. Además, aunque los miméticos incluyen determinados grupos N-acilo tal como se especifica en la tabla 1 (familia 1), en la práctica de las diversas realizaciones de la invención pueden usarse otros grupos N-acilo o fenilo sustituido o no sustituido en R₁. Además, aunque varios de los agonistas en la tabla 1 (familias 2-5) tienen norleucina en R₁, o un residuo de aminoácido, en la práctica de diversas realizaciones de esta invención pueden usarse varios residuos de aminoácido (D o L) en el residuo R₁, incluyendo sin limitación, los residuos de aminoácido tirosina, fenilalanina, ácido aspártico, arginina, isoleucina, serina, histidina, glicina, cisteína, metionina, triptófano, norvalina, ornitina, S-bencilcisteína. Finalmente, aunque todos los compuestos sintetizados y sometidos a prueba en la tabla 1 incluían repeticiones de 5 metilo, las repeticiones de metilo (n) podrían oscilar entre 3-6 dentro de la práctica de algunas de las realizaciones de la presente invención.

Los compuestos dentro de la tabla 1 se han evaluado también tal como sigue:

Evaluación de la actividad del mimético de HGF:

Se evaluó normalmente la actividad del mimético de HGF mediante uno o ambos dos métodos: aumento de la fosforilación dependiente de HGF de c-Met en células HEK293, o 2) aumento de la dispersión de células dependiente de HGF en células MDCK. Se sometieron a prueba todos los compuestos en la familia usando el ensayo de fosforilación de c-Met. Se evaluaron adicionalmente N-hexanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida y se encontró que tiene una dispersión de células MDCK dependiente de HGF espectacularmente aumentada. La tabla 2 presenta un resumen de los resultados.

TABLA 2

Compuesto (10^{-12} M)	Actividad del mimético de HGF
N-heptanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	++++
N-hexanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	++++
N-pentanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	++++
N-butanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	+++
N-propananoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	++
N-acetanoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	+
N-benzoil-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	+
N-hexanoil- ψ ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$)-Tyr-Ile-(6)aminohexamida	+++

Cultivo celular. Se hicieron crecer células de riñón embrionario humano 293 (HEK293), células de riñón canino Madin Darby (MDCK) y células de melanoma murino B16F10 en DMEM, suero bobino fetal (FBS) al 10%. Se hicieron crecer las células hasta el 90-100% de confluencia antes de su uso. Para la mayoría pero no todos los estudios se privaron de suero las células HEK y MDCK durante 24 horas antes del inicio del tratamiento con el fármaco.

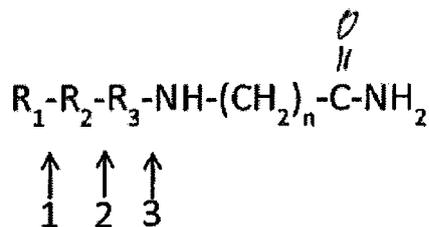
Inmunotransferencia de tipo Western. Se sembraron células HEK293 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se hicieron crecer hasta el 95% de confluencia en DMEM que contenía FBS al 10%. Se privaron de suero las células durante 24 horas antes del tratamiento para reducir los niveles basales de fosfo-Met. Tras la privación de suero, se prepararon cócteles compuestos por vehículo y HGF (2,5 ng/ml) con/sin el compuesto de prueba y se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadió el cóctel a las células durante 10 minutos para estimular el receptor Met y proteínas posteriores. Se recogieron las células usando tampón de lisis RIPA (Upstate) fortalecido con cócteles de inhibidores de fosfatasa 1 y 2 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Se clarificó el lisado mediante centrifugación a 15.000 g durante 15 minutos, se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo de proteína total BCA, y entonces se diluyeron volúmenes apropiados de los lisados con tampón Laemmli reductor 2x y se calentaron durante diez minutos a 95°C. Se resolvieron muestras que contenían cantidades idénticas de proteína usando SDS-PAGE (Criterion, BioRad Laboratories), se transfirieron a nitrocelulosa y se bloquearon en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo frente a fosfo-Met al tampón de bloqueo a una concentración final de 1:1000 y se incubó a 4°C durante la noche con agitación suave. Entonces se lavaron las membranas varias veces con agua y TBS (PBS, Tween-20 al 0,05%), se añadió una dilución 1:5000 de antisuero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa del rábano, y se incubaron adicionalmente las membranas durante una hora a temperatura ambiente. Se visualizaron las proteínas usando el sistema de sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, Fenton, MO) y se determinaron los pesos moleculares mediante comparación con marcadores de peso molecular de proteína (BenchMark, Invitrogen; y Kaleidoscope, BioRad). Se digitalizaron las imágenes y se analizaron usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad UVP.

Ensayo de dispersión. Se hicieron crecer células MDCK hasta el 100% de confluencia sobre los cubreobjetos en placas de seis pocillos y se lavaron dos veces con PBS. Entonces se transfirieron de manera aséptica los cubreobjetos confluentes a placas de seis pocillos nuevas que contenían 900 μl de DMEM libre de suero. Se añadieron Norleual, péptido Hinge y/o HGF (2,5 ng/ml) a pocillos apropiados. Los pocillos de control recibieron vehículo de PBS. Se incubaron las placas a 37°C con el 5% de CO_2 durante 48 horas. Se retiró el medio y se fijaron las células con metanol. Se tiñeron las células con Diff-Quik Wright-Giemsa (Dade-Behring, Newark, DE) y se tomaron imágenes digitales. Se retiraron los cubreobjetos con pinzas y se capturaron más imágenes digitales. Se logró la cuantificación de píxeles de las imágenes usando Image J y se realizó el análisis estadístico usando Prism 5 e InStat v.3.05.

Para la fórmula estructural general presentada anteriormente, y reproducida a continuación para facilidad de referencia, hay varios compuestos diferentes que pueden prepararse según los procedimientos de síntesis descritos anteriormente y usados para las terapias descritas a continuación. La tabla 3 identifica diversas familias a modo de ejemplo con diversos compuestos enumerados en esas familias (identificados por sustitución de restos dentro de la fórmula general).

TABLA 3

Estructura general:



5 Las flechas 1-3 pueden ser pb = enlace peptídico; ψ = enlace peptídico reducido ($\text{CH}_2\text{-NH}_2$)

Familia n.º	R1	R2	R3	n	1	2	3
1	hexanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	heptanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	pentanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	butanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	propanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	acetanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	isopropanol	Y		5	pb	pb	pb
	terc-butanoílo	Y		5	pb	pb	pb
	isobutanoílo	Y		5	pb	pb	pb
benzoílo	Y		5	pb	pb	pb	
2	hexanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	heptanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	pentanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	butanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	propanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	acetanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	isopropanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	terc-butanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
	isobutanoílo	Y		5	ψ	pb	pb
benzoílo	Y		5	ψ	pb	pb	
3	hexanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	heptanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	pentanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	butanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	propanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	acetanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	isopropanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	terc-butanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
	isobutanoílo	Y		5	ψ	pb	ψ
benzoílo	Y		5	ψ	pb	ψ	
4	hexanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	heptanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	pentanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	butanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	propanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	acetanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	isopropanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	terc-butanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
	isobutanoílo	Y		5	pb	pb	ψ
benzoílo	Y		5	pb	pb	ψ	
5	hexanoílo	F		5	pb	pb	pb
	heptanoílo	F		5	pb	pb	pb
	pentanoílo	F		5	pb	pb	pb
	butanoílo	F		5	pb	pb	pb
	propanoílo	F		5	pb	pb	pb

ES 2 622 385 T3

	acetanoílo	F	I	5	pb	pb	pb
	isopropanoílo	F	I	5	pb	pb	pb
	terc-butanoílo	F	I	5	pb	pb	pb
	isobutanoílo	F	I	5	pb	pb	pb
	benzoílo	F	I	5	pb	pb	pb
6	hexanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	heptanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	pentanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	butanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	propanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	acetanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	isopropanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	terc-butanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	isobutanoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
	benzoílo	F	I	5	ψ	pb	pb
7	hexanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	heptanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	pentanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	butanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	propanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	acetanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	isopropanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	terc-butanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	isobutanoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
	benzoílo	F	I	5	ψ	pb	ψ
8	hexanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	heptanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	pentanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	butanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	propanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	acetanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	isopropanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	terc-butanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	isobutanoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
	benzoílo	F	I	5	pb	pb	ψ
9	hexanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	heptanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	pentanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	butanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	propanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	acetanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	isopropanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	terc-butanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	isobutanoílo	C	I	5	pb	pb	pb
	benzoílo	C	I	5	pb	pb	pb
10	hexanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	heptanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	pentanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	butanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	propanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	acetanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	isopropanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	terc-butanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	isobutanoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
	benzoílo	C	I	5	ψ	pb	pb
11	hexanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	heptanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ

ES 2 622 385 T3

	pentanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	butanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	propanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	acetanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	isopropanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	terc-butanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	isobutanoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
	Benzoílo	C	I	5	ψ	pb	ψ
12	hexanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	heptanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	pentanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	butanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	propanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	acetanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	isopropanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	terc-butanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	isobutanoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	benzoílo	C	I	5	pb	pb	ψ
	13-16 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=S						
5	17-20 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=T						
	21-24 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=D						
	25-28 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=E						
10	29-32 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=Y, R3=V						
	33-36 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=F, R3=V						
15	37-40 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=C, R3=V						
	41-44 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=S, R3=V						
	45-48 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=T, R3=V						
20	49-52 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=D, R3=V						
	53-56 Mismo patrón que las familias 1-4 con R2=E, R3=V						
25	57-85 Mismo patrón que las familias 29-56 con R3=L						
	86-170 Mismo patrón que las familias 1-85 con n=3						
	171-256 Mismo patrón que las familias 1-85 con n=4						
30	257-341 Mismo patrón que las familias 1-85 con n=6						
	R ₁	R ₂	R ₃	n	1	2	3
342	D-norleucina	Y	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	F	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	C	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	S	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	T	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	D	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	E	I	5	pb	pb	pb
	D-norleucina	G	I	5	pb	pb	pb
343	D-norleucina	Y	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	F	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	C	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	S	I	5	pb	pb	ψ

	D-norleucina	T	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	D	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	E	I	5	pb	pb	ψ
	D-norleucina	G	I	5	pb	pb	ψ
344	D-norleucina	Y	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	F	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	C	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	S	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	T	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	D	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	E	I	5	ψ	pb	pb
	D-norleucina	G	I	5	ψ	pb	pb
345	D-norleucina	Y	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	F	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	C	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	S	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	T	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	D	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	E	I	5	ψ	pb	ψ
	D-norleucina	G	I	5	ψ	pb	ψ

346-349 Mismo patrón que las familias 342-345 con R3=V

350-353 Mismo patrón que las familias 342-345 con R3=L

5

354-365 Mismo patrón que las familias 342-353 con R1=D norvalina

366-377 Mismo patrón que las familias 342-345 con R3=D-lisina

10

378-389 Mismo patrón que las familias 342-345 con R3=D-arginina

390-401 Mismo patrón que las familias 342-345 con R3=D S-metilcisteína

15

402-457 Mismo patrón que las familias 342-401 con n=3

458-513 Mismo patrón que las familias 342-401 con n=4

514-569 Mismo patrón que las familias 342-401 con n=6

20

Alternativamente, los análogos o miméticos de factores de crecimiento de la presente divulgación también pueden representarse como compuestos por cuatro elementos unidos mediante enlaces peptídicos covalentes o enlaces peptídicos reducidos, tal como sigue:

I-II-III-IV

25

en donde

I = un ácido tal como ácido heptanoico, hexanoico, pentanoico, butírico, propiónico, acético, benzoico o benzoico sustituido, e isoformas de los mismos; o D o L norleucina, lisina, arginina, norvalina, ornitina o S-bencilcisteína

30

II = un residuo de aminoácido de D o L cisteína, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, tirosina, glicina, homocisteína, homoserina u homofenilalanina;

35

III = un residuo de aminoácido de D o L isoleucina, leucina o valina; y

IV = ácido amino-hexanoico, amino-pentanoico o aminobutírico; en donde los elementos I, II, III y IV están unidos mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos reducidos.

40

En una realización de la divulgación el análogo es: ácido hexanoico-tirosina-isoleucina-amida del ácido (6)-amino-hexanoico. Usando la fórmula I como fórmula genérica, para este análogo particular, R1= hexanoílo; R2 es Tyr; R3 es Ile; y n = 5. Alternativamente, usando la nomenclatura I - II - III - IV, en esta realización, I = ácido hexanoico, II = Tyr; III = Ile; y IV = amida del ácido hexanoico.

Realizaciones de la invención implican proporcionar uno o más miméticos de HGF a un sujeto que lo necesita. Sujetos o pacientes a modo de ejemplo que podrían beneficiarse de recibir terapia tal como administración del uno o más miméticos de HGF descritos en el presente documento son generalmente mamíferos, y habitualmente seres humanos, aunque no es necesario que éste sea siempre el caso, puesto que también se contemplan aplicaciones veterinarias y relacionadas con la investigación de la tecnología. Generalmente un sujeto o paciente adecuado que necesita terapia lo identifica, por ejemplo, un profesional o profesionales de atención sanitaria usando pruebas, mediciones o criterios conocidos. Por ejemplo, en el tratamiento para la demencia, se identificarán sujetos que ya tienen síntomas de demencia, o que corren el riesgo de desarrollar síntomas de demencia. Se seguirán procedimientos de identificación similares para otras enfermedades y/o trastornos (por ejemplo, terapia contra el cáncer, otras terapias de disfunciones cognitivas, etc.). Entonces se desarrolla un protocolo de tratamiento adecuado basado en el paciente, la enfermedad y/o el trastorno y su estadio de desarrollo, y el mimético de HGF y su dosificación y formato de administración, así como otros factores relevantes. El sujeto recibe entonces tratamiento con mimético de HGF. Realizaciones de la invención también comprenden una o más etapas en relación con la monitorización de los efectos o el desenlace de la administración con el fin de evaluar el protocolo de tratamiento y/o ajustar el protocolo según se requiera o de una manera que es probable que proporcione más beneficio, por ejemplo aumentando o disminuyendo las dosis de medicación, o cambiando el tipo particular de mimético que se administra, o cambiando la frecuencia de dosificación o la vía de administración, etc. Con particular referencia a la realización de proporcionar potenciación cognitiva por ejemplo, aunque en algunos casos la mejora en la cognición (o la prevención de la pérdida de cognición) que se produce puede ser completa, por ejemplo el desempeño del paciente regresa a la normalidad o permanece normal (tal como se evalúa en comparación con sujetos de control adecuados o valores normalizados obtenidos de los mismos), no es necesario que éste sea siempre el caso. Los expertos en la técnica reconocerán que incluso un nivel inferior de mejora en la cognición puede ser altamente beneficioso para el paciente, tal como puede ser la ralentización de la evolución de una enfermedad, en contraposición a una cura completa.

Los métodos de la divulgación implican administrar composiciones que comprenden los miméticos de HGF dados a conocer en el presente documento a un paciente que lo necesita. La presente invención por tanto proporciona también composiciones que comprenden los análogos/miméticos de HGF tal como se describe en el presente documento, habitualmente junto con un portador o diluyente farmacológicamente adecuado. En algunas realizaciones, está presente un mimético de HGF sustancialmente purificado en una composición; en otras realizaciones está presente más de un mimético de HGF, estando cada mimético de HGF sustancialmente purificado antes de mezclarse en la composición. La preparación de composiciones farmacológicamente adecuadas para su uso como medicamentos la conocen bien los expertos en la técnica. Normalmente, tales composiciones se preparan como o bien disoluciones o bien suspensiones líquidas, sin embargo también se contemplan formas sólidas tales como comprimidos, píldoras, polvos y similares. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución en, o suspensión en, líquidos antes de su administración. La preparación también puede emulsionarse. Los principios activos pueden mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con los principios activos. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, o combinaciones de los mismos. Además, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, y similares. Si se desea administrar una forma oral de la composición, pueden añadirse diversos espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de la dispersión o aglutinantes. La composición de la presente invención puede contener cualquiera de tales componentes adicionales para proporcionar la composición en una forma adecuada para su administración. La cantidad final de mimético de HGF en las formulaciones puede variar. Sin embargo, en general, la cantidad en las formulaciones será de desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 99%.

Las composiciones (preparaciones) de mimético de HGF de la presente invención pueden administrarse mediante cualquiera de los muchos medios adecuados que conocen bien los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a: mediante inyección, inhalación, por vía oral, por vía intravaginal, por vía intranasal, mediante ingestión de un alimento o producto que contiene el mimético, por vía tópica, como gotas oculares, por medio de pulverizaciones, etc. En realizaciones preferidas, el modo de administración es por vía oral o mediante inyección. Además, las composiciones pueden administrarse conjuntamente con otras modalidades de tratamiento tales como otros agentes que se usan para tratar, por ejemplo, demencia o los estados que provocan demencia en el paciente, ejemplos de los cuales incluyen pero no se limitan a la administración de antidepresivos y fármacos psicoactivos, la administración de dopamina y agentes similares. De manera similar, en modalidades de tratamiento de cáncer, los miméticos de HGF pueden administrarse junto con analgésicos y otros fármacos adecuados. Por tanto, en realizaciones de la invención, puede usarse uno o más miméticos de HGF en combinación con uno o más fármacos bioactivos diferentes.

La cantidad de inhibidor de HGF que se administra puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 1.000 mg/kg, y preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100 mg/kg, aunque tal como reconocerá un experto en la técnica, la cantidad precisa puede variar dependiendo de uno o más atributos del receptor del fármaco, incluyendo pero sin limitarse a: peso, salud global, género, edad, nacionalidad, historia genética, otros estados que están tratándose, etc., y dosis más grandes o más

pequeñas están dentro de la práctica de esta invención. La dosificación también puede tener lugar periódicamente a lo largo de un periodo de tiempo, y la dosificación puede cambiar (aumentar o disminuir) con el tiempo.

Los miméticos de HGF de la invención pueden usarse para tratar una variedad de trastornos de la función cognitiva (disfunción cognitiva) así como otros trastornos que están relacionados con la actividad de HGF o la falta de la misma. "Función cognitiva" o "cognición" tal como se usa el presente documento se refiere a una gama de funciones cerebrales de alto nivel, incluyendo pero sin limitarse a: la capacidad para aprender y recordar información; la capacidad para organizar, planear y solucionar problemas; la capacidad para concentrar, mantener y desplazar la atención según sea necesario; y para comprender y usar el lenguaje; la capacidad para percibir de manera precisa el entorno; la capacidad para realizar cálculos. Tales funciones incluyen pero no se limitan a memoria (por ejemplo adquirir, retener y recuperar nueva información); atención y concentración (particularmente atención dividida); procesamiento de la información (por ejemplo tratar con información reunida por los cinco sentidos); funciones ejecutivas (por ejemplo planeamiento y priorización); funciones visuoespaciales (por ejemplo percepción visual y capacidades de construcción); habla y fluencia verbal (por ejemplo encontrar las palabras); intelecto general (por ejemplo "inteligencia"); memoria a largo plazo (remota); aptitudes de conversación; comprensión lectora; etc. En cambio, por "disfunción cognitiva" quiere decirse la pérdida de tales capacidades. Las pérdidas pueden medirse, detectarse y/o diagnosticarse de cualquiera de las muchas formas conocidas por los expertos habituales en la técnica. Tales métodos incluyen pero no se limitan a: el uso de pruebas normalizadas realizadas por un profesional (rompecabezas, juegos de palabras o problemas, etc.); por autonotificación y/o las notificaciones de cuidadores, amigos y miembros de la familia de un individuo aquejado; por observación de las actividades, aptitudes de vida, hábitos y copia de mecanismos del individual por profesionales o profanos; por los resultados de cuestionarios administrados a un individuo aquejado; etc.

Tales trastornos pueden estar provocados, por ejemplo, por una disminución en la conectividad sináptica y/o densidad de neuronas debido a una variedad de factores. En algunas realizaciones, la pérdida está provocada por una lesión cerebral, por ejemplo lesión cerebral traumática. La lesión cerebral traumática, que está produciéndose a niveles récord como resultado de guerras y actividades deportivas, se caracteriza por conectividad neuronal reducida. Por eso, el uso de miméticos de HGF representa una opción de tratamiento viable. Tales lesiones cerebrales pueden ser el resultado de un traumatismo externo al cerebro, por ejemplo provocado por un accidente de alto impacto (por ejemplo un accidente de coche, una caída, etc.), un incidente de disparo, una lesión deportiva (por ejemplo provocada por impacto en la cabeza tal como experimentan boxeadores y jugadores de fútbol); lesiones recibidas en combate, etc. Alternativamente, tales lesiones pueden ser el resultado de traumatismo cerebral interno, por ejemplo como resultado de accidente cerebrovascular, aneurisma, procedimiento quirúrgico, tumor, etc. u otros tipos de estados que resultan de la falta de oxígeno en el cerebro o en secciones del cerebro; lesiones debidas a inhalación de gases tóxicos; debido a envejecimiento del cerebro; a enfermedades y trastornos que ejercen un efecto perjudicial sobre el sistema nervioso y/o cerebro, tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, trastornos cerebrales tales como esquizofrenia, etc.

Como ejemplo específico de una terapia contemplada por realizaciones de la divulgación, los miméticos de HGF pueden usarse para el tratamiento de demencia. Por "demencia" quiere decirse una pérdida grave de la capacidad cognitiva en una persona previamente sin afectar, más allá de lo que podría esperarse del envejecimiento normal. Puede ser estática, el resultado de una lesión cerebral global única, o progresiva, dando como resultado declive a largo plazo debido a daño o enfermedad en el cuerpo. Aunque la demencia es de lejos más común en la población geriátrica, puede producirse en cualquier estadio de adultez. Para los fines de realizaciones de esta invención, el término "demencia" puede incluir y/o estar provocada por, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, etc. o combinaciones de éstas. En otras realizaciones de la invención, puede excluirse la enfermedad de Alzheimer de esta definición. Otras causas de demencia que puede tratarse tal como se describe en el presente documento incluyen pero no se limitan a hipotiroidismo e hidrocefalia de presión normal. Las formas heredadas de la enfermedades que provocan o están asociadas con demencia que puede tratarse tal como se describe en el presente documento incluyen pero no se limitan a: degeneración lobular frontotemporal, enfermedad de Huntington, demencia vascular, demencia pugilística, etc. En poblaciones más jóvenes, la alteración cognitiva progresiva puede estar provocada por enfermedad psiquiátrica, alcohol o consumo de otras drogas, o alteraciones metabólicas. Determinados trastornos genéticos pueden provocar demencia neurodegenerativa verdadera en poblaciones más jóvenes (por ejemplo 45 años y por debajo). Estos incluyen enfermedad de Alzheimer familiar, SCA17 (herencia dominante); adrenoleucodistrofia (ligada al cromosoma X); enfermedad de Gaucher de tipo 3, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, neurodegeneración asociada a pantotenato cinasa, enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Wilson. Deficiencias en vitaminas e infecciones crónicas también pueden imitar ocasionalmente la demencia degenerativa. Éstas incluyen deficiencias de vitamina B12, folato o niacina, y causas infecciosas incluyendo meningitis criptocócica, VIH, enfermedad de Lyme, leucoencefalopatía multifocal progresiva, panencefalitis esclerosante subaguda, sífilis y enfermedad de Whipple. Con respecto a la demencia rápidamente progresiva, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob provoca normalmente una demencia que empeora a lo largo de semanas a meses, estando provocada por priones. Las causas más comunes de la demencia lentamente progresiva también presentan algunas veces progresión rápida, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, demencia con cuerpos de Lewy y degeneración lobular frontotemporal (incluyendo degeneración corticobasal y parálisis supranuclear progresiva).

Además, la encefalopatía o el delirio puede desarrollarse de manera relativamente lenta y dar como resultado demencia. Las posibles causas incluyen infección cerebral (encefalitis viral, panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Whipple) o inflamación (encefalitis límbica, encefalopatía de Hashimoto, vasculitis cerebral); tumores tales como linfoma o glioma; toxicidad farmacológica (por ejemplo fármacos anticonvulsivos); causas metabólicas tales como insuficiencia hepática o insuficiencia renal; y hematoma subdural crónico. La demencia que se trata según los métodos de la presente invención también puede ser el resultado de otros estados o enfermedades. Por ejemplo, hay muchos estados médicos y neurológicos en los que la demencia sólo se produce tardíamente en la enfermedad, o como una característica menor. Por ejemplo, una proporción de pacientes con enfermedad de Parkinson desarrollan demencia. También se produce alteración cognitiva en los síndromes de Parkinson-plus de parálisis supranuclear progresiva y degeneración corticobasal (y la misma patología subyacente puede provocar los síndromes clínicos de degeneración lobular frontotemporal). Estados inflamatorios crónicos del cerebro pueden afectar a la cognición a largo plazo, incluyendo enfermedad de Behçet, esclerosis múltiple, sarcoidosis, síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico. Además, los estados heredados que también pueden provocar demencia junto con otras características incluyen: enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, xantomatosis cerebrotendinosa, síndrome de ataxia/temblor asociado al cromosoma X frágil, aciduria glutárica de tipo 1, enfermedad de Krabbe, enfermedad de orina de jarabe de arce, enfermedad de Niemann Pick de tipo C, enfermedad de Kufs, neuroacantocitosis, acidemias orgánicas, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, trastornos del ciclo de la urea, síndrome de Sanfilippo de tipo B y ataxia espinocerebelosa de tipo 2.

Además, para tratar la demencia, los miméticos de HGF de la invención pueden usarse para neuroprotección y/o para tratar enfermedades neurodegenerativas, algunas de las cuales también implican demencia tal como se describió anteriormente. Para neuroprotección, los miméticos de HGF pueden administrarse de manera profiláctica, es decir antes de que el sujeto se encuentre con o se exponga a un posible riesgo neurológico. Por ejemplo, los miméticos pueden administrarse antes de la exposición a un fármaco, producto químico o procedimiento médico que se sabe o es probable que provoque daño neuronal. Con respecto al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, la actividad antiapoptótica pro supervivencia general de HGF apoya el uso de miméticos de HGF para tratar enfermedades neurodegenerativas incluyendo pero sin limitarse a enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), etc.

Además, los miméticos pueden usarse para el tratamiento de "depresión", mediante lo cual quiere decirse trastorno depresivo mayor (TDM) (también conocido como trastorno depresivo recurrente, depresión clínica, depresión mayor, depresión unipolar o trastorno unipolar) y también depresión que es característica de trastorno bipolar, etc. La depresión es en última instancia una enfermedad en la que las neuronas y los contactos sinápticos se pierden en el hipocampo. La capacidad de HGF para inducir nuevas conexiones sinápticas y estimular la neurogénesis en el hipocampo apoya el uso de miméticos de HGF para el tratamiento de depresión.

Además, también pueden aumentarse las capacidades cognitivas de personas aquejadas de determinadas predisposiciones genéticas a disfunción cognitiva, por ejemplo personas con trastornos genéticos tales como síndrome de Down, falta de desarrollo cerebral apropiado por ejemplo debido a falta de oxígeno antes o durante el nacimiento, diversos trastornos congénitos que interfieren con el desarrollo cerebral, etc.

Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, los miméticos de HGF pueden inhibir el sistema de HGF/Met, y por tanto pueden usarse como agentes anticancerígenos. Los miméticos de HGF pueden usarse para atenuar transformaciones malignas y metastásicas.

Los miméticos de HGF tienen aplicación en la terapia de enfermedad fibrótica. La fibrosis hepática, renal, cardíaca y pulmonar es un problema creciente en la población envejecida. Desafortunadamente, la degradación de la función que acompaña a los cambios fibróticos es difícil de tratar. La capacidad drástica de HGF para inhibir o revertir la fibrosis tisular sugiere que miméticos de HGF activos por vía oral proporcionan una opción terapéutica.

Los miméticos de HGF tienen aplicación en la terapia de enfermedad vascular periférica: enfermedad arterial de extremidades inferiores. La enfermedad vascular que da como resultado una mala perfusión es una secuela común de la diabetes, obesidad y aterosclerosis. Una opción de tratamiento es la inducción de nuevos vasos colaterales en los órganos y tejidos afectados. La potente actividad angiogénica de HGF y miméticos de HGF puede proporcionar una utilidad clínica para el tratamiento de insuficiencia vascular.

También pueden usarse miméticos de HGF para la cicatrización de heridas. La cicatrización defectuosa de heridas es un rasgo distintivo de víctimas diabéticas y de quemaduras. La capacidad de HGF para promover la cicatrización de heridas debido a sus actividades angiogénicas y mitogénicas apoya el uso de miméticos de HGF para potenciar el proceso de cicatrización de heridas. Los datos indican que varios miméticos de HGF son potenciadores de la reparación de heridas eficaces en individuos tanto normales como diabéticos.

Sin querer restringirse a la teoría, se cree que el mecanismo probable que subyace a esta marcada actividad procognitiva es una conectividad sináptica aumentada. Esto se debe probablemente a un aumento en la actividad sináptica en miniatura ocasionada por el aumento de las densidades de espinas dendríticas y la alteración del fenotipo morfológico de espinas postsinápticas.

Los ejemplos anteriores se proporcionan con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención, pero no deben interpretarse como limitativos de la invención de ningún modo.

5 Ejemplos

EJEMPLO 1. Regulación de la sinaptogénesis por Dihexa y Nle1-AngIV.

Se encontró previamente que los fragmentos de tetrapéptido (Nle1-YIH) y tripéptido (Nle1-YI) del análogo Nle1-AngIV de AngIV son los fragmentos activos más pequeños que pueden superar la disfunción cognitiva inducida por escopolamina en una tarea de aprendizaje espacial. Usando el tripéptido como nuevo molde, se sintetizaron análogos activos adicionales con estabilidad metabólica, permeabilidad de la barrera hematoencefálica y actividad oral mejorada. En este ejemplo, se muestra la caracterización del análogo de angiotensina IV novedoso, activo por vía oral, Dihexa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y cirugía. Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho (derivadas de Taconic) que pesaban 390-450 g con libre acceso a agua y alimento (dieta de roedores Harland Tekland F6, Madison, WI) excepto la noche previa a la intervención quirúrgica cuando se retiró el alimento. Se anestesió cada animal con clorhidrato de ketamina más xilazina (100 y 2 mg/kg por vía i.m. respectivamente; Phoenix Scientific; St. Joseph, MO, y Moby; Shawnee, KS). Se colocó de manera estereotáxica una cánula de guía intracerebroventricular (icv) (PE-60, Clay Adams; Parsippany, NY) (modelo 900, David Kopf Instruments; Tujunga, CA) en el hemisferio derecho usando coordenadas de cráneo planas 1,0 mm posterior y 1,5 mm lateral al bregma (se remite a Wright *et al.* 1985). La cánula guía medía 2,5 cm de longitud global y se preparó con una protuberancia de calor colocada a 2,5 mm desde su punta biselada, actuando por tanto como un tope para controlar la profundidad de penetración. Una vez en posición, se aseguró la cánula al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y cemento central. Se alojaron de manera posoperatoria los animales individualmente en un vivario aprobado por la American Accreditation for Laboratory Animal Care mantenido a $22\pm 1^\circ\text{C}$ en un ciclo de luz/oscuridad alterno de 12 h iniciado a las 06:00 h. Todos los animales se trataron de manera cuidadosa durante 5 min al día durante los 5-6 días de recuperación posquirúrgica. La verificación histológica de colocación de la cánula se realizó mediante la inyección de 5 μl de colorante verde rápido por medio de la cánula guía tras la finalización de la prueba de comportamiento. La colocación correcta de la cánula fue evidente en todas las ratas utilizadas en este estudio.

Pruebas de comportamiento. El laberinto de agua consistía en un tanque circular pintado de negro (diámetro: 1,6 m; altura: 0,6 m), llenado hasta una profundidad de 26 cm con agua a $26\text{-}28^\circ\text{C}$. Se colocó una plataforma circular negra (diámetro: 12 cm; altura: 24 cm) a 30 cm de la pared y se sumergió 2 cm por debajo de la superficie del agua. El laberinto se dividió de manera funcional en cuatro cuadrantes iguales designados como NO, NE, SO y SE. Para cada rata la ubicación de la plataforma se asignó de manera aleatoria a uno de los cuadrantes y permaneció fija en toda la duración del entrenamiento. Los puntos de entrada estaban en las esquinas del cuadrante (es decir N, S, E y O) y se asignaron de manera pseudoaleatoria de modo que cada ensayo comenzó en un punto de entrada diferente que el ensayo precedente. Se cubrieron tres de las cuatro paredes de la sala de pruebas con pistas espaciales exteriores al laberinto que consistían en diferentes formas (círculos, cuadrados, triángulos) y colores. Se registró la trayectoria de baño de los animales usando un sistema de seguimiento de vídeo computerizado (Chromotrack; San Diego Instruments, CA). El ordenador presentó la distancia de nado y la demora de nado total. Se determinó la velocidad de nado a partir de estos valores.

