

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 226**

51 Int. Cl.:

A61K 38/50 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 31/7084 (2006.01)

C07H 19/20 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2005** **E 15193068 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 3006040**

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

30 Prioridad:

04.06.2004 US 577233 P

04.01.2005 US 641330 P

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

11.04.2018

73 Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY (100.0%)

One Brookings Drive

St. Louis, MO 63130, US

72 Inventor/es:

MILBRANDT, JEFFREY;

ARAKI, TOSHIYUKI y

SASAKI, YO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 663 226 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para tratar neuropatías

5 CAMPO

Esta invención se refiere en general a enfermedades y afecciones que afectan a las neuronas y, más particularmente, a procedimientos y composiciones para tratar o prevenir neuropatías y otras enfermedades y afecciones que implican neurodegeneración. Se divulgan también procedimientos de identificación de agentes para
10 tratar o prevenir neuropatías.

ANTECEDENTES

La degeneración axonal aparece en una variedad de enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de
15 Parkinson y Alzheimer, así como tras lesión traumática, tóxica o isquémica en neuronas. Tales enfermedades y afecciones están asociadas a axonopatías que incluyen disfunción axonal. Es un ejemplo de axonopatía la degeneración walleriana (Waller, *Philos Trans R. soc. Lond.* 140: 423-429, 1850), que aparece cuando la porción distal de axón se secciona del cuerpo celular. El axón seccionado cae rápidamente en la degeneración. La axonopatía puede ser, por lo tanto, un rasgo crítico de enfermedades y afecciones neuropáticas y los déficit
20 axonales pueden ser un componente importante de la discapacidad del paciente.

El documento FR 2.842.424 divulga el uso del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o al menos uno de sus análogos, sustratos de mono-ADP-ribosil transferasa (ART), en la preparación de un medicamento que se pretende que module la actividad de al menos un receptor purinérgico, preferiblemente de tipo P2X o P2Y.
25

RESUMEN

Por consiguiente, los presentes inventores han tenido éxito en el descubrimiento de que la degeneración axonal puede disminuirse o prevenirse aumentando la actividad de NAD en las neuronas enfermas y/o lesionadas. Se cree
30 que la actividad aumentada de NAD puede actuar aumentando la actividad sirtuina, que produce entonces una reducción de la degeneración axonal de las células neuronales lesionadas. Por tanto, puede ser un enfoque para prevenir la degeneración axonal mediante la activación de moléculas de sirtuina, es decir SIRT1, en axones de mamífero lesionados. La activación de SIRT1 puede ser a través de acción directa sobre la molécula de SIRT1 o aumentando el suministro de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), que actúa como sustrato para la
35 actividad histona/proteína desacetilasa de SIRT1. La activación de SIRT1 da como resultado una reducción de la gravedad de la degeneración axonal o una prevención de la degeneración axonal. Se cree también posible que el aumento en la actividad de NAD pueda actuar a través de otros mecanismos que no impliquen la sirtuina. Por tanto, aumentar la actividad de NAD, que puede actuar a través del aumento de la actividad de SIRT1 o a través de uno o más de otros mecanismos o ambos, puede disminuir o prevenir la degeneración axonal en axones de mamífero
40 lesionados.

Por tanto, en diversas realizaciones, la presente invención está dirigida a agentes para uso en el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero necesitado de ello, donde el agente es NAD o NaMN.

45 En diversas realizaciones, el agente puede aumentar la actividad de SIRT1 a través del aumento de la actividad de NAD. Se cree que aumentar la actividad de NAD puede aumentar la actividad sirtuina porque el NAD puede actuar como sustrato de SIRT1. Tales agentes pueden incluir NAD o NaMN.

En diversas realizaciones, la presente invención está dirigida a agentes para uso en el tratamiento o la prevención
50 de una axonopatía en un mamífero necesitado de ello, donde el agente es NAD o NaMN, y actúa aumentando la actividad de NAD en neuronas y/o células de soporte enfermas y/o lesionadas, y donde la axonopatía es hereditaria o congénita o está asociada a enfermedad neurodegenerativa, enfermedad neuronal motora, neoplasia, trastorno endocrino, enfermedad metabólica, deficiencia nutricional, aterosclerosis, una enfermedad autoinmunitaria, lesión mecánica, lesión inducida por productos químicos o fármacos, lesión térmica, lesión por radiación, compresión
55 nerviosa, trastorno retinal o del nervio óptico, disfunción mitocondrial, demencia progresiva, enfermedades desmielinizantes, isquemia y/o apoplejía, enfermedad infecciosa o enfermedad inflamatoria.

En diversas realizaciones, la divulgación puede implicar también procedimientos de tratamiento de una neuropatía mediante la administración a un mamífero, y en particular un ser humano, de una cantidad efectiva de un agente que
60 actúa aumentando la actividad de NAD nuclear en neuronas y/o células de soporte enfermas y/o lesionadas tales

como, por ejemplo, glía, células musculares, fibroblastos, etc.

Tal agente puede ser NAD o NADH, mononucleótido de nicotinamida, mononucleótido de ácido nicotínico o ribósido de nicotinamida o derivados de los mismos; o una enzima que genere NAD tal como una mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa o un ácido nucleico que codifique una enzima que genere NAD, tal como un ácido nucleico que codifique una mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa o un agente que aumente la expresión de un ácido nucleico que codifique una enzima en una ruta que genere NAD o un agente que aumente la actividad y/o estabilidad de una enzima en una ruta que genere NAD o un agente que aumente la actividad de NAD. La mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa puede ser una proteína NMNAT1.

En diversas realizaciones, la divulgación puede implicar también procedimientos de tratamiento o prevención de una neuropatía óptica en un mamífero necesitado de ello. Los procedimientos pueden comprender administrar al mamífero una cantidad efectiva de un agente que actúe aumentando la actividad de NAD en neuronas enfermas y/o lesionadas. Administrar al mamífero puede comprender administrar al ojo, en particular administrar el agente con un sistema de suministro de liberación mantenida o administrar un aglomerado de liberación mantenida que comprende el agente al ojo.

El agente puede ser NAD o NADH, mononucleótido de nicotinamida, mononucleótido de ácido nicotínico o ribósido de nicotinamida; o una enzima que genere NAD tal como una mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa; o un ácido nucleico que codifique una enzima que genere NAD, tal como un ácido nucleico que codifique una mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa o un agente que aumente la actividad de NAD. La mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa puede ser una proteína NMNAT1 o una proteína NMNAT3.

En diversas realizaciones de los procedimientos de la divulgación, la neuropatía asociada a la degradación axonal puede ser cualquiera de una serie de neuropatías tales como, por ejemplo, aquellas que son hereditarias o congénitas o asociadas a la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, infección por herpes, diabetes, esclerosis lateral amiotrófica, una enfermedad desmielinizante, isquemia o apoplejía, lesión química, lesión térmica, SIDA y similares. Además, pueden tratarse también enfermedades neurodegenerativas no mencionadas anteriormente, así como un subconjunto de las enfermedades mencionadas anteriormente, con los procedimientos de la presente invención. Tales subconjuntos de enfermedades pueden incluir enfermedad de Parkinson, enfermedades no de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o enfermedades no de Alzheimer y demás.

En diversas realizaciones, la presente divulgación está también dirigida a procedimientos de cribado de agentes para tratar una neuropatía en un mamífero. Los procedimientos pueden comprender administrar a células neuronales *in vitro* o *in vivo* un agente candidato, producir una lesión axonal en las células neuronales y detectar una reducción de la degeneración axonal de las células neuronales lesionadas. En diversas realizaciones, el procedimiento puede comprender detectar un aumento de la actividad de NAD producida por un agente candidato en una célula, y en particular en una célula neuronal. El aumento en la actividad de NAD puede ser un aumento en la actividad de NAD nuclear.

Se proporcionan también procedimientos para cribar agentes que aumenten la actividad sirtuina en neuronas, así como para cribar agentes que aumenten la actividad biosintética de NAD en las neuronas. Los procedimientos pueden comprender administrar a células neuronales de mamífero *in vitro* o *in vivo* un agente candidato, producir una lesión axonal en las células neuronales y detectar una reducción de la degeneración axonal de las células neuronales lesionadas. Tales procedimientos pueden ser, en algunas realizaciones, procedimientos de cribado primarios en que ensayos secundarios delimitan adicionalmente la actividad asociada a la actividad sirtuina o a NAD y enzimas o componentes de las rutas biosintética o de recuperación de NAD.

En diversas realizaciones de los procedimientos de cribado de la divulgación, la lesión axonal puede producirse mediante una serie de procedimientos incluyendo lesión química de las células neuronales, lesión térmica de las células neuronales, privación de oxígeno de las células neuronales y lesión física de las células neuronales.

Se proporciona también un vector recombinante en diversas realizaciones. El vector puede comprender un promotor ligado operativamente con una secuencia que codifica una proteína NMNAT1 o proteína NMNAT3 de mamífero. En diversos aspectos de tales realizaciones, el vector recombinante puede ser un lentivirus o un virus adenoasociado.