Cada miembro de los grupos de tratamiento en los estudios de escopolamina recibió una inyección icv de bromhidrato de escopolamina (70 nmol en 2 μl de aCSF a lo largo de una duración de 20 s) 30 min antes de someterse a prueba seguido por Dihexa 10 min antes de someterse a prueba. Los grupos de control recibieron escopolamina o aCSF 20 min antes de someterse a prueba seguido por aCSF 10 min antes de someterse a prueba. El protocolo de pruebas de comportamiento se ha descrito previamente en detalle (Wright *et al.* 1999). Las ratas en el estudio de ratas envejecidas recibieron Dihexa de aCSF (grupo de control). Brevemente, se realizaron ensayos de adquisición en 8 días consecutivos con 5 ensayos/día. El primer día de entrenamiento se colocó el animal sobre la plataforma durante 30 s antes del primer ensayo. Los ensayos comenzaron con la colocación de la rata mirando hacia la pared del laberinto en uno de los puntos de entrada asignados. Se le dejó a la rata un máximo de 120 s para ubicar la plataforma. Una vez que el animal ubicó la plataforma se le permitió un periodo de descanso de 30 s sobre la plataforma. Si la rata no encontraba la plataforma, el experimentador colocaba al animal sobre la plataforma durante el periodo de descanso de 30 s. El siguiente ensayo comenzó inmediatamente tras el periodo de descanso.

Tras el día 8 del entrenamiento de adquisición, se realizó un ensayo adicional durante el cual se retiró la plataforma (ensayo de sonda). Se requería que el animal nadase los 120 s completos para determinar la persistencia de la respuesta aprendida. Se registraron el tiempo total gastado dentro del cuadrante objetivo donde se había ubicado la plataforma durante la adquisición y el número de cruces de ese cuadrante. Tras la finalización de cada conjunto diario de ensayos se secó el animal con una toalla y se colocó bajo una lámpara de 100 vatios durante 10-15 min y entonces se devolvió a su jaula de alojamiento.

Preparación de cultivos de células del hipocampo. Se cultivaron neuronas del hipocampo (2×10^5 células por cm cuadrado) de ratas Sprague Dawley P1 sobre placas recubiertas con poli-L-lisina de Sigma (St. Louis, MO; 300.000 de peso molecular). Se mantuvieron neuronas del hipocampo en medio Neurobasal A de Invitrogen (Carlsbad, CA) complementado con B27 de Invitrogen, L-glutamina 0,5 mM y citosina-D-arabinofuranosa 5 mM de Sigma añadidas a los 2 días *in vitro*. Luego se cultivaron las neuronas del hipocampo 3-7 días adicionales, tiempo en el que o bien se transfectoran o bien se trataron con diversos reactivos farmacológicos tal como se describe en (Wayman, Davare *et al.* 2008).

10 *Transfección.* Se transfectoran las neuronas con mRFP- β -actina el día *in vitro* 6 (DIV6) usando LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Este protocolo produjo la eficacia de transfección del 3-5% deseada propiciando así la visualización de neuronas individuales. Eficacias más altas ocultaron los árboles dendríticos de neuronas individuales. La expresión de actina etiquetada de manera fluorescente permitió una clara visualización de las espinas dendríticas, a medida que las espinas dendríticas se enriquecían en actina. El DIV7 se trataron las células con vehículo (H_2O) o péptidos (tal como se describe en el texto) añadidos al medio. El DIV12 se fijaron las neuronas (paraformaldehído al 4%, sacarosa al 3%, PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,4) durante 20 min a temperatura ambiente y se montaron. Se secaron los portaobjetos durante al menos 20 horas a 4°C y se obtuvieron imágenes fluorescentes con software de microscopía digital Slidebook 4.2 que se realiza con un microscopio confocal invertido Olympus IX81 con lentes de inmersión en aceite 60X, NA 1,4 y resolución de 0,280 μm . Se midió la densidad de espinas dendríticas sobre dendritas primarias y secundarias a una distancia de al menos 150 μm desde el soma. Se analizaron cinco segmentos de 50 μm de longitud de dendrita de al menos 10 neuronas por punto de datos para cada punto de datos notificado. Se repitió cada experimento al menos tres veces usando preparaciones de cultivo independientes. Se determinó la longitud de dendrita usando el programa Image J 1.41o de los National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD) y el programa Neuron J de seguimiento de neuritas (Meijering, Jacob *et al.* 2004). Las espinas se contaron manualmente.

30 *Preparación y transfección de cultivos de cortes del hipocampo organotípicos.* Se cultivaron hipocampos de ratas Sprague Dawley P4 tal como se describió previamente (Wayman, Impey *et al.* 2006). Brevemente, se cultivaron cortes de 400 μm en (Milipore, Billerica, MA) durante 3 días tras los cuales se transfectoran biolísticamente con proteína fluorescente de tomate (TFP) usando una pistola génica Helios (BioRad, Hercules, CA), según el protocolo del fabricante, para visualizar los árboles dendríticos. Tras un periodo de recuperación de 24 horas se estimularon los cortes con vehículo (H_2O), Dihexa o Nle1-AngIV 1 pM durante 2 días. Se fijaron los cortes y se montaron. Se obtuvieron imágenes de procesos neuronales CA1 del hipocampo y se midieron como se describió anteriormente.

35 *Inmunocitoquímica.* Las neuronas transfectadas se trataron, se fijaron y se tiñeron. Brevemente, se permeabilizaron las células con detergente Triton X-100 al 0,1% (Bio-Rad; Hercules, CA) durante 10 minutos. Se usó una albúmina sérica bovina al 8% (Interger Company; Burlington, MA) en PBS para impedir la unión no específica durante una hora a T.A.; las incubaciones con anticuerpo primario fueron a una dilución de 1:2500 (véase a continuación) en BSA al 1% en PBS a 4°C durante la noche. Se aplicó anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-ratón Alexafluor 488 1:3000 (Invitrogen: Carlsbad, CA) durante dos horas a temperatura ambiente. Se montaron los cubreobjetos con reactivo antidesvanecimiento ProLong Gold (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se realizaron todos los lavados con PBS. Se realizaron la obtención de imágenes y el análisis tal como se describió anteriormente. Para la transmisión excitatoria presináptica se empleó el marcador VGLUT1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) (Balschun, Moechars *et al.*) y para la transmisión presináptica general se aplicó sinapsina1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) (Ferreira y Rapoport 2002). Se estableció una función postsináptica mediante PSD-95 (Milipore, Billerica, MA) (El-Husseini, Schnell *et al.* 2000). En cada caso se contó el número total de espinas para los grupos de tratamiento, control, Nle1-AngIV y Dihexa, para garantizar un fenotipo activo. Se contó el número total de espinas enriquecidas en actina adyacentes a VGLUT1 o sinapsina y se convirtió en un porcentaje ya que el porcentaje de correlación de espinas inducidas por tratamiento con respecto a marcadores presinápticos es un indicador fuerte de la capacidad para transmitir señales excitatorias. En esta solicitud el número de correlaciones consistió en espinas de actina etiquetadas con rojo fluorescente frente a puntos inmunopositivos para PSD-95 verdes que, cuando se fusionaron, dieron como resultado una espina naranja.

55 *Registros de células completas.* Se realizaron experimentos de registro electrofisiológico de fijación de voltaje sobre neuronas del hipocampo cultivadas transfectadas con mRFP- β -actina (control de vehículo) y sobre neuronas del hipocampo transfectadas con pretratamiento de 5 días con Dihexa o Nle1-AngIV 1 pM. Se tomaron registros de las neuronas que tenían forma de tipo piramidal (cuerpos celulares de ~ 20 μm y distribución de dendritas asimétrica). El tiempo tras la transfección fue de 6 días. Se intercambié el medio de cultivo por una disolución extracelular que contenía (en mM) NaCl 140, KCl 2,5, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 3, glucosa 25 y HEPES 5; se ajustó el pH a 7,3 con KOH; se ajustó la osmolalidad a 310 mOsm. Se dejó que los cultivos se equilibrasen en una cámara de registro montada sobre un microscopio invertido (IX-71; Olympus optical, Tokio) durante 30 min antes del registro. Se visualizaron las células transfectadas con fluorescencia (Olympus optical). Se sacaron las pipetas de registro (extractor de micropipeta P-97 Flaming/Brown; Sutter Instrument, Novato, CA) de vidrio de borosilicato de pared convencional sin filamento (DO = 1,5 mm; Sutter Instrument). La resistencia en CC de pipeta a baño de los electrodos de fijación de voltaje oscilaba entre 4,0 y 5,2 M Ω , y se llenaron con una disolución interna de la siguiente composición (en mM):

CsCl 25, CsCH₃O₃S 100, fosfocreatina 10, EGTA 0,4, HEPES 10, MgCl₂ 2, Mg-ATP 0,4 y Na-GTP 0,04; se ajustó el pH a 7,2 con CsOH; se ajustó la osmolalidad a 296 - 300 mOsm. Se aislaron farmacológicamente las EPSC en miniatura (mEPSC) bloqueando los canales de cloruro de receptor de GABA con picrotoxina (100 μM; Sigma), bloqueando los receptores de glicina con estriquina (1 μM; Sigma) y bloqueando la generación de potenciales de acción con tetrodotoxina (TTX, 500 nM; Tocris). Se obtuvieron registros usando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se filtraron las señales analógicas con filtro Bessel de paso bajo a 2 kHz, se digitalizaron a 10 kHz a través de una interfaz Digidata 1440A (Molecular Devices) y se almacenaron en un ordenador usando software Clampex 10.2 (Molecular Devices). Se mantuvo el potencial de membrana a -70 mV a temperatura ambiente (25°C) durante un periodo de 0,5 - 2 h tras la retirada del cultivo del incubador. No se corrigieron los potenciales de uniones líquidas. Los análisis de los datos se realizaron usando el software Clampfit 10.2 (Molecular Devices) y software Mini-Analysis 6.0 (Synaptosoft Inc.; Fort Lee, NJ). Los criterios para un registro exitoso incluyeron la resistencia eléctrica del sello entre la superficie exterior de la pipeta de registro y la célula unida >2 GΩ, resistencia de entrada de neuronas >240 MΩ. Las mEPSC tuvieron un tiempo de registro de 5 min.

RESULTADOS

Se sabe desde hace tiempo que Nle1-AngIV es un agente de potenciación cognitiva potente (Wright y Harding, 2008) pero está limitado en cuanto a la utilidad clínica por su inestabilidad metabólica ($t_{1/2}$ =1,40 minutos en suero de rata). Con el fin de explotar las propiedades procognitivas de moléculas de tipo AngIV necesitan desarrollarse análogos más estables metabólicamente. Como parte de este proceso de desarrollo se sintetizó Dihexa (N-ácido hexanoico-Tyr-Ile-amida del ácido (6)-hexanoico) y se caracterizó ($t_{1/2}$ =330 minutos en suero de rata). Para determinar si el análogo estabilizado, Dihexa todavía poseía actividad pro-cognitiva/anti-demencia se sometió a prueba en dos modelos de demencia, los modelos de rata envejecida y amnesia por escopolamina. Estos estudios demostraron que Dihexa podía revertir los déficits cognitivos observados en ambos modelos. Dihexa administrada o bien por vía intracerebroventricular o bien por vía oral mediante sonda gástrica mejoraron el rendimiento en el laberinto de agua alcanzando niveles de rendimiento observados en ratas sanas jóvenes. En la figura 1A, Dihexa administrada a 100 pmoles (n=8, p<0,01) pero no 10 pmoles revirtió los déficits de aprendizaje dependientes de escopolamina tal como se evidenció por una demora de escape equivalente a controles no tratados con escopolamina. Se observaron resultados similares cuando se administró Dihexa por vía oral (figura 1B) a dosis tanto baja (1,25 mg/kg/día) como alta (2 mg/kg/día). El rendimiento del grupo de dosis alta no fue diferente del de los controles (n=8, p<0,01). Las ratas envejecidas agrupadas de manera aleatoria (20-24 semanas) incluidos ambos sexos se trataron de manera similar con Dihexa oral a lo largo del periodo de prueba de 8 días (n=8) y se compararon con los controles no tratados (figura 1C). Los resultados indican que las ratas tratadas tuvieron un rendimiento significativamente mejor en el laberinto de agua que las ratas no tratadas. (p<0,05).

Una hipótesis que se expuso para explicar los efectos procognitivos de Nle1-AngIV y Dihexa era que estaban actuando como miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos y como tales pueden estar soportando la expansión de la conectividad neuronal induciendo el crecimiento de espinas dendríticas y el establecimiento de numerosas nuevas sinapsis. Para determinar la influencia de la Dihexa sobre la espinogénesis y sinaptogénesis, se sometió a ensayo en cultivos neuronales de hipocampo transfectados con mRFP-β-actina de alta densidad. Las espinas enriquecidas en actina tenían una respuesta aumentada al tratamiento con Dihexa y Nle1-AngIV de manera dependiente de la dosis (figuras 2A y B). Se produjo un efecto máximo aparente mediante aplicación de Dihexa 10⁻¹² M (media ± EEM; 30 espinas por longitud de dendrita de 50 μm frente a 19 para el control; ***= P < 0,001; n = 50 y 100 respectivamente) mientras que los resultados de una dosis de 10⁻¹³ M no fueron significativamente diferentes de las neuronas tratadas con control (media ± EEM; 21 espinas por dendrita de 50 μm para ambos grupos frente a 19 para el control; * = P < 0,05; n = 95 y 100 respectivamente). Sin embargo, fueron diferentes estadísticamente de la dosis de Dihexa 10⁻¹² M. La neuronas que recibieron una dosis de 10⁻¹⁰ M de Dihexa tenían menos espinas que las neuronas tratadas con vehículo (media ± EEM; 11 espinas por longitud de dendrita de 50 μm frente a 19 para el control; # = P < 0,01; n = 50 y 100 respectivamente). Nle1-AngIV indujo de manera similar un aumento dependiente de la dosis en la densidad de espinas con una diferencia marcada en la dosis de 10⁻¹⁰ M que promovió la espinogénesis (media ± EEM; 22 espinas por longitud de dendrita de 50 μm frente a 17 para el control; ** = P < 0,01; n = 50). Se observaron de nuevo aumentos máximos en la densidad de espinas tras el tratamiento con una dosis de 10⁻¹² M (media ± EEM; 25 y 26 espinas por longitud de dendrita de 50 μm respectivamente frente a 17 para el control; ** = P < 0,01; n = 50). La dosis de 10⁻¹³ M de Nle1-AngIV tampoco tuvo efecto sobre los números de espinas basales (media ± EEM; 17 espinas por longitud de dendrita de 50 μm frente a 17 para el control; ** = P < 0,01; n = 50).

Los efectos de una aplicación a largo plazo (5 días) de los agonistas de AT4 Dihexa y Nle1-AngIV se compararon con una aplicación aguda de los agonistas (30 minutos) a la dosis biológicamente eficaz de 10⁻¹² M (figuras 3A-E). Los resultados revelaron un aumento de casi 3 veces en el número de espinas estimuladas por Dihexa y un aumento mayor de 2 veces para espinas estimuladas por Nle1-AngIV tras un tratamiento de 5 días (figura 3 D). Ambos grupos de tratamiento difirieron significativamente del grupo de control de vehículo para el que el número promedio de espinas por longitud de dendrita de 50 μm fue de 15. El número promedio de espinas para los grupos tratados con Dihexa y Nle1-AngIV fue de 41 y 32 espinas por longitudes de dendrita de 50 μm, respectivamente (media ± EEM, n = 200; *** = P < 0,001 mediante ANOVA de una vía y prueba a posteriori de Tukey). Los datos de

comportamiento (datos no mostrados) sugieren que está teniendo lugar un rápido mecanismo de acción durante la adquisición de la tarea de memoria espacial. Por tanto se midió la capacidad de tanto Dihexa como Nle1-AngIV para promover la espinogénesis mediante una aplicación de 30 minutos aguda el día final de cultivo (figura 3 E). La aplicación de 30 minutos aguda de Dihexa y Nle1-AngIV, el 12º día *in vitro* (DIV12) revela un aumento significativo de espinas en comparación con neuronas tratadas con vehículo 30 minutos (números de espinas medios con Dihexa por longitud de dendrita de 50 µm = 23,9 ± EEM; números de espinas medios con Nle1-AngIV = 2,6 ± EEM; números de espinas medio para neuronas tratadas con control de vehículo = 17,4 ± EEM; n = 60; *** = p < 0,0001 mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Tukey).

Existen correlaciones fuertes entre el tamaño de la espina, la persistencia de las espinas, el número de receptores de AMPA y la eficacia sináptica. También se ha sugerido una correlación entre la existencia de memorias a largo plazo con el volumen de espinas (Kasai, Fukuda *et al.*, 2001; Yasumatsu, Matsuzaki *et al.* 2008). Con estas consideraciones en mente se tomaron mediciones del tamaño de la cabeza de espinas. Los resultados indican que dosis de 10⁻¹² M de Dihexa y Nle1-AngIV aumentaron la anchura de la cabeza de espinas (figura 4). Anchura promedio de la cabeza de espinas para Nle1-AngIV = 0,87 µm (** = P < 0,001; media ± EEM) y Dihexa = 0,80 µm (** = P < 0,01; media ± EEM) respectivamente en comparación con el tamaño de la cabeza control (0,67 µm).

Dihexa y Nle1-AngIV median en la sinaptogénesis

Para cuantificar la transmisión sináptica, se sometieron a inmunotinción neuronas transfectadas con mRFP-β-actina frente a marcadores sinápticos. Se estimularon las neuronas del hipocampo durante 5 días *in vitro* con Dihexa o Nle1-AngIV 10⁻¹² M (figuras 5A-F). Se estudiaron con sonda los patrones de neurotransmisores de Nle1-AngIV y Dihexa para determinar la transmisión sináptica excitatoria tiñendo frente al marcador presináptico glutamatérgico transportador de glutamato vesicular 1 (VGLUT1) (Balschun, Moechars *et al.* 2010). Se empleó el marcador presináptico universal sinapsina para medir la yuxtaposición de las espinas recién formadas con botones presinápticos (Ferreira y Rapoport 2002). PSD-95 sirvió como marcador para la densidad postsináptica (El Husseini, Schnell *et al.* 2000).

Las neuronas tratadas con Dihexa y Nle1-AngIV aumentaron significativamente la espinogénesis; números de espinas medios por longitud de dendrita de 50 µm para Nle1-AngIV = 39,4; números de espinas medios por longitud de dendrita de 50 µm para Dihexa = 44,2; números de espinas medios por longitud de dendrita de 50 µm para neuronas tratadas con vehículo = 23,1 (media ± EEM, *** = P < 0,001) (figuras 3B, D y F y tabla 4). El porcentaje de correlación para las espinas recién formadas con los marcadores sinápticos se calculó como una medida de la formación de sinapsis funcionales. Las espinas inducidas por tratamiento con Dihexa y Nle1-AngIV no difirieron de las neuronas tratadas con control en el porcentaje de correlación con VGLUT1, sinapsina o PSD-95 (P > 0,05) (figuras 5A, C y E y tabla 4).

Tabla 4. Resumen del porcentaje de correlación con marcadores de componentes sinápticos y el número de espinas inducidas por tratamiento con Dihexa y Nle1-AngIV.

Tratamiento	Control	Nle1-AngIV	Dihexa
Número de espinas/50 µm	22	39	44
% de correlación con VGLUT1	95,2	95,1	94,4
Número de espinas/50 µm	19	31	37
% de correlación con sinapsina	93,4	94,2	96,3
Número de espinas/50 µm	18	36	43
% de correlación con PSD-95	98,03	97,38	98,71

El número total de espinas para cada grupo de tratamiento se indica como el número de espinas por longitud de dendrita de 50 µm. El porcentaje de correlación del marcador presináptico sinapsina, el marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1 o el componente postsináptico PSD-95 se indica directamente a continuación. N = 25 para cada grupo de tratamiento.

Los resultados anteriores sugieren que las espinas dendríticas recién formadas producidas por tratamiento con Dihexa y Nle1-AngIV están creando sinapsis funcionales. Para respaldar adicionalmente esta conclusión, se registraron corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mEPSC), cuya frecuencia se corresponde con el número de sinapsis funcionales, a partir de neuronas del hipocampo trasfectadas con mRFP-β-actina. Se midió un aumento de casi dos veces en las corrientes mediadas por AMPA tras el tratamiento con Nle1-AngIV y Dihexa 10⁻¹² M (figuras 6A y B). La frecuencia media de las mEPSC mediadas por AMPA registradas de neuronas tratadas con vehículo fue de 3,06 ± 0,23 Hz a partir de 33 células. Nle1-AngIV indujo un aumento de 1,7 veces con respecto al porcentaje de la frecuencia de control (5,27 ± 0,43 Hz a partir de 25 células; media ± EEM; *** = P < 0,001 frente al grupo de control y Dihexa produjo un aumento de 1,6 veces (4,82 ± 0,34 Hz a partir de 29 células; *** = P < 0,001 frente al grupo de control confirmando una amplificación de las sinapsis funcionales. No se observaron diferencias en la amplitud, tiempos de elevación o disminución (datos no mostrados), lo que sugiere que las propiedades

individuales de la sinapsis no se alteraron.

Para evaluar adicionalmente la significación fisiológica de la inducción de espinas observada en neuronas del hipocampo neonatales disociadas, se evaluaron los efectos de Dihexa y Nle1-AngIV sobre la formación de espinas en cultivos de cortes del hipocampo organotípicos. Estas preparaciones, aunque todavía de origen neonatal, representan un entorno más intacto y tridimensional que las neuronas disociadas. Las neuronas CA1 del hipocampo, que se han vinculado funcionalmente a plasticidad del hipocampo y aprendizaje/memoria, pudieron identificarse fácilmente basándose en la morfología y se seleccionaron para su análisis. Dihexa y Nle1-AngIV aumentaron significativamente la espinogénesis en cultivos de cortes del hipocampo organotípicos en comparación con neuronas tratadas con vehículo. No hubo diferencias en los números de espinas entre los grupos de tratamiento con Dihexa y Nle1-AngIV (figuras 7A y B). Los números de espinas medidos para los cortes de control fueron de 7 por longitud de dendrita de 50 μm frente a 11 espinas por longitud de dendrita de 50 μm para neuronas tratadas con tanto Nle1-AngIV como Dihexa; media \pm EEM, n = 13-20; ** = P < 0,01.

DISCUSIÓN

En este estudio, tanto Dihexa como Nle1-AngIV fueron un potenciador cognitivo potente cuando se administraron o bien por vía ICV o bien por vía oral. Como se predijo, tanto Dihexa como Nle1-AngIV promovieron la espinogénesis y potenciaron la sinaptogénesis en neuronas del hipocampo de rata cultivadas. Tal como se espera de un análogo de angiotensina IV, Dihexa ejerció efectos de inducción de espinas a concentraciones subnanomolares (Harding, Cook *et al.* 1992; Krebs, Hanesworth *et al.* 2000) produciéndose algo de formación de espinas por Dihexa y Nle1-AngIV tan pronto como 30 minutos tras la estimulación (figura 3D). Sin embargo, el efecto máximo requiere un periodo de tratamiento significativamente más largo (figura 3C).

Se tomaron mediciones del tamaño de la cabeza de espinas como un indicador de la potenciación sináptica. Espinas más grandes con un área de superficie mayor tienden a tener sinapsis más grandes, un PSD más grande para reclutar proteínas de andamiaje y un número mayor de receptores de neurotransmisores receptivos glutamatérgicos (Kennedy 1997). Aunque no difieren entre sí (P > 0,05), tanto los grupos de tratamiento con Dihexa como con Nle1-AngIV presentaron grandes expansiones en el tamaño de la cabeza de espinas. Se propone que los cambios en los números y la morfología de las espinas son mecanismos para convertir cambios sinápticos a corto plazo en cambios sumamente estables y duraderos (Hering y Sheng 2001).

Para evaluar la importancia funcional de estos cambios de espinas, se sometieron a inmunotinción neuronas del hipocampo estimuladas con Nle1-AngIV y Dihexa frente al marcador presináptico glutamatérgico VGLUT1 (Balschun, Moechars *et al.* 2010), el marcador presináptico general sinapsina (Ferreira y Rapoport 2002) y el marcador postsináptico PSD-95 (Kennedy 1997; Han y Kim 2008) para descifrar fenotipos de neurotransmisores. La alta e inalterada correlación entre VGLUT1, sinapsina y PSD-95 en dendritas tanto tratadas como de control sugiere que las espinas recién formadas soportan sinapsis funcionales (figura 5 y tabla 4) (Han y Kim 2008; Yasumatsu, Matsuzaki *et al.* 2008). Además, una correlación casi perfecta entre espinas marcadas con mRFP- β -actina y la tinción de marcador presináptico general sinapsina y VGLUT1, que identifica sinapsis glutamatérgicas excitatorias, sugiere que la mayoría de los efectos dependientes de AngIV sobre espinas del hipocampo se restringían a sinapsis excitatorias. Estos hallazgos se corresponden de manera adecuada con los hallazgos de De Bundel *et al.* en los que no se observó efecto sobre el neurotransmisor GABA inhibitor por angiotensina IV nativa (De Bundel, Demaegd *et al.* 2010).

El aumento en la frecuencia de mEPSC observada por las preparaciones tratadas con Dihexa y Nle1-AngIV respalda además que las espinas nuevas forman sinapsis funcionales (Malgaroli y Tsien 1992; Hering y Sheng 2001; Tiler y Pozzo-Miller 2003). El fortalecimiento consecuente de la neurotransmisión iniciado por Dihexa y Nle1-AngIV no podía atribuirse a fluctuaciones intrínsecas de liberación de neurotransmisores o influencias metabólicas y mecánicas (Yasumatsu, Matsuzaki *et al.* 2008). Los datos presentados en el presente documento sugieren que Nle1-AngIV y Dihexa aumentan la actividad sináptica en miniatura aumentando las densidades de espinas dendríticas y alterando el fenotipo morfológico de las espinas postsinápticas *in vitro* y puede representar el mecanismo que subyace al aprendizaje facilitado observado con análogos de AngIV (Wright, Stubley *et al.* 1999; Lee, Albiston *et al.* 2004).

Para unir los datos de comportamiento adulto a la teoría mecanística *in vitro*, se emplearon cultivos de cortes del hipocampo organotípicos que mantienen un entorno representativo de un hipocampo intacto y evaluaron para detectar espinogénesis inducida por tratamiento. La aplicación de Nle1-AngIV y Dihexa 10^{-12} M en cortes de hipocampo transfectados balísticamente aumenta significativamente las densidades de espinas (figura 7) implicando que tales cambios pueden de hecho estar produciéndose en el hipocampo intacto.

Por tanto, la Dihexa se ajusta a los criterios necesarios para un fármaco antidemencia eficaz: 1) es activo por vía oral, ya que sobrevive al paso a través del intestino y entra en el cerebro; 2) aumenta la conectividad neuronal, una propiedad necesaria cuando nos enfrentamos a una pérdida de conectividad neuronal; y 3) es económico de sintetizar haciéndolo por tanto accesible a los pacientes.

EJEMPLO 2. La diana de análogos de AngIV es el factor de crecimiento de hepatocitos

Este ejemplo muestra que el ligando de angiotensina IV novedoso Dihexa y su molécula original Nle1-AngIV actúan a través del sistema de HGF/receptor c-Met.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Cirugía

10 Se mantuvieron ratas Sprague-Dawley macho (derivadas de Taconic) que pesaban 390-450 g con libre acceso a agua y alimento (dieta de roedores Harland Tekland F6, Madison, WI) excepto la noche previa a la intervención quirúrgica cuando se retiró el alimento. Se anestesió cada animal con clorhidrato de ketamina más xilazina (100 y 2 mg/kg por vía i.m. respectivamente; Phoenix Scientific; St. Joseph, MO, y Moby; Shawnee, KS). Se colocó de manera estereotáxica una cánula de guía intracerebroventricular (icv) (PE-60, Clay Adams; Parsippany, NY) (modelo 15 900, David Kopf Instruments; Tujunga, CA) en el hemisferio derecho usando coordenadas de cráneo planas 1,0 mm posterior y 1,5 mm lateral al bregma (Wright *et al.*, 1985). La cánula guía medía 2,5 cm de longitud global y se preparó con una protuberancia de calor colocada a 2,5 mm desde su punta biselada, actuando por tanto como un tope para controlar la profundidad de penetración. Una vez en posición, se aseguró la cánula al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y cemento central. Se alojaron de manera posoperatoria los animales un vivario 20 aprobado por la American Accreditation for Laboratory Animal Care mantenido a 22±1°C en un ciclo de luz/oscuridad alterno de 12 h iniciado a las 06:00 h. Todos los animales se trataron de manera cuidadosa durante 5 min al día durante los 5-6 días de recuperación posquirúrgica.

Pruebas de comportamiento

25

El laberinto de agua consistía en un tanque circular pintado de negro (diámetro: 1,6 m; altura: 0,6 m), llenado hasta una profundidad de 26 cm con agua a 26-28°C. Se colocó una plataforma circular negra (diámetro: 12 cm; altura: 24 cm) 30 cm de la pared y se sumergió 2 cm por debajo de la superficie del agua. El laberinto se dividió de manera funcional en cuatro cuadrantes iguales designados como NO, NE, SO y SE. Para cada rata la ubicación de la 30 plataforma se asignó de manera aleatoria a uno de los cuadrantes y permaneció fija en toda la duración del entrenamiento. Los puntos de entrada estaban en las esquinas del cuadrante (es decir N, S, E, O) y se asignaron de manera pseudoaleatoria de modo que cada ensayo comenzó en un punto de entrada diferente que el ensayo precedente. Se cubrieron tres de las cuatro paredes de la sala de pruebas con pistas espaciales exteriores al laberinto que consistían en diferentes formas (círculos, cuadrados, triángulos) y colores. Se registró la trayectoria de 35 baño de los animales usando un sistema de seguimiento de vídeo computerizado (Chromotrack; San Diego Instruments, CA). El ordenador presentó la distancia de nado y demora de nado total. Se determinó la velocidad de nado a partir de estos valores.

Cada miembro de los grupos de tratamiento recibió una inyección icv de bromhidrato de escopolamina (70 nmol en 2 µl de aCSF a lo largo de una duración de 20 s) 20 min antes de someterse a prueba seguido por Dihexa (300 pmol en 2 µl de aCSF), Hinge (300 pmol en 2 µl de aCSF) o Hinge + Dihexa (300 pmol en 4 µl de aCSF) 5 min antes de someterse a prueba. Esta preparación de escopolamina es un modelo animal generalmente aceptado de la disfunción de memoria espacial que acompaña a la demencia (Fisher *et al.*, 2003). Los grupos de control recibieron escopolamina o aCSF 20 min antes de someterse a prueba seguido por aCSF 5 min antes de someterse a prueba. 45 El protocolo de prueba de comportamiento se ha descrito previamente en detalle (Wright *et al.*, 1999). Brevemente, se realizaron ensayos de adquisición en 8 días consecutivos, 5 ensayos/día. El primer día del entrenamiento se colocó el animal sobre el pedestal durante 30 s antes del primer ensayo. Los ensayos comenzaron con la colocación de la rata mirando hacia la pared del laberinto en uno de los puntos de entrada asignados. Se le dejó a la rata un máximo de 120 s para ubicar la plataforma. Una vez que el animal ubicó la plataforma se le permitió un periodo de 50 descanso de 30 s sobre la plataforma.

Si la rata no encontraba la plataforma, el experimentador colocaba al animal sobre la plataforma durante el periodo de descanso de 30 s. El siguiente ensayo comenzó inmediatamente tras el periodo de descanso. Tras la finalización de cada conjunto diario de ensayos se secó el animal con una toalla y se colocó bajo una lámpara de 100 vatios 55 durante 10-15 min y entonces se devolvió a su jaula de alojamiento.

Análisis estadísticos

Se usó ANOVA de una vía para analizar los resultados de espigas dendríticas y se analizaron los efectos significativos mediante la prueba a posteriori de Tukey. Las demoras medias del conjunto de datos del laberinto de agua de Morris hasta encontrar la plataforma durante cada bloque diario de cinco ensayos se calcularon para cada animal durante cada día de adquisición. Se usaron ANOVA de una vía para comparar demoras de grupo los días 1, 4 y 8 del entrenamiento. Los efectos significativos se analizaron mediante la prueba a posteriori de Newman-Keuls con un nivel de significación fijado a P < 0,05. 65

Ensayo de dispersión. Se hicieron crecer células MDCK hasta el 100% de confluencia sobre los cubreobjetos en

placas de seis pocillos y se lavaron dos veces con PBS. Entonces se transfirieron de manera aséptica los cubreobjetos confluentes a placas de seis pocillos nuevas que contenían 900 μ l de DMEM libre de suero. Se añadieron Norleual, péptido Hinge y/o HGF (20 ng/ml) a los pocillos apropiados. Los pocillos de control recibieron vehículo de PBS. Se incubaron las placas a 37°C con el 5% de CO₂ durante 48 horas. Se retiró el medio y se fijaron las células con metanol. Se tiñeron las células con Diff-Quik Wright-Giemsa (Dade-Behring, Newark, DE) y se tomaron imágenes digitales. Se retiraron los cubreobjetos con pinzas y se capturaron más imágenes digitales. Se logró la cuantificación de píxeles de las imágenes usando Image J y se realizó el análisis estadístico usando Prism 5 e InStat v.3.05.

10 *Preparación de cultivos de células neuronales del hipocampo disociadas*

Se cultivaron neuronas del hipocampo (2×10^5 células por centímetro cuadrado) de ratas Sprague Dawley P1-2 sobre placas recubiertas con poli-L-lisina de Sigma (St. Louis, MO; 300.000 de peso molecular). Se mantuvieron neuronas del hipocampo en medio Neurobasal A de Invitrogen (Carlsbad, CA) complementado con B27 de Invitrogen, L-glutamina 0,5 mM y citosina-D-arabinofurano 5 mM de Sigma añadidos a los 2 días *in vitro*. Luego se cultivaron las neuronas del hipocampo 3-7 días adicionales, tiempo en el que o bien se transfectaron o bien se trataron con diversos reactivos farmacológicos tal como se describe en el texto o las leyendas de las figuras.

20 *Transfección de cultivos de células neuronales del hipocampo disociadas*

Se transfectaron las neuronas con mRFP- β -actina el día *in vitro* 6 (DIV6) usando LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Este protocolo produjo la eficacia de transfección del 3-5% deseada propiciando de este modo la visualización de las neuronas individuales. Eficacias más altas ocultaron los árboles dendríticos de neuronas individuales. La expresión de actina etiquetada de manera fluorescente permitió una clara visualización de las espinas dendríticas, a medida que las espinas dendríticas se enriquecían en actina. El DIV7 se trataron las células con vehículo (H₂O) o péptidos (tal como se describe en el texto) añadidos al medio. El DIV12 se fijaron las neuronas (paraformaldehído al 4%, sacarosa al 3%, PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,4) durante 20 min a temperatura ambiente y se montaron. Se secaron los portaobjetos durante al menos 20 horas a 4°C y se obtuvieron imágenes fluorescentes con software de microscopía digital Slidebook 4.2 que se realiza con un microscopio confocal invertido Olympus IX81 con lentes de inmersión en aceite 60X, NA 1,4 y resolución de 0,280 μ m. Se midió la densidad de espinas dendríticas sobre dendritas primarias y secundarias a una distancia de al menos 150 μ m desde el soma. Se analizaron cinco segmentos de 50 μ m de longitud de dendrita de al menos 10 neuronas por punto de datos para cada punto de datos notificado. Se repitió cada experimento al menos tres veces usando preparaciones de cultivo independientes. Se determinó la longitud de dendrita usando el programa Image J 1.41o de los National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD) y el programa Neuron J de seguimiento de neuritas (Meijering, Jacob *et al.* 2004). Las espinas se contaron manualmente.

40 *Preparación y transfección de cultivos de cortes del hipocampo organotípicos*

Se cultivaron hipocampos de ratas Sprague Dawley P4 tal como se describió previamente (Wayman, Impey *et al.* 2006). Brevemente, se cultivaron cortes de 400 μ m en (Milipore, Billerica, MA) durante 3 días tras los cuales se transfectaron biolísticamente con proteína fluorescente de tomate (TFP) usando una pistola génica Helios (BioRad, Hercules, CA), según el protocolo del fabricante, para visualizar los árboles dendríticos. Tras un periodo de recuperación de 24 horas se estimularon los cortes con Dihexa o Nle1-AngIV 1 pM durante 2 días. Se fijaron los cortes y se montaron. Se obtuvieron imágenes de procesos neuronales CA1 del hipocampo y se midieron tal como se describió anteriormente.

50 *Cortes de hipocampo agudos*

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley adultas (250 g +) obtenidas de Harlan Laboratories (Ca, EE.UU.) con isofluorano (Vet One™, MWI, Meridian, ID, EE.UU.) y se decapitaron. Se extirpó el cerebro rápidamente y se colocó dentro de líquido cefalorraquídeo artificial enfriado con hielo (aCSF) durante aproximadamente 30 s. Se separaron ambos hemisferios mediante un corte sagital medio y se retiraron ambos hipocampos. Se seccionaron cortes transversal y longitudinalmente (400 μ m) para garantizar la penetrabilidad del fármaco, usando un cortador de tejido Mcllwain (Brinkmann, Gomshall, R.U.) y se transfirió a una cámara de incubación gasificada (95% de O₂/5% de CO₂) que contenía aCSF durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se transfirieron los cortes a tubos nuevos, se retiró el aCSF mediante succión cuidadosa y se reemplazó por aCSF que contenía vehículo (aCSF + aCSF), 100 ng/ml con factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) recombinante adulto libre de portador (R and D Systems, MN, EE.UU.) en aCSF, Hinge 10⁻¹⁰ M (Harding lab), 50 ng/ml en aCSF, Dihexa 10⁻¹⁰ M (Harding lab) en aCSF, Dihexa 10⁻¹² M en aCSF o HGF 50 ng/ml + Dihexa 10⁻¹² M en aCSF durante 30 minutos a 37°C balanceo suave. Se retiró el aCSF y se lisaron los cortes usando tampón RIPA (Upstate/Milipore, Billerica, MA) y cócteles de inhibidores I y II (Sigma, St. Louis, MO), se sonicaron en hielo y se clarificaron mediante centrifugación durante 30 minutos, 13.000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante del sedimento y se almacenó a -80°C o se procesó inmediatamente para electroforesis en gel.

65

ARNhp

Se diseñó una secuencia diana para c-Met usando un programa de diseño central de iARN (véase la página web ubicada en cancan.cshl.edu/). Se insertó la secuencia diana GTGTCAGGAGGTGTTTGAAAG (SEQ ID NO: 2) en el vector pSUPER (Oligoengine, Seattle WA) que dirige la producción endógena de ARNhp bajo el promotor H1. Se transfeció el ARNhp dentro de las células usando el método de lipofectamina descrito anteriormente. La verificación del silenciamiento del receptor se realizó creando un producto génico etiquetado con c-Met-6-Myc usando el sistema de clonación Gateway (Invitrogen). Se clonó la secuencia que codifica para la proteína Met a partir de ADNc de cerebro completo de rata usando cebadores obtenidos de Integrated DNA Technologies, Inc. Se purificó en gel el producto amplificado y se cortó una banda correspondiente a una banda de 190 kDa y se clonó en un vector de destino PCAGGS-6-Myc (Gateway).

Electroforesis en gel e inmunotransferencia de tipo Western

Se cuantificó la concentración de proteína de las muestras usando el método de BCA (Pierce, Rockford, IL) siguiendo el protocolo del fabricante. Se añadieron las muestras a tampón de SDS-PAGE y se sometieron a ebullición durante 10 min antes de cargar sobre un gel precolado de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) para electroforesis. Se transfirieron las proteínas sobre membranas de PVDF (Bio Rad, Hercules, CA) y se bloquearon con AquaBlock™ (New England Biolabs, Ipswich, MA) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Se realizó la incubación con anticuerpo primario en AquaBlock™ con anticuerpo de conejo anti-Met y anticuerpo de conejo anti-fosfo-Met (Tyr1234/1235) (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) durante la noche a 4°C. Se realizaron lavados alternativos con PBS y PBST. Se realizaron incubaciones con anticuerpo secundario (IRDye) (Rockland, Gilbertsville, PA) en AquaBlock™ durante una hora a TA. Se obtuvieron imágenes de las inmunotransferencias usando un sistema de obtención de imágenes Odyssey Infrared Imaging System de LI-COR (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Inmunocitoquímica

Las neuronas transfectadas se trataron, se fijaron y se tiñeron como se describió previamente en el capítulo dos. Brevemente, se permeabilizaron las células con detergente Triton X-100 al 0,1% (Bio-Rad; Hercules, CA) durante 10 minutos. Se usó una albúmina sérica bovina al 8% (Intergen Company; Burlington, MA) en PBS para impedir la unión no específica durante una hora a T.A.; las incubaciones con anticuerpo primario fueron a una dilución de 1:2500 (véase a continuación) en BSA al 1% en PBS a 4°C durante la noche. Se aplicó anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-ratón Alexafluor 488 1:3000 (Invitrogen; Carlsbad, CA) durante dos horas a temperatura ambiente. Se montaron los cubreobjetos con reactivo antidesvanecimiento ProLong Gold (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se realizaron todos los lavados con PBS. Se realizaron la obtención de imágenes y el análisis tal como se describió anteriormente. Para la transmisión excitatoria presináptica se empleó el marcador VGLUT1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) (Balschun, Moechars *et al.*) y para la transmisión presináptica general se aplicó sinapsina1 (Synaptic Systems, Goettingen, Alemania) (Ferreira y Rapoport 2002). Se estableció una función postsináptica mediante PSD-95 (Milipore, Billerica, MA) (E1-Husseini, Schnell *et al.* 2000). En cada caso se contó el número total de espinas para los grupos de tratamiento, control, Nle1-AngIV y Dihexa, para garantizar un fenotipo activo. Se contó el número total de espinas enriquecidas en actina (roja) adyacentes a VGLUT1 o sinapsina y se convirtió en un porcentaje ya que el porcentaje de correlación de espinas inducidas por tratamiento con respecto a marcadores presinápticos es un indicador fuerte de la capacidad para transmitir señales excitatorias. En esta solicitud el número de correlaciones consistió en espinas de actina etiquetadas con rojo fluorescente frente a puntos inmunopositivos para PSD-95 verdes que, cuando se fusionaron, dieron como resultado una espina naranja.

Registros de células completas

Se realizaron experimentos de registro electrofisiológico de fijación de voltaje sobre neuronas del hipocampo cultivadas transfectadas con mRFP-β-actina (control de vehículo) y sobre neuronas del hipocampo transfectadas con pretratamiento de 5 días con Hinge o Dihexa 1pM, o HGF 10 ng/ml (R&D Systems). Se tomaron registros de las neuronas que tenían forma de tipo piramidal (cuerpos celulares de ~20 μm y distribución de dendritas asimétrica). El tiempo tras la transfección fue de 6 días. Se intercambió el medio de cultivo por una disolución extracelular que contenía (en mM) NaCl 140, KCl 2,5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 3, glucosa 25 y HEPES 5; se ajustó el pH a 7,3 con KOH; se ajustó la osmolalidad a 310 mOsm. Se dejó que los cultivos se equilibrasen en una cámara de registro montada sobre un microscopio invertido (IX-71; Olympus optical, Tokio) durante 30 min antes del registro. Se visualizaron las células transfectadas con fluorescencia (Olympus optical). Se sacaron las pipetas de registro (extractor de micropipeta P-97 Flaming/Brown; Sutter Instrument, Novato, CA) de vidrio de borosilicato de pared convencional sin filamento (DO = 1,5 mm; Sutter Instrument). La resistencia en CC de pipeta a baño de los electrodos de fijación de voltaje oscilaba entre 4,0 y 5,2 MΩ, y se llenaron con una disolución interna de la siguiente composición (en mM): CsCl 25, CsCH₃O₃S 100, fosfocreatina 10, EGTA 0,4, HEPES 10, MgCl₂ 2, Mg-ATP 0,4 y Na-GTP 0,04; se ajustó el pH a 7,2 con CsOH; se ajustó la osmolalidad a 296 - 300 mOsm. Se aislaron farmacológicamente las EPSC en miniatura (mEPSC) bloqueando los canales de cloruro de receptor de GABA con picrotoxina (100 μM; Sigma), bloqueando los receptores de glicina con estriquina (1 μM; Sigma) y bloqueando la generación de potenciales de

acción con tetrodotoxina (TTX, 500 nM; Tocris). Se obtuvieron registros usando un amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se filtraron las señales analógicas con filtro Bessel de paso bajo a 2 kHz, se digitalizaron a 10 kHz a través de una interfaz Digidata 1440A (Molecular Devices) y se almacenaron en un ordenador usando software Clampex 10.2 (Molecular Devices). Se mantuvo el potencial de membrana a -70 mV a temperatura ambiente (25°C) durante un periodo de 0,5 - 2 h tras la retirada del cultivo del incubador. No se corrigieron los potenciales de uniones líquidas. Los análisis de los datos se realizaron usando el software Clampfit 10.2 (Molecular Devices) y software Mini-Analysis 6.0 (Synaptosoft Inc.; Fort Lee, NJ). Los criterios para un registro exitoso incluyeron la resistencia eléctrica del sello entre la superficie exterior de la pipeta de registro y la célula unida >2 GΩ, resistencia de entrada de neuronas >240 MΩ. Las mEPSC tuvieron un tiempo de registro de 5 min.

RESULTADOS

El factor de crecimiento de hepatocitos aumenta la arquitectura dendrítica y soporta la sinaptogénesis

Se ha mostrado previamente que Dihexa y Nle1-AngIV inducen la espinogénesis en neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP-β-actina (véase el ejemplo 1); sin embargo el mecanismo que subyace a esta acción era desconocido. Debido a la capacidad de Norleual, otro análogo de AngIV para bloquear la acción de HGF sobre c-Met (Yamamoto *et al.*, 2010), se planteó la hipótesis de que los aumentos en la densidad de espinas iniciados por Dihexa y Nle1-AngIV están mediados por el sistema de HGF/c-Met. Como tal, se evaluaron los efectos de HGF sobre la espinogénesis en cultivos de hipocampo disociados. Se transfectaron neuronas del hipocampo con mRFP-β-actina el día *in vitro* (DIV) 6 y se estimularon con HGF durante 5 días.

Se observó un aumento dependiente de la dosis en los números de espinas tras la estimulación con HGF siendo la dosis eficaz más baja de 5 ng/ml (números de espinas medios = 24,7; ** = $p < 0,01$ frente a control; ns frente a HGF 10 y 20 ng/ml). Los efectos más significativos se produjeron por dosis de 10 y 20 ng/ml (números de espinas medios = 27,5 y 27,0 respectivamente; $n = 50$ por grupo de tratamiento; *** = $p < 0,001$; $df = 4/245$; $F = 13,5$). Sin embargo, una dosis de 2,5 ng/ml de HGF no tuvo efecto sobre los números de espinas basales (números de espinas medios = 18,6 frente a control = 18,0) (figura 8) y por tanto se consideró que era subumbral.

Para evaluar la capacidad de HGF para aumentar la espinogénesis en un entorno más relevante fisiológicamente, se emplearon cortes de hipocampo organotípicos. Se estimularon los cortes de hipocampo, que se transfectaron biolísticamente con la proteína de tomate fluorescente roja soluble con HGF 10 ng/ml, Dihexa 10^{-12} M o vehículo durante 48 horas. Las neuronas del hipocampo CA1, que se sabe que experimentan cambios plásticos en respuesta al aprendizaje se seleccionaron fácilmente para el análisis basándose en la morfología. Dihexa y HGF aumentaron significativamente el número de espinas por longitud de dendrita de 50 μm en las neuronas del hipocampo CA1 (números de espinas medios = 15,0 y 18,5 respectivamente en comparación con números de espinas de control medios = 6,1; *** = $P < 0,001$ y ** = $P < 0,01$ entre grupos de tratamiento; $df = 2/81$; $F = 41,5$) (figuras 9A y B).

Estudios previos en los que se trataron neuronas con Dihexa y Nle1-AngIV indicaron que la mayoría de las espinas dendríticas que se inducían se ubicaban conjuntamente con marcadores tanto pre- como postsinápticos, indicando que estas espinas nuevas soportaban sinapsis funcionales. Además, la mayoría de las entradas sinápticas parecían ser glutamatérgicas. Puesto que se propone que Dihexa, Nle1-AngIV y HGF actúan todos a través de un mecanismo común, se evaluaron las propiedades funcionales de espinas inducidas por HGF. Se sometieron a inmunotinción neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP-β-actina para detectar un marcador general de zonas activas presinápticas, sinapsina (Ferreira y Rapoport; 2002) así como un marcador específico para sinapsis glutamatérgicas, transportador de glutamato vesicular 1 (VGLUT1) (Balschun, Moechars *et al.* 2010). La estimulación con HGF aumentó significativamente el número de espinas postsinápticas (número medio de espinas por longitud de dendrita de 50 μm para HGF = 33 frente a 23 para el control; *** = $P < 0,001$; ± EEM mediante ANOVA de una vía) garantizando por tanto un fenotipo activo mediante el tratamiento con HGF (figuras 10A y B). Se contó el número de espinas postsinápticas adyacentes a VGLUT1, o puntos positivos para sinapsina y se convirtieron a un porcentaje de las espinas totales contadas. Para neuronas tratadas con HGF (10 ng/ml) sometidas a inmunotinción frente a sinapsina1, se observó una correlación del 98% entre el marcador presináptico y la espina enriquecida en actina postsináptica (figura 9C). Una correlación del 95% para VGLUT1 y espinas postsinápticas indicó que las espinas inducidas por HGF eran casi exclusivamente glutamatérgicas (figura 10D). La correlación entre puntos verdes y espinas rojas para neuronas tratadas con vehículo fue del 94% de manera similar para sinapsina y VGLUT1 (figuras 10C y D).

Los datos anteriores sugieren que las espinas producidas en respuesta al tratamiento con HGF forman sinapsis funcionales. Además, la alta correlación con VGLUT1 sugiere que muchas de estas entradas son de naturaleza excitatoria. Para evaluar adicionalmente esta conclusión, se midió la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura mediadas por AMPA espontáneas (mEPSC) a partir de neuronas tras el tratamiento con HGF y se compararon estos datos con los obtenidos para Dihexa, que se habían establecido previamente para aumentar la frecuencia de mEPSC. Los registros se realizaron sobre neuronas del hipocampo disociadas transfectadas con mRFP-β-actina y tratadas con Dihexa 10^{-12} M, HGF 10 ng/ml o un volumen equivalente de vehículo durante 5 días. Tanto el tratamiento con HGF (frecuencia media = $7,09 \pm 0,53$; $n = 11$) como con Dihexa

(frecuencia media = $6,75 \pm 0,99$; $n = 9$) aumentaron la transmisión sináptica excitatoria casi dos veces con respecto a neuronas tratadas con control (frecuencia media = $3,55 \pm 0,60$; $n = 9$; ** = $P < 0,002$; media \pm EEM mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Neuman-Keuls) (figura 11), lo que confirma la suposición de que el tratamiento con HGF soporta una sinaptogénesis aumentada.

5 Con el fin de determinar si las acciones de ligandos de angiotensina IV están mediadas por HGF/c-Met, se realizó un experimento de sinergia. Se mostró previamente que dosis subumbral de HGF aumentadas con dosis subumbral de Dihexa o Nle1-AngIV promovían la espinogénesis, lo que sugiere un mecanismo de acción común. Se estimularon neuronas del hipocampo disociadas transfectadas con mRFP- β -actina durante 5 días con concentraciones subumbral de HGF y Dihexa ($2,5 \text{ ng/ml} + 10^{-13} \text{ M}$, respectivamente), dosis biológicamente activas de HGF (10 ng/ml), Dihexa o Nle1-AngIV (10^{-12} M) o una combinación de dosis subumbral de HGF $2,5 \text{ ng/ml} +$ Dihexa 10^{-12} M o HGF $2,5 \text{ ng/ml} +$ Nle1-AngIV 10^{-12} M . Los resultados se presentan en las figuras 12 A y B. Concentraciones subumbral de HGF ($2,5 \text{ ng/ml}$), Dihexa y Nle1-AngIV (10^{-13} M) no tuvieron efecto sobre la espinogénesis basal y no difirieron de las neuronas tratadas con control (media \pm EEM, números de espinas para el control = 17,4, HGF = 16,5, Dihexa = 17,1 y Nle1-AngIV = 16,5 por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$; $p > 0,05$). Dosis biológicamente activas de HGF (10 ng/ml), Dihexa y Nle1-AngIV (10^{-12} M) produjeron un efecto significativo con respecto a las espinas tratadas con control (media \pm EEM, números de espinas para HGF = 29,3, Dihexa = 26,4 y Nle1-AngIV = 29,8 por dendrita de $50 \mu\text{m}$). Dosis subumbral combinadas de Dihexa $2,5 \text{ ng/ml} + 10^{-13} \text{ M}$ y Nle1-AngIV $2,5 \text{ ng/ml} + 10^{-13} \text{ M}$ copiaron fenotípicamente los efectos de cada agonista a su dosis biológicamente activa sola (media \pm EEM, los números de espinas para HGF + Dihexa son 28,8 y para HGF + Nle1-AngIV son 26,2 por longitud de dendrita de $50 \mu\text{m}$ en comparación con neuronas tratadas con control = 17,4; *** = $P < 0,001$; media \pm EEM; mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Tukey).

25 Buscando una confirmación adicional de interacciones mediadas por HGF/c-Met y ligando de angiotensina IV, se utilizó el antagonista de HGF novedoso Hinge (DYIRNC, SEQ ID NO: 3) (Kawas *et al.*, 20113). Se confirmó Hinge como un antagonista de HGF/receptor c-Met por su capacidad para inhibir la dispersión de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), el método de referencia para la evaluación de la actividad mediada por c-Met. La dispersión celular implica una pérdida de las propiedades de adhesión celular, migración y diferenciación celular, las características distintivas de las acciones de HGF y c-Met (Yamamoto, Elias *et al.*, 2010; Birchmeier, Sonnenberg *et al.* 1993). Se sometió Hinge a prueba para determinar sus efectos sobre neuronas del hipocampo disociadas y se encontró que no tenía efecto sobre la espinogénesis a lo largo de un amplio intervalo de dosis, indicando por tanto que Hinge y el sistema de HGF/c-Met no desempeñan un papel significativo en la espinogénesis basal observada en las neuronas cultivadas (figura 13A). Sin embargo, Hinge inhibió eficazmente la formación de espinas en neuronas estimuladas con HGF 10 ng/ml (figura 13B), Nle1-AngIV 10^{-12} M (figura 13C) o Dihexa 10^{-12} M (Figura 12D) respaldando adicionalmente la confirmación de que esas acciones están mediadas por el sistema de HGF/c-Met.

40 Para evaluar los efectos de Hinge sobre la transmisión sináptica excitatoria, se registraron las mEPSC a partir de neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina durante 5 días con Hinge (10^{-12} M), HGF (10 ng/ml), Dihexa (10^{-12} M), Hinge + HGF ($10^{-12} \text{ M} + 10 \text{ ng/ml}$, respectivamente) o Hinge + Dihexa (10^{-12} M cada uno). Hinge solo no afecta a la transmisión sináptica (frecuencia media = $4,51 \pm 0,47$) en comparación con neuronas tratadas con vehículo (frecuencia media = $5,31 \pm 0,35$; figura 14A y B). Las frecuencias de HGF y Dihexa aumentaron significativamente en comparación con neuronas tratadas con tanto Hinge como vehículo (frecuencia media para HGF = $9,66 \pm 0,20$ y para Dihexa = $8,25 \pm 0,56$). Sin embargo estos efectos se ven significativamente atenuados por la estimulación en presencia de Hinge (frecuencias medias para HGF + Hinge = $5,25 \pm 0,27$ y Dihexa + Hinge = $5,57 \pm 0,65$; figuras 14A y B). Estos resultados sugieren que las espinas recién generadas están formando sinapsis funcionales y aunque Hinge no tiene efecto sobre la transmisión sináptica, es su capacidad para inhibir la espinogénesis la que atenúa las frecuencias mediadas por AMPA.

50 El receptor de angiotensina IV propuesto, HGF es el ligando para el receptor tirosina cinasa c-Met. Aunque se ha documentado bien la localización de ARNm de c-Met y HGF en el cerebro (Jung, Castren *et al.* 1994; Honda, Kagoshima *et al.* 1995; Thewke y Seeds 1996; Achim, Katyal *et al.* 1997), la presencia y distribución de proteína c-Met no se ha examinado. Por tanto se estudiaron con sonda varias regiones cerebrales para determinar la presencia de c-Met pero no se pudo hacer eso para HGF debido a la falta de anticuerpos eficaces. Se observaron altos niveles de proteína c-Met en la mayoría de las regiones del cerebro. Específicamente, se observó la señal máxima de proteína c-Met en el hipocampo y parece ser mayor que en el hígado que es un sitio principal de producción de HGF. También se observa una señal fuerte en la corteza prefrontal y el mesencéfalo, regiones de importancia para la cognición, mientras que la neocorteza tenía una señal algo atenuada el cerebelo produjo la señal más baja (figuras 15 A y B).

60 La aparente dependencia de las acciones de Dihexa del sistema de HGF/c-Met predijo que Dihexa en presencia de niveles subumbral de HGF debe poder estimular la fosforilación y activación de c-Met. Por tanto se estimularon cortes del hipocampo de ratas adultas agudas con HGF, Dihexa en condiciones de saturación y no saturación solos y en combinación y se estudiaron con sonda para determinar fosfo-Met. La fosforilación del receptor c-Met indica activación del receptor. La figura 16 muestra la fosforilación del receptor c-Met tras un tratamiento de 30 minutos con vehículo y diversas concentraciones de HGF o Dihexa. Dosis de saturación de HGF (100 ng/ml) y Dihexa (10^{-10} M)

Dihexa aumentaron ambas las fosforilación de c-Met en comparación con cortes tratados con control (aCSF); ($p < 0,007$). Las dosis de no saturación de HGF (50 ng/ml) y Dihexa (10^{-12} M) no eran estadísticamente diferentes de los cortes tratados con control ($p > 0,05$) y por tanto se consideraron que eran subumbral. Sin embargo, las dosis subumbral de HGF y Dihexa combinadas parecían producir un efecto de manera similar a la dosis de saturación de HGF y Dihexa ($p < 0,007$). Por tanto, dependiente de la dosis, parece que Dihexa puede activar independientemente el sistema de HGF/c-Met en el cerebro de rata adulta sola así como conjuntamente con HGF. Conjuntamente con estos hallazgos, Dihexa puede aumentar drásticamente la capacidad de HGF para activar c-Met mediante fosforilación en células HEK293 (figura 17) y estimular la dispersión de células MDCK (figura 18).

Para confirmar de manera irrefutable que los análogos de AngIV actúan por medio del sistema de HGF/c-met, se empleó un ARNhp para c-Met para inactivar el receptor. Se transfectaron neuronas del hipocampo disociadas con ARN de mRFP- β -actina y shMet y se permitió que tuviera lugar la inactivación del receptor durante 48 horas antes de la estimulación con 0,5 μ g (por pocillo) de HGF (10 ng/ml), Dihexa o Nle1-AngIV (ambos a 10^{-12} M). Una exposición más prolongada parecía ser perjudicial o tóxica para las neuronas. Se verificó una inactivación del receptor c-Met eficaz transfectando células de riñón embrionario humano (HEK) con (0,1 μ g) de c-Met etiquetado con 6-Myc, (0,1 μ g) de shMet o mRFP- β -actina solo. Se confirmó la inactivación satisfactoria mediante inmunotransferencia para c-met etiquetado con Myc usando un anticuerpo anti-Myc (figura 19).

Se trataron neuronas transfectadas con mRFP- β -actina sola, que servía como control, con HGF 10 ng/ml, Dihexa o Nle1-AngIV 10^{-12} M. Se observó un aumento significativo en el número de espinas en comparación con neuronas tratadas con control (números de espinas medios por longitud de dendrita de 50 μ m = 13,2 frente a HGF = 20,6; Dihexa = 21,8 y Nle1-AngIV = 20,0; $p < 0,05$ mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Tukey). Neuronas transfectadas con mRFP- β -actina y shMet que se estimularon con HGF 10 ng/ml, Dihexa o Nle1-AngIV 10^{-12} M, no diferían del control en cuanto al número de espinas (números de espinas medios por longitud de dendrita de 50 μ m = 13,5 frente a HGF = 12,4; Dihexa = 12,0 y Nle1-AngIV = 12,1; $p > 0,05$ mediante ANOVA de una vía seguido por prueba a posteriori de Tukey) tal como se muestra en la figura 20. Se empleó una secuencia de ARN reorganizada al azar como control negativo y no tuvo ningún efecto sobre la espinogénesis basal o estimulada (datos no mostrados). Estos resultados confirman que los efectos de análogos de AngIV están mediados por el sistema de HGF/c-Met.

Se empleó el laberinto de agua de Morris, una tarea de aprendizaje espacial dependiente del hipocampo que requiere que las ratas localicen un pedestal escondido por debajo de la superficie del agua orientándose ellas mismas con claves exteriores al laberinto, para evaluar el impacto del antagonista de HGF, Hinge, sobre los efectos procognitivos de Dihexa. Los grupos sometidos a prueba incluyeron aCSF seguido por aCSF, escopolamina (70 nM) seguido por aCSF, escopolamina seguido por Dihexa (300 pM), aCSF seguido por Hinge (300 pM) y escopolamina + Hinge seguido por Dihexa. La figura 21 representa las demoras medias hasta encontrar el pedestal escondido durante los días 1-8 de entrenamiento en el laberinto de agua. Ninguno de los grupos difería significativamente en la demora hasta encontrar el pedestal el día uno de entrenamiento. Las demoras medias para el grupo de control de vehículo (aCSF \rightarrow aCSF) grupo = 89,3 s; el grupo tratado con escopolamina = 114,7 s; la demora del grupo tratado con escopolamina + Hinge \rightarrow Dihexa = 107,9 s; la demora media del grupo de Hinge = 111,1 s; y el grupo de escopolamina \rightarrow Dihexa = 115,2 s. Para el cuarto día de entrenamiento, considerado un día crucial en el que se produce la mayor mejora en el entrenamiento y la plasticidad neural (Meighan *et al.*, 2006), el grupo de escopolamina (demora media hasta encontrar el pedestal = 102,4 s) y el grupo de escopolamina + Hinge \rightarrow Dihexa (demora media = 105,2 s) no mostraron signos de mejora en comparación con el grupo de control de vehículo (demora media = 43,0 s), el grupo de Hinge grupo (demora media = 78,3 s) y el grupo de escopolamina \rightarrow Dihexa (demora media = 63,0 s). El día final de entrenamiento, cuando se produjo el aprendizaje máximo (Meighan, Meighan *et al.* 2006), las demoras medias para el grupo de escopolamina (demora media hasta encontrar el pedestal = 84,8 s) y el grupo de escopolamina + Hinge \rightarrow Dihexa (demora media = 93,6 s) indicaron poca mejora en el aprendizaje en comparación con el grupo de control de vehículo (demora media = 43,0 s), el grupo de Hinge (demora media = 46,1 s) y el grupo de escopolamina \rightarrow Dihexa (demora media 62,3 s). Estos resultados sugieren que HGF y c-Met desempeñan un papel importante en procesos cognitivos dependientes del hipocampo.

Discusión

Los efectos procognitivos de análogos de angiotensina IV sugieren que pueden desarrollarse fármacos antidemencia basados en este sistema (Braszko, Kupryszewski *et al.* 1988; Stublely-Weatherly, Harding *et al.* 1996; Pederson, Harding *et al.* 1998; Wright, Stublely *et al.* 1999). Sin embargo, debido a la escasa estabilidad metabólica de la angiotensina IV y muchos análogos de AngIV, la incapacidad de los análogos tempranos para penetrar la barrera hematoencefálica y el no poder identificar el receptor AT4, ninguna compañía farmacéutica ha seguido adelante con su desarrollo. Dihexa, un análogo de angiotensina IV novedoso sintetizado por el laboratorio de los presentes inventores, es estable y activo por vía oral y ha superado por tanto los principales impedimentos farmacocinéticos que impiden el desarrollo. Se ha comprobado que Dihexa es estable en la sangre durante más de 5 horas (no mostrado), sobrevive al paso a través del intestino penetrando la barrera hematoencefálica y supera las deficiencias cognitivas en modelos agudos y crónicos de demencia (no mostrado). Un mecanismo general, establecido para la facilitación de la tarea de laberinto de agua, implica la expansión del árbol dendrítico en forma de espinas

postsinápticas recién desarrolladas y sinaptogénesis acompañante. El último obstáculo que queda para el desarrollo era la falta de un mecanismo molecular.