Se proporciona también en diversas realizaciones un vector recombinante que comprende un promotor ligado operativamente con una secuencia que codifica una proteína SIRT1. En diversos aspectos de tales realizaciones, el vector recombinante puede ser un lentivirus o un virus adenoasociado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra que la actividad de NMNAT1 de la proteína de fusión Wld^s produce una degeneración retardada de los axones lesionados, mostrando:

5

A) degeneración walleriana *in vitro* en cultivos de explante neuronal de ganglios de raíz dorsal (DRG) infectados con lentivirus que expresan la proteína Wld^s o EGFP, donde se muestran neuritas inmunorreactivas con tubulina β III antes de transección y 12, 24, 48 y 72 h después de transección (barra de escala= 1 mm y "*" denota la localización de los cuerpos celulares antes de la retirada; y

10 B) degeneración walleriana *in vitro* en neuronas de DRG infectadas con lentivirus que expresan EGFP solo, proteína Wld^s, la porción Ufd2a (70 residuos) de la proteína Wld^s fusionada con EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP), Ufd2a(1-70)-EGFP con señal de localización nuclear C-terminal, la porción NMNAT1 de la proteína Wld^s fusionada con EGFP, Ufd2a dominante-negativa (Ufd2a(P1140A)), o constructo de siRNA de Ufd2a, en que se muestran imágenes representativas de neuritas y los datos de análisis cuantitativo de los números de neuritas restantes (porcentaje de neuritas restantes respecto a antes de la transección \pm D.E.) en el punto temporal indicado con cada constructo (parte inferior izquierda), y el "*" indica diferencia significativa ($p < 0,0001$) con las neuronas infectadas con EGFP; mostrando también señal de EGFP antes de la transección, que confirma la expresión transgénica (fila inferior, barra de escala= 50 μ m) y análisis de inmunotransferencia, que confirma la expresión de proteína por transferencia génica lentivírica y la regulación negativa por siRNA de la proteína Ufd2a (paneles inferiores derechos).

20

La Figura 2 ilustra que el suministro aumentado de NAD protege a axones de la degeneración después de lesión, mostrando:

A) actividad enzimática de Wld^s de tipo silvestre y mutante y proteínas NMNAT1, en que se prepararon lisados a partir de células HEK293, que expresan la proteína indicada, y se ensayó la producción de NAD usando mononucleótido de nicotinamida como sustrato y la cantidad de NAD generada en 1 h se convirtió en NADH, se cuantificó por intensidad de fluorescencia y se normalizó a la concentración de proteína total, mostrando que ambos mutantes no tienen esencialmente actividad enzimática; y

30 B) degeneración walleriana *in vitro* en neuronas de DRG infectadas con lentivirus que expresan NMNAT1 o proteína Wld^s, los mutantes de estas proteínas que carecen de actividad de síntesis de NAD, NMNAT1(W170A) y Wld^s(W258A) o EGFP, donde el diagrama de barras muestra los datos de análisis cuantitativo del número de neuritas restantes en el punto temporal indicado para cada constructo (porcentaje de neuritas restantes respecto a antes de la transección \pm D.E.) y el "*" indica diferencia significativa ($p < 0,0001$) con las neuronas infectadas con EGFP;

35 C) expresión de proteína en células infectadas con lentivirus detectada por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos del marcaje 6XHis; y

D) explante neuronal de DRG que expresa NMNAT1 o EGFP (control) cultivado con vincristina 0,5 μ M, donde se muestran imágenes representativas de neuritas (contraste de fases;

40 Barra= 1 mm) en los momentos indicados después de la adición de vincristina, y se representa la cuantificación del efecto protector en los puntos temporales indicados como el área cubierta por neuritas respecto a la cubierta por neuritas antes del tratamiento.

La Figura 3 ilustra que la protección axonal requiere el pretratamiento de neuronas con NAD antes de la lesión, mostrando:

45

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

50 B) explantes de DRG preincubados con NAD 1 mM durante 4, 8, 12, 24 o 48 h antes de la transección, donde el diagrama de barras muestra el número de neuritas restantes en cada experimento (porcentaje de neuritas restantes respecto a antes de la transección \pm D.E.) en cada uno de los puntos temporales indicados y el "*" indica una protección axonal significativa en comparación con el control ($p < 0,0001$).

La Figura 4 ilustra que la protección axonal dependiente de NAD está mediada por la activación de SIRT1, mostrando:

55

A) degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante de DRG preincubados con NAD 1 mM solo (control) o en presencia de sirtinol 100 μ M (un inhibidor de Sir2) o 3-aminobencimida 20 mM (3AB, un inhibidor de PARP);

60 B) degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante de DRG incubados con resveratrol (10, 50 o 100 μ M); y

C) izquierda: degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante de DRG infectados con siRNA que expresa lentivirus específico de cada miembro de la familia de SIRT (SIRT1-7), donde el diagrama de barras muestra el análisis cuantitativo del número de neuritas restantes (porcentaje de neuritas restantes respecto a antes de la transección \pm D.E.) en el punto temporal indicado para cada afección y el "" indica puntos significativamente diferentes del control ($< 0,0001$);

tabla media: Efectividad de cada siRNA de SIRT (expresada como % de nivel de ARNm de tipo silvestre) usando qRT-PCR en células NIH3T3 infectadas y

derecha: inmunotransferencia usando anticuerpos de SIRT1 para mostrar una expresión reducida de SIRT1 en presencia de siRNA de SIRT1, que bloqueaba efectivamente la protección axonal dependiente de NAD.

10

La Figura 5 ilustra la ruta biosintética de NAD de mamífero en que se ilustra la biosíntesis de NAD de mamífero predicha basándose en el análisis de expresión enzimática y en estudios de levadura y eucariotas inferiores (abreviaturas usadas: QPRT, quinolinato fosforribosiltransferasa; NaPRT, ácido nicotínico fosforribosiltransferasa; NmPRT, nicotinamida fosforribosiltransferasa; Nrk, ribósido de nicotinamida cinasa; NMNAT, mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa; QNS, NAD sintetasa).

15

La Figura 6 ilustra el análisis de expresión de enzimas biosintéticas de NAD en mamífero, mostrando (A) los niveles de ARNm de enzima biosintética de NAD se determinaron después de 1, 3, 7 y 14 días después de transección del nervio en DRG de rata por qRT-PCR, en que el nivel de expresión se normalizaba a la expresión de des-3-fosfato de gliceraldehído deshidrogenasa en cada muestra y es indicativo respecto al nivel de expresión en DRG no axotomizados; (B) la degeneración de neurita introducida por incubación de DRG en rotenona 1 o 0,1 μ M durante el tiempo indicado y los niveles de ARNm de enzima sintética de NAD se determinaron por qRT-PCR como se describe en el texto.

20

La Figura 7 ilustra la localización subcelular de las enzimas NMNAT y su capacidad de proteger al axón, mostrando (A) un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante neuronal de DRG infectados con lentivirus que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, en que se muestran fotos representativas tomadas a las 12 y 72 horas después de la transección; (B) la localización subcelular de NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3 en células HEK293T usando inmunohistoquímica con anticuerpo contra el marcaje 6xHis para detectar cada proteína y tinción de las células con el tinte marcador nuclear (bisbenzimidida) como comparación para determinar la localización nuclear frente a citoplasmática de cada proteína (barra de escala= 25 μ m); (C) la actividad enzimática de NMNAT1 y NMNAT3 de tipo silvestre y mutante en que cada proteína marcada con 6xHis se purificó del lisado de células HEK293T que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, en que la cantidad de NAD generado después de 1 h a 37 $^{\circ}$ C se convertía en NADH, se cuantificaba y se normalizaba a la concentración de proteína; (D) la expresión de proteína de NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 y nucNMNAT3 por transferencia génica lentivírica confirmada por análisis de inmunotransferencia de células HEK293T infectadas con cada uno de los virus y (E) un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante neuronal de DRG infectados con lentivirus que expresan NMNAT1, cytNMNAT1, NMNAT3 o nucNMNAT3, que muestra datos de análisis cuantitativo de los números de neuritas restantes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía.

30

La Figura 8 ilustra la aplicación exógena de sustratos biosintéticos de NAD y su capacidad de proteger al axón, mostrando (A) un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* que usa cultivos de explante neuronal de DRG después de la aplicación exógena de NAD y NmR con fotos representativas tomadas a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la transección; (B) un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* usando cultivos de explante neuronal de DRG después de la aplicación exógena de Na, Nam, NaMN, NMN, NaAD, NAD y NmR que muestra los datos de análisis cuantitativo de los números de neuritas restantes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía; (C) explantes neuronales de DRG infectados con lentivirus que expresan NaPRT e incubados con o sin Na 1 mM durante 24 horas antes de la axotomía, en un ensayo de degeneración walleriana *in vitro* que muestra los datos de análisis cuantitativo de los números de neuritas restantes a las 12, 24, 48 y 72 horas después de la axotomía.

40

La Figura 9 ilustra la transección de nervio óptico después de inyección intravítrea de sustratos biosintéticos de NAD. Se inyectó NAD, NMN, NmR o Nam en el compartimento intravítreo del ojo izquierdo de rata y se dejaron incorporar las células ganglionares de retina durante 24 horas, después de lo cual se transeccionó el nervio óptico izquierdo por enucleación del ojo y se recogieron los nervios ópticos derecho e izquierdo a los 4 días después de la transección y se analizaron por transferencia Western en que se usaron nervios ópticos transeccionados de ratones sin tratamiento antes de la axotomía como control negativo; mostrando en la figura los datos de análisis cuantitativo del porcentaje de inmunorreactividad de neurofilamento restante del nervio óptico transeccionado respecto a no transeccionado \pm D.E.