En el presente documento se demuestra que las acciones de análogos de AngIV dependen del sistema de HGF/c-Met. Ambos sistemas parecen mediar en efectos fisiológicos similares. El sistema de angiotensina IV/AT4 tiene efectos cerebroprotectores (Wright, Clemens *et al.* 1996; Date, Takagi *et al.* 2004), aumenta la potenciación a largo plazo (Kramar, Armstrong *et al.* 2001; Wayner, Armstrong *et al.* 2001; Akimoto, Baba *et al.* 2004; Davis, Kramar *et al.* 2006), tiene efectos procognitivos bien establecidos (Wright y Harding 2008) y se sospecha que regula el desarrollo de células madre neurales. El sistema de HGF/c-Met también tiene efectos procognitivos (Akimoto, Baba *et al.* 2004; Tyndall y Walikonis 2006; Tyndall y Walikonis 2007) y se sabe que está implicado en la regulación de células madre (Urbanek, Rota *et al.* 2005; Nicoleau, Benzakour *et al.* 2009). Además de similitudes funcionales, hay homología de secuencia entre angiotensina IV y la región de ligador "bisagra" de HGF (Wright, Yamamoto *et al.* 2008). Esta noción se vio reforzada por la observación de que el antagonista de AT4 bien conocido, Norleual, puede bloquear muchas funciones reguladas por HGF/c-Met tales como dispersión de células MDCK (Yamamoto, Elias *et al.* 2010).

La agilización de la tarea de laberinto de agua la efectúan Dihexa y el ligando de angiotensina IV original, Nle1-AngIV, mediante el aumento de la neurotransmisión que se produce a través de la elaboración del árbol dendrítico. El vínculo planteado como hipótesis entre la acción de análogos de AngIV y el sistema de HGF/c-Met predijo que como Dihexa y Nle1-AngIV HGF debe poder estimular el crecimiento de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo disociadas. Tal como se predijo, HGF promovió un aumento dependiente de la dosis en la espinogénesis (figura 7) en neuronas del hipocampo disociadas. Se encontró posteriormente que la concentración más eficaz de HGF (10 ng/ml) estimulaba neuronas del hipocampo en cultivos de cortes del hipocampo organotípicos que son preparaciones más intactas de manera similar a Dihexa (figuras 8A y B) estableciendo además un vínculo mecanístico entre Dihexa y HGF/c-Met. Para evaluar la relevancia fisiológica de estas nuevas espinas y determinar la firma de neurotransmisores de las sinapsis residentes, se sometieron a inmunotinción espinas inducidas por el tratamiento con HGF marcadas con mRFP- β -actina para detectar el marcador presináptico universal sinapsina que se ubica en las zonas activas presinápticas (Ferreira y Rapoport 2002) y el marcador presináptico excitatorio VGLUT1 que se encuentra en sinapsis presinápticas glutamatérgicas (Balschun, Moechars *et al.*). La razón de espinas marcadas con mRFP- β -actina postsinápticas yuxtapuestas a espinas con sinapsina o VGLUT1 no era diferente de neuronas tratadas con control lo que sugiere que las espinas inducidas por el tratamiento están formando sinapsis funcionales (figuras 9A-D). Se obtuvo la validación adicional de la sinaptogénesis registrando las mEPSC, ráfagas presinápticas espontáneas independientes de los potenciales de acción, en neuronas tratadas con HGF y Dihexa. Se amplificó la transmisión mediada por AMPA en respuesta al tratamiento con HGF y Dihexa tal como se muestra por el aumento de las frecuencias (figura 10).

Se usaron concentraciones subumbral de Dihexa y HGF o Nle1-AngIV y HGF para estimular neuronas del hipocampo *in vitro* para determinar si los ligandos de angiotensina IV Dihexa y Nle1-AngIV, y HGF afectan a la misma cascada de señalización o actúan sobre un receptor (c-Met). Para determinar si Dihexa y Nle1-AngIV intervienen en la misma cascada de señalización, se combinaron concentraciones subumbral de ligandos de AngIV con dosis subumbral de HGF. Mientras que las concentraciones subumbral de cada ligando solo no alteraron la espinogénesis basal, concentraciones subumbral combinadas de Dihexa 10^{-13} M y HGF 2,5 ng/ml o Nle1-AngIV 10^{-13} M y 2,5 ng/ml de HGF produjeron un efecto casi máximo, de manera similar a dosis de sensibilidad biológica de cada ligando solo (figuras 11A y B). Las similitudes en las respuestas dendríticas a los análogos de AngIV y HGF concuerdan con un mecanismo de acción común.

Para reforzar adicionalmente esta coincidencia de mecanismo, se empleó el antagonista de HGF novedoso Hinge y se evaluó para determinar sus efectos sobre neuronas del hipocampo estimuladas con análogos de AngIV y HGF. Hinge, como el antagonista de angiotensina IV Norleual, se estableció como antagonista de c-Met por su capacidad para bloquear la fosforilación dependiente de HGF de c-Met e impedir la dispersión dependiente de HGF en la línea de células epiteliales MDCK. La dispersión celular, que es el rasgo distintivo de una interacción HGF/c-Met, conduce a una pérdida de las propiedades de adhesión celular que permite que las células migren (Yamamoto, Elias *et al.*; Birchmeier, Sonnenberg *et al.* 1993). Se encontró que Hinge no tenía efectos adversos sobre neuronas del hipocampo cultivadas y no promovía o dificultaba la espinogénesis (figura 12A). Sin embargo, a concentraciones picomolares, Hinge impedía la espinogénesis inducida por HGF, Nle1-AngIV y Dihexa (figuras 12B-D) sugiriendo además que los efectos observados para los ligandos de angiotensina IV de los inventores están mediados por HGF/c-Met. Se evaluaron los efectos de Hinge sobre la sinaptogénesis registrando las frecuencias de mEPSC en neuronas del hipocampo cultivadas. Mientras que Hinge solo no alteraba las transmisión sináptica de línea base, atenuaba los aumentos por HGF y Dihexa en las frecuencias de AMPA (figuras 13A y B). Este efecto se debía probablemente a una atenuación de la espinogénesis promovida por los tratamientos con HGF y Dihexa ya que, sin el efecto antagonizante de Hinge, cada agonista aumentaba las frecuencias de mini-AMPA (figuras 13A-B y figura 10) formando por tanto conexiones sinápticas funcionales. Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que la inhibición de HGF no altera el número de sinapsis funcionales en neuronas tratadas con vehículo pero atenúa los efectos de HGF y Dihexa sobre la sinaptogénesis disminuyendo el número de espinas postsinápticas.

Para apoyar adicionalmente la opinión de que los agonistas Dihexa y Nle1-AngIV actúan a través de HGF y su receptor c-Met, se transfectaron neuronas del hipocampo con ARNhp para inactivar el receptor c-Met. Se verificó la

inactivación del receptor mediante inmunotransferencia frente a un producto génico de c-Met etiquetado con Myc (figura 16). Tal como se esperaba, la estimulación de neuronas del hipocampo transfectadas con mRFP- β -actina con HGF, Dihexa y Nle1-AngIV había potenciado significativamente los árboles dendríticos mientras que las que se transfectaron adicionalmente con ARN de shc-Met no eran diferentes de las neuronas tratadas con control (figura 17). Estos datos proporcionan un apoyo concluyente de la creencia de los inventores de que los ligandos de angiotensina IV Dihexa y Nle1-AngIV actúan a través del sistema de HGF/c-Met.

Se ha mostrado que el ligando de angiotensina IV recién desarrollado Dihexa facilita la adquisición de una tarea de aprendizaje espacial y memoria en ratas tratadas con escopolamina (datos no mostrados). Debido a que es prohibitivamente caro someter a prueba HGF en el laberinto de agua, en su lugar se evaluó su implicación en la cognición empleando el antagonista de HGF Hinge para bloquear las acciones de Dihexa. El tratamiento con el antagonista del receptor colinérgico muscarínico escopolamina hace que las ratas sean amnésicas de manera aguda y por tanto no puedan aprender la tarea. Se observa un efecto de rescate en ratas a las que se les administra Dihexa tras el pretratamiento con escopolamina. Estas ratas presentan una agilización rápida de la tarea y no tuvieron un rendimiento diferente de las ratas tratadas con vehículo. El grupo de ratas que se pretrató con una escopolamina y Hinge no presentó el efecto de rescate observado mediante Dihexa en la preparación de escopolamina (figuras 14A y B). Estos datos demuestran una función del sistema de HGF y c-Met en el aprendizaje y la memoria, y que pueden usarse agentes que imitan la acción de HGF para potenciar el aprendizaje y la memoria en sujetos que lo necesitan.

EJEMPLO 3: Desarrollo de análogos de angiotensina IV como modificadores de factor de crecimiento de hepatocitos/Met

La familia de 6-AH [D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂; en donde X= diversos aminácidos] de análogos de angiotensina IV se unen directamente a factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) e inhiben la capacidad de HGF para formar dímeros funcionales. El miembro de la familia de 6-AH estabilizado metabólicamente, D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, tenía un t_{1/2} en sangre de 80 min en comparación con el compuesto original Norleual (Nle-Tyr-Leu- ψ -(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe, SEQ ID NO: 1), que tenía un t_{1/2} en sangre de < 5 min. Se encontró que los miembros de la familia de 6-AH actuaban como miméticos del dominio de dimerización de HGF (región de bisagra), e inhibían la interacción de una molécula de HGF con un péptido de ³H-bisagra dando como resultado una capacidad atenuada de HGF para activar su receptor Met. Esta interferencia se tradujo en la inhibición de la señalización, proliferación y dispersión dependiente de HGF en múltiples tipos de células a concentraciones por debajo del intervalo picomolar bajo. También se observó una correlación significativa entre la capacidad de los miembros de la familia de 6-AH para bloquear la dimerización de HGF e inhibición de la actividad celular. Además, un miembro de la familia de 6-AH con cisteína en la posición 2 era un antagonista particularmente eficaz de las actividades celulares dependientes de HGF. Este compuesto suprimió la colonización pulmonar por células de melanoma murino B16-F10, que se caracterizan por un sistema de HGF/Met sobreactivo. Conjuntamente estos datos indican que la familia de 6-AH de análogos de AngIV ejercen su actividad biológica modificando la actividad del sistema de HGF/Met y ofrecen el potencial como agentes terapéuticos en trastornos que dependen de o presentan una sobreactivación del sistema de HGF/Met.

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento multifuncional, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor Met son importantes mediadores para la mitogénesis, motogénesis y morfogénesis en un amplio intervalo de tipos de células (Birchmeier *et al.*, 2003) incluyendo células epiteliales (Kakazu *et al.*, 2004), endoteliales (Kanda *et al.*, 2006) y hematopoyéticas (Ratajczak *et al.*, 1997), neuronas (Thompson *et al.*, 2004), melanocitos (Halaban *et al.*, 1992) y hepatocitos (Borowiak *et al.*, 2004). Además, la regulación incorrecta del sistema de HGF/Met conduce a menudo a cambios neoplásicos y a cáncer (tanto en seres humanos como animales) en donde contribuye a la formación de tumores, metástasis tumoral y angiogénesis tumoral (Christensen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). La sobreactivación de este sistema de señalización se vincula de manera rutinaria a un mal pronóstico del paciente (Liu *et al.*, 2010). Por tanto puede esperarse que moléculas que inhiben el sistema de HGF/Met presenten actividad anticancerígena y atenúen transformaciones metastásicas y malignas.

HGF es un factor de crecimiento polipeptídico heteromérico de vertebrados con una estructura de dominios que se asemeja estrechamente a las proteinasas de la familia del plasminógeno (Donate *et al.*, 1994). HGF consiste en siete dominios: un dominio amino terminal, un dominio de dimerización-ligador, cuatro dominios kringle (K1-K4) y un dominio de homología a serina proteinasa (SPH) (Lokker *et al.*, 1992; Chirgadze *et al.*, 1999). El propolipéptido de cadena sencilla se procesa proteolíticamente por convertasas para producir un heterodímero de α (cadena pesada de 55 KDa) y β (cadena ligera de 34 KDa) maduro, que se unen entre sí por medio de una unión disulfuro (Stella y Comoglio, 1999; Birchmeier *et al.*, 2003; Gherardi *et al.*, 2006). Además del procesamiento proteolítico, HGF requiere dimerización para que se active completamente (Lokker *et al.*, 1992; Chirgadze *et al.*, 1999; Youles *et al.*, 2008). Varios informes han mostrado que el HGF forma dímeros y/o multímeros, que se disponen en una orientación de cabeza a cola, antes de su interacción con Met (Gherardi *et al.*, 2006). La superficie de contacto de los dímeros, que abarca los aminoácidos de ligador entre dominios (K122, D123, Y124, I125, R126 y N127) se denomina región de bisagra (Gherardi *et al.*, 2006; Youles *et al.*, 2008). Aunque tanto pre-pro-HGF como el heterodímero unido por

disulfuros activo se unen a Met con alta afinidad, es sólo el heterodímero el que puede activar Met (Lokker *et al.*, 1992; Shet *et al.*, 2008).

5 Estudios recientes en el laboratorio (Yamamoto *et al.*, 2010) han mostrado que concentraciones picomolares del análogo de AngIV, Norleual (Nle-Tyr-Leu- ψ -(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe), pueden inhibir de manera potente el sistema de HGF/Met y se unen directamente a la región de bisagra de HGF bloqueando su dimerización (Kawas *et al.*, 2011). Además, un hexapéptido que representa la región de bisagra real presentaba propiedades bioquímicas y farmacológicas idénticas a las de Norleual (Kawas *et al.*, 2011). La principal implicación de esos estudios era que las moléculas que seleccionan como diana el dominio de dimerización de HGF podrían representar opciones terapéuticas anticancerígenas novedosas y viables. Además, estos datos apoyan el desarrollo de tales moléculas usando el péptido Hinge y/o Norleual como moldes sintéticos.

15 A pesar de su marcado perfil anticancerígeno, Norleual es altamente inestable, lo que hace que su transición a uso clínico sea problemática. Por tanto, se ha desarrollado en el laboratorio una familia de análogos relacionados con Ang IV metabólicamente estables, que se denominan en este caso familia de 6-AH debido a la amida del ácido de 6-aminohexanoico sustituida en la posición C-terminal. Esta sustitución, junto con D-norleucina en el extremo N-terminal, potencia la resistencia metabólica de miembros de la familia.

20 En este ejemplo 3, se demuestra que los miembros de la familia de 6-AH (es decir, miméticos de HGF) tienen estabilidad metabólica superior en comparación con Norleual, se unen a HGF con alta afinidad y actúan como miméticos de región de bisagra; impidiendo por tanto la dimerización de HGF y la activación. Esta interferencia se traduce en la inhibición de la señalización, proliferación y dispersión dependiente de HGF en múltiples tipos de células a una concentración en el intervalo picomolar. Era evidente una correlación positiva entre la capacidad para bloquear la dimerización y la inhibición de los desenlaces celulares de la activación de HGF. Finalmente, D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, un miembro de la familia de 6-AH, suprimía la colonización pulmonar por células de melanoma murino B16-F10, que se caracterizan por un sistema de HGF/Met sobreactivo. Este ejemplo resalta la capacidad de moléculas de tipo AngIV para unirse a HGF, bloquear la dimerización de HGF e inhibir el sistema de HGF/Met. Además, estos miméticos de HGF tienen utilidad como fármacos relacionados con AngIV y pueden funcionar como agentes terapéuticos en trastornos en los que la inhibición del sistema de HGF/Met sería clínicamente ventajosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

35 Animales. Se usaron ratones C57BL/6 de granjas Taconic en los estudios de colonización de pulmón. Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley macho (250+ g) de Harlan Laboratories (CA, EE.UU.) para su uso en estudios farmacocinéticos. Se alojaron los animales y se cuidaron según las directrices de los NIH tal como se describe en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio".

40 Compuestos. Se sintetizaron D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-COOH; en donde X= diversos aminácidos y Norleual (Nle-Tyr-Leu- ψ -(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe, SEQ ID NO: 1) usando métodos en fase sólida basados en Fmoc en el laboratorio de Harding y se purificaron mediante HPLC de fase inversa. Se verificaron la pureza y estructura mediante CL-EM. Se adquirió factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) de R&D Systems (Minneapolis, MN).

45 Anticuerpos. Se adquirió anticuerpo anti-Met de Cell Signaling Technology (Beverly, MA) y se adquirió el anticuerpo frente a fosfo-Met de AbCam, Inc (Cambridge, MA).

50 Cultivo celular. Se hicieron crecer células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) y células de riñón canino Madin Darby (MDCK) en DMEM, suero bobino fetal al 10% (FBS). Se hicieron crecer las células hasta el 100% confluencia antes de su uso. Se privaron de suero las células HEK y MDCK durante 2-24 h antes del inicio del tratamiento con el fármaco.

55 Estudios de estabilidad en sangre. Para comparar la estabilidad en sangre de Norleual y D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, un miembro representativo de la familia de 6-AH, se añadieron 20 μ l de vehículo que contenía compuesto (agua [Norleual] o etanol al 30% [DNle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂]) a 180 μ l de sangre heparinizada y se incubó a 37°C durante diversos tiempos. Para Norleual, se detuvieron las incubaciones a 37°C a 0, 20, 40 y 60 min, y para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, se detuvieron las incubaciones a 0, 1, 3 y 5 h.

60 Al final de cada incubación, se añadieron 20 μ l de Nle¹-AngIV (100 μ g/ml) a cada muestra como patrón interno. Se centrifugaron las muestras de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ a 4°C durante 5 min a 2300x g para sedimentar los eritrocitos, y se transfirió el plasma a tubos limpios. Se precipitaron las muestras de Norleual y D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ añadiendo 3 volúmenes de acetonitrilo enfriado con hielo (ACN) y se agitaron con vórtex las muestras vigorosamente. Se centrifugaron todas las muestras a 4°C, 2300x g durante 5 min y se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios. Entonces se evaporaron las muestras hasta sequedad en un concentrador Savant SpeedVac® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), se reconstituyó el residuo en 225 μ l de metanol al 35%, se agitó con vórtex brevemente, se transfirió a viales de inyector automático de HPLC y se inyectaron 100 μ l en el

sistema de HPLC.

Entonces se separaron las muestras mediante HPLC en una columna Econosphere C18 (100 mm x 2,1 mm) de Grace Davison Discovery Science (Deerfield, IL). Se detectaron los picos y se analizaron mediante métodos de espectroscopía de masas usando un espectrómetro de masas LCMS-2010EV (Shimadzu, Kyoto, Japón). La fase móvil consistía en agua para HPLC (Sigma St. Louis, MO) con ácido trifluoroacético al 0,1% o ácido heptafluorobutírico al 0,1% (Sigma St. Louis, MO) y concentraciones variables de ACN o metanol. Se llevó a cabo la separación usando un método en gradiente, a temperatura ambiental y una velocidad de flujo de 0,3 ml/min (véase más adelante para más información). Se determinaron las semividas de estabilidad suponiendo una descomposición exponencial de una única fase usando el programa gráfico/estadístico Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA).

IV Farmacocinética.

Procedimientos quirúrgicos. Se les permitió a ratas Sprague-Dawley macho (250+ g) alimento (dietas para roedores de Harlan Teklad) y agua a voluntad en la instalación para animales certificada AAALAC. Se alojaron las ratas en salas de temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Se cateterizaron las venas yugulares derechas de las ratas con catéteres Hidrocoat™ de poliuretano estériles (Access Technologies, Skokie, IL, EE.UU.) bajo anestesia con ketamina (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, EE.UU.) e isoflurano (Vet One™, MWI, Meridian, ID, EE.UU.). Se exteriorizaron los catéteres a través de la piel dorsal. Se lavaron los catéteres con solución salina heparinizada antes y después de la recogida de muestras de sangre y se llenaron con disolución de cierre de heparina-glicerol (6 ml de glicerol, 3 ml de solución salina, 0,5 ml de gentamicina (100 mg/ml), 0,5 ml de heparina (10.000 u/ml)) cuando no se usaba durante más de 8 h. Se permitió que los animales se recuperaran de la cirugía durante varios días antes de su uso en cualquier experimento, y se sometieron a ayuno durante la noche antes del experimento farmacocinético.

Estudio farmacocinético. Se colocaron ratas cateterizadas en jaulas metabólicas antes del inicio del estudio y se recogieron muestras de sangre a tiempo cero. Entonces se les dosificó a los animales por vía intravenosa por medio de los catéteres de las venas yugulares, DNle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (24 mg/kg) en etanol al 30%. Tras la dosificación, se recogieron muestras de sangre tal como sigue (los tiempos y los volúmenes de sangre recogidos se enumeran en orden cronológico):

Compuesto	Tiempo (min)	Volumen de sangre recogido (μl)
D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH ₂) ₅ -CONH ₂	0, 12, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300	200, 200, 200, 200, 200, 300, 400, 500, 500

Tras tomarse cada muestra de sangre, se lavó el catéter con disolución salina y se inyectó un volumen de solución salina igual al volumen de sangre extraído (para mantener el volumen de sangre total).

Preparación de muestras de sangre. Tras la recogida en tubos de microcentrífuga de polipropileno sin heparina, se centrifugaron las muestras de sangre inmediatamente a 4°C, 2300x g durante 5 min para eliminar cualquier célula y coágulo y se transfirió el suero a tubos de microcentrífuga limpios. Se añadió un volumen de patrón interno (Nle¹-AngIV, 100 μg/ml) igual a 0,1 veces el volumen de suero de la muestra. Entonces se añadió un volumen de acetonitrilo enfriado con hielo igual a cuatro veces el volumen de suero de la muestra y se agitó con vórtex la muestra vigorosamente durante 30 s. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios, se mantuvieron sobre hielo hasta el final del experimento y se almacenaron a 4°C después hasta su procesamiento adicional.

Se prepararon diluciones en serie de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ en etanol al 30% a partir de la disolución madre usada para dosificar a los animales para determinar las curvas patrón. Se añadieron 20 μl de cada dilución en serie a 180 μl de sangre sobre hielo para obtener concentraciones finales de 0,01 μg/ml, 0,1 μg/ml, 1 μg/ml y 10 μg/ml. Se centrifugaron las muestras a 4°C, 2300x g durante 5 min y se transfirió el suero a tubos de microcentrífuga de polipropileno. Se añadió un volumen de patrón interno (Nle¹-AngIV, 100 μg/ml) igual a 0,1 veces el volumen de suero de la muestra. Entonces se añadió un volumen de acetonitrilo enfriado con hielo igual a cuatro veces el volumen de suero de la muestra y se agitó con vórtex la muestra vigorosamente durante 30 s. Se transfirieron los sobrenadantes a tubos limpios y se almacenaron las muestras a 4°C y se procesaron junto con las muestras del estudio farmacocinético. Se evaporaron todas las muestras hasta sequedad en un concentrador Savant SpeedVac®. Se reconstituyó el residuo en 225 μl de metanol al 35% y se agitó con vórtex brevemente. Entonces se transfirieron las muestras a viales de inyector automático de HPLC y se inyectaron 100 μl en el sistema de HPLC un total de 2 veces (2 análisis de HPLC/EM) para cada muestra.

Sistema cromatográfico y condiciones. El sistema de HPLC/EM usado era de Shimadzu (Kyoto, Japón), consistiendo en un módulo de bus de comunicaciones CBM-20A, bombas LC-20AD, inyector automático SIL-20AC, detector de red de diodos SPD-M20A y espectrómetro de masas LCMS-2010EV. Se lograron la recogida e integración de datos usando software de soluciones de CLEM de Shimadzu. La columna analítica usada fue una Econosphere C18 (100 mm x 2,1 mm) de Grace Davison Discovery Science (Deerfield, IL, EE.UU.). La fase móvil consistía en metanol de calidad para HPLC y agua con ácido trifluoroacético al 0,1%. Se llevó a cabo la separación usando un método no

isocrático (el 40% - 50% de metanol a lo largo de 10 min) a temperatura ambiental y una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Para el análisis de EM, se usó un modo de ión positivo (Scan) para monitorizar la m/z de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ a 542 y la m/z de Nle¹-AngIV (usado para el patrón interno) a 395. Se logró satisfactoriamente una buena separación de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ y el patrón interno en sangre. No eluyeron conjuntamente picos interferentes con el analito o patrón interno. El análisis de pureza de pico reveló un índice de pureza de pico para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ de 0,95 y el patrón interno de 0,94. D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ eluyó a los 5,06 min y el patrón interno a los 4,31 min. Se normalizaron los datos basándose en la recuperación del patrón interno.

10 *Análisis farmacocinético.* Se realizó el análisis farmacocinético usando datos de ratas individuales. Se calcularon la media y desviación estándar (DE) para el grupo. Se calcularon parámetros farmacocinéticos no compartimentales a partir de los perfiles de concentración de fármaco en suero-tiempo mediante el uso del software WinNonlin® (Pharsight, Mountain View, CA, EE.UU.). Se determinaron los siguientes parámetros relevantes cuando fue posible: área bajo la curva de concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el último punto de tiempo (AUC_{0-último}) o extrapolada hasta el infinito (AUC_{0-∞}), concentración C_{máx} en plasma extrapolada hasta tiempo cero (C₀), semivida de eliminación terminal (t_{1/2}), volumen de distribución (V_d) y aclaramiento (CL).

Metabolismo microsómico. Se obtuvieron microsomas de hígado de rata macho de Celsis (Baltimore, MD, EE.UU.). Se siguió el protocolo de Celsis para evaluar el metabolismo de fármacos dependiente de microsomas con adaptaciones menores. Se preparó un sistema de regeneración de NADPH (NRS) tal como sigue: se añadieron NADP 1,7 mg/ml, glucosa-6-fosfato 7,8 mg/ml y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 6 unidades/ml a 10 ml de bicarbonato de sodio al 2% y se usó inmediatamente. Se prepararon en acetonitrilo disoluciones 500 μM de Norleual, D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, piroxicam, verapamilo y 7-etoxicumarina (controles con metabolización baja, moderada y alta, respectivamente). Se suspendieron los microsomas en tampón Tris 0,1 M (pH 7,38) a 0,5 mg/ml y se añadieron 100 μl de la suspensión microsómica a tubos de microcentrifuga preenfriados sobre hielo. A cada muestra, se le añadieron 640 μl de tampón Tris 0,1 M, 10 μl de compuesto de prueba 500 μM y 250 μl de NRS. Se incubaron las muestras en un horno de hibridación con función de asador a 37°C durante los tiempos de incubación apropiados (10, 20, 30 40 ó 60 min). Se transfirieron 500 μl de cada muestra a tubos que contenían 500 μl de acetonitrilo enfriado con hielo con patrón interno por muestra de incubación. Se prepararon muestras de curva patrón en tampón de incubación y se añadieron 500 μl a 500 μl de acetonitrilo enfriado con hielo con patrón interno. Entonces se analizaron todas las muestras mediante cromatografía de líquidos de alta resolución/espectrometría de masas. Se determinaron las concentraciones de fármaco y la pérdida de muestra original en relación con muestras de control negativo que no contenían microsomas. Se determinó el aclaramiento mediante análisis de regresión no lineal para k_e y t_{1/2} y la ecuación Cl_{int} = k_e V_d. Para la correlación *in vitro-in vivo*, se calculó Cl_{int} por kg de peso corporal usando las siguientes mediciones para ratas Sprague-Dawley: 44,8 mg de proteína por g de hígado, 40 g de hígado por kg de peso corporal.

Unión a HGF. Se evaluó la unión de análogos de 6-AH a HGF mediante competencia usando un ensayo de unión soluble. Se incubaron 250 μl de PBS que contenía HGF humano (1,25 ng) con ³H-Hinge, el dominio de dimerización central de HGF, en presencia de concentraciones variables de análogos de 6-AH entre 10⁻¹³ M y 10⁻⁷ M (diluciones semilogarítmicas) durante 40 min a 37°C. Entonces se centrifugaron los productos incubados a través de columnas de centrifugación Bio-Gel P6 (400 μl de volumen empaquetado) durante 1 min para separar ³H-Hinge libre y unido y se recogió el eluyente. Se añadieron cinco mililitros de fluido de centelleo al eluyente, que contenía el ³H-Hinge unido a HGF, y entonces se contó usando un contador de centelleo. Se calcularon las desintegraciones totales por minuto de ³H-Hinge unido basándose en la eficacia de recuento de la máquina. Se determinaron los valores de K_i para la unión de los péptidos usando el programa Prism 5. Se realizaron curvas de unión de competencia por triplicado. Los estudios cinéticos preliminares indicaron que se alcanzó la unión en equilibrio a los 40 min de incubación a 37°C. Se ha mostrado recientemente que ³H-Hinge se une a HGF con alta afinidad (Kawas *et al.*, 2011).

50 Dimerización de HGF. Se evaluó la dimerización de HGF usando PAGE seguido por tinción con plata (Kawas *et al.*, 2011). Se incubó HGF humano a una concentración de 0,08 ng/μl con o sin análogos de 6-AH con heparina a una concentración final de 5 μg/ml. Entonces se añadió tampón de carga a cada muestra y se separó la mezcla mediante PAGE nativa usando geles precolados Criterion XT en gradiente (Bis-Tris al 4-12%; Biorad Laboratories, Hercules, CA). A continuación se tiñó el gel con plata para la detección del monómeros y dímeros de HGF. Se cuantificaron las bandas a partir de imágenes digitales usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad UVP (Upland, CA).

60 Inmunotransferencia de tipo Western. Se sembraron células HEK293 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se hicieron crecer hasta el 95% de confluencia en DMEM que contenía FBS al 10%. Se privaron de suero las células durante 24 horas antes del tratamiento para reducir los niveles basales de fosfo-Met. Tras la privación de suero, se prepararon cócteles compuestos por vehículo y HGF con/sin análogos de 6-AH y se preincubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadió el cóctel a las células durante 10 minutos para estimular el receptor Met y proteínas posteriores. Se recogieron las células usando tampón de lisis RIPA (Upstate) fortalecido con cócteles de inhibidores de fosfatasa 1 y 2 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Se clarificó el lisado mediante

centrifugación a 15.000 nx g durante 15 minutos, se determinaron las concentraciones de proteína usando el ensayo de proteína total BCA (Pierce), y entonces se diluyeron volúmenes apropiados de los lisados con tampón Laemmli reductor 2x y se calentaron durante diez minutos a 95° C. Se resolvieron muestras que contenían cantidades idénticas de proteína usando SDS-PAGE (Criterion, BioRad Laboratories), se transfirieron a nitrocelulosa y se bloquearon en solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió el anticuerpo frente a fosfo-Met al tampón de bloqueo a una concentración final de 1:1000 y se incubó a 4°C durante la noche con agitación suave. Entonces se lavaron las membranas varias veces con agua y TBS (PBS, Tween-20 al 0,05%), se añadió una dilución 1:5000 de antisero de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa del rábano, y se incubaron adicionalmente las membranas durante 1 h a temperatura ambiente. Se visualizaron las proteínas usando el sistema de sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce, Fenton, MO) y se determinaron los pesos moleculares mediante comparación con marcadores de peso molecular de proteína (BenchMark, Invitrogen; y Kaleidoscope, BioRad). Se digitalizaron las imágenes y se analizaron usando un sistema de detección y cuantificación de la radiactividad UVP.

Proliferación celular. Se sembraron 5000 células MDCK en los pocillos de una placa de 96 pocillos en DMEM con FBS al 10%. Para inducir quiescencia celular, se privaron de suero las células durante 24 h antes del inicio del tratamiento. Tras la privación de suero, se añadió al medio HGF 10 ng/ml solo y con diversas concentraciones de análogos de 6-AH o vehículo de PBS. Se permitió que las células crecieran en estas condiciones durante 4 días con una adición diaria de análogos de 6-AH. En el cuarto día, se añadió 1 mg/ml de reactivo de 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)3,5-difenilformazán (MTT, Sigma-Aldrich) preparado en PBS a las células y se incubó durante 4 h. Se añadió dimetilsulfóxido diluido en tampón glicina 0,01 M para solubilizar las membranas celulares y se cuantificó la absorbancia de MTT reducido en el tampón a 590 nm usando un lector de placas (Biotek Synergy 2, Winooski, VT). Se determinó la proliferación dependiente de HGF restando la proliferación basal (en ausencia de HGF) de las tasas de proliferación total en grupos que contienen HGF.

Ensayo de dispersión. Se hicieron crecer células MDCK hasta el 100% de confluencia sobre los cubreobjetos en placas de seis pocillos y se lavaron dos veces con PBS. Entonces se transfirieron de manera aséptica los cubreobjetos confluentes a placas de seis pocillos nuevas que contenían 900 µl de DMEM libre de suero. Se añadieron Norleual, péptido Hinge y/o HGF (20 ng/ml) a pocillos apropiados. Los pocillos de control recibieron vehículo de PBS. Se incubaron las placas a 37°C con el 5% de CO₂ durante 48 horas. Se retiró el medio y se fijaron las células con metanol. Se tiñeron las células con Diff-Quik Wright-Giemsa (Dade-Behring, Newark, DE) y se tomaron imágenes digitales. Se retiraron los cubreobjetos con pinzas y se capturaron más imágenes digitales. Se logró la cuantificación de píxeles de las imágenes usando Image J y se realizó el análisis estadístico usando Prism 5 e InStat v.3.05. (GraphPad; San Diego, CA).

Formación de colonias en el pulmón. Se les inyectaron a ratones C57BL/6 de seis a ocho meses de edad 400.000 células B16-F10 en 200 µl de PBS mediante inyección en la vena de la cola y posteriormente recibieron inyecciones intraperitoneales diarias de o bien D-Nle-X-Cys-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (10 µg/kg y 100 µg/kg) o un control de vehículo de PBS. Dos semanas después, se anestesiaron los ratones y se perfundieron los pulmones con PBS y se extirparon. Se tomaron fotografías y se solubilizaron los pulmones en Triton x-100 al 1%, Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM y azida de sodio al 0,02%. Se rompieron las muestras mediante sonicación (Mixonix, Farmingdale, NY) y se centrifugaron. Se transfirió el sobrenadante a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia de melanina a 410 nm usando un lector de placas.

Análisis estadístico. Se usó análisis de la varianza de una vía independiente (ANOVA) (InStat v.3.05 y Prism 5) para determinar las diferencias entre grupos. Se realizaron pruebas a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer o Bonferroni cuando fuera necesario. Se determinaron las comparaciones estadísticas de dos grupos usando la prueba de la t de Student bilateral (InStat v.3.05 y Prism 5).

RESULTADOS

El análogo de AngIV D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ es más estable metabólicamente que Norleual (Nle-Tyr-Leu-ψ-(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe (SEQ ID NO: 1): Se mostró previamente que el peptidomimético relacionado con AngIV Norleual presentaba actividades anti-HGF/Met, antiangiogénicas y anticancerígenas (Yamamoto *et al.*, 2010). La presencia de enlaces peptídicos no protegidos en las uniones tanto N- como C-terminales predice que Norleual debe tener una mala estabilidad metabólica y un rápido aclaramiento para la circulación, propiedades que pueden limitar su utilidad clínica. En un intento por superar esta limitación, se diseñó una familia de compuestos, la familia de 6-AH y se sintetizó para ofrecer defensa frente a exopeptidasas. La figura 22 demuestra que tal como se esperaba Norleual es inestable en sangre heparinizada mientras que D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ presentaba una estabilidad mejorada.

El análogo de AngIV D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ tiene una semivida de circulación mucho más prolongada que Norleual (Nle-Tyr-Leu-ψ-(CH₂-NH₂)³⁻⁴-His-Pro-Phe (SEQ ID NO: 1)):

Tal como se anticipa a partir de los datos de estabilidad en sangre *in vitro*, D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂

presentaba una semivida de eliminación *in vivo* prolongada de 1012 min tras la inyección i.v. en ratas. Otros parámetros farmacocinéticos relevantes de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ tras una única dosis en bolo i.v. se resumen en la tabla 5. Se modelaron los datos en suero usando el software Win-Nonlin® para realizar el análisis no compartimental. D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ parecía distribuirse extensamente fuera del compartimento de sangre central y/o unirse dentro de los tejidos tal como se evidencia por su gran volumen de distribución (Vd). No se espera que D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ se una sumamente a proteínas plasmáticas según el modelado de relación de estructura-actividad cuantitativa (QSAR) (comentado más adelante) y puesto que la recuperación total a partir del suero era mayor del 35%. Estos resultados, que sugieren que es probable que D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ sea relativamente hidrófobo, están de acuerdo con el desenlace de las estimaciones del modelado de QSAR generado mediante el programa ADMET Predictor® que calculó un coeficiente de reparto en octanol:agua de 28,18 para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (tabla 6).

De manera no sorprendente debido a su estabilidad, carácter hidrófobo y pequeño tamaño, se predijo que D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ estaba disponible por vía oral. El valor de P_{ef} representa la permeabilidad en el yeyuno humano eficaz predicha de la molécula. El valor de P_{ef} predicho para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (1,53) es intermedio entre los valores de P_{ef} para enalapril (1,25) y piroxicam (2,14), dos fármacos biodisponibles por vía oral. También se predijo que el 42,68 por ciento de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ no estaba unido a proteínas plasmáticas en circulación, estando por tanto disponible para su distribución en los tejidos.

También contribuía a su lenta eliminación de la sangre la falta de metabolismo de fase I de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ no presentaba metabolismo detectable a lo largo de 90 min en un ensayo de metabolismo *in vitro* usando microsomas de hígado de rata (datos no mostrados). Conjuntamente estos datos indican que D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ es más estable metabólicamente que Norleual, presenta una semivida alargada en la circulación y penetra en el tejido eficazmente. Globalmente estas propiedades farmacocinéticas favorables justifican la evaluación mecanística y terapéutica de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ y moléculas relacionadas.

Los análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ se unen a HGF y compiten con el péptido ³H-Hinge por la unión a HGF:

Se analizaron varios miembros de la familia de 6-AH, D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, para determinar la capacidad para competir por la unión de ³H-Hinge a HGF. Tal como resultará evidente a continuación, los miembros de la familia de 6-AH presentan una capacidad variada para bloquear la acción biológica de HGF. Como tal, se evaluaron las propiedades de unión a HGF de una selección de análogos con actividad biológica variable para determinar si había una relación entre actividad inhibitoria y afinidad por HGF. La hipótesis que se formula era que los análogos se unen directamente a HGF y afectan al secuestro de HGF en una forma inactiva. Para comenzar la evaluación de esta idea, se usó un péptido de ³H-Hinge como sonda para evaluar la unión a HGF directa de los péptidos. El uso de ³H-Hinge para estudiar con sonda la interacción se basaba en la capacidad de ³H-Hinge para unirse específicamente y con alta afinidad a HGF (Kawas *et al.*, 2011). Se inició un estudio de competición con varios derivados de la familia de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. Este estudio demostró que diferentes análogos tienen capacidades variables para unirse a HGF, y que los análogos que muestran antagonismos frente a HGF están actuando como miméticos de Hinge. Se encontró que derivados de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ competían con Hinge por la unión a HGF y presentaban un intervalo de afinidades por HGF, oscilando las K_i entre 1,37x10⁻⁷-1,33x10⁻¹⁰ M (figura 23). Tal como se esperaba parece que hay relación entre la capacidad de un compuesto para unirse a HGF y su capacidad para bloquear la dimerización e inhibir actividades dependientes de HGF (véanse las figuras 25, 26, 27).

Análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ bloquean la dimerización de HGF: Varios informes han mostrado que el HGF necesita formar homodímeros y/o multímeros, antes de su activación de Met (Chirgadze *et al.*, 1999; Gherardi *et al.*, 2006). Este dímero está dispuesto en una orientación de cabeza a cola; la superficie de contacto del dímero comprende una región central, la región de bisagra que es importante para la formación y orientación apropiadas del dímero. Un examen de conservación de secuencias homólogas frente a todos los posibles transcritos que eran independientes de y no se derivaban de angiotensinógeno que buscaba similitudes con AngIV identificó homología parcial con la región de bisagra (Yamamoto *et al.*, 2010) de la familia de proteínas de plasminógeno, que incluyen el propio plasminógeno, su producto de degradación antiangiogénico, angioestatina, y las hormonas proteicas factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y proteína estimulante de macrófagos (MSP). Además, se mostró que el análogo de AngIV Norleual, que es un potente inhibidor del sistema de HGF/Met, se unía a HGF y bloqueaba su dimerización (Kawas *et al.*, 2011). Este conocimiento, junto con la demostración de que algunos miembros de la familia de 6-AH se unen con alta afinidad a la región de bisagra de HGF, condujo a la expectativa de que podría esperarse que otros análogos de AngIV activos, como miembros de la familia de 6-AH, inhibieran la dimerización de HGF y que la capacidad de un análogo individual para unirse a HGF e inhibir procesos dependientes de HGF debe reflejarse en su capacidad para atenuar la dimerización. Los datos en la figura 24 confirman esta expectativa demostrando que D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ y D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, que se unen a HGF con alta afinidad (figura 23) y atenúan eficazmente procesos dependientes de HGF (figuras 25, 26, 27), bloquean completamente la formación de dímeros de HGF. En cambio D-Nle-Met-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, que tienen baja afinidad por HGF (figura 23) y presenta poca actividad anti-HGF/Met, no puede bloquear la dimerización a la concentración sometida a prueba. El análogo de D-Nle-Trp-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, que presenta una inhibición intermedia de la dimerización, tiene de

manera predecible una afinidad moderada por HGF y una capacidad moderada para inhibir procesos dependientes de HGF (figuras 25, 26, 27). Conjuntamente estos datos confirman la expectativa de que análogos de 6-AH activos puedan bloquear la dimerización y además que el potencial inhibidor de la dimerización de un análogo se traduce, al menos cualitativamente, en su capacidad para bloquear procesos dependientes de HGF.

5

El análogo de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ atenúa la señalización de Met dependiente de HGF:

Tras establecer que los miembros de la familia de 6-AH presentan una gama de perfiles inhibidores de la dimerización de y unión a HGF, a continuación se determinó si estas propiedades serían paralelas a la capacidad de un compuesto para inhibir la señalización de Met. Una característica de receptores de factores de crecimiento unidos a tirosina cinasa como Met es una etapa de autofosforilación de un residuo de tirosina requerida, que es esencial para el reclutamiento final de diversas proteínas de señalización con dominio SH₂. Por tanto se evaluó la capacidad de varios análogos de 6-AH para inducir la fosforilación de tirosina de Met. Tal como se anticipó, los datos en la figura 25 demuestran que tanto D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ como D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂, que se unen a HGF con alta afinidad (figura 23) y bloquean eficazmente su dimerización (figura 24) podían bloquear la autofosforilación de Met. El análogo de D-Nle-Trp-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ tenía actividad inhibidora intermedia, y el análogo de D-Nle-Met-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ no mostró capacidad para afectar a la activación de Met. Conjuntamente, estos datos indican que la capacidad de análogos de 6-AH para inhibir la activación de Met dependiente de HGF era paralela a su afinidad de unión a HGF y su capacidad para bloquear la dimerización.

20

Análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ afectan a la proliferación de células MDCK estimulada por HGF/Met:

La activación de Met inicia múltiples respuestas celulares incluyendo aumento de la proliferación y motilidad, supervivencia potenciada y diferenciación (Zhang y Vande Woude, 2003). Como prueba inicial de la capacidad de miembros de la familia de 6-AH para alterar la actividad celular dependiente de HGF, se evaluó la capacidad de varios miembros de la familia para modificar la actividad proliferativa de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), un modelo celular convencional para investigar el sistema de HGF/Met (Stella y Comoglio, 1999). Tal como se observa en la figura 26, hay un amplio intervalo de actividad inhibidora frente a la proliferación celular dependiente de HGF. De manera similar a los resultados de los experimentos de unión y dimerización, los análogos de Cys2 y Tyr2 presentaban una marcada actividad inhibidora. El análogo de Asp2, que no se había evaluado en los estudios anteriores, también presentaba una actividad inhibidora pronunciada. Los análogos de Trp2, Phe2 y Ser2 también mostraban actividad inhibidora, aunque menos que la observada con los análogos más potentes. La disminución en la proliferación de MDCK dependiente de HGF por debajo de los niveles de control para algunos compuestos no es sorprendente puesto que el experimento se llevó a cabo en el 2% de suero, que probablemente contiene algún nivel de HGF. El péptido Hinge (KDYIRN), que representa el dominio de dimerización de HGF, se incluyó como control positivo. Un estudio reciente ha demostrado que Hinge se une a HGF con alta afinidad bloqueando su dimerización y actuando como un potente inhibidor de las actividades celulares dependientes de HGF incluyendo proliferación de MDCK (Kawas *et al.*, 2011).

Análogos de D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ modifican la dispersión celular mediada por HGF/Met en células MDCK:

La dispersión celular es el efecto distintivo de la señalización de HGF/Met; un proceso caracterizado por disminución de la adhesión celular, aumento de la motilidad y aumento de la proliferación. El tratamiento de células MDCK con HGF inicia una respuesta de dispersión que se produce en dos fases. En primer lugar, las células pierden su adhesión célula a célula y se polarizan. En segundo lugar, se separan completamente y migran lejos unas de otras. Se espera que si los miembros de la familia de 6-AH pueden inhibir el sistema de HGF/Met, entonces deben poder modificar la dispersión de células MDCK dependiente de HGF.

Las figuras 27 A y B indican que los análogos que se encontraron anteriormente que bloquean la dimerización de HGF eran inhibidores eficaces de la dispersión celular mediada por HGF/Met en células MDCK, mientras que los análogos con escasa afinidad por HGF eran ineficaces. La figura 28 muestra una correlación entre el bloqueo de la dimerización de HGF y la afinidad de unión a HGF y la capacidad para impedir la dispersión de células MDCK.

D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ inhibe la migración de células de melanoma murino B16-F10 y la formación de colonias en el pulmón:

Para evaluar la utilidad prospectiva de los miembros de la familia de 6-AH' como opciones terapéuticas potenciales, se examinó la capacidad de [D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂], un análogo que presenta un fuerte perfil inhibidor frente a la activación de Met dependiente de HGF, para suprimir la capacidad migratoria y de formación de colonias en el pulmón de células de melanoma murino B16-F10. Las células de melanoma B16 sobreexpresan Met (Ferraro *et al.*, 2006), y se eligieron para estos estudios porque la señalización de Met es crítica para su migración, invasión y metástasis. Como prueba final para la significación fisiológica del bloqueo por la familia de 6-AH de los desenlaces celulares dependientes de Met, se evaluó la capacidad de D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ para inhibir la formación de colonias pulmonares por células B16-F10 tras inyección en la vena de la cola en ratones. La figura 29a ilustra la respuesta inhibidora que se observó con inyecciones intraperitoneales diarias a dos dosis (10 µg/kg/día y 100 µg/kg/día) de [D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂]. La figura 29b proporciona una evaluación cuantitativa de la

65

colonización pulmonar midiendo el contenido en melanina, lo que refleja el nivel de colonización por melanoma. Conjuntamente estos datos demuestran que el tratamiento de células de melanoma con D-Nle-Cys-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ previno radicalmente la colonización del pulmón y resaltan la utilidad de los análogos de 6-AH como agentes anticancerígenos.

DISCUSIÓN:

Recientemente ha crecido el interés en el desarrollo de opciones terapéuticas que seleccionan como diana el sistema de HGF/Met. En la actualidad este interés ha estado dirigido principalmente por la constatación de que la sobreactivación del sistema HGF/c-Met es una característica común de muchos cánceres humanos (Comoglio *et al.*, 2008; Eder *et al.*, 2009). Sin embargo, la utilidad potencial de fármacos anti-HGF/Met, va más allá de su uso como agentes anticancerígenos. Por ejemplo, la implicación reconocida del sistema de HGF/c-Met en la regulación de la angiogénesis (véase la revisión) apoya la utilidad potencial de antagonistas de HGF/Met para el tratamiento de trastornos en los que el control de la vascularización tisular sería clínicamente beneficiosa. Estos podrían incluir enfermedades hipervasculares del ojo como retinopatía diabética y el tipo húmedo de degeneración macular. En ambos casos están actualmente en uso terapias antiangiogénicas (véase la revisión- Jeganathan, 2011). También están examinándose compuestos antiangiogénicos como opciones de tratamiento en una variedad de otros trastornos que van desde la obesidad en donde se selecciona como diana la vascularización del tejido adiposo (Daquinag *et al.*, 2011), hasta enfermedad hepática crónica (Coulon *et al.*, 2011), psoriasis en donde está considerándose la aplicación tópica de fármacos antiangiogénicos (Canavese *et al.*, 2010).

Actualmente la industria farmacéutica está empleando dos enfoques generales para bloquear las actividades celulares dependientes de Met (Eder *et al.*, 2009; Liu X *et al.* 2010). La primera implica el desarrollo de anticuerpos humanizados de un solo brazo frente a HGF (Burgess *et al.*, 2006; Stabile *et al.*, 2008) o Met (Martens *et al.*, 2006). El segundo enfoque utiliza "inhibidores de cinasa", que bloquean las consecuencias intracelulares de la activación de Met. Estos "inhibidores de cinasa" son moléculas hidrófobas pequeñas que funcionan intracelularmente compitiendo por la unión de ATP al dominio cinasa de Met inhibiendo así la autofosforilación del receptor., 2002; Christensen *et al.*, 2003; Sattler *et al.*, 2003). A pesar de la promesa de los enfoques biológico y de inhibidores de cinasa, que están representados actualmente en ensayos clínicos, ambos tienen limitaciones que surgen de consideraciones de toxicidad o especificidad y/o coste (Hansel *et al.*, 2010; Maya, 2010).

Un tercer enfoque, que el laboratorio de los presentes inventores está siguiendo, aprovecha una etapa en el proceso de activación del sistema de HGF-Met; concretamente la necesidad de que se dimerice HGF antes de que pueda activar Met. Por tanto se ha seleccionado como diana el proceso de dimerización desarrollando moléculas que imitan el dominio de dimerización, la región de bisagra, con la idea de que puedan actuar como reemplazos dominantes negativos. Estudios recientes han validado este enfoque general demostrando que las moléculas diseñadas alrededor de angiotensina IV (Yamamoto *et al.*, 2010) o la propia secuencia de bisagra (Kawas *et al.*, 2011) pueden unirse a HGF, bloquear su dimerización y atenuar las acciones celulares dependientes de HGF. Los estudios descritos en el presente documento representan una primera etapa hacia la producción de opciones terapéuticas útiles dirigidas a la dimerización de HGF. El enfoque primario de este estudio era mejorar las características farmacocinéticas de un compuesto original, Norleual (Yamamoto *et al.*, 2010) al tiempo que se mantenía la actividad biológica. Para este fin se sintetizó y evaluó satisfactoriamente una familia de nuevas moléculas, la familia de 6-AH [D-Nle-X-Ile-NH-(CH₂)₅-COOH]. Un subconjunto de estas moléculas no sólo había mejorado la estabilidad metabólica y el t_{1/2} circulante sino que presentaba una actividad *in vitro* e *in vivo* excelente.

Además de caracterizar una nueva familia de antagonistas de HGF/Met, este ejemplo demuestra una relación cualitativa entre la capacidad de un compuesto para unirse a HGF y bloquear la dimerización de HGF y su actividad biológica *in vitro*. Además estos estudios proporcionan datos de estructura-actividad iniciales y allanan el camino para una evaluación más extensa. Las modificaciones químicas que se hicieron en los extremos N- y C-terminales de la molécula de AngIV y la mejora resultante en la estabilidad metabólica resaltan el papel crítico desempeñado por las exopeptidasas en el metabolismo de moléculas derivadas de AngIV. La importancia demostrada de la protección de los extremos terminales para las características farmacocinéticas sugiere numerosos enfoques de síntesis adicionales que pueden aplicarse incluyendo la inserción de uniones no peptídicas (véase Sardinia *et al.*, 1994) entre los aminoácidos primero y segundo, el reemplazo del aminoácido N-terminal con un aminoácido no α y acilación N-terminal.

En resumen, estos estudios validan adicionalmente la noción de que la selección como diana del dominio de dimerización de HGF es un medio eficaz de inhibición del sistema de HGF/Met. Además demuestran que pueden producirse moléculas con características farmacocinéticas favorables resaltando por tanto su utilidad clínica.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos estimados con WinNonlin® para D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ tras la administración intravenosa en ratas Sprague-Dawley macho adultas. Media +/- EEM; n = 5. AUC_{0-∞} = área bajo la curva. Vd = volumen de distribución. Cp⁰ = concentración inicial de fármaco en suero. t_{1/2} = semivida biológica. KE = velocidad de eliminación. CL = velocidad de aclaramiento.

Parámetro farmacocinético

D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ (media ± EEM)

AUC _{0-∞} (min.ng/ml)	692 ± 293,2
Vd (L/kg)	104186,8 ± 65034,3
Cp ⁰ (ng/ml)	68,2 ± 32,2
t1/2 (min)	1012,0 ± 391,4
KE (min ⁻¹)	0,001 ± 0,0002
CL (L/min/kg)	58,3 ± 15,6

5 Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas predichas de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂. Se estimaron las propiedades fisicoquímicas de D-Nle-Tyr-Ile-NH-(CH₂)₅-CONH₂ tras el modelado con el software ADMET Predictor®. LogP es el coeficiente de reparto en octanol:agua. P_{ef.} es la permeabilidad en yeyuno humano eficaz predicha. P_{prom} es la permeabilidad intestinal promedio aproximada a lo largo de todo el tracto intestinal humano. Pr_{no uni.} Es el porcentaje no unido a proteínas plasmáticas.

Propiedad fisicoquímica	Valor predicho
logP	1,45
P _{ef.}	1,53
P _{prom}	0,39
Pr _{no uni.}	42,68

10 Aunque la invención se ha descrito en cuanto a sus realizaciones preferidas, los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede ponerse en práctica con modificación.

Por consiguiente, la presente invención no debe limitarse a las realizaciones descritas anteriormente.

15 Bibliografía

- 15 Achim, C. L., S. Katyal, *et al.* (1997). "Expression of HGF and cMet in the developing and adult brain." *Brain Res Dev Brain Res* 102(2): 299-303.
- 20 Abounader R, Lal B, Luddy C, Koe G, Davidson B, Rosen EM y Lattera J (2002) In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. *FASEB JOURNAL* 16:108-110.
- 25 Aguirre Ghiso JA, Alonso DF, FarAfa-as EF, Gomez DE y de Kier JoffAfa" EB (1999) Deregulation of the signaling pathways controlling urokinase production. Its relationship with the invasive phenotype. *European journal of biochemistry / FEBS* 263:295-304.
- Akimoto, M., A. Baba, *et al.* (2004). "Hepatocyte growth factor as an enhancer of nmda currents and synaptic plasticity in the hippocampus." *Neuroscience* 128(1): 155-62.
- 30 Aoki M, Warita H, Suzuki N, Itoyama Y. (2009) Development of motor neuron restorative therapy in amyotrophic lateral sclerosis using hepatocyte growth factor. *Rinsho Shinkeigaku* 49: 814-817.
- Ahmet I, Sawa Y, Iwata K y Matsuda H (2002) Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates cardiac remodeling in the canine heart: A novel gene therapy for cardiomyopathy. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 124:957-963.
- 35 Balschun, D., D. Moechars, *et al.* "Vesicular glutamate transporter VGLUT1 has a role in hippocampal long-term potentiation and spatial reversal learning." *Cereb Cortex* 20(3): 684-93.
- 40 Bean J, Brennan C, Shih J-Y, Riely G, Viale A, Wang L, Chitale D, Motoi N, Szoke J, Broderick S, Balak M, Chang W-C, Yu C-J, Gazdar A, Pass H, Rusch V, Gerald W, Huang S-F, Yang P-C, Miller V, Ladanyi M, Yang C-H y Pao W (2007) MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:20932.
- 45 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E y Vande Woude GF (2003) MET, METASTASIS, MOTILITY AND MORE, in *Nature Reviews Molecular Cell Biology* pp 915-925, Nature Publishing Group.
- Birchmeier, C., E. Sonnenberg, *et al.* (1993). "Tyrosine kinase receptors in the control of epithelial growth and morphogenesis during development." *Bioessays* 15(3): 185-90.
- 50 Boccaccio C, Gaudino G, Gambarotta G, Galimi F y Comoglio PM (1994) Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF. *The Journal of biological chemistry* 269:12846-12851.

55

- Boros P y Miller CM (1995) Hepatocyte growth factor: A multifunctional cytokine. *Lancet* 345:293.
- Borowiak M, Garratt AN, Wajsborth T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C y Wigler MH (2004) Met Provides Essential Signals for Liver Regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:10608-10613.
- Boulton M (1999) A role for hepatocyte growth factor in diabetic retinopathy? *British journal of ophthalmology*. 83:763.
- Braszko, J. J., G. Kupryszewski, *et al.* (1988). "Angiotensin II-(3-8)-hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats." *Neuroscience* 27(3): 777-83.
- Burgess T, Coxon A, Meyer S, Sun J, Rex K, Tsuruda T, Chen Q, Ho SY, Li L, Kaufman S, McDorman K, Cattley RC, Elliott G, Zhang K, Feng X, Jia XC, Green L, Radinsky R y Kendall R (2006) Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-Met-dependent human tumors. *Cancer research* 66:1721-1729.
- Calissano P, Matrone C, Amadoro G (2010) Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins to Alzheimer's disease. *Dev Neurobiol* 70:372-383.
- Canavese M, Altruda F, Ruzicka T, y Schaubert J (2010) Barkmeier A. J & Carvounis P E (2011) Retinal pigment epithelial tears and the management of exudative age-related macular degeneration. *Seminars in Ophthalmology* 26: 94-103.
- Christensen JG Burrows J y Salgia R (2005) c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Letters* 225:1-26.
- Christensen JG, Schreck R, Burrows J, Kuruganti P, Chan E, Le P, Chen J, Wang X, Ruslim L, Blake R, Lipson KE, Ramphal J, Do S, Cui JJ, Cherrington JM y Mendel DB (2003) A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Research* 63:7345-7355.
- Chirgadze DY, Hepple JP, Zhou H, Byrd RA, Blundell TL y Gherardi E (1999) Crystal structure of the NK1 fragment of HGF/SF suggests a novel mode for growth factor dimerization and receptor binding. *Nature structural biology* 6:72-79.
- Comoglio PM, Giordano S y Trusolino L (2008) Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nature reviews. Drug discovery* 7:504-516.
- Coulon S, Heindryckx F, Geerts A, Van Steenkiste, C Colle I, y Van Vlierberghe H (2011) Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver International* 31: 146-162.
- Danilkovitch-Miagkova A y Zbar B (2002) Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors. *The Journal of clinical investigation* 109:863-867.
- Daquinag A C, Zhang Y, y Kolonin M G (2011) Vascular targeting of adipose tissue as an anti-obesity approach. *Trends in Pharmacological Sciences* 32:300-307.
- Date, I., N. Takagi, *et al.* (2004). "Hepatocyte growth factor improved learning and memory dysfunction of microsphere- embolized rats." *J Neurosci Res* 78(3): 442-53.
- Davis, C. J., E. A. Kramar, *et al.* (2006). "AT4 receptor activation increases intracellular calcium influx and induces a non-N-methyl-D-aspartate dependent form of long-term potentiation." *Neuroscience* 137(4): 1369-79.
- De Bundel, D., H. Demaegdt, *et al.* (2010) "Involvement of the AT1 receptor subtype in the effects of angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 on hippocampal neurotransmitter levels and spatial working memory." *J Neurochem* 112(5): 1223-34.
- Derksen PW, de Gorter DJ, Meijer HP, Bende RJ, van Dijk M, Lokhorst HM, Bloem AC, Spaargaren M y Pals ST (2003) The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia: official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 17:764-774.
- Dikmen SS, Corrigan JD, Levin HS, Machamer J, Stiers W, Weisskopf MG (2009) Cognitive outcome following traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil.* 24:430-438.
- Donate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S y Blundell TL (1994) Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Science* 3:2378-2394.

- Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Jr., Bladt F, Birchmeier C, Barres BA y Tessier-Lavigne M (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron* 17:1157-1172.
- 5 Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA y LoRusso PM (2009) Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15:2207-2214.
- 10 El-Husseini, A. E., E. Schnell, *et al.* (2000). "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses." *Science* 290(5495): 1364-8.
- Elsen GE, Choi LY, Prince VE, Ho RK. (2009) The autism susceptibility gene met regulates zebrafish cerebellar development and facial motor neuron migration. *Dev Biol* 335: 78-92.
- 15 Fafalios A, Ma J, Tan X, Stoops J, Luo J, Defrances MC, Zarnegar R.(2011) A hepatocyte growth factor receptor (Met)-insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism. *Nat Med.*17:1577-84.
- Ferrario D, Corso S, Fasano E, Panieri E, Santangelo R, Borrello S, Giordano S, Pani G y Galeotti T (2006) Prometastatic signaling by Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene* 25:3689-3698.
- 20 Ferreira, A. y M. Rapoport (2002). "The synapsins: beyond the regulation of neurotransmitter release." *Cell Mol Life Sci* 59(4): 589-95.
- 25 Fisher, A., Z. Pittel, *et al.* (2003). "M1 muscarinic agonists can modulate some of the hallmarks in Alzheimer's disease: implications in future therapy." *J Mol Neurosci* 20(3): 349-56.
- Flaquer M, Franquesa M, Vidal A, Bolaños N, Torras J, Lloberas N, Herrero-Fresneda I, Grinyó JM, Cruzado JM. (2010) Hepatocyte growth factor gene therapy enhances infiltration of macrophages and may induce kidney repair in db/db mice as a model of diabetes. *Diabetologia*. 30 de marzo. [Publicación electrónica antes de la impresión].
- 30 Fujimoto J y Kaneda Y (1999) Reversing liver cirrhosis: impact of gene therapy for liver cirrhosis. *GENE THERAPY - BASINGSTOKE-* 6:305-306.
- 35 Gao X, Deng P, Xu ZC, Chen J (2011) Moderate traumatic brain injury causes acute dendritic and synaptic degeneration in the hippocampal dentate gyrus.. *PLoS One.*6:e24566.
- Gherardi E, Sandin S, Petoukhov MV, Finch J, Youles ME, A" Fverstedt L-Gr, Miguel RN, Biundell TL, Vande Woude GF, Skoglund U y Svergun DI (2006) Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling, in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* págs. 4046-4051.
- 40 Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, Vande Woude G (2012) Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat Rev Cancer*. 12:89-103.
- 45 Halaban R, Rubin JS, Funasaka Y, Cobb M, Boulton T, Faletto D, Rosen E, Chan A, Yoko K, White W y *et al.* (1992) Met and hepatocyte growth factor/scatter factor signal transduction in normal melanocytes and melanoma cells. *Oncogene* 7:2195-2206.
- Han, K. y E. Kim (2008). "Synaptic adhesion molecules and PSD-95." *Prog Neurobiol* 84(3): 263-83.
- 50 Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA y George AJ (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9:325-338.
- Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K y Nakanishi I (1998) Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in Gastric Cancers: Detection by Fluorescence In Situ Hybridization. *Laboratory investigation*. 78:1143.
- 55 Harding, J. W., V. I. Cook, *et al.* (1992). "Identification of an AII(3-8) [AIV] binding site in guinea pig hippocampus." *Brain Res* 583(1-2): 340-3.
- 60 Hartmann G, Weidner KM, Schwarz H y Birchmeier W (1994) The motility signal of scatter factor/hepatocyte growth factor mediated through the receptor tyrosine kinase met requires intracellular action of Ras. *The Journal of biological chemistry* 269:21936-21939.
- 65 Hayashi Y, Kawazoe Y, Sakamoto T, Ojima M, Wang W, Takazawa T, Miyazawa D, Ohya W, Funakoshi H, Nakamura T, Watabe K. (2006) Adenoviral gene transfer of hepatocyte growth factor prevents death of injured adult motoneurons after peripheral nerve avulsion. *Brain Res* 21: 187-195.