50

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención implica procedimientos y composiciones para tratar neuropatías. Los procedimientos pueden comprender administrar a un mamífero una cantidad efectiva de una sustancia que aumente la actividad de NAD en neuronas enfermas y/o lesionadas. Se cree que la actividad aumentada de NAD puede actuar aumentando la actividad sirtuina, que produce entonces una reducción de la degeneración axonal de células neuronales lesionadas en comparación con la degeneración axonal que aparece en células neuronales lesionadas no tratadas con el agente. Tal reducción de la degeneración axonal puede incluir una mejora completa o parcial de la lesión en la neurona. Se cree también posible que el aumento en la actividad de NAD podría actuar a través de otros mecanismos que no implican a moléculas de sirtuina que producen o contribuyen a la producción de una reducción de la degeneración axonal.

Siete moléculas de sirtuina conocidas referenciadas como SIRT constituyen la familia Sir2 de histona/proteína desacetilasas en mamíferos, y todas tales moléculas de sirtuina están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación. Las siete sirtuinas humanas, SIRT1-SIRT7, son histona/proteína desacetilasas dependientes de NAD que se describen más completamente en relación con los NCBI LocusLink ID No. 23411, 22933, 23410, 23409, 23408, 51548 y 51547, respectivamente (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>). En diversos aspectos de la divulgación, los procedimientos y composiciones de la presente divulgación pueden aumentar la actividad de una cualquiera o más de las sirtuinas y, en particular, diversos procedimientos de la presente divulgación aumentan la actividad de SIRT1.

Por actividad de una sustancia, se hace referencia a la concentración de la sustancia particular o bien a la efectividad funcional de la sustancia. La concentración de una sustancia puede aumentarse mediante numerosos factores incluyendo, por ejemplo, aumentar la síntesis, reducir la degradación, aumentar la biodisponibilidad de la sustancia o disminuir la unión de la sustancia o aumentar de otro modo la cantidad disponible de sustancia libre.

Aumentar la efectividad funcional puede ser el resultado de, por ejemplo, un cambio en la conformación molecular, un cambio en las condiciones bajo las cuales actúa la sustancia, un cambio en la sensibilidad hacia la sustancia y similares. Aumentar la actividad con respecto a las moléculas de sirtuina pretende significar aumentar la concentración o potenciar la efectividad funcional o aumentar la disponibilidad de NAD o aumentar el flujo a través de una o más rutas sintéticas para NAD o cualquier combinación de los mismos.

Las neuropatías pueden incluir cualquier enfermedad o afección que afecte a neuronas y/o células de soporte tales como, por ejemplo, glía, células musculares, fibroblastos, etc., y en particular, aquellas enfermedades o afecciones que implican daño axonal. El daño axonal puede estar causado por lesión traumática o por lesión no mecánica debida a enfermedades o afecciones, y el resultado de tal daño puede ser degeneración o disfunción del axón y pérdida de la actividad neuronal funcional. Las enfermedades y afecciones productoras de o asociadas a dicho daño axonal están entre un gran número de enfermedades y afecciones neuropáticas. Tales neuropatías pueden incluir neuropatías periféricas, neuropatías centrales y combinaciones de las mismas. Además, las manifestaciones neuropáticas periféricas pueden producirse por enfermedades centradas principalmente en el sistema nervioso central, y las manifestaciones del sistema nervioso central pueden producirse por enfermedades esencialmente periféricas o sistémicas.

Las neuropatías periféricas implican daño en los nervios periféricos y pueden causarse por enfermedades de los nervios o como resultado de dolencias sistémicas. Algunas de tales enfermedades pueden incluir diabetes, uremia, enfermedades infecciosas tales como SIDA o lepra, deficiencias nutricionales, trastornos vasculares o de colágeno tales como aterosclerosis y enfermedades autoinmunitarias tales como lupus sistémico eritematoso, escleroderma, sarcoidosis, artritis reumatoide y poliarteritis nodosa. La degeneración de nervios periféricos puede ser también el resultado de daño traumático, es decir mecánico, en nervios, así como daño químico o térmico en nervios. Tales afecciones que lesionan los nervios periféricos incluyen lesiones por compresión o atrapamiento tales como glaucoma, síndrome del túnel carpiano, traumatismo directo, lesiones penetrantes, contusiones, fracturas o huesos dislocados; presión que afecta a nervios superficiales (cúbito, radio o peroné) que puede ser el resultado del uso prolongado de muletas o de permanecer en una posición demasiado tiempo o por un tumor; hemorragia intraneural; isquemia; exposición al frío o radiación o a ciertas medicinas o sustancias tóxicas tales como herbicidas o plaguicidas. En particular, el daño al nervio puede ser el resultado de lesión química debida a un agente anticanceroso citotóxico tal como, por ejemplo, un alcaloide del vinca tal como vincristina. Los síntomas típicos de tales neuropatías periféricas incluyen debilidad, entumecimiento, parestesia (sensaciones anormales tales como quemazón, cosquilleo, pinchazos u hormigueos) y dolor en brazos, mano, piernas y/o pies. La neuropatía puede estar también asociada a disfunción mitocondrial. Tales neuropatías pueden exhibir niveles de energía reducidos, es decir, niveles reducidos de NAD y ATP.

La neuropatía periférica puede ser también una neuropatía metabólica y endocrina que incluye un amplio espectro

de trastornos de nervios periféricos asociados a enfermedades sistémicas de origen metabólico. Estas enfermedades, algunas de las cuales se mencionan anteriormente, incluyen diabetes sacarina, hipoglucemia, uremia, hipotiroidismo, insuficiencia hepática, policitemia, amiloidosis, acromegalia, porfiria, trastornos del metabolismo de lípidos/glicolípidos, deficiencias nutricionales/vitamínicas y trastornos mitocondriales, entre otros. El 5 distintivo común de estas enfermedades es la afectación de nervios periféricos mediante la alteración de la estructura o función de mielina y axones debido a una desregulación de la ruta metabólica.

Las neuropatías pueden incluir también neuropatías ópticas tales como glaucoma; degeneración de ganglios de retina tal como aquellas asociadas a retinitis pigmentaria y otras neuropatías retinales; neuritis y/o degeneración del 10 nervio óptico, incluyendo la asociada a esclerosis múltiple; lesión traumática en el nervio óptico que puede incluir, por ejemplo, lesión durante la retirada de tumor; neuropatías ópticas hereditarias tales como enfermedad de Kjer y neuropatía óptica hereditaria de Leber; neuropatías ópticas isquémicas, tales como aquellas secundarias a arteritis de células gigantes; neuropatías ópticas metabólicas tales como enfermedades neurodegenerativas incluyendo la neuropatía de Leber mencionada anteriormente, deficiencias nutricionales tales como deficiencias en vitaminas B12 15 o ácido fólico, y toxicidades tales como debidas a etambutol o cianuro; neuropatías causadas por reacciones adversas a fármacos y neuropatías causadas por deficiencia vitamínica. Las neuropatías ópticas isquémicas incluyen también neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica.

Las enfermedades neurodegenerativas que están asociadas a la neuropatía o axonopatía en el sistema nervioso 20 central incluyen una variedad de enfermedades. Tales enfermedades incluyen aquellas que implican demencia progresiva tales como, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, enfermedad de Pick y enfermedad de Huntington; enfermedades del sistema nervioso central que afectan a la función muscular tales como, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedades de neuronas motoras y ataxias progresivas tales como esclerosis lateral amiotrófica; enfermedades desmielinizantes tales como, por ejemplo, esclerosis múltiple; encefalitis víricas 25 tales como, por ejemplo, aquellas causadas por enterovirus, arbovirus y herpesvirus simple y enfermedades priónicas. Las lesiones mecánicas tales como glaucoma o lesiones traumáticas en la cabeza o médula pueden causar también lesión nerviosa y degeneración en el cerebro y médula espinal. Además, la isquemia y la apoplejía, así como afecciones tales como deficiencia nutricional y toxicidad química tal como con agentes quimioterapéuticos, pueden causar neuropatías del sistema nervioso central.

30 El término "tratamiento" como se usa en la presente memoria pretende incluir intervención antes o después de la aparición de lesión neuronal. Como tal, el tratamiento puede prevenir la lesión neuronal mediante la administración antes de que ocurra un ataque primario a las neuronas, así como mejorar la lesión neuronal mediante la administración después de que ocurra un ataque primario a las neuronas. Tal ataque primario a las neuronas puede 35 incluir o ser el resultado de cualquier enfermedad o afección asociada a una neuropatía. "Tratamiento" incluye también prevención de la progresión de lesión neuronal. "Tratamiento" como se usa en la presente memoria puede incluir la administración de fármacos y/o sustancias sintéticas, la administración de sustancias biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos, vectores víricos y similares, así como la administración de sustancias tales como nutracéuticos, aditivos alimentarios o alimentos funcionales.

40 Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación son útiles para tratar mamíferos. Tales mamíferos incluyen seres humanos así como mamíferos no humanos. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, animales de compañía tales como perros y gatos, animales agrícolas tales como ganado incluyendo vacas, caballos y similares, y animales exóticos tales como animales de zoo.