- Hering, H. y M. Sheng (2001). "Dendritic spines: structure, dynamics and regulation." *Nat Rev Neurosci* 2(12): 880-8.
- 5 Honda S, Kagoshima M, Wanaka A, Tohyama M, Matsumoto K y Nakamura T (1995) Localization and functional coupling of HGF and c-Met/HGF receptor in rat brain: implication as neurotrophic factor. *Brain research. Molecular brain research* 32:197-210.
- Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M, Kelsen DP y Chaganti RS (1990) Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer research* 50:6417-6422.
- 10 Ieraci A, Forni PE, Ponzetto C. Viable hypomorphic signaling mutant of the Met receptor reveals a role for hepatocyte growth factor in postnatal cerebellar development. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15200-5.
- Jeganathan, V. S. E. (2011) Anti-angiogenesis drugs in diabetic retinopathy. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12:369-372.
- 15 Jin H, Yang R, Li W, Ogasawara AK, Schwall R, Eberhard DA, Zheng Z, Kahn D y Paoni NF (2003) Early Treatment with Hepatocyte Growth Factor Improves Cardiac Function in Experimental Heart Failure Induced by Myocardial Infarction. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 304:654-705.
- 20 Jun EJ, Kim HS y Kim YH (2007) Role of HGF/c-Met in serum-starved ARPE-19 cells. *Korean journal of ophthalmology: KJO* 21:244-250.
- Jung, W., E. Castren, *et al.* (1994). "Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain." *J Cell Biol* 126(2): 485-94.
- 25 Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya-Shimada W, Nakamura T, Matsumoto K, Matsuyama S, Nakamura T. (2009) Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 65:194-200.
- 30 Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya W, Nakamura T. (2007) Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res* 59: 446-456.
- 35 Kaibori M, Inoue T, Oda M, Naka D, Kawaguchi T, Kitamura N, Miyazawa K, Kwon AH, Kamiyama Y y Okumura T (2002) Exogenously Administered HGF Activator Augments Liver Regeneration through the Production of Biologically Active HGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290:475-481.
- Kane MJ, Angoa-Pérez M, Briggs DI, Viano DC, Kreipke CW, Kuhn DM (2011). A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 12 de septiembre. [Publicación electrónica antes de la impresión].
- 40 Kaplan GB, Vasterling JJ, Vedak PC (2010) Brain-derived neurotrophic factor in traumatic brain injury, post-traumatic stress disorder, and their comorbid conditions: role in pathogenesis and treatment. *Behav Pharmacol.* 21:427-437.
- 45 Kasai, H., M. Fukuda, *et al.* (2001)"Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition." *Trends Neurosci* 33(3): 121-9.
- Kakazu A, Chandrasekher G, y Bazan HE (2004) HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad- but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 45:3485-3492.
- 50 Kanda S, Kanetake H y Miyata Y (2006) HGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells is regulated by Src. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 344:617-622.
- 55 Kato N, Nakanishi K, Nemoto K. (2009) Efficacy of HGF gene transfer for various nervous injuries and disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 9: 300-306.
- Katsura Y, Okano T, Noritake M, Kosano H, Nishigori H, Kado S y Matsuoka T (1998) Hepatocyte growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and other retinal disorders. *Diabetes care* 21:1759-1763.
- 60 Kawas LH, Yamamoto BJ, Wright JW, Harding JW. (2011) Mimics of the dimerization domain of hepatocyte growth factor exhibit anti-met and anti-cancer activity. *Journal of Pharmacological and Experimental therapeutics*, 339: 509-518.
- 65 Kawas LH, McCoy AT, Yamamoto BJ, Wright JW, Harding JW. (2012) Development of Angiotensin IV Analogs as

- Hepatocyte Growth Factor/Met Modifiers. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. (30 de noviembre, publicación electrónica antes de la impresión).
- 5 Kennedy, M. B. (1997). "The postsynaptic density at glutamatergic synapses." *Trends Neurosci* 20(6): 264-8.
- Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Miyazaki Y, Kiyohara T, Hiraoka S y Matsuzawa Y (2000) Met/HGF receptor modulates bcl-w expression and inhibits apoptosis in human colorectal cancers. *British Journal of Cancer* 83:668-673.
- 10 Koike H, Ishida A, Shimamura M, Mizuno S, Nakamura T, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. prevention of onset of Parkinson's disease by in vivo gene transfer of human hepatocyte growth factor in rodent model: a model of gene therapy for Parkinson's disease. (2006) *Gen Ther* 13:1639-1644.
- 15 Kondo I, Ohmori K, Oshita A, Takeuchi H, Fuke S, Shinomiya K, Noma T, Namba T y Kohno M (2004) Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer: the first demonstration of myocardial transfer of a "functional" gene using ultrasonic microbubble destruction. *Journal of the American College of Cardiology* 44:644-653.
- 20 Kramar, E. A., D. L. Armstrong, *et al.* (2001). "The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus in vitro." *Brain Res* 897(1-2): 114-21.
- Krebs, L. T., J. M. Hanesworth, *et al.* (2000). "A novel angiotensin analog with subnanomolar affinity for angiotensin converting enzyme." *J Pharmacol Exp Ther* 293(1): 260-7.
- 25 Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H y Tahara E (1992) Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189:227-232.
- Lan F, Xu J, Zhang X, Wong VW, Li X, Lu A, Lu W, Shen L, Li L. Hepatocyte growth factor promotes proliferation and migration in immortalized progenitor cells. (2008) *Neuroreport*. 19:765-9.
- 30 Lee, J., A. L. Albiston, *et al.* (2004). "Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats." *Neuroscience* 124(2): 341-9.
- 35 Lim CS y Walikonis RS. Hepatocyte growth factor and c-Met promote dendritic maturation during hippocampal neuron differentiation via the Akt pathway. (2008) *Cell Signal*. 20: 825-35.
- Liu X, Newton RC y Scherle PA (2009) Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends in Molecular medicine* 16:37-45.
- 40 Liu X, Yao W, Newton RC y Scherle PA (2008) Targeting the c-MET signaling pathway for cancer therapy. *Expert opinion on investigational drugs* 17:997-1011.
- Liu X, Newton RC y Scherle PA (2010) Developing Met pathway inhibitors for cancer therapy: progress and challenges. *Trends in Molecular Medicine* 16:37-45.
- 45 Liu Y y Yang J (2006) Hepatocyte growth factor: New arsenal in the fights against renal fibrosis? *Kidney International* 70:238-240.
- 50 Lokker NA, Mark MR, Luis EA, Bennett GL, Robbins KA, Baker JB y Godowski PJ (1992) Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding. *The EMBO journal* 11:2503-2510.
- Maina F, Klein R.(1999) Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci*. 2:213-7.
- 55 Malgaroli, A. y R. W. Tsien (1992). "Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons." *Nature* 357(6374): 134-9.
- Martens T, Schmidt N-O, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M y Lamszus K (2006) A Novel One-Armed Anti-c-Met Antibody Inhibits Glioblastoma Growth In vivo. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 12:6144.
- 60 Masel BE, DeWitt DS (2010) Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma*. 27:1529-1540.
- 65 Maya BL (2010) Endocrine side effects of broad-acting kinase inhibitors. *Endocrine-Related Cancer* 17:233-244.
- Meighan, S. E., P. C. Meighan, *et al.* (2006). "Effects of extracellular matrix-degrading proteases matrix

- metalloproteinases 3 and 9 on spatial learning and synaptic plasticity." *J Neurochem* 96(5): 1227-41.
- Meijering, E., M. Jacob, *et al.* (2004). "Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images." *Cytometry A* 58(2): 167-76.
- 5 Michieli P, Basilico C, Pennacchietti S, Maffe A, Tamagnone L, Giordano S, Bardelli A y Comoglio PM (1999) Mutant Met-mediated transformation is ligand-dependent and can be inhibited by HGF antagonists. *Oncogene* 18.
- 10 Miller CT, Lin L, Casper AM, Lim J, Thomas DG, Orringer MB, Chang AC, Chambers AF, Giordano TJ y Glover TW (2006) Genomic amplification of MET with boundaries within fragile site FRA7G and upregulation of MET pathways in esophageal adenocarcinoma. *ONCOGENE -BASINGSTOKE-* 25:409-418.
- 15 Morotti A, Mila S, Accornero P, Tagliabue E, y Ponzetto C (2002) K252a inhibits the oncogenic properties of Met, the HGF receptor. *Oncogene* 21:4885-4893.
- Nagahara y Tuszynski (2011) Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 10:209-19.
- 20 Nakanishi K, Uenoyama M, Tomita N, Morishita R, Kaneda Y, Ogihara T, Matsumoto K, Nakamura T, Maruta A, Matsuyama S, Kawai T, Aurues T, Hayashi T e Ikeda T (2002) Gene Transfer of Human Hepatocyte Growth Factor into Rat Skin Wounds Mediated by Liposomes Coated with the Sendai Virus (Hemagglutinating Virus of Japan). *The American journal of pathology.* 161:1761.
- 25 Nicoleau C, Benzakour O, Agasse F, Thiriet N, Petit J, Prestoz L, Roger M, Jaber M, Coronas V. Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. (2009) *Stem Cells.* 27:408-19.
- 30 Parr C, Watkins G, Mansel RE y Jiang WG (2004) The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:202-211.
- Patel AD, Gerzanich V, Geng Z, Simard JM. (2010) Glibenclamide reduces hippocampal injury and preserves rapid spatial learning in a model of traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 69; 1177-1190.
- 35 Pederson, E. S., J. W. Harding, *et al.* (1998). Attenuation of scopolamine-induced spatial learning impairments by an angiotensin IV analog. *Regul Pept* 74: 97-103.
- 40 Peng KY, Horng LY, Sung HC, Huang HC, Wu RT.(2011) Hepatocyte growth factor has a role in the amelioration of diabetic vascular complications via autophagic clearance of advanced glycation end products: Dispo85E, an HGF inducer, as a potential botanical drug. *Metabolism.* 60:888-92.
- Pietronave S, Forte G, Locarno D, Merlin S, Zamperone A, Nicotra G, Isidoro C, Di Nardo P y Prat M (2010) Agonist monoclonal antibodies against HGF receptor protect cardiac muscle cells from apoptosis. *American journal of physiology.* 298:H1155.
- 45 Potempa S y Ridley AJ (1998) Activation of Both MAP Kinase and Phosphatidylinositide 3-Kinase by Ras Is Required for Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-induced Adherens Junction Disassembly. *Molecular biology of the cell /* 9:2185.
- 50 Qi L, Cui X, Dong W, Barrera R, Nicastro J, Coppa GF, Wang P, Wu R. (2011) Ghrelin Attenuates Brain Injury after Traumatic Brain Injury and Uncontrolled Hemorrhagic Shock in Rats. *Mol Med.* (Publicación electrónica antes de la impresión).
- 55 Rangasamy SB, Soderstrom K, Bakay RAE y Kordower JH. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. (2010) *Progress in Brain Research* 184: 237-264.
- Ratajczak MZ, Marlicz W, Ratajczak J, Wasik M, Machalinski B, Carter A y Gewirtz AM (1997) Effect of hepatocyte growth factor on early human haemopoietic cell development. *British Journal of Haematology* 99:228-236.
- 60 Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich DW 3rd, Bullock MR (2010) Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *J Neurosurg.* 112:1125-1138.
- Ridley AJ, Comoglio PM y Hall A (1995) Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Molecular and cellular biology* 15:1110-1122.
- 65 Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH y Woude GFV (1994) Invasiveness and Metastasis of NIH 3T3 Cells Induced by Met-Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Autocrine Stimulation. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 91:4731-4735.

Santos OF, Moura LA, Rosen EM, Nigam SK. (1993) Modulation of HGF-induced tubulogenesis and branching by multiple phosphorylation mechanisms. *Dev Biol* 159: 535-548.

Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, Shirazian S, Liang C, Podar K, Christensen JG, y Salgia R (2003) A novel small molecule met inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPRMET tyrosine kinase. *Cancer Research* 63:5462-5469.

Schwarzbach E, Bonislawski DP, Xiong G, Cohen AS (2006) Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. *Hippocampus*. 16:541-550.

Shang A, Liu K, Wang H, Wang J, Hang X, Yang Y, Wang Z, Zhang C, Zhou D (2011) Neuroprotective effects of neuroglobin after mechanical injury. *Neurol Sci*. 14 de septiembre. [Publicación electrónica antes de la impresión].

Sheth PR, Hays JL, Elferink LA y Watowich SJ (2008) Biochemical Basis for the Functional Switch That Regulates Hepatocyte Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Activation, in *Biochemistry* págs. 4028-4038.

Stabile LP, Rothstein ME, Keohavong P, Jin J, Yin J, Land SR, Dacic S, Luong TM, Kim KJ, Dulak AM y Siegfried JM (2008) Therapeutic targeting of human hepatocyte growth factor with a single neutralizing monoclonal antibody reduces lung tumorigenesis. *Molecular Cancer Therapeutics* 7:1913-1922.

Stella MC y Comoglio PM (1999) HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 31:1357-1362.

Stubley-Weatherly, L., J. W. Harding, *et al.* (1996). "Effects of discrete kainic acid-induced hippocampal lesions on spatial and contextual learning and memory in rats." *Brain Res* 716(1-2): 29-38.

Sun W, Funakoshi H y Nakamura T (2002) Localization and functional role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor c-met in the rat developing cerebral cortex. *Molecular Brain Research* 103.

Takeo S, Takagi N y Takagi K (2007) [Ischemic brain injury and hepatocyte growth factor]. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 127:1813-1823.

Takeuchi D, Sato N, Shimamura M, Kurinami H, Takeda S, Shinohara M, Suzuki S, Kojima M, Ogihara T y Morishita R (2008) Alleviation of Abeta-induced cognitive impairment by ultrasound-mediated gene transfer of HGF in a mouse model. *Gene therapy* 15:561-571.

Tannock I (2005) *The basic science of oncology*. McGraw-Hill, Medical Pub. Division, Nueva York.

Thewke, D. P. y N. W. Seeds (1996). "Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor, c-met, and tissue-type plasminogen activator during development of the murine olfactory system." *J Neurosci* 16(21): 6933-44.

Thompson J, Dolcet X, Hilton M, Tolcos M y Davies AM (2004) HGF promotes survival and growth of maturing sympathetic neurons by PI-3 kinase- and MAP kinase-dependent mechanisms. *Molecular and Cellular Neurosciences* 27:441-452.

Tong CY, Hui AB, Yin XL, Pang JC, Zhu XL, Poon WS y Ng HK (2004) Detection of oncogene amplifications in medulloblastomas by comparative genomic hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *Journal of neurosurgery* 100:187-193.

Trapp T, Kögler G, El-Khattouti A, Sorg RV, Besselmann M, Föcking M, Bührle CP, Trompeter I, Fischer JC y Wernet P (2008) Hepatocyte Growth Factor/c-MET Axis-mediated Tropism of Cord Blood-derived Unrestricted Somatic Stem Cells for Neuronal Injury. *Journal of Biological Chemistry* 283.

Tyler, W. J. y L. Pozzo-Miller (2003). "Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones." *J Physiol* 553(Pt 2): 497-509.

Tyndall, S. J. y R. S. Walikonis (2006). "The receptor tyrosine kinase Met and its ligand hepatocyte growth factor are clustered at excitatory synapses and can enhance clustering of synaptic proteins." *Cell Cycle* 5(14): 1560-8.

Tyndall SJ y Walikonis RS (2007) Signaling by hepatocyte growth factor in neurons is induced by pharmacological stimulation of synaptic activity. *Synapse (Nueva York, N.Y.)* 61:199-204.

Ueda H, Nakamura T, Matsumoto K, Sawa Y y Matsuda H (2001) A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats. *Cardiovascular research* 51:41-50.

- Urbanek, K., M. Rota, *et al.* (2005). "Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival." *Circ Res* 97(7): 663-73.
- 5 Wang TW, Zhang H, Gyetko MR, Parent JM. (2011) Hepatocyte growth factor acts as a mitogen and chemoattractant for postnatal subventricular zone-olfactory bulb neurogenesis. *Mol Cell Neurosci.* 48: 38-50.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Padiaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK y Zarnegar R (2002) A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Molecular Cell* 9:411-421.
- 10 Wayman, G. A., M. Davare, *et al.* (2008). "An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by downregulating p250GAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26): 9093-8.
- Wayman, G. A., S. Impey, *et al.* (2006). "Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2." *Neuron* 50(6): 897-909.
- 15 Wayner, M. J., D. L. Armstrong, *et al.* (2001). "Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo." *Peptides* 22(9): 1403-14.
- 20 Weidner KM, Behrens Jr, Vandekerckhove J y Birchmeier W (1990) Scatter Factor: Molecular Characteristics and Effect on the Invasiveness of Epithelial Cells. *The Journal of Cell Biology* 111:2097-2108.
- Wright, J. W., J. A. Clemens, *et al.* (1996). "Effects of LY231617 and angiotensin IV on ischemia-induced deficits in circular water maze and passive avoidance performance in rats." *Brain Res* 717(1-2): 1-11.
- 25 Wright, J. W. y J. W. Harding (1985) "The brain RAS and Alzheimer's disease." *Exp Neurol* 223(2): 326-33.
- Wright, J. W. y J. W. Harding (2008). "The angiotensin AT4 receptor subtype as a target for the treatment of memory dysfunction associated with Alzheimer's disease." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 9(4): 226-37.
- 30 Wright, J. W., L. Stublely, *et al.* (1999). "Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning." *J Neurosci* 19(10): 3952-61.
- Wright, J. W., B. J. Yamamoto, *et al.* (2008). "Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets." *Prog Neurobiol* 84(2): 157-81.
- 35 Xiao G-H, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuchi Y, Woude GFV y Testa JR (2001) Anti-Apoptotic Signaling by Hepatocyte Growth Factor/Met via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:247-252.
- 40 Xu W y Wu SG (1999) The possible relationship between hepatomegaly and release of HGF into plasma induced by clofibrate in rats, in.
- Yamamoto BJ, Elias PD, Masino JA, Hudson BD, McCoy AT, Anderson ZJ, Varnum MD, Sardinia MF, Wright JW y Harding JW (2010) The Angiotensin IV Analog Nle-Tyr-Leu-ψ-(CH2-NH2)3-4-His-Pro-Phe (Norleual) Can Act as a Hepatocyte Growth Factor/c-Met Inhibitor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 333:161.
- 45 Yamamoto Y, Livet J, Pollock RA, Garces A, Arce V, deLapeyrière O, Henderson CE. (1997) Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development* 124: 2903-2913.
- 50 Yasumatsu, N., M. Matsuzaki, *et al.* (2008). "Principles of long-term dynamics of dendritic spines." *J Neurosci* 28(50): 13592-608.
- 55 You WK, McDonald DM (2008) The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep.* 41:833-839.
- Youles M, Holmes O, Petoukhov MV, Nessen MA, Stivala S, Svergun DI y Gherardi E (2008) Engineering the NK1 Fragment of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor as a MET Receptor Antagonist, in *Journal of Molecular Biology* págs. 616-622.
- 60 Zhang B, Chen X, Lin Y, Tan T, Yang Z, Dayao C, Liu L, Jiang R, Zhang J (2011) Impairment of synaptic plasticity in hippocampus is exacerbated by methylprednisolone in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Res.*;1382:165-172.
- 65 Zhang BL, Chen X, Tan T, Yang Z, Carlos D, Jiang RC, Zhang JN (2011) Traumatic brain injury impairs synaptic

plasticity in hippocampus in rats. Chin Med J (Engl). 124:740-745.

5 Zhang L, Himi T, Morita I y Murota S (2000) Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. Journal of neuroscience research 59:489-496.

Zhang YW y Vande Woude GF (2003) HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. Journal of Cellular Biochemistry 88:408-417.

10 Zhu Y, Hojo Y, Ikeda U y Shimada K (2000) Production of hepatocyte growth factor during acute myocardial infarction. Heart (British Cardiac Society) 83:450-455.

Lista de secuencias

15 <110> Washington State University Research Foundation

<120> MIMÉTICOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE HEPATOCITOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

20 <130> 03170033ta

<150> Documento US61/471.122

<151> 02-04-2011

25 <150> Documento US61/471.124

<151> 02-04-2011

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Ligando de angiotensina sintético

<220>

40 <221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Norleucina

<220>

45 <221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(4)

<223> Un enlace peptídico reducido (-CH₂-NH₂-)

<400> 1

Xaa Tyr Leu His Pro Phe

1

5

50

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 2

60 gtgtcaggag gtgtttggaa ag 22

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de bisagra sintético

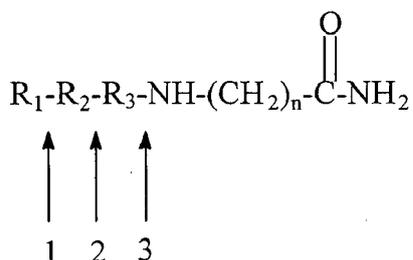
5

<400> 3

Asp Tyr Ile Arg Asn Cys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Mimético de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que tiene la fórmula general:



5

en la que

10 R_1 es uno de un grupo N-acilo, y un aminoácido, seleccionándose dicho aminoácido del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina, ácido aspártico, arginina, isoleucina, serina, histidina, glicina, cisteína, metionina, triptófano, lisina, norvalina, ornitina y s-bencilcisteína;

15 R_2 es un aminoácido seleccionado del grupo seleccionado del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina, ácido aspártico, arginina, isoleucina, serina, histidina, glicina, cisteína, metionina, triptófano, lisina y valina;

R_3 es isoleucina; y

n oscila entre 3-6;

20 y en la que los enlaces covalentes 1, 2 y 3 se seleccionan del grupo que consiste en enlaces peptídicos o enlaces peptídicos reducidos.

25 2. Mimético de HGF según la reivindicación 1, en el que R_1 es i) un grupo N-acilo grupo y se selecciona del grupo que consiste en hexanoílo, heptanoílo, pentanoílo, butanoílo, propanoílo, acetanoílo y benzoílo, o ii) un aminoácido seleccionado de tirosina, fenilalanina, ácido aspártico, arginina, isoleucina, serina, histidina, glicina, cisteína, metionina, triptófano, lisina, norvalina, ornitina y s-bencilcisteína.

3. Mimético de HGF según la reivindicación 1, en el que R_2 es tirosina.

30 4. Mimético de HGF según la reivindicación 1, en el que dicho mimético de HGF es ácido hexanoico-tirosina-isoleucina-amida del ácido (6)-amino-hexanoico.

5. Composición, que comprende:

35 al menos un mimético de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador, estando dicho mimético de HGF disuelto o distribuido en dicho portador.

40 6. Composición según la reivindicación 5, que comprende además al menos otro agente bioactivo diferente de dicho al menos un mimético de HGF.

7. Composición según la reivindicación 6, en la que dicho al menos otro agente bioactivo se selecciona del grupo que consiste en antidepresivos, fármacos psicoactivos y analgésicos.

45 8. Uno o más miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción cognitiva en un sujeto que lo necesita.

9. Uno o más miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos para su uso según la reivindicación 8, adaptados para administración realizada múltiples veces a lo largo de un periodo de tiempo.

50 10. Uno o más miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos para su uso según la reivindicación 9, mediante lo cual la cantidad de dicho mimético de HGF administrado se ajusta basándose en resultados de prueba obtenidos sometiendo a prueba la cognición de dicho sujeto durante dicho periodo de tiempo.

55 11. Uno o más miméticos de factor de crecimiento de hepatocitos para su uso según la reivindicación 8, en los que dicho mimético de HGF es ácido hexanoico-tirosina-isoleucina-amida del ácido (6)-amino-hexanoico.

12. Mimético de HGF según la reivindicación 1 para uso médico en la expansión de la conectividad sináptica y/o producción de reemplazo neuronal en un sujeto que lo necesita.
- 5 13. Mimético de HGF para su uso según la reivindicación 12 adaptado para administración realizada después de que dicho sujeto haya padecido traumatismo de la médula espinal.
- 10 14. Mimético de HGF según la reivindicación 1 para su uso en i) el tratamiento de demencia en un sujeto que lo necesita, ii) para su uso en la producción de neuroprotección o inducción de neuroregeneración en un sujeto que lo necesita, iii) para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, iv) para su uso en el tratamiento de diabetes en un sujeto que lo necesita, v) para su uso en el tratamiento de enfermedad fibrótica incluyendo fibrosis cardíaca, pulmonar, renal y hepática en un sujeto que lo necesita, vi) para su uso en el tratamiento de insuficiencia vascular incluyendo trombosis venosa profunda y oclusión de arterias coronarias en un sujeto que lo necesita, vii) para su uso en la facilitación de la cicatrización de heridas en un sujeto que lo necesita, o viii) para su uso en el retardo o la reversión o de la hipervascularización del ojo en enfermedades incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular en un sujeto que lo necesita.
- 15 15. Uso de un mimético de HGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para mejorar la función cognitiva en individuos con capacidades cognitivas normales de los mismos.
- 20