45 Las sustancias que pueden aumentar la actividad sirtuina en mamíferos pueden incluir polifenoles, algunos de los cuales se han descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Howitz et al., Nature 425: 191-196, 2003 y la información suplementaria que acompaña al artículo). Tales compuestos pueden incluir estilbenos tales como resveratrol, piceatanol, desoxirrapontina, *trans*-estilbeno y rapontina; calconas tales como buteína, isoliquiritigeno y 3,4,2',4',6'- 50 pentahidroxicalcona y calcona; flavonas tales como fisetina, 5,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona, luteolina, 3,6,3',4'-tetrahidroxiflavona, quercetina, 7,3',4',5'-tetrahidroxiflavona, kempferol, 6-hidroxiapigenina, apigenina, 3,6,2',4'-tetrahidroxiflavona, 7,4'-dihidroxiflavona, 7,8,3',4'-tetrahidroxiflavona, 3,6,2',3'-tetrahidroxiflavona, 4'-hidroxiflavona, 5,4'-dihidroxiflavona, 5,7-dihidroxiflavona, morina, flavona y 5-hidroxiflavona; isoflavonas tales como daidzeína y genisteína; flavanonas tales como naringenina, 3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavanona y flavanona o catequinas tales 55 como (-)-epicatequina, (-)-catequina, (-)-galocatequina, (+)-catequina y (+)-epicatequina.

Pueden identificarse polifenoles adicionales u otras sustancias que aumentan la actividad sirtuina desacetilasa usando sistemas de ensayo descritos en la presente memoria, así como en ensayos comercialmente disponibles tales como ensayos enzimáticos fluorescentes (Biomol International L.P., Plymouth Meeting, Pensilvania). Sinclair et 60 al. divulgan también sustancias que pueden aumentar la actividad sirtuina (Sinclair et al., WO2005/02672).

En diversos aspectos de la divulgación, otras sustancias pueden aumentar la actividad sirtuina indirectamente aumentando la actividad de NAD como resultado del funcionamiento de sirtuina particular a través de la actividad histona/proteína desacetilasa dependiente de NAD. La actividad de NAD puede aumentarse mediante la administración de NAD o NADH así como mediante la síntesis de NAD. El NAD puede sintetizarse a través de tres rutas principales, la ruta *de novo* en que se sintetiza NAD a partir de triptófano, la ruta de recuperación de NAD en que se genera NAD reciclando productos de NAD degradados tales como nicotinamida (Lin et al. *Curent Opin. Cell Biol.* 15: 241-246, 2003; Magni et al., *Cell Mol. Life Sci.* 61: 19-34, 2004) y la ruta de ribósido de nicotinamida cinasa, en que se convierte el ribósido de nicotinamida en mononucleótido de nicotinamida por la ribósido de nicotinamida cinasa (Bieganowski et al., *Cell* 117: 495-502, 2004). Por tanto, administrar a neuronas lesionadas un precursor de NAD en la ruta *de novo* tal como, por ejemplo, triptófano o nicotinato y/o sustancias en la ruta de recuperación de NAD tales como, por ejemplo, nicotinamida, ácido nicotínico, mononucleótido de ácido nicotínico o desamidoNAD y/o sustancias en la ruta de ribósido de nicotinamida cinasa tales como, por ejemplo, ribósido de nicotinamida o mononucleótido de nicotinamida, podría aumentar potencialmente la actividad de NAD. Como se muestra a continuación, el mononucleótido de nicotinamida, el mononucleótido de ácido nicotínico o el ribósido de nicotinamida, además de NAD, protegen frente a la degeneración axonal en una extensión similar al NAD, sin embargo, el ácido nicotínico y la nicotinamida no lo hacían. La actividad de NAD aumentada puede aumentar entonces la actividad sirtuina histona/proteína desacetilasa en las neuronas lesionadas y disminuir o prevenir la degeneración axonal. Además, se cree que otras sustancias pueden actuar aumentando la actividad enzimática o aumentando los niveles de NAD, mononucleótido de nicotinamida, mononucleótido de ácido nicotínico, ribósido de nicotinamida o enzimas sirtuinas o reduciendo la degradación de NAD, mononucleótido de nicotinamida, mononucleótido de ácido nicotínico, ribósido de nicotinamida o enzimas sirtuinas.

En diversos aspectos de la divulgación, puede aumentarse NAD en neuronas lesionadas administrando enzimas que sinteticen NAD o ácidos nucleicos que comprendan enzimas que sinteticen NAD. Tales enzimas pueden incluir una enzima de la ruta *de novo* para sintetizar NAD, una enzima de la ruta de recuperación de NAD o una enzima de la ruta de ribósido de nicotinamida cinasa y, en particular, una enzima de la ruta de recuperación de NAD tal como, por ejemplo, una mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa (NMNAT) tal como NMNAT1. Por tanto, en un ejemplo no limitante, la administración de una NMNAT tal como NMNAT1 o NMNAT3 o un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una NMNAT tal como NMNAT1 o NMNAT3 puede disminuir o prevenir la degeneración axonal en neuronas lesionadas.

La enzima NMNAT1 (E.C.2.7.7.18) se representa según los números de acceso a GenBank para el gen y/o proteína de NMNAT1 humana: NP_073624; NM_022787; AAL76934; AF459819 y NP_073624; AF314163. Es una variante de este gen NMNAT2 (KIAA0479), cuya versión humana puede encontrarse en los números de acceso a GenBank NP_055854 y NM_015039.

Como se usa en la presente memoria, el término "porcentaje de identidad" o "identidad porcentual" o "% de identidad" hace referencia a la identidad de secuencia entre dos secuencias aminoacídicas o entre dos secuencias nucleotídicas. La identidad puede determinarse cada una comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo o similar residuo aminoacídico (p.ej., similar en la naturaleza estérica y/o electrónica), entonces puede hacerse referencia a las moléculas como homólogas (similares) en esa posición. Expresiones como porcentaje de homología, similitud o identidad hacen referencia a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden usarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.) y pueden usarse, p.ej., con los ajustes por defecto. ENTREZ está disponible en el National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md. En un aspecto de la divulgación, la identidad porcentual de dos secuencias puede determinarse por el programa GCG con una ponderación de hueco de 1, p.ej. cada hueco aminoacídico se pondera como si hubiera un solo desapareamiento aminoacídico o nucleotídico entre las dos secuencias. Se describen otras técnicas para alineamiento en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU. Preferiblemente, se utiliza para alinear las secuencias un programa de alineamiento que permite huecos en la secuencia. El de Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en los alineamientos de secuencia. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). También puede utilizarse el programa GAP que usa el procedimiento de alineamiento de Needleman y Wunsch para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa usa el software MPSRCH, que funciona en un ordenador MASPAR. El MPSRCH usa un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar las secuencias en un ordenador masivamente paralelo. Este

enfoque mejora la capacidad de captar coincidencias relacionadas distantes y es especialmente tolerante frente a huecos pequeños y errores de secuencia nucleotídica. Las secuencias aminoacídicas codificadas por ácido nucleico pueden usarse para buscar en bases de datos tanto de proteína como de ADN. Se describen bases de datos con secuencias individuales en *Methods in Enzymology*, ed. Doolittle, supra. Las bases de datos incluyen Genbank, 5 EMBL y la base de datos de ADN de Japón (DDBJ).

Una "variante" de un polipéptido hace referencia a un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica del polipéptido en que están alterados uno o más residuos aminoacídicos. La variante puede tener cambios "conservativos", donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p.ej., 10 reemplazo de leucina por isoleucina). Una variante puede tener cambios "no conservativos" (p.ej., reemplazo de glicina por triptófano). Las variaciones menores análogas pueden incluir también deleciones o inserciones aminoacídicas, o ambas. Pueden encontrarse directrices para determinar cuáles residuos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin anular la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos bien conocidos en la materia, por ejemplo el software LASERGENE (DNASTAR).

15 El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia polinucleotídica, puede englobar una secuencia polinucleotídica relacionada con la de un gen particular o la secuencia de codificación del mismo. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes "alélicas", de "corte y empalme", de "especie" o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, 20 pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al corte y empalme alterno de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias polinucleotídicas que varían de una especie a otra. Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia polinucleotídica de un gen 25 particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden englobar "polimorfismos de un solo nucleótido" (SNP) en que la secuencia polinucleotídica varía en una base. La presencia de SNP puede ser indicativa, por ejemplo, de una cierta población, un estado patológico, o una propensión a un estado patológico.

Un agente que puede usarse para tratar o prevenir una neuropatía de acuerdo con los procedimientos y 30 composiciones de la presente divulgación puede comprender un mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa (NMNAT) o un polinucleótido que codifica una NMNAT. En particular, el agente puede ser una enzima que tiene actividad de NMNAT y al menos un 50 % de identidad con una NMNAT1 humana o al menos un 50 % de identidad con una NMNAT3 humana, al menos un 60 % de identidad con una NMNAT1 humana o al menos un 60 % de identidad con una NMNAT3 humana, al menos un 70 % de identidad con una NMNAT1 humana o al menos un 70 % de identidad con una NMNAT3 humana, al menos un 80 % de identidad con una NMNAT1 humana o al 35 menos un 80 % de identidad con una NMNAT3 humana, al menos un 90 % de identidad con una NMNAT1 humana o al menos un 90 % de identidad con una NMNAT3 humana, al menos un 95 % de identidad con una NMNAT1 humana o al menos un 95 % de identidad con una NMNAT3 humana. Además, el agente puede comprender una NMNAT1 humana, una NMNAT3 humana o variantes sustituidas conservativamente de las mismas.

40 El agente puede comprender también un polinucleótido que tiene al menos un 50 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 50 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 60 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 60 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de 45 identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 95 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 95 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una NMNAT3 humana. El agente puede ser también un polinucleótido que codifica una NMNAT1 humana, una NMNAT3 humana o una variante del mismo.