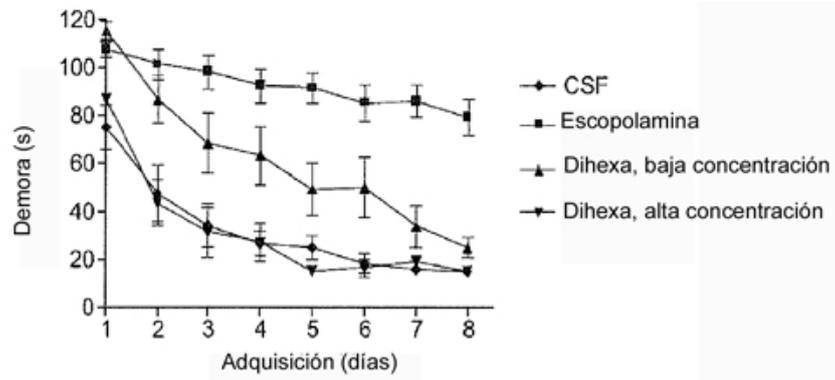


Figura 1A

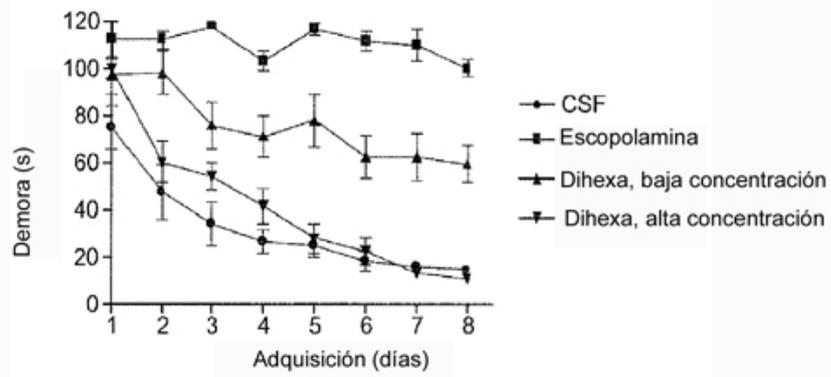


Figura 1B

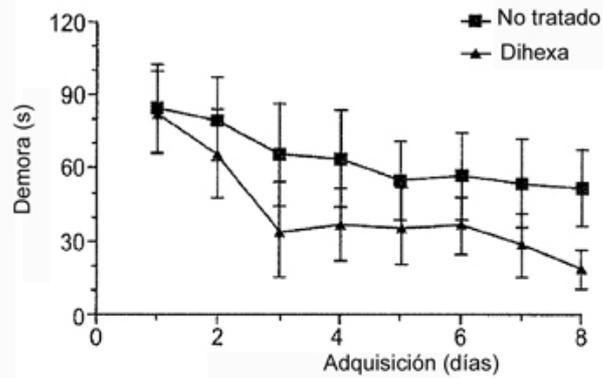


Figura 1C

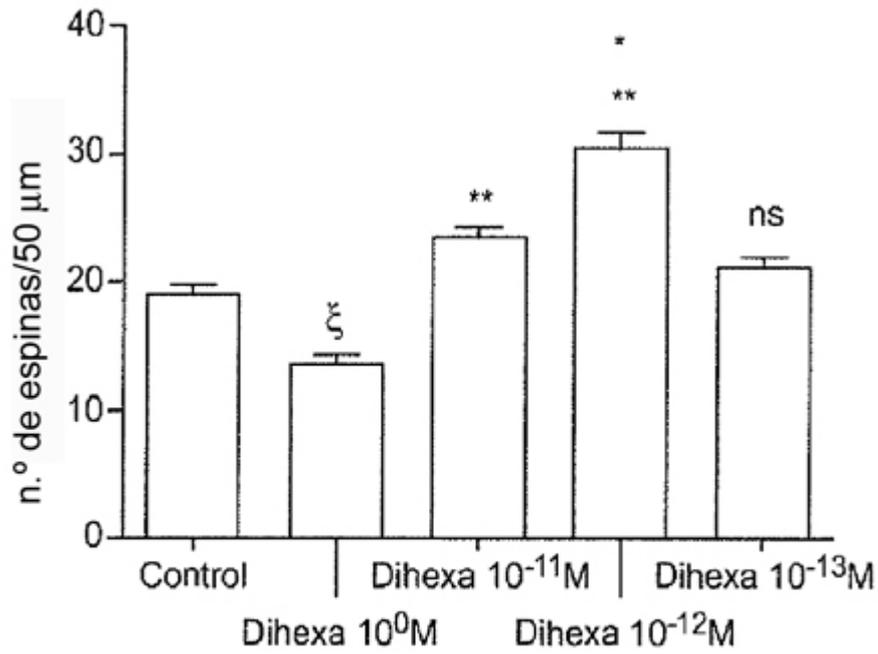


Figura 2A

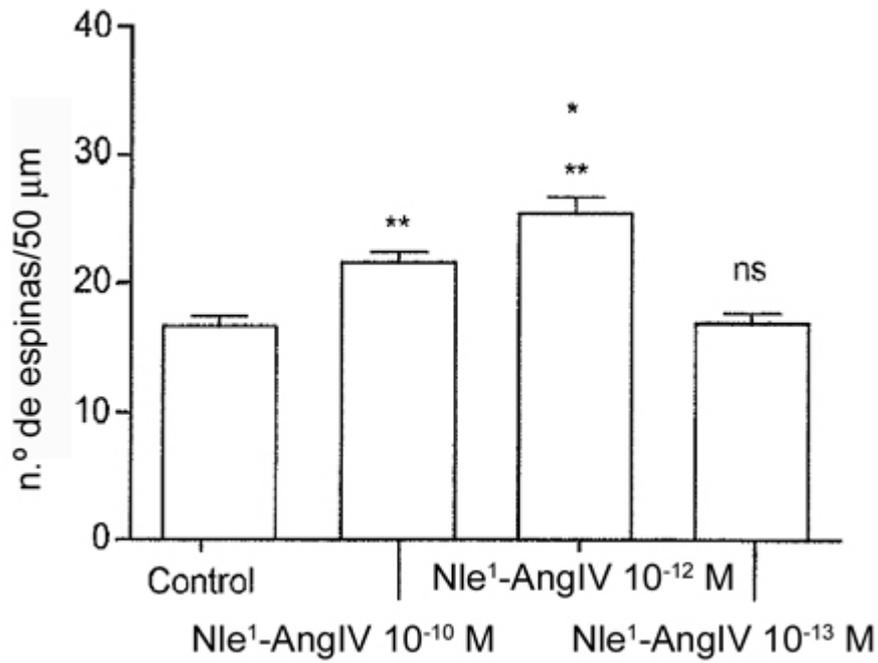


Figura 2B

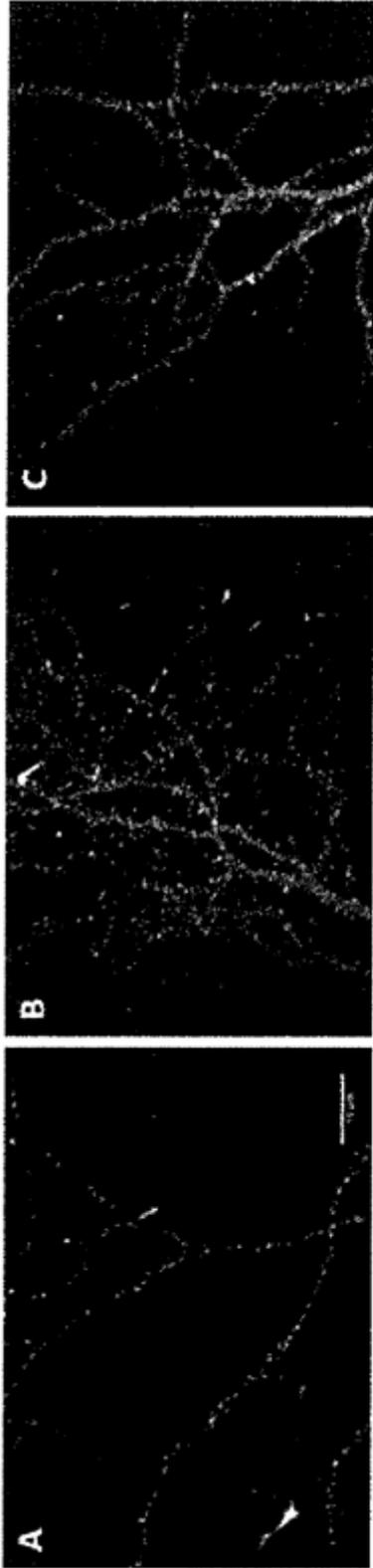


Figura 3A

Figura 3B

Figura 3C

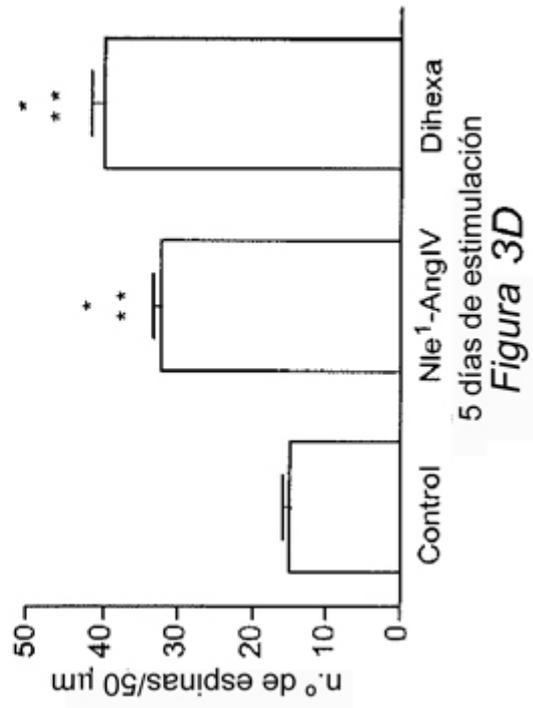


Figura 3D

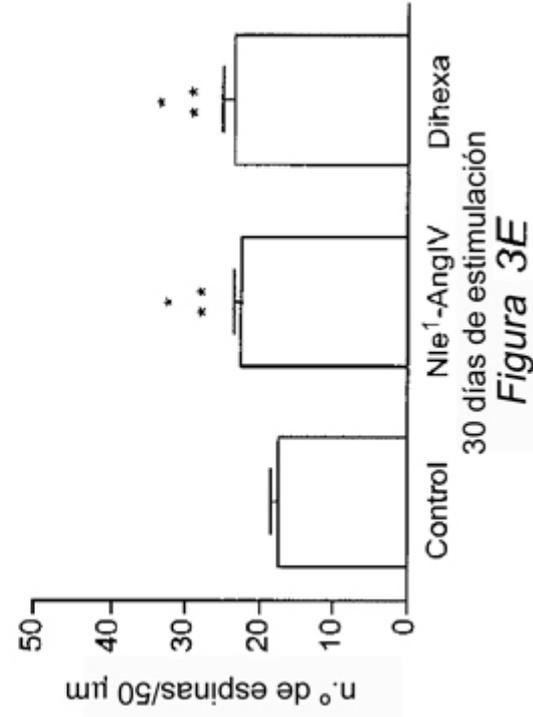


Figura 3E

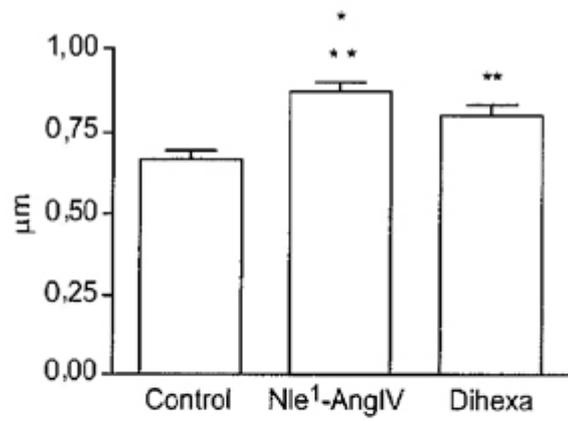


Figura 4

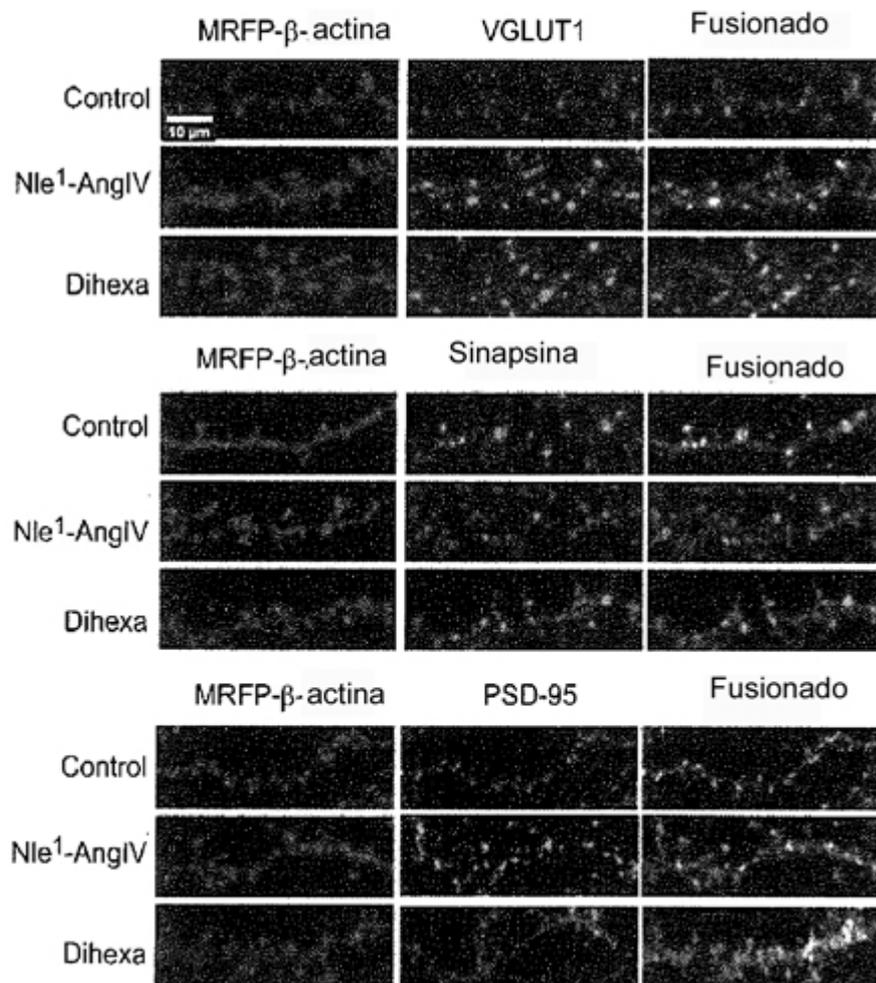


Figura 5A

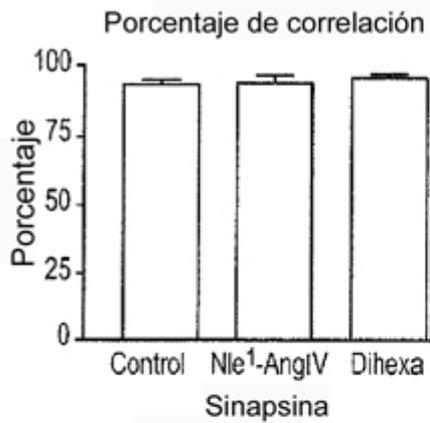


Figura 5B

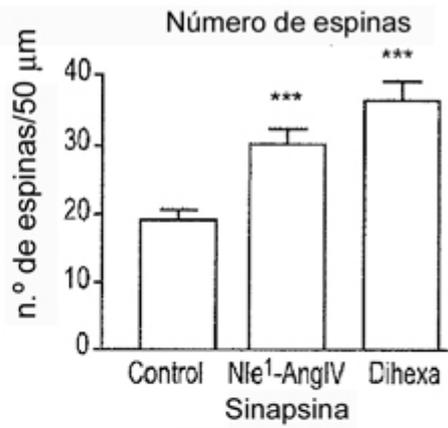


Figura 5C

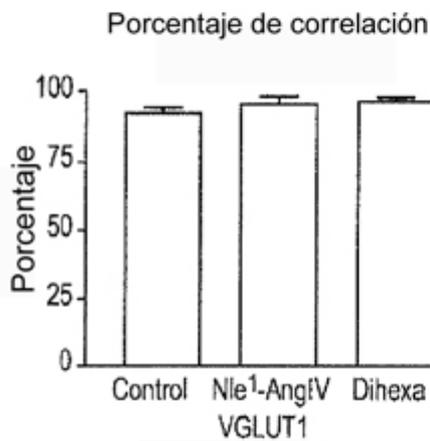


Figura 5D

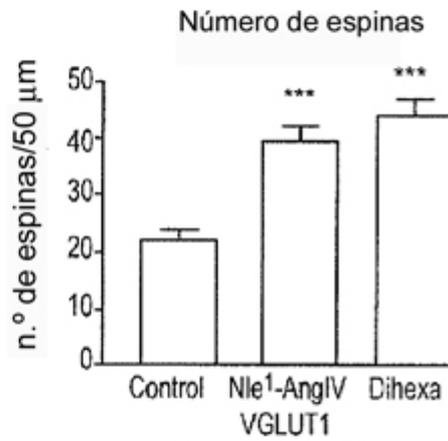


Figura 5E

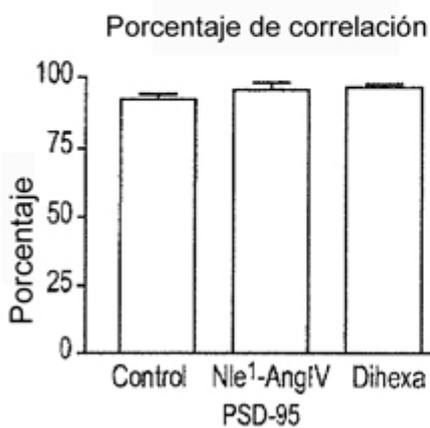


Figura 5F

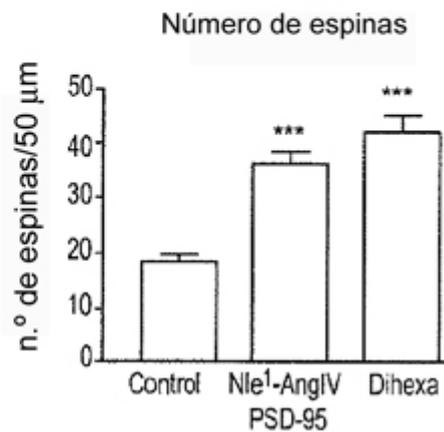


Figura 5G

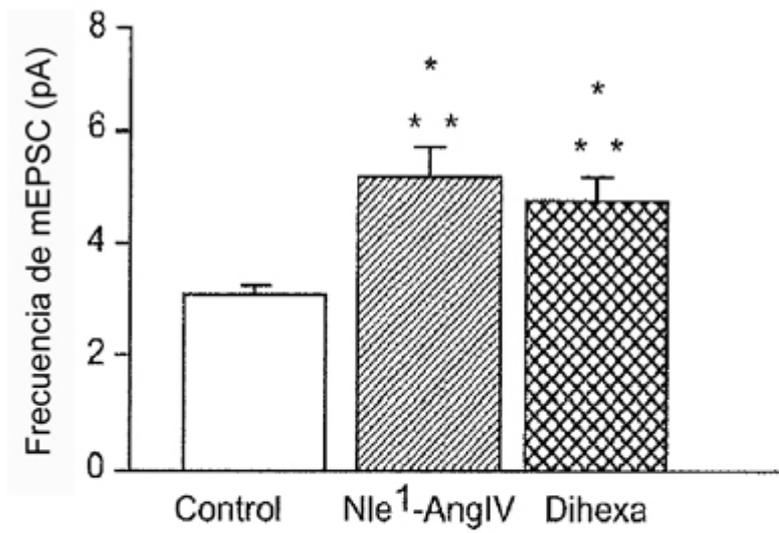


Figura 6A

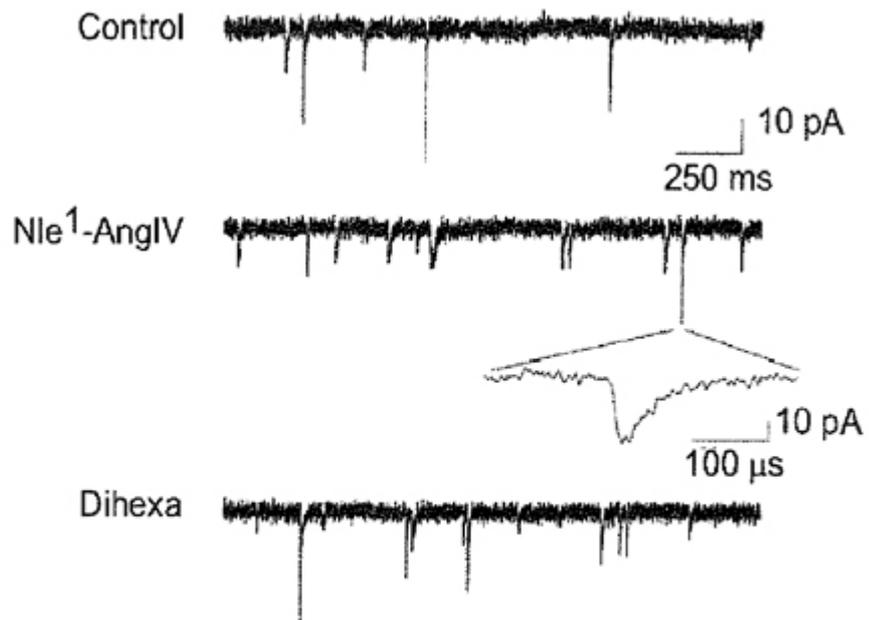


Figura 6B

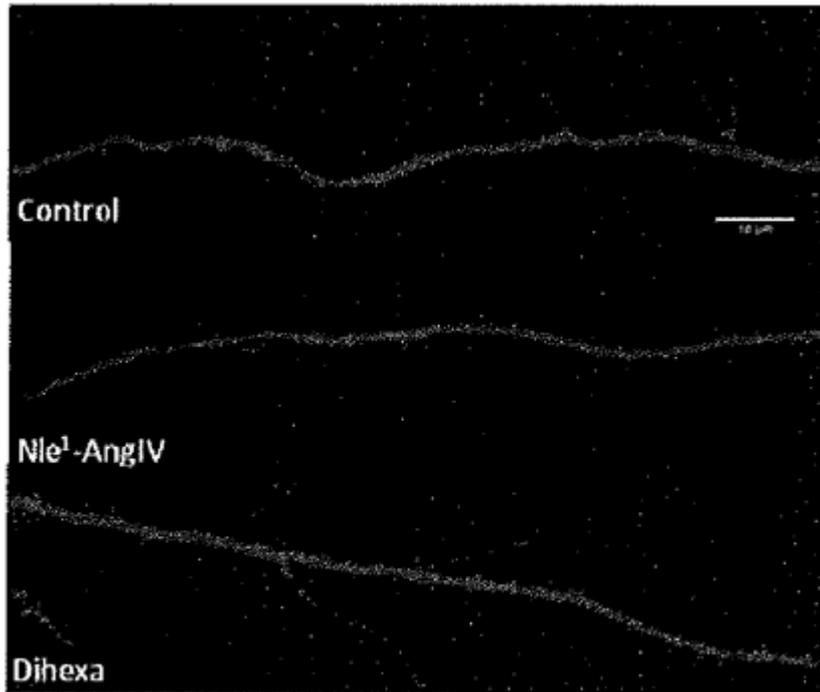


Figura 7A

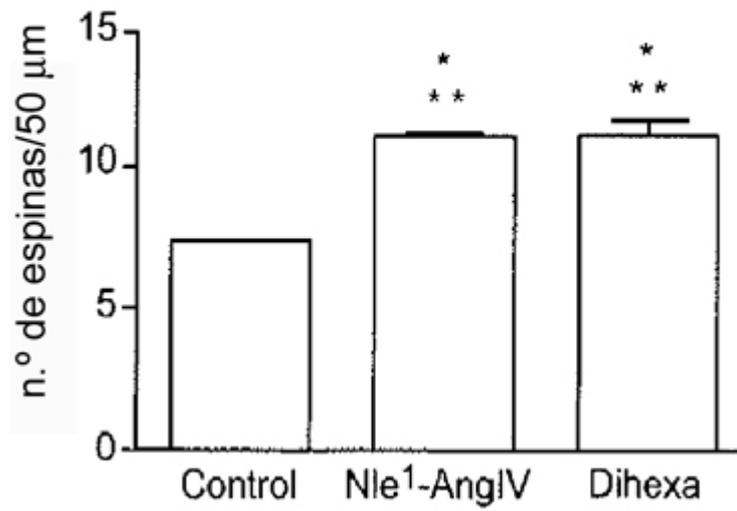


Figura 7B

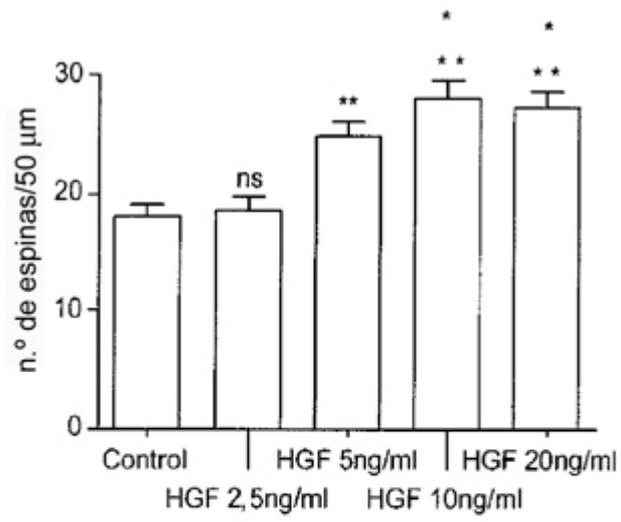


Figura 8

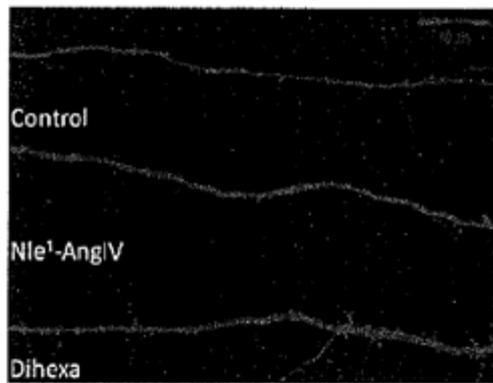


Figura 9A

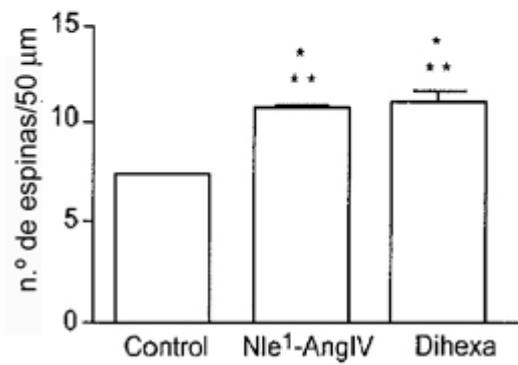


Figura 9B

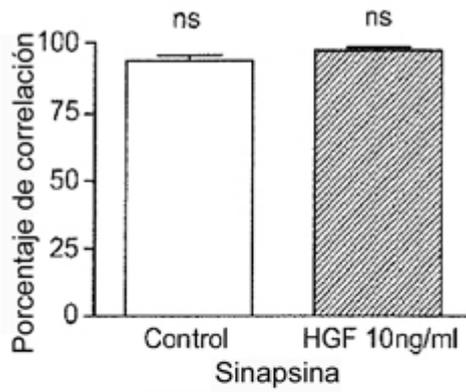


Figura 10A

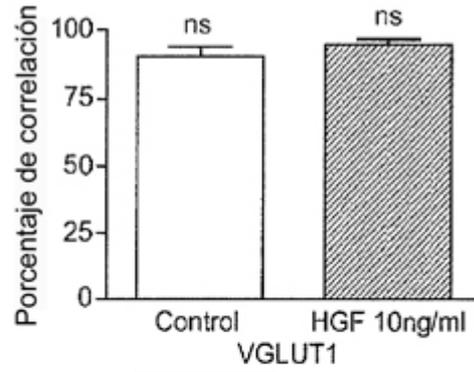


Figura 10B

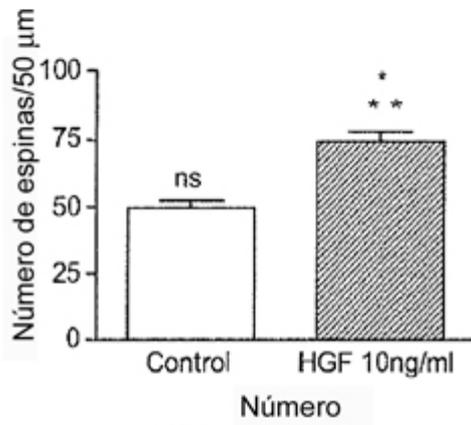


Figura 10C

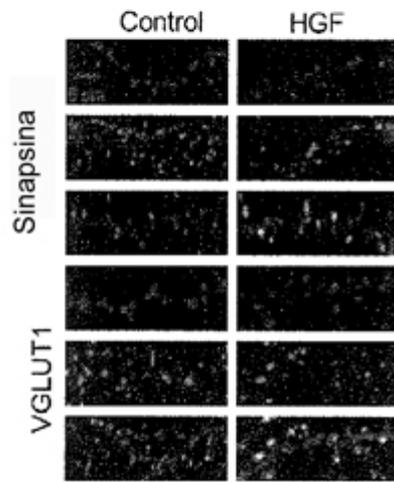


Figura 10D

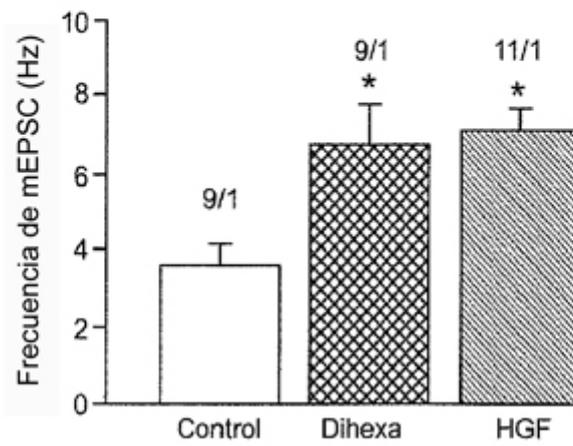


Figura 11

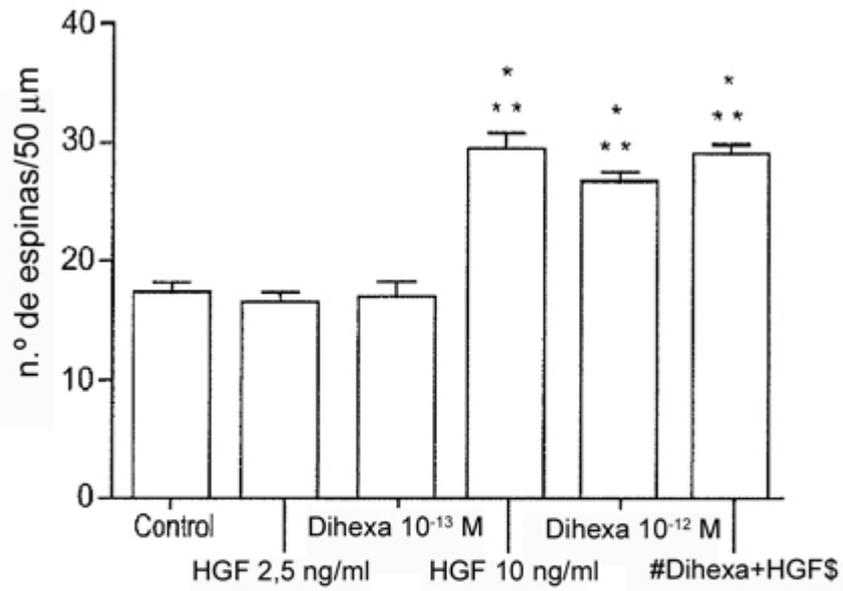


Figura 12A

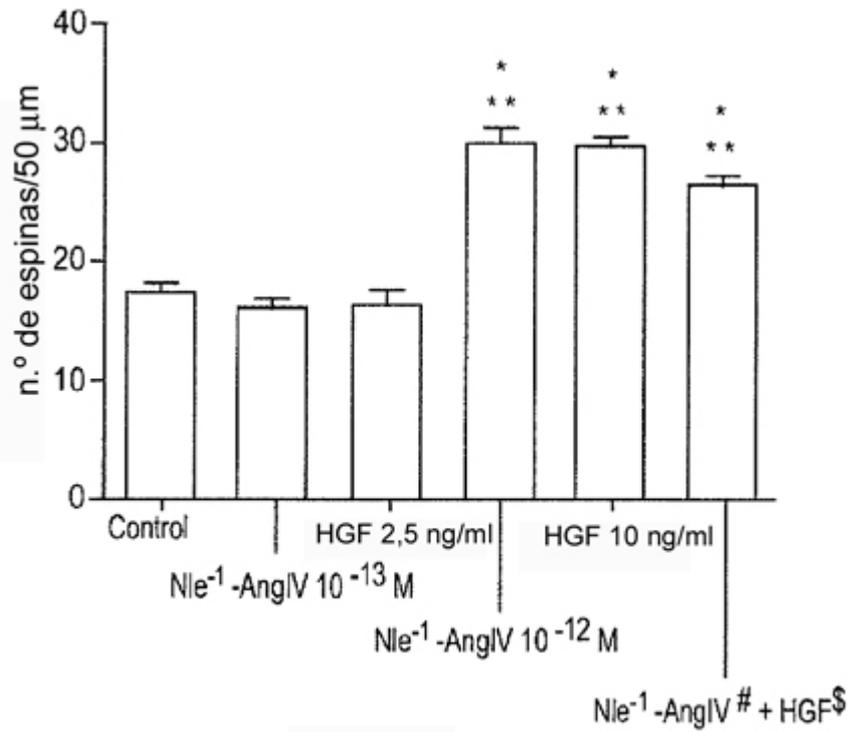


Figura 12B

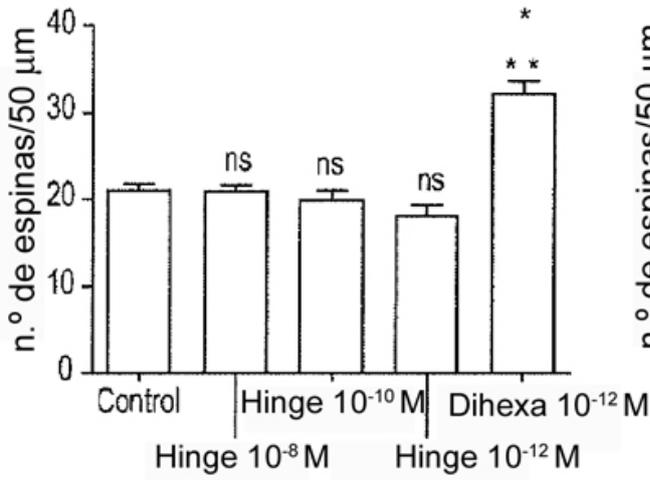


Figura 13A

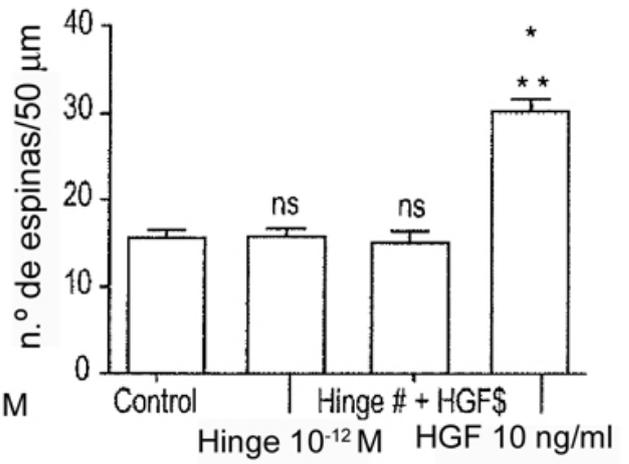


Figura 13B

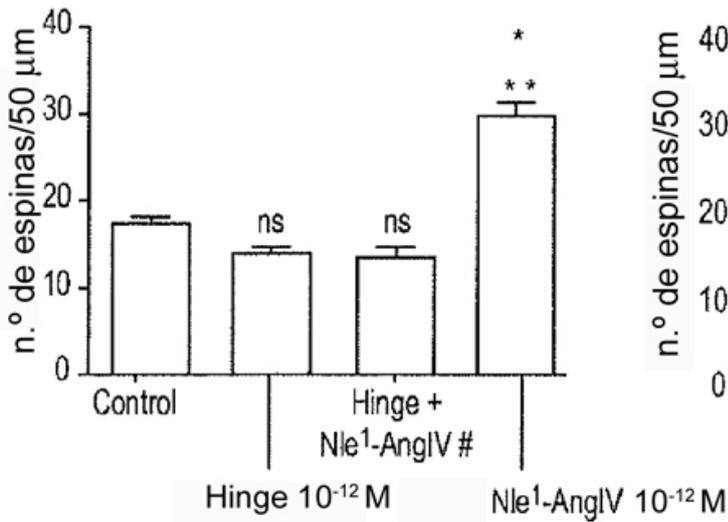


Figura 13C

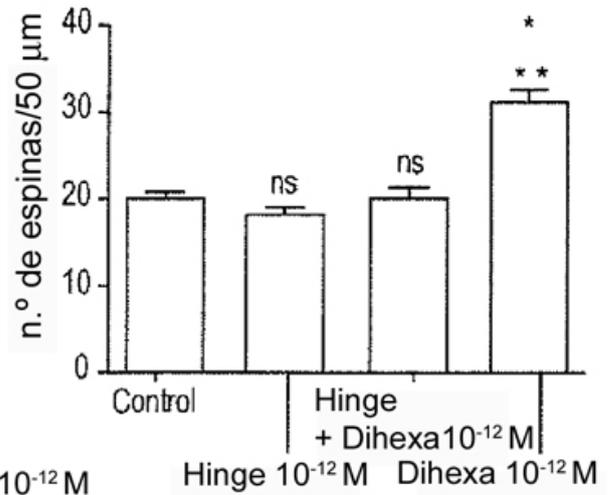


Figura 13D

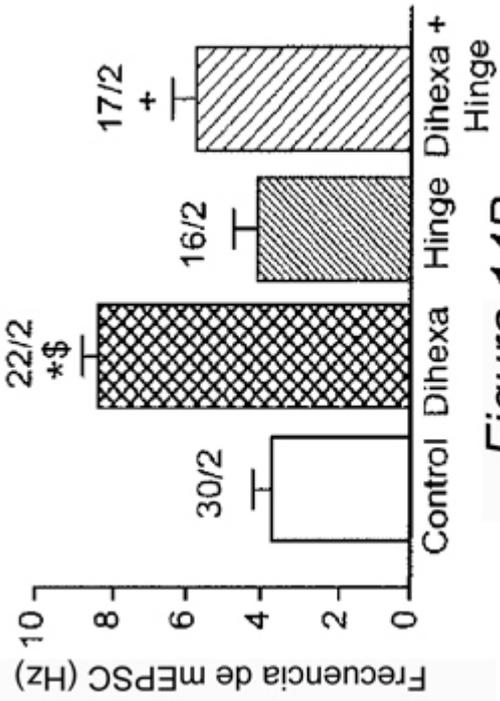


Figura 14B

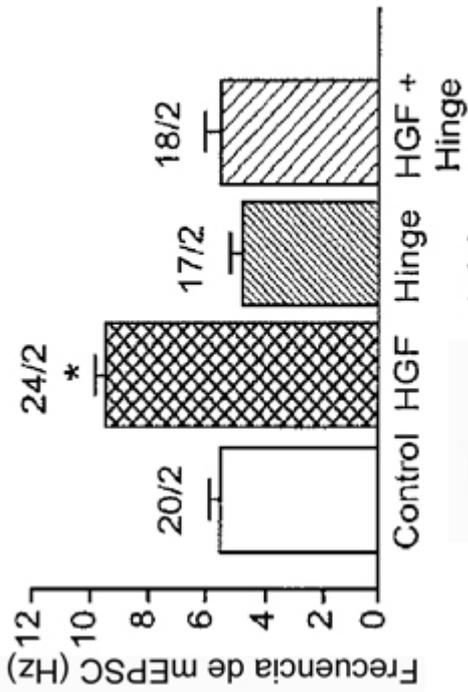


Figura 14A

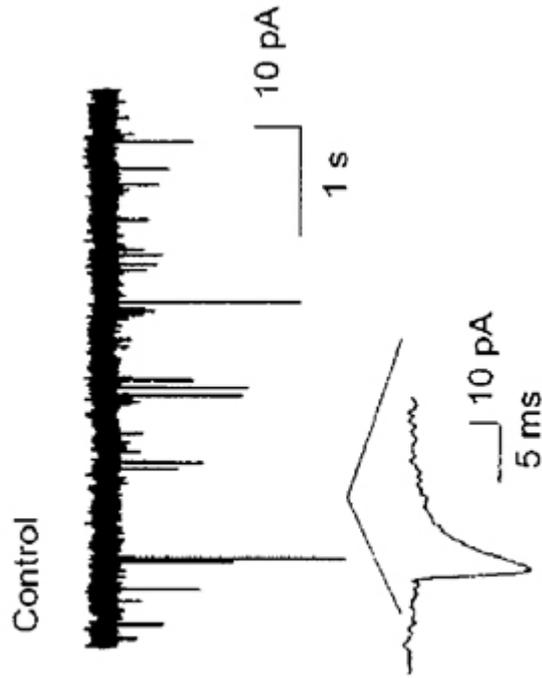


Figura 14D

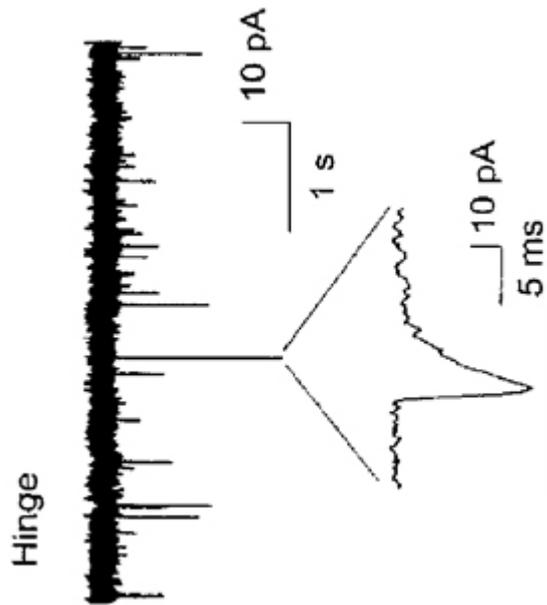


Figura 14C

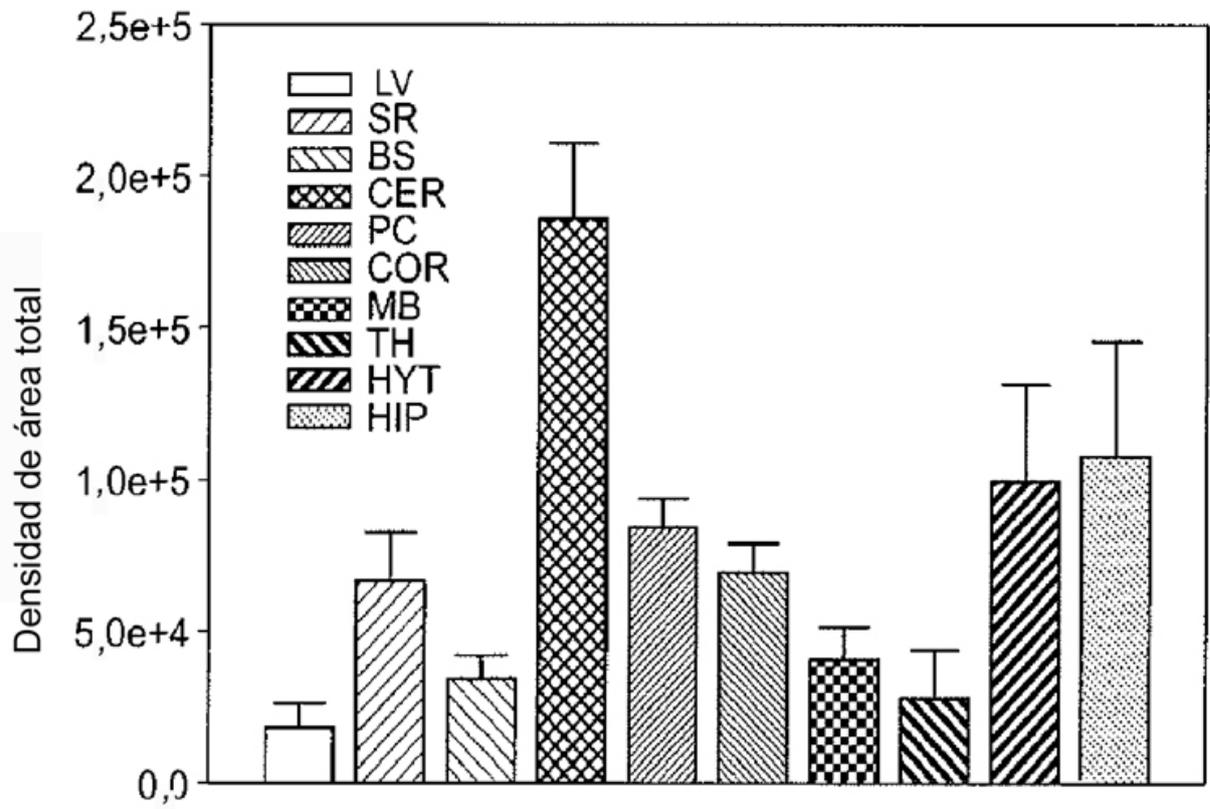
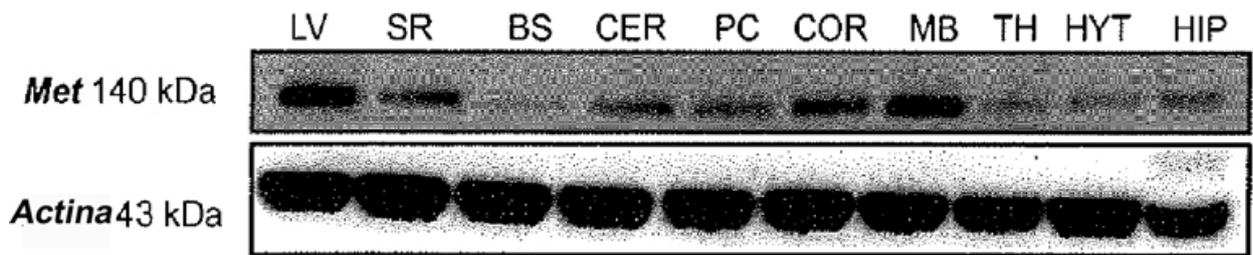


Figura 15

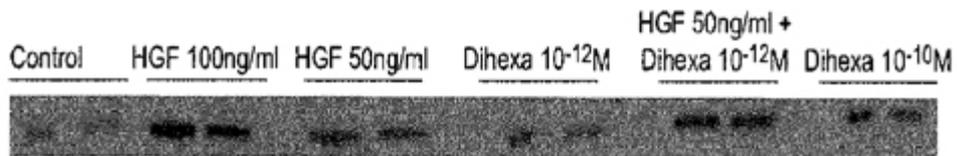
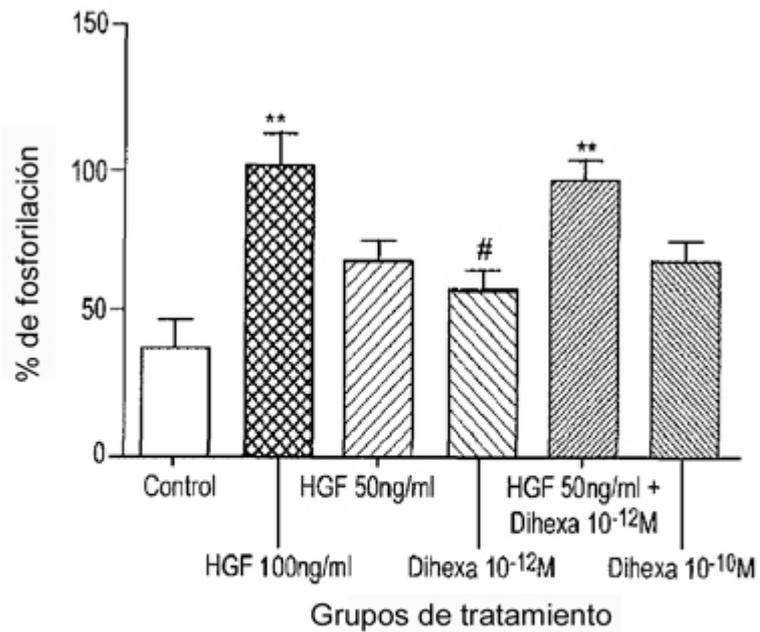


Figura 16

HGF 50ng	-	-	+	-	-	-	-	+	-
HGF 2.5ng	-	+	-	-	-	-	+	-	-
HGF 1.25ng	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Dihexa 10 ⁻¹² M	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Dihexa 10 ⁻¹⁰ M	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura 17

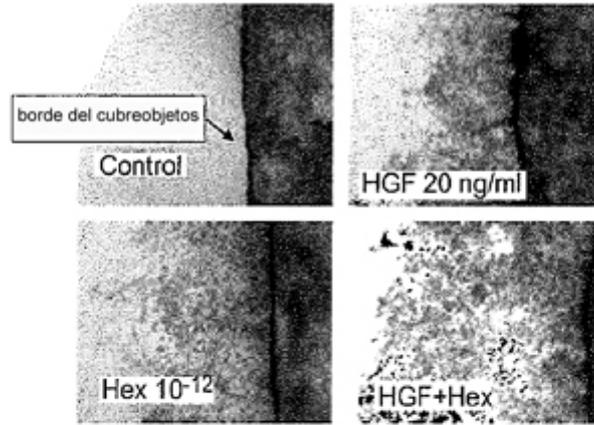


Figura 18

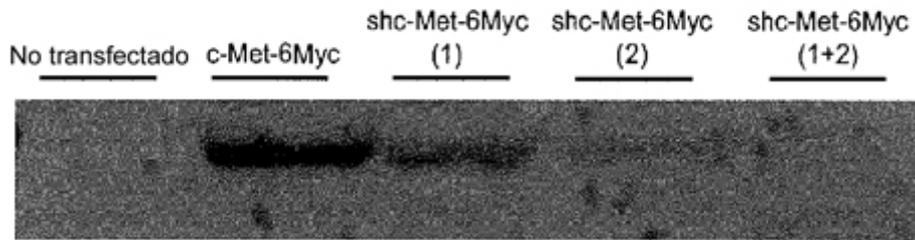


Figura 19

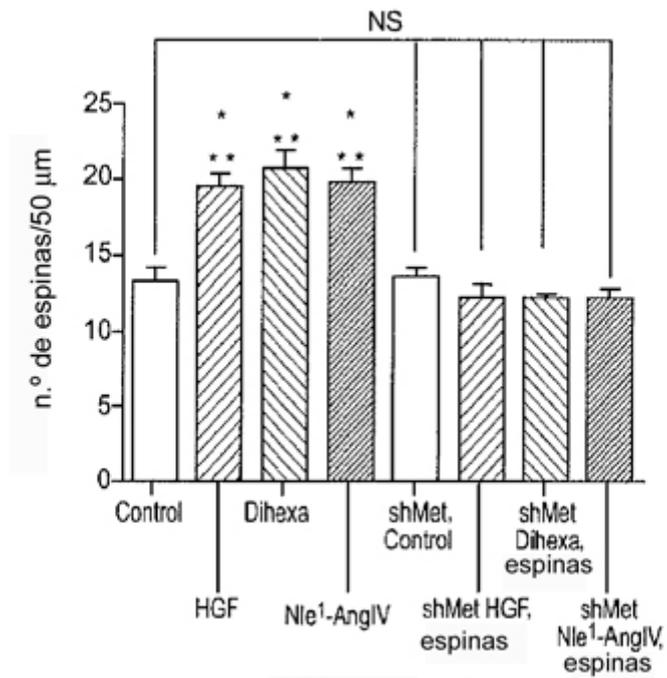


Figura 20

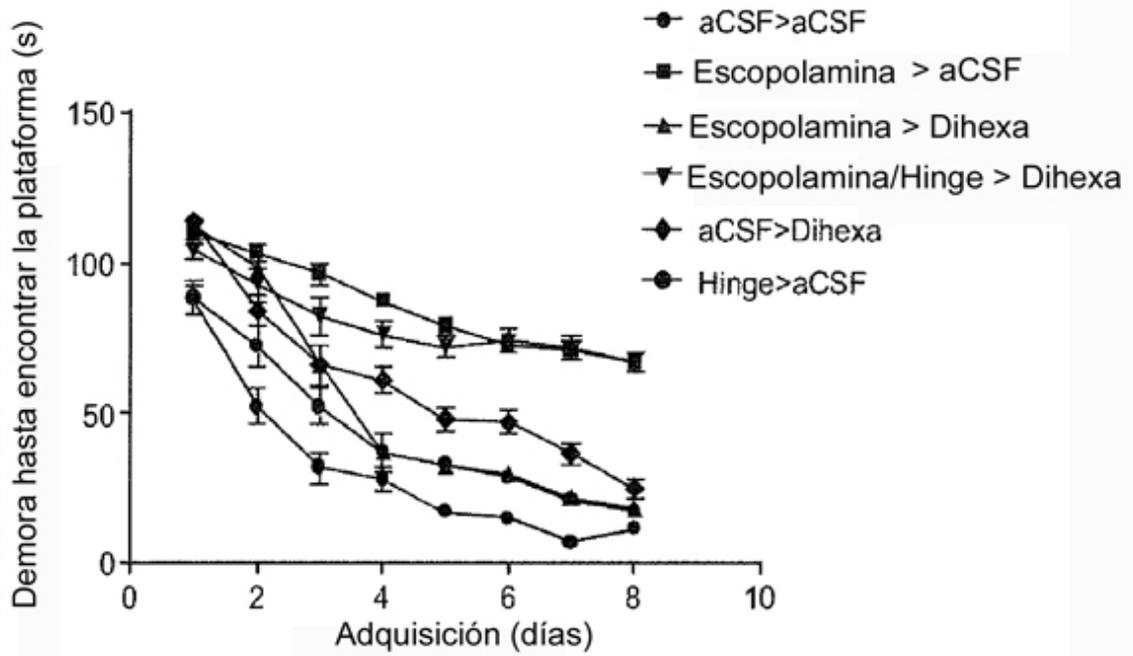


Figura 21

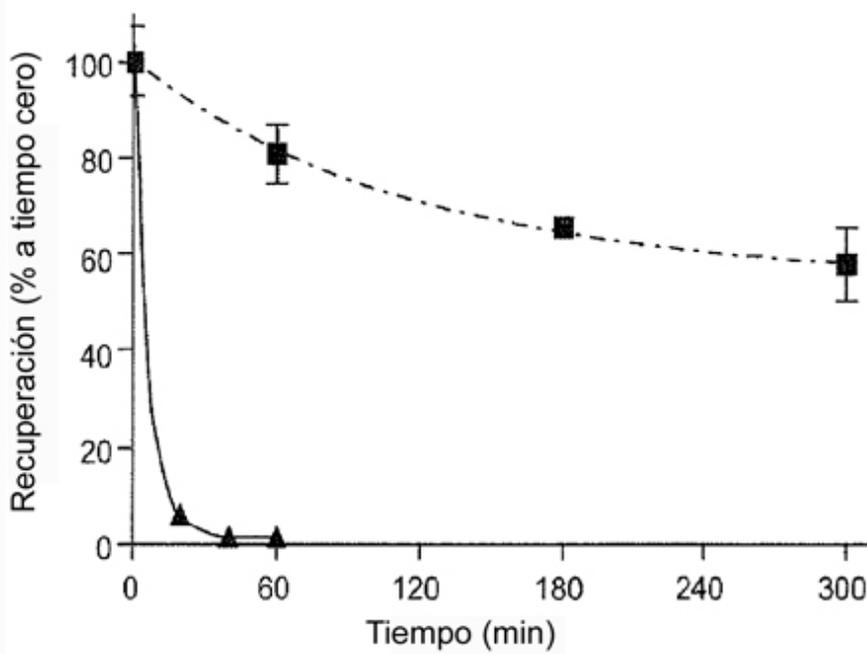


Figura 22

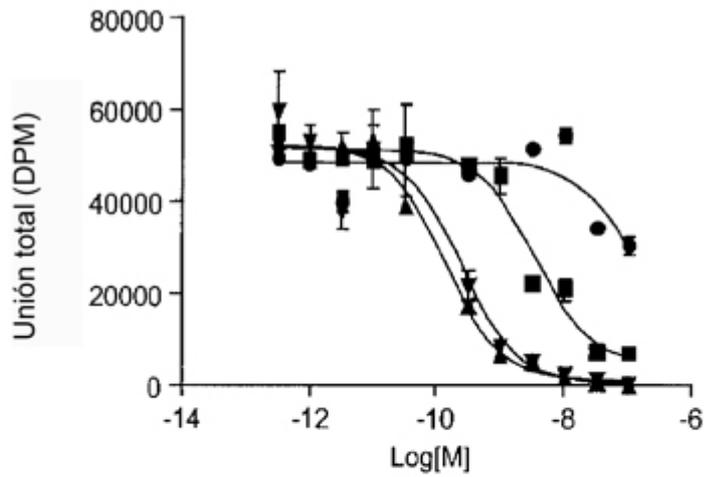


Figura 23

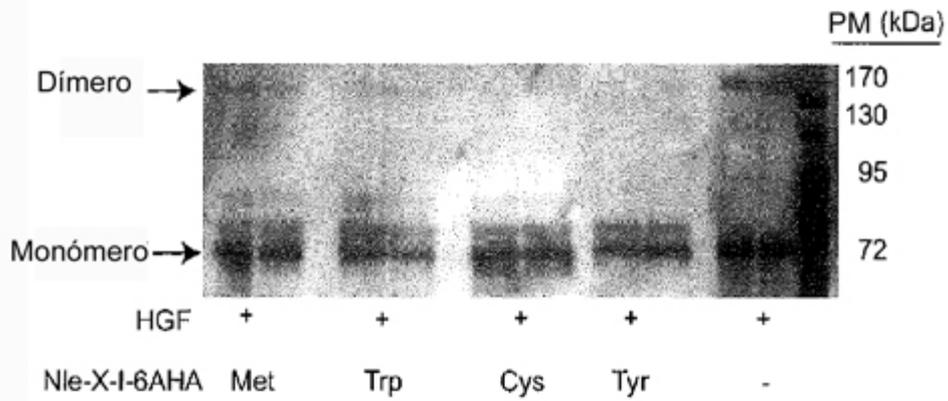


Figura 24A

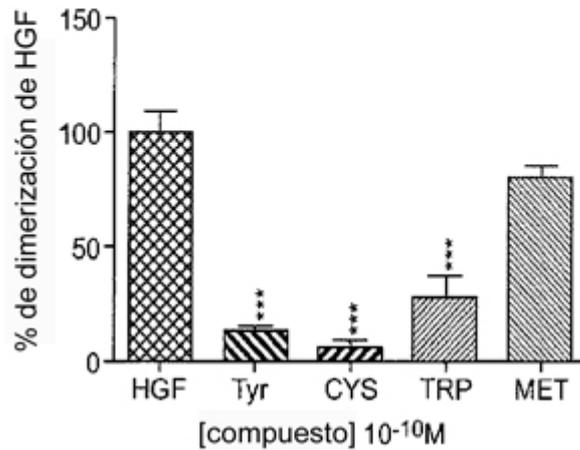


Figura 24B

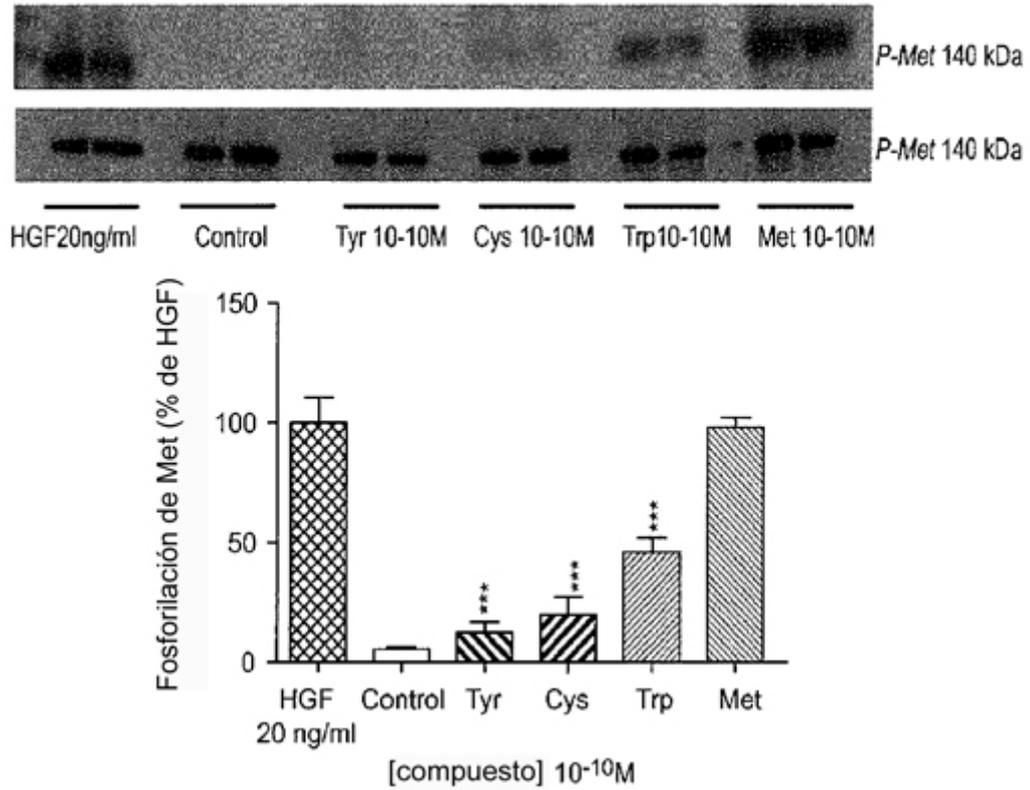


Figura 25

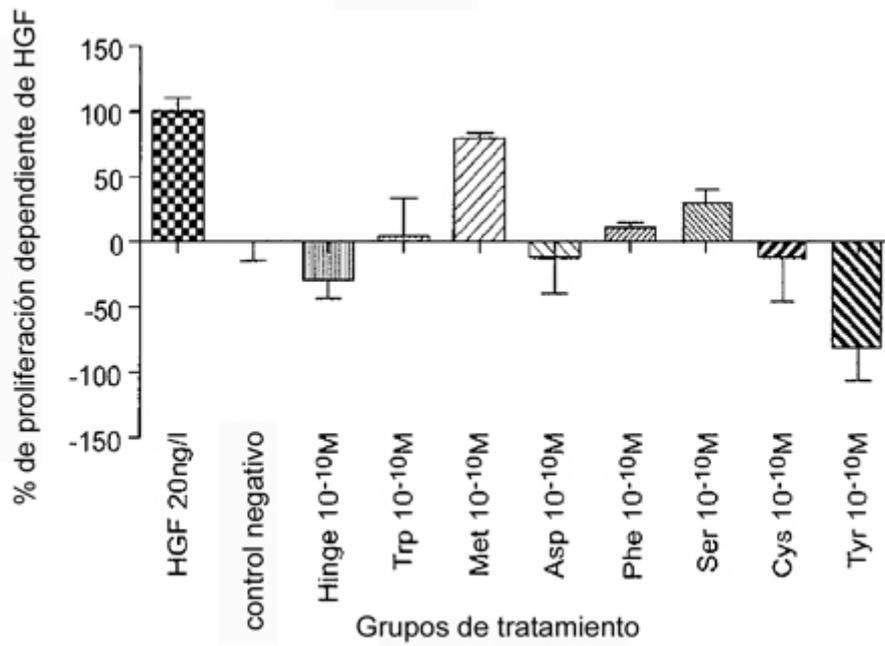
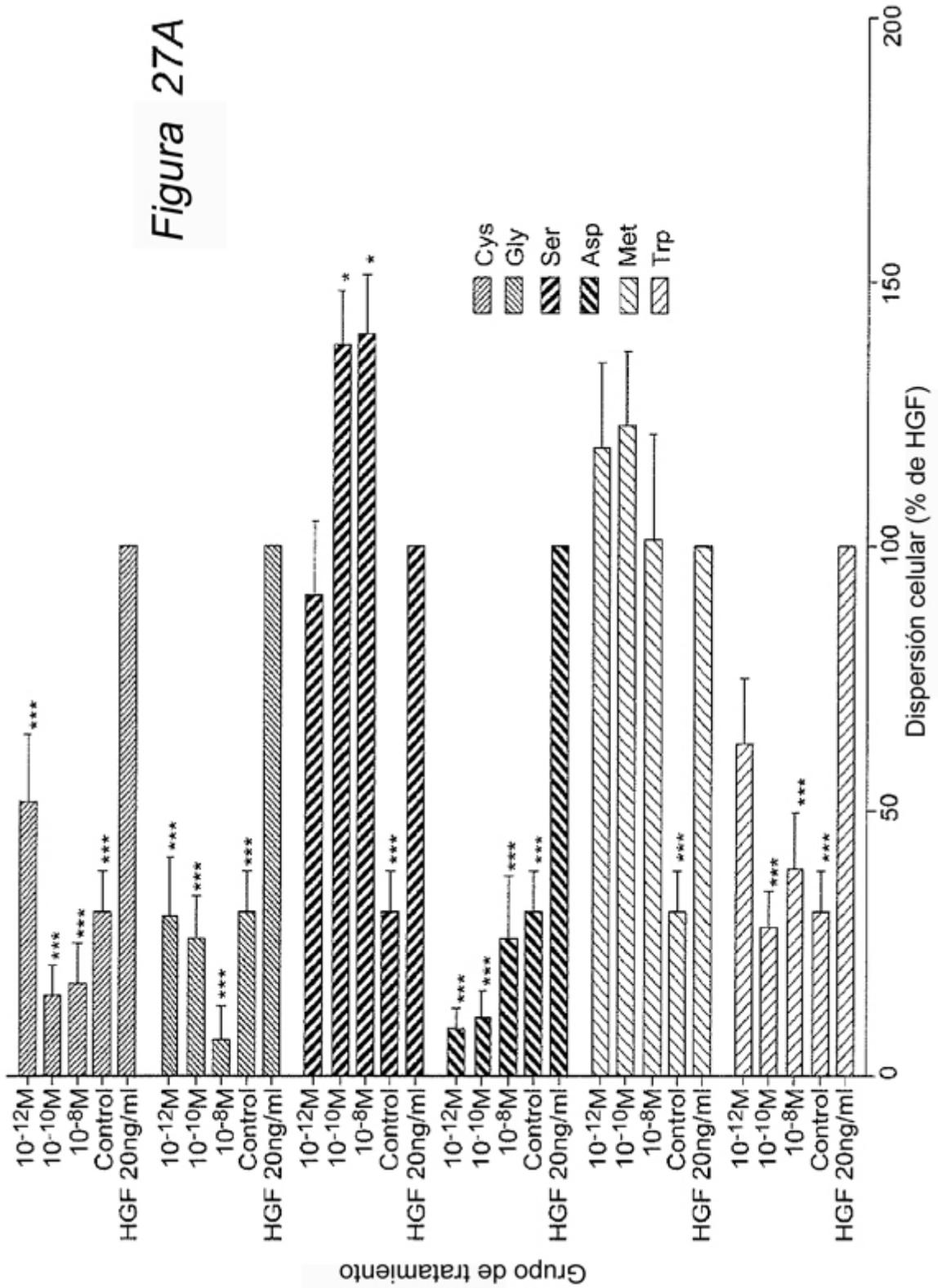


Figura 26

Figura 27A



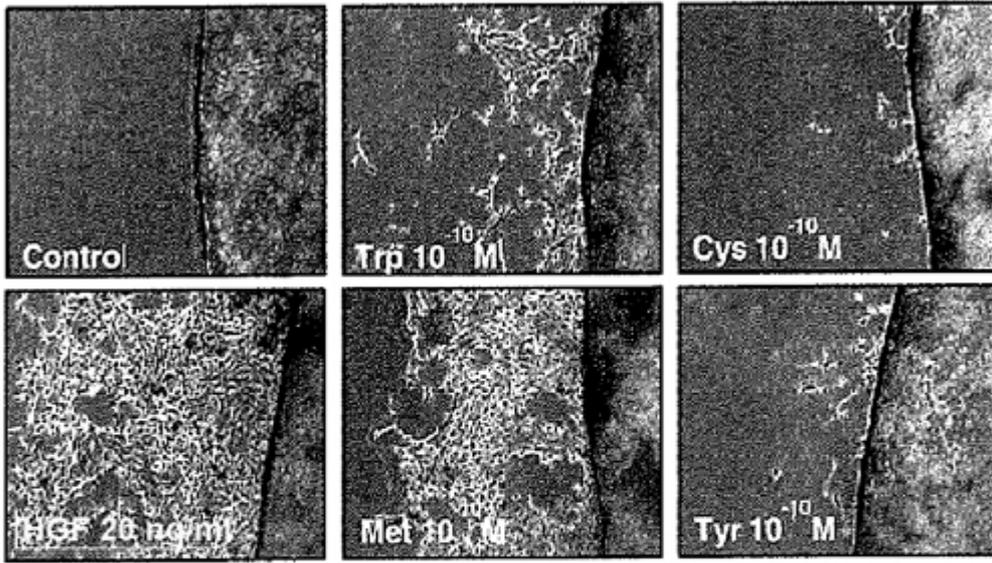


Figura 27B

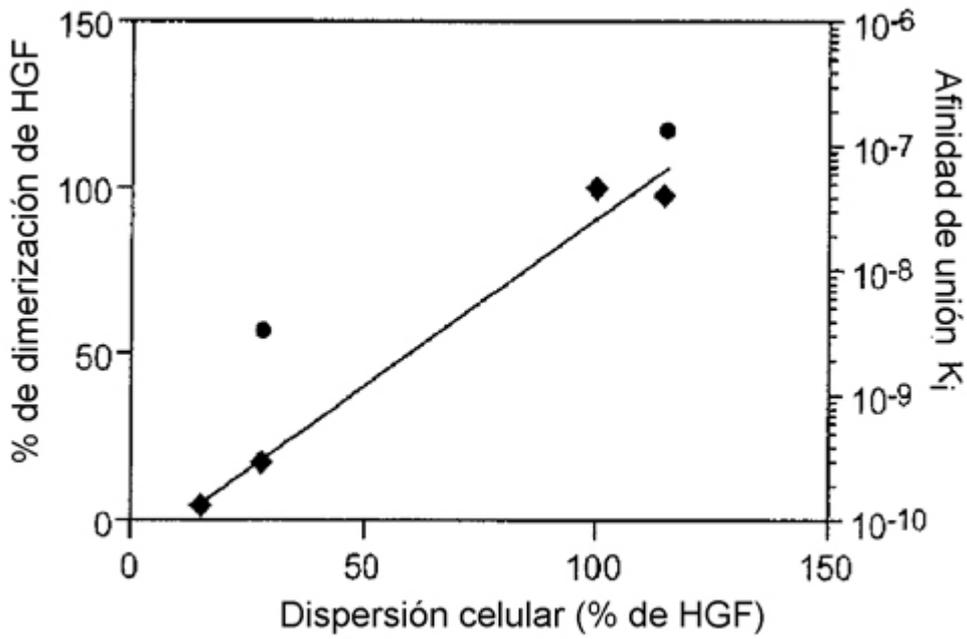


Figura 28

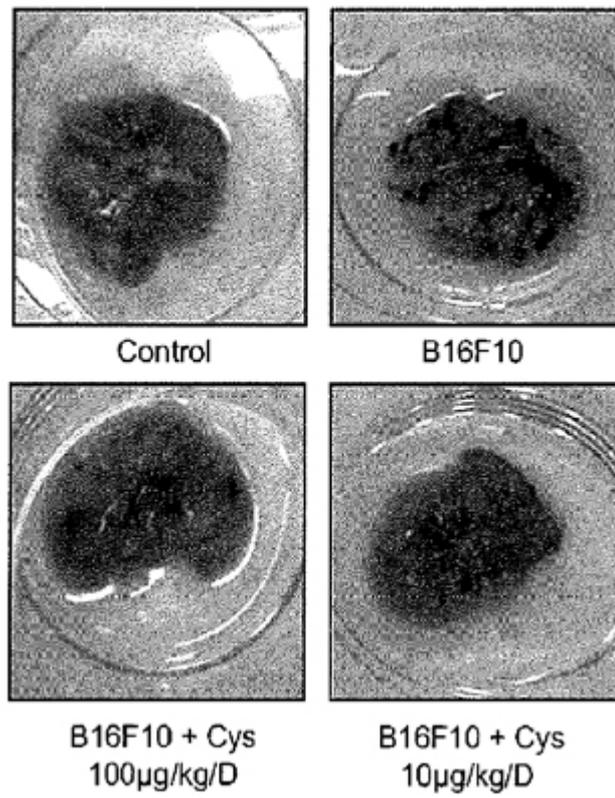


Figura 29A

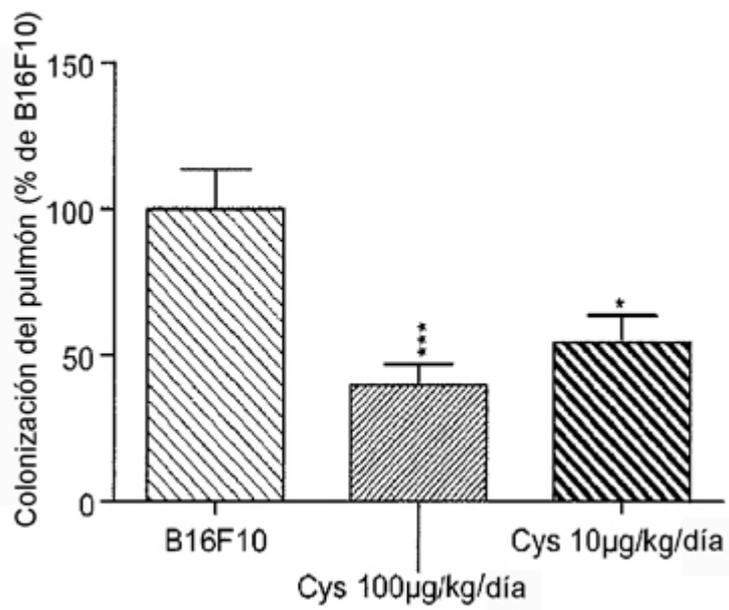


Figura 29B