55 El agente puede comprender también un polipéptido de sirtuina o un ácido nucleico que codifica un polipéptido de sirtuina. En particular, el agente puede comprender una enzima que tiene actividad de SIRT y al menos un 50 % de identidad con una SIRT1 humana, al menos un 60 % de identidad con una SIRT1 humana, al menos un 70 % de identidad con una SIRT1 humana, al menos un 80 % de identidad con una SIRT1 humana, al menos un 90 % de 60 identidad con una SIRT1 humana o al menos un 95 % de identidad con una SIRT1 humana. Además, el agente

puede comprender una SIRT1 humana o variantes conservativamente sustituidas de la misma. El agente puede comprender también un polinucleótido que tiene al menos un 50 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana, polinucleótido que tiene al menos un 60 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 70 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana, un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana o un polinucleótido que tiene al menos un 95 % de identidad con un ácido nucleico que codifica una SIRT1 humana. Además, el agente puede comprender un polinucleótido que codifica una SIRT1 humana o una variante de la misma.

10

La administración puede ser mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo bucal, dental, endocervical, intramuscular, por inhalación, intracraneal, intralinfática, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrapleural, intratecal, intratraqueal, intrauterina, intravascular, intravenosa, intravesical, intranasal, oftálmica, oral, ótica, por perfusión biliar, perfusión cardiaca, periodontal, rectal, subcutánea medular, sublingual, tópica, intravaginal, transdérmica, uretral o uretral. Las formas de dosificación pueden ser en aerosol, incluyendo aerosol medido, barra masticable, cápsula, cápsula que contiene aglomerados recubiertos, cápsula que contiene aglomerados de liberación retardada, cápsula que contiene aglomerados de liberación extendida, concentrado, crema, crema potenciada, crema de supositorio, disco, apósito, elixir, emulsión, enema, fibra de liberación extendida, película de liberación extendida, gas, gel, gel medido, gránulo, gránulo de liberación retardada, gránulo efervescente, goma de mascar, implante, inhalante, inyectable, complejo lipídico inyectable, liposomas inyectables, inserto, inserto de liberación extendida, dispositivo intrauterino, jalea, líquido, líquido de liberación extendida, loción, loción potenciada, loción de champú, aceite, pomada, pomada potenciada, pasta, pastilla, aglomerado, polvo, polvo de liberación extendida, polvo medido, anillo, champú, solución de jabón, solución para papilla refrigerante, solución/gotas, solución de concentrado, gel que forma solución/gotas, esponja, pulverizador, pulverizador medido, supositorio, suspensión, suspensión/gotas, suspensión de liberación extendida, torunda, jarabe, comprimido, comprimido masticable, comprimido que contiene partículas recubiertas, comprimido de liberación retardada, comprimido dispersable, comprimido efervescente, comprimido de liberación extendida, comprimido de disgregación oral, tampón, cinta o pastilla para chupar/píldora.

30 La administración intraocular puede incluir administración por inyección, incluyendo inyección intravítrea, por gotas oculares y por suministro transescleral.

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

35

Se contempla también que ciertas formulaciones que contienen las composiciones que aumentan la actividad sirtuina se administren por vía oral. Tales formulaciones preferiblemente se encapsulan y formulan con vehículos adecuados en formas de dosificación sólidas. Algunos ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio alginatos, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, gelatina, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, magnesio, estearato, agua, aceite mineral y similares. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes o agentes aromatizantes. Las composiciones pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, mantenida o retardada de los ingredientes activos después de la administración al paciente, empleando procedimientos bien conocidos en la materia. Las formulaciones pueden contener también sustancias que disminuyan la degradación proteolítica y promuevan la absorción tales como, por ejemplo, agentes tensioactivos.

La dosis específica puede calcularse entonces de acuerdo con el peso corporal o área superficial corporal aproximados del paciente o el volumen de espacio corporal que ocupa. La dosis dependerá también de la vía de administración particular seleccionada. El refinamiento adicional de los cálculos necesario para determinar la dosificación apropiada para tratamiento se realiza rutinariamente por los especialistas en la materia. Tales cálculos pueden realizarse sin experimentación indebida por un especialista en la materia en vista de la actividad en preparaciones de ensayo tales como se han descrito en otro lugar para ciertos compuestos (véase, por ejemplo, Howitz et al., Nature 425: 191-196, 2003 y la información suplementaria que acompaña al artículo). Las dosificaciones exactas pueden determinarse junto con estudios de dosis y respuesta estándares. Se entenderá que la cantidad de composición administrada realmente se determinará por un facultativo en vista de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección o afecciones para tratar, la elección de la composición para administrar, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y la vía de administración elegida.

60

En diversos aspectos de la divulgación, se divulgan procedimientos de cribado de agentes candidatos. En uno de tales procedimientos de ensayo, se ensaya en los agentes la efectividad en la reducción o prevención de la degeneración axonal de células neuronales lesionadas. Se administran por tanto los agentes candidatos a células neuronales sometidas a lesión y se detecta una reducción de la degeneración axonal de las células neuronales lesionadas. Típicamente, el agente se añade antes de producirse la lesión, sin embargo, en algunos aspectos, la lesión puede producirse antes de la adición del compuesto candidato. El procedimiento puede practicarse *in vitro* o *in vivo*. Las pruebas *in vitro* pueden practicarse usando cualquiera de una serie de células neuronales de mamífero bajo una variedad de condiciones experimentales en que se desencadena la lesión. Son un ejemplo de tipos de célula neuronal de mamífero que pueden usarse las células de ganglio de raíz dorsal primaria lesionadas por transección y retirada del cuerpo celular neuronal o bien el crecimiento en medios que contienen vincristina como se describe a continuación. Las pruebas *in vivo* pueden practicarse en animales intactos tales como, por ejemplo, un modelo de regeneración de nervios periféricos en ratón (Pan et al., J. Neurosci. 23: 11479-11488, 2003) o un modelo de neuropatía motora progresiva en ratón (Schmalbruch et al., J. Neuropathol. Exp. Neurol. 50: 192-204, 1991; Ferri et al., Current Biol. 13: 669-673, 2003).

Debido a que el mecanismo de reducción o prevención de la lesión neuronal es el resultado de un aumento de la actividad de histona/proteína desacetilasa dependiente de NAD de las moléculas de sirtuina, el procedimiento de ensayo puede usarse también como cribado primario para sustancias que aumenten directamente la actividad sirtuina o bien a través del aumento de la actividad de NAD. Por tanto, los procedimientos anteriores pueden usarse para cribar agentes que aumenten la actividad biosintética de NAD o agentes que aumenten la actividad sirtuina en neuronas.

Los vectores recombinantes que sirven como vehículos para un ácido nucleico que codifica una molécula de sirtuina o una enzima para la biosíntesis de NAD están también dentro del alcance de la presente divulgación. Tales vectores recombinantes pueden comprender un promotor ligado operativamente con una secuencia que codifica una proteína NMNAT1 de mamífero o una proteína sirtuina de mamífero tal como una proteína SIRT1. Tales vectores recombinantes pueden ser cualquier vector adecuado tal como, por ejemplo, un lentivirus o virus adenoasociado. Puede usarse también cualquier promotor adecuado tal como, por ejemplo, un promotor de ubiquitina, un promotor de CMV o un promotor de β -actina.

La invención puede entenderse adicionalmente por referencia a los ejemplos siguientes, algunos de los cuales no entran dentro del alcance de las reivindicaciones y se incluyen solo con fines de referencia.

EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra que los axones transeccionados de neuronas transfectadas con un vector que expresa la proteína Wld^s muestran una degeneración retardada en comparación con neuronas de control.

En ratones con *wld^f*, se ha mostrado que se retarda la degeneración walleriana en respuesta a la lesión axonal (Gillingwater, et al., JPhysiol, 534: 627-639, 2001). El análisis genético ha mostrado que la mutación *wld^f* comprende un triplicado en tándem de 85 kb que da como resultado la sobreexpresión de una molécula nuclear quimérica (la proteína Wld^s). Esta proteína está compuesta por los 70 AA N-terminales de Ufd (proteína de degradación de la fusión de ubiquitina)2a, un factor de ensamblaje de la cadena de ubiquitina, fusionados con la secuencia completa de mononucleótido de nicotinamida adenililtransferasa (NMNAT1), un enzima de la ruta de recuperación de NAD que genera NAD en el núcleo. La proteína Wld^s tiene actividad de NMNAT, pero carece de función ligasa de ubiquitina, sugiriendo que la protección axonal deriva de la actividad de NMNAT1 aumentada o de una inhibición "dominante negativa" de la función de Ufd2a.

Para identificar el mecanismo de degeneración axonal retardada mediado por la proteína Wld^s, se empleó un modelo de degeneración walleriana *in vitro*. Se infectaron neuronas de explante de DRG primario con lentivirus que expresan las proteínas apropiadas y se lesionaron los axones por retirada del cuerpo celular neuronal (transección) o bien crecimiento en vincristina (tóxico).

Los constructos de expresión lentivírica se proporcionaron amablemente por D. Baltimore (Lois, et al., Science 295: 868-72, 2002). Se modificó el vector FUGW para generar un vector lanzadera de expresión general FUIV (promotor de ubiquitina-gen de interés-IRES-YFP potenciada (Venus)) que posibilita una expresión potenciada de YFP en células que expresan el gen de interés. Se clonaron las siguientes proteínas en el vector FUIV, cada una con un marcaje de hexahistidina en el extremo C. Proteína mutante quimérica Wld^s; Ufd2a que contiene una mutación puntual (P1140A), que se ha mostrado anteriormente que inhibe la función de Ufd2a de tipo silvestre como "dominante negativa" (Ufd2a(P1140)). Se clonaron los siguientes genes en el vector FUGW: 1) Los primeros 70 AA

de Ufd2a (la porción contenida en la proteína Wld^s) fusionados con el extremo N de EGFP (Ufd2a(1-70)-EGFP) o EGFP con señal de localización nuclear en el extremo C (Ufd2a(1-70)-nucEGFP). 2) La porción de NMNAT1 de la proteína Wld^s fusionada con el extremo C de EGFP (EGFP-NMNAT1).

- 5 Se proporcionó el ADNc de murino para Ufd2a/Ube4b (mKIAA0684) por el Kazusa DNA Research Institute. Los ADNc de murino para NMNAT1 (número de acceso: BC038133) se adquirieron en la ATCC. Se usó mutagénesis mediada por PCR para generar mutaciones puntuales en Ufd2a, NMNAT1 y Wld^s.

- Se generaron constructos de siRNA en el vector FSP-si generado a partir de la cadena principal de FUGW reemplazando el promotor de ubiquitina y el ADNc de GFP por el promotor U6 humano y la señal de terminación Pol I seguido de promotor de SV40-gen de puromicina N-acetiltransferasa. Se practicó la clonación del constructo de siRNA como se describe anteriormente, de modo que el siRNA se transcriba a partir del promotor U6 (Castanotto, et al., *RNA*, 8: 1454-60, 2002). Las secuencias usadas para la regulación negativa por siRNA de la expresión de proteína fueron 1692-1710 de SIRT1, 1032-1050 de SIRT2, 538~556 de SIRT3, 1231~1249 de SIRT4, 37~55 de SIRT5, 1390~1408 de SIRT6 y 450-468 de SIRT7. Se confirmó la integridad de cada constructo de expresión lentivírica y de siRNA por secuenciación de ADN.

- Se cultivaron explantes de DRG de ratón de embriones E12.5 en presencia de factor de crecimiento nervioso 1 nM. Se retiraron las células no neuronales de los cultivos añadiendo 5-fluorouracilo al medio de cultivo. Se practicó la transección de neuritas a 10-20 DIV usando una aguja de calibre 18 para retirar los cuerpos celulares neuronales. Se practicó la incubación con dinucleótido de β -nicotinamida y adenina (Sigma) o Sirtinol (Calbiochem) usando las condiciones indicada en el texto o las figuras.

- Se generaron vectores de expresión lentivírica usando células HEK293T como se describen anteriormente. Para la confirmación de la expresión de proteína derivada de lentivirus, se infectaron células HEK293T con lentivirus y se lisaron 3 días después de la infección. Se analizaron estos lisados por inmunotransferencia usando el anticuerpo monoclonal anti-marcaje His (Qiagen) para detectar la expresión de las proteínas marcadas con hexahistidina respectivas. Se practicó la infección lentivírica de neuronas de DRG incubando $\sim 10^6$ - 10^7 ufp de virus/ml con el explante de DRG durante 24 h empezando 3-7 días antes de la transección axonal. Se examinaron las neuronas infectadas bajo un microscopio fluorescente invertido para asegurar una expresión de transgén mediada por lentivirus detectable en > 95 % de las neuronas.

- Se practicó el análisis cuantitativo de la degeneración axonal como se describe anteriormente (Zhai, et al., *Neuron* 39: 217-25, 2003). Brevemente, se examinaron los cultivos usando microscopio de contraste de fases en los momentos indicados. Los axones con una apariencia fragmentada no refractiva se designaron como "degenerados". En cada punto temporal, se puntuaron con anonimato al menos 200 axones distinguibles individualmente a partir de varias imágenes tomadas aleatoriamente de cada cultivo. Se ensayó cada condición en explantes por triplicado en cada experimento. Se obtuvieron resultados de 2-4 experimentos independientes para cada condición. Se practicó el análisis estadístico mediante la prueba de t de Student. Para los cálculos del área cubierta por neuritas, se analizaron imágenes capturadas digitalmente de muestra por cuadruplicado de dos experimentos independientes usando el software Analysis 3.1 (Soft Imaging System, Lakewood, CO).

- Se encontró que los axones transeccionados de neuronas que expresan la proteína Wld^s degeneraban con la cinética retardada característica de neuronas derivadas de ratones con *wld^s* (Buckmaster, et al., *Eur J Neurosci* 7: 1596-602, 1995) como se muestra en la Figura 1A.

- A continuación, se comparó la degeneración axonal después de transección en neuronas que sobreexpresan la proteína Wld^s con aquellas que expresan las porciones Ufd2a o NMNAT1 que constituyen la proteína Wld^s ligadas a EGFP. Se muestran los resultados en la Figura 1B.

- Se encontró que la expresión de la degeneración axonal retardada por EGFP-NMNAT1 es comparable a la de la proteína Wld^s misma, mientras que los 70 AA N-terminales de Ufd2a (fusionados con EGFP), orientados a núcleo o bien a citoplasma, no afectaban a la degeneración axonal. Se practicó la cuantificación de estos efectos contando el porcentaje de neuritas restantes en diversos momentos después de la retirada de los cuerpos celulares neuronales. Este análisis mostró que la EGFP-NMNAT1, como la proteína Wld^s misma, daba como resultado un aumento de >10 veces de neuritas intactas 72 h después de la lesión. Para excluir adicionalmente la implicación directa de UPS en la protección axonal mediada por la proteína Wld^s, se examinó el efecto de la inhibición de Ufd2a usando un mutante de Ufd2a dominante negativo o un constructo de siRNA de Ufd2a. Sin embargo, ninguno de estos procedimientos daba como resultado una degradación axonal retardada en respuesta a la axotomía. Conjuntamente, estos experimentos demostraron que la porción NMNAT1 de la proteína Wld^s es responsable de la degeneración axonal

retardada observada en ratones con *wld^s*.

EJEMPLO 2

5 Este ejemplo muestra que las mutaciones en NMNAT1 completa y en la proteína Wld^s anulan los efectos protectores axonales de las proteínas .

La NMNAT1 es una enzima de la ruta de recuperación de NAD nuclear que cataliza la conversión de mononucleótido de nicotinamida (NMM) y mononucleótido de nicotinato (NaMN) en NAD y mononucleótido de nicotinato y adenina (NaAD), respectivamente. La protección axonal observada en neuronas que sobreexpresan NMNAT1 podría estar mediada por su capacidad de sintetizar NAD (es decir, su actividad enzimática) o, quizás, por otras funciones desconocidas de esta proteína. Para enfrentarse a esta cuestión, se usó la estructura cristalina de NMNAT1 para identificar varios residuos que se predice que participan en la unión a sustrato. Se manipuló una mutación en uno de estos residuos (W170A) en NMNAT1 completa y la proteína Wld^s. Los ensayos enzimáticos in vitro confirmaron que ambas de estas proteínas mutantes estaban gravemente limitadas en su capacidad de sintetizar NAD (Fig. 2A). Se introdujeron en neuronas cada uno de estos mutantes y sus respectivas contrapartidas de tipo silvestre para valorar su capacidad de proteger a los axones de la degradación. Se encontró que las neuronas que expresan estos mutantes enzimáticamente inactivos no tenían efectos protectores axonales (Fig. 2A), indicando que la producción de NAD/NaAD es responsable de la capacidad de NMNAT1 de prevenir la degradación axonal.

EJEMPLO 3

Este ejemplo ilustra que la actividad aumentada de NMNAT en neuronas lesionadas con vincristina muestra también una degradación axonal retardada.

Además de la transección mecánica, se observa también protección axonal en ratones con *wld^s* frente a otros agentes dañinos tales como isquemia y toxinas (Coleman, et al., Trends Neurosci 25: 532-37, 2002; Gillingwater, et al., J Cereb Blood Flow Metab 24: 62-66, 2004). Se buscó determinar si la actividad de NMNAT aumentada retardaría también la degradación axonal en respuesta a otros tipos de lesión axonal tales como vincristina, un reactivo quimioterapéutico del cáncer con toxicidad axonal bien caracterizada. Se hicieron crecer neuronas que expresan NMNAT1 o EGFP (control) en vincristina 0,5 µM durante hasta 9 d. Se encontró que los axones de neuronas que expresan NMNAT1 mantenían su longitud y refractabilidad originales, mientras que los axones que emanan de neuronas que expresan EGFP se retraían gradualmente y habían degenerado en su mayoría para el día 9 (Fig. 2B). Estos resultados indican que la actividad de NMNAT1 por sí misma puede proteger a los axones de una serie de ataques y media los efectos protectores observados en ratones con *wld^s*.

EJEMPLO 4

40 Este ejemplo muestra que el NAD administrado exógenamente puede proteger a neuronas lesionadas de la degeneración axonal.

Experimentos previos han mostrado que las células neuronales expresan proteínas de membrana que pueden unirse a y transportar NAD extracelular a la célula (Bruzzone, et al., Faseb J 15: 10-12, 2001). Esto alentó a investigar si el NAD administrado exógenamente podría prevenir la degeneración axonal. Se añadieron diversas concentraciones de NAD a cultivos neuronales antes de la transección axonal y se examinó la extensión de la degradación axonal. Se encontró que el NAD 0,1-1 mM añadido 24 h antes de la axotomía retardaba significativamente la degeneración axonal, aunque el NAD aplicado exógenamente era ligeramente menos efectivo en la protección de axones que la expresión de NMNAT1 mediada por lentivirus (Fig. 3A). Estos resultados proporcionan un apoyo directo a la idea de que un suministro de NAD aumentado puede prevenir la degradación axonal.

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra que se requería NAD antes de la retirada de los cuerpos celulares neuronales para proteger a las neuronas lesionadas de la degeneración axonal.

Para entender mejor el mecanismo de protección axonal dependiente de NAD (NDAP), se examinó si se requería NAD antes de la retirada de los cuerpos de células neuronales, o si la exposición directa de los axones seccionados a altos niveles de NAD era suficiente para proporcionar protección (Fig. 3B). Se prepararon cultivos neuronales y se añadió NAD 1 mM al medio de cultivo en el momento de la transección axonal o en diversos momentos (4 a 48 h)

antes de la lesión.

Se encontró que administrar NAD en el momento de la transección axonal, o durante hasta 8 h antes de la lesión, no tenía efectos protectores sobre los axones. Sin embargo, se observó una preservación axónica significativa cuando se incubaban las neuronas con NAD durante periodos más largos de tiempo antes de la lesión, apareciendo los mayores efectos después de al menos 24 h de pretratamiento con NAD. Estos resultados indican que la protección axonal dependiente de NAD no está mediada por una modificación postraduccional rápida en los axones mismos.

El requisito de una exposición extendida a NAD de las neuronas intactas para prevenir la degradación axonal en respuesta a lesión sugiere que el proceso protector requiere eventos transcripcionales y/o traduccionales *de novo*. De forma interesante, tanto la proteína Wld^s como NMNAT1 están localizadas en el núcleo (datos no mostrados). De forma similar, la mayoría de enzimas que constituyen la ruta de recuperación de NAD en levadura están también compartimentalizadas en el núcleo. Se compararon los niveles de NAD en neuronas de DRG de tipo silvestre y que expresan NMNAT1 usando ensayos enzimáticos a microescala sensibles (Szabo, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93: 1753-58, 1996), sin embargo, no se encontraron cambios en los niveles de NAD celular globales (datos no mostrados). Esto es similar a las observaciones en levadura, en que la activación de esta ruta nuclear no cambiaba los niveles globales de NAD (Anderson, et al., J Biol Chem, 277: 18881-90, 2002; Huh, et al., Nature, 425: 686-91, 2003). Además, los niveles de NAD de tejido en los cerebros de ratones de tipo silvestre y con *wld^s* son similares a pesar de los niveles aumentados de actividad de NMNAT1 en los ratones con *wld^s* (Mack, et al., Nat Neurosci, 4: 1199-206, 2001). Estos datos sugieren que la actividad enzimática dependiente de NAD en el núcleo, en contraposición con los procesos dependientes de NAD citoplasmáticos, es probable que medie la protección axonal observada en respuesta a la actividad de NMNAT aumentada.

EJEMPLO 6

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

La familia de Sir2 de proteína desacetilasas y poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) son las actividades enzimáticas nucleares dependientes de NAD principales. Sir2 es una desacetilasa de histonas y otras proteínas dependiente de NAD, y su activación es básica para promover una longevidad aumentada en levadura y *C. elegans* (Bitterman, et al., Microbiol Mol Biol Rev, 67: 376-99, 2003; Hekimi, et al., Science 299: 1351-54, 2003). La PARP se activa por el daño al ADN y está implicada en la reparación de ADN (S.D. Skaper, Ann NY Acad Sci, 993: 217-28 y 287-88, 2003). Estas enzimas, en particular las proteínas Sir2, han generado un gran interés en los últimos años ya que proporcionan un vínculo potencial entre la restricción calórica y sus efectos sobre el proceso de envejecimiento. La importancia de estas enzimas dependientes de NAD en la regulación de la actividad génica impulsó la investigación de su papel en el proceso autodestructivo de la degradación axonal. Por lo tanto, se ensayó si los inhibidores de Sir2 (Sirtinol) y PARP (3-aminobenzamida (3AB)) podrían afectar a la protección axonal dependiente de NAD (NDAP) (Fig. 4A). Se cultivaron las neuronas en presencia de NAD 1 mM y Sirtinol (100 μM) o 3AB (20 mM). Se practicó la transección axonal mediante la retirada de los cuerpos celulares neuronales y se valoró la extensión de la degradación axonal 12 a 72 h después. Se encontró que el Sirtinol bloqueaba efectivamente el NDAP, indicando que la proteínas Sir2 son efectoras probables de este proceso. En contraposición, 3AB no tenía efecto sobre NDAP, indicando que la PARP no desempeña un papel en la protección axonal. Para examinar adicionalmente el papel de las proteínas Sir2 en NDAP, se ensayaron los efectos de resveratrol (10~100 μM), un compuesto de polifenol que potencia la actividad de Sir2 (Howitz, et al., Nature, 425: 191-96, 2003). Se encontró que las neuronas tratadas con resveratrol antes de la axotomía mostraban una reducción de la degradación axonal que era comparable con la obtenida usando NAD (Fig. 4A), proporcionando un apoyo adicional a la idea de que las proteínas Sir2 son efectoras de la protección axonal mediada por la actividad de NMNAT aumentada.

EJEMPLO 7

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

En seres humanos y roedores, se han identificado siete moléculas que comparten el dominio conservado Sir2 (sirtuina (SIRT)1 a 7), aunque algunas de estas proteínas no parecen tener actividad histona/proteína desacetilasa (Buck, et al., J Leukoc Biol, S0741-5400, 2004). SIRT1 está localizada en el núcleo y está implicada en la remodelación de cromatina y la regulación de factores de transcripción tales como p53 (J. Smith, Trends Cell Biol, 12: 404-406, 2002). La localización celular de otras proteínas SIRT es menos clara, pero se han encontrado algunas en el citoplasma y en mitocondria. Para determinar cuál proteína o proteínas SIRT están implicadas en la protección axonal dependiente de NAD, se practicaron experimentos de desactivación génica usando constructos de siRNA para orientar específicamente a cada miembro de la familia de SIRT. Se infectaron las neuronas con lentivirus que

expresan constructos de siRNA de SIRT específicos que suprimían efectivamente la expresión de su diana pretendida (Fig. 4B). Se cultivaron las neuronas infectadas en NAD 1 mM y se practicó la transección axonal retirando los cuerpos celulares. Se encontró que el constructo de siRNA de SIRT1 era tan efectivo en el bloqueo de los efectos protectores axonales de NAD como el inhibidor Sirtinol. En contraposición, la inhibición de las demás proteínas SIRT no tenía efectos significativos sobre NDAP (Fig. 4B). Estos resultados indican que SIRT1 es el efector principal del suministro de NAD aumentado que previene efectivamente la autodestrucción axonal. Aunque SIRT1 puede desacetilar proteínas directamente implicadas en la estabilidad axonal, su localización predominantemente nuclear junto con el requisito de NAD 24 h antes de la lesión para una protección efectiva, sugiere que SIRT1 regula un programa genético que conduce a la protección axonal.

10

La degeneración axonal es un fenómeno autodestructivo activo, observado no solo después de lesión y en respuesta a quimioterapia, sino también en asociación con el envejecimiento, enfermedades metabólicas tales como neuropatía diabética y enfermedades neurodegenerativas. Los resultados indican que el mecanismo molecular de protección axonal en los ratones con *wld^f* es debido a un suministro aumentado de NAD resultante de la actividad potenciada de la ruta de recuperación de NAD y la consiguiente activación de la histona/proteína desacetilasa SIRT1.

15

EJEMPLOS 8-11

20 Se usaron los siguientes Materiales y Procedimientos en los Ejemplos 8-11.

Construcción de plásmidos de expresión y mutagénesis. Se amplificaron por PCR regiones de codificación de las enzimas biosintéticas de NAD a partir de los clones de EST BC038133 para NMNAT1 de murino y BC005737 para mononucleótido de nicotinamida adeniltransferasa 3 (NMNAT3) de murino, usando Herculase (Stratagene). El ADNc marcado con hexahistidina de NAD sintetasa humana (QNS) se proporcionó amablemente por el Dr. N. Hara (Universidad de Shimane, Shimane, Japón). Se añadió el marcaje de hexahistidina en el extremo 3' de cada ADNc. Se generó NMNAT1 citosólica mutante (cytNMNAT1) mediante mutagénesis dirigida a sitio mediada por PCR. Se generó la forma nuclear de NMNAT3 (nucNMNAT3) añadiendo una señal de localización nuclear al extremo C-terminal de NMNAT3. Se clonó cada fragmento de enzima sintética de NAD amplificado por PCR en el vector lanzadera lentivirico FCIV como se describe anteriormente. Se secuenció la integridad de todos los constructos usando los kits de secuenciación *Taq* DyeDeoxy Terminator Cycle (Applied Biosystems) y un secuenciador de ADN 373 de Applied Biosystems.

25

30

Sustratos biosintéticos de NAD. Se adquirieron todos los sustratos biosintéticos de NAD en Sigma (Na, Nam, NMN, NaMN, dinucleótido de ácido nicotínico y adenina (NaAD) y NAD). Se sintetizó el NmR a partir de NMN. Se confirmó la conversión de NMN en NmR por HPLC (Waters) usando la columna en fase inversa LC-18T (Supelco). NmR eluye a 260 ± 10 segundos y NMN eluye a 150 ± 10 segundos bajo caudal de 1 ml/min de tampón que contiene K_2HPO_4 50 mM y KH_2PO_4 50 mM (pH 7,0). Se tuvo acceso a la actividad biológica de NmR como se describe anteriormente usando cepas de levadura proporcionadas amablemente por el Dr. Charles Brenner (Dartmouth Medical School, Nueva Hampshire, EE.UU.).

35

40

Análisis de PCR de transcripción inversa cuantitativa instantánea. Se practicaron todos los procedimientos quirúrgicos de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud para el uso y cuidado de animales de laboratorio en la Universidad de Washington. Para el análisis de expresión después de lesión nerviosa, se transeccionaron los nervios ciáticos de un ratón C57BL/6 en L4 y L5. Se recogieron los DRG en los puntos temporales indicados y se combinaron para extraer el ARN. Se cultivaron explantes de DRG de rata de embriones E14.5 durante 14 días de acuerdo con el procedimiento descrito, se cultivaron con medios que contenían vincristina 10 nM durante el periodo indicado y se extrajo el ARN. Se prepararon los ARN totales de las fuentes de tejido combinadas o cultivos de explante de DRG. Se prepararon moldes de ADNc de primera hebra a partir de 1 µg de cada ARN usando procedimientos estándares. Se practicaron dos síntesis de ADNc independientes para cada muestra de ARN. Se practicó la transcripción inversa cuantitativa (RT)-PCR monitorizando instantáneamente el aumento de fluorescencia del tinte SYBR-GREEN en un sistema de detección de secuencia *TaqMan* 7700 (Applied Biosystems).

45

50

Cultivo celular, axotomía in vitro y cuantificación de la degeneración axonal. Se cultivaron explantes de DRG de ratón de embriones E12.5 en DMEM que contenía 10 % de FCS y factor de crecimiento nervioso 1 nM. Se retiraron las células no neuronales de los cultivos añadiendo 5-fluorouracilo a los medios de cultivo. Se practicó la transección de las neuritas a 14-21 DIV usando una aguja de calibre 18 para retirar los cuerpos celulares neuronales. Se generaron los vectores de expresión lentiviricos. Se practicó la infección lentivirica 3-7 días antes de la transección axonal durante 24 h. Se practicó el análisis cuantitativo de la degeneración de neuritas.

55

60

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

Sobreexpresión de proteína NMNAT, purificación por afinidad y ensayo enzimático. Se transfectaron células HEK293T con un plásmido de expresión por cada enzima usando precipitación con fosfato de calcio. Tres días después, se lavaron las células con PBS dos veces y se suspendieron entonces en tampón que contenía fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0) y NaCl 300 mM (tampón A). Se homogeneizaron entonces las células con SONIFIRE 450 (BRANSON) y se recogió el sobrenadante por centrifugación a 10.000 g durante 10 min. Se lavó el gel de afinidad His-select Nickel (Sigma) con tampón A, se añadió 0,1 ml de suspensión de gel al 50 % a 1 ml de sobrenadante y se incubó durante 10 min a 4 °C, se lavaron entonces extensamente con tampón A las perlas de unión a proteína marcada con hexahistidina. Se eluyeron las proteínas añadiendo 100 µl de solución que contenía fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), NaCl 300 mM e imidazol 250 mM. Se midió la actividad enzimática relativa de NMNAT usando proteínas purificadas por afinidad como se describe anteriormente, se restó el valor obtenido de las células transfectadas ficticiamente y se normalizó mediante la cantidad de proteína recombinante determinada por densitometría.

Administración de sustratos biosintéticos de NAD y transección de nervio óptico. Se disolvieron Nam, NMN, NmR o NAD en PBS a la concentración de 100 mM o 1 M. Se inyectó cada una de las soluciones de 5 µl en el componente intravítreo izquierdo bajo anestesia a una tasa de 0,5 µl/ml por segundo. Se transeccionó el nervio óptico izquierdo a las 24 horas después de la inyección intravítrea y se recuperó el nervio óptico en el momento indicado. Se homogeneizó el tejido de nervio óptico en 100 µl de un tampón que contenía Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), 1 % de SDS y DTT 1 mM. Se analizaron 50 µg de proteína por cada muestra mediante transferencia Western usando anticuerpo 2H3 anti-neurofilamento (Developmental Studies Hybridoma Center) y anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch). Se calculó la tasa de degeneración a partir de la relación de inmunorreactividad de neurofilamento de nervios transeccionados frente a contralaterales.

EJEMPLO 8

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

Se sintetiza NAD a través de tres rutas principales tanto en procariotas como en eucariotas. En la ruta de novo, se sintetiza NAD a partir de triptófano (Fig. 5). En la ruta de recuperación, se genera NAD a partir de vitaminas incluyendo ácido nicotínico y nicotinamida. Una tercera ruta a partir de ribósido de nicotinamida, llamada ruta independiente de Preiss-Handler, se ha descubierto recientemente. La última reacción enzimática de la ruta de novo implica la conversión de quinolato en NaMN por QPRT (EC 2.4.2.19). En este punto, la ruta de novo converge con la ruta de recuperación. NaPRT (EC 2.4.2.11) convierte Na en NaMN, que se convierte entonces en NaAD por NMNAT (EC 2.7.7.1). QNS1 (EC 6.3.5.1) convierte NaAD en NAD. (NmPRT (EC 2.4.2.12); también reseñada como visfatina) convierte Nam en NMN. NMN se convierte también en NAD por NMNAT. La nicotinamidasasa (PNC, EC 3.5.1.19), que convierte Nam en Na en la ruta de recuperación de levaduras y bacterias, no se ha identificado en mamíferos. En la ruta independiente de Preiss-Handler, NrK (EC 2.7.1.22) convierte NmR en NMN y converge con la ruta de recuperación. La mayoría de estas enzimas de mamíferos que incluyen QPRT, NmPRT, QNS1, NrK1/2 y NMNAT1/2/3 se han clonado y caracterizado anteriormente. Se identificó también un homólogo en mamífero de NaPRT como un EST anotado como homólogo de mamífero de NaPRT bacteriana.

Para investigar la expresión de enzimas biosintéticas de NAD de mamífero en el sistema nervioso, se practicó una RT-PCR cuantitativa usando ARN de cerebro, retina, médula espinal y DRG de ratón a las edades de E14, P0, P7, P14 y P21. Todas las enzimas se expresan ubicuamente en el sistema nervioso a lo largo del desarrollo y en la madurez, con la excepción de NrK2, cuya expresión es muy baja en todos los tejidos examinados (datos no mostrados). Para identificar la inducibilidad de las enzimas sintetizadoras de NAD en respuesta a ataques neuronales,

se comparó la expresión de ARN de cada enzima en DRG a los 1, 3, 7 y 14 días después de la transección del nervio ciático frente a DRG no lesionados. Como se muestra en la Fig. 6A, la mayoría de las enzimas se regulaba positivamente 2 a 8 veces después de la lesión. Entre estas, la expresión de Nr2 está inducida de forma excepcionalmente alta (más de 20 veces) a los 14 días después de la axotomía. Se analizó también la expresión de las enzimas sintéticas de NAD durante la degeneración axonal causada por neurotoxina en neurona de DRG de rata cultivada. Se trataron las neuronas de DRG con rotenona 0,1 μ M y 1 μ M para causar degeneración axonal y se recogió el ADN a las 24 horas después de la adición de rotenona. La expresión de Nr2 aumentó más de 6 veces después del tratamiento de rotenona (Fig. 6B). Estos resultados sugieren que, aunque todas las actividades enzimáticas en la ruta de síntesis de NAD están presentes ubicuamente, la Nr2 puede ser responsable de suministrar sustrato de síntesis de NAD después de los ataques neuronales.

EJEMPLO 9

Este ejemplo ilustra que tanto las enzimas Nmat nucleares como citoplasmáticas rescatan a los axones de la degeneración.

Para determinar si la localización nuclear de NMNAT1 es esencial para proporcionar la protección axonal, se analizó el efecto de la distribución subcelular de la enzima NMNAT en el ensayo de generación walleriana in vitro y se comparó con la extensión de la protección axonal entre la sobreexpresión de NMNAT citoplasmática y nuclear. La NMNAT1 tiene una presunta señal de localización nuclear PGRKRKW en los aminoácidos 211-217 de la proteína NMNAT1. Se generó una NMNAT1 mutante designada como cytNMNAT1 en que esta señal de localización nuclear se alteraba a PGAAAAW y se examinó la distribución subcelular. Como se muestra en la Fig. 7B, la mayoría de cytNMNAT1 se localizaba en el citosol, como se esperaba.

A continuación, se confirmó la actividad enzimática de cytNMNAT1. Se purificaron NMNAT1 y su cytNMNAT1 mutante a partir de lisado celular que expresa cualquiera de las proteínas usando gel de afinidad. Se midió la actividad enzimática de proteínas purificadas por afinidad como se describe anteriormente y se encontró que la actividad de cytNMNAT1 no se alteraba por esta mutación (Fig. 7C). Después de la sobreexpresión de cytNMNAT1 en neuronas de DRG, se observó una fuerte protección de neuritas así como NMNAT1 silvestre nuclear (Fig. 7A, E). Se confirmó adicionalmente este resultado usando la isoenzima NMNAT1 que carece de señal de localización nuclear. Entre las dos isoenzimas de NMNAT, la NMNAT3 se ha reseñado previamente que se localiza fuera de núcleo y mitocondrias, y tiene una actividad enzimática comparable a la NMNAT1. Se añadió la señal de localización nuclear KPDKIKTED de topoisomerasa I humana al extremo C de NMNAT3 para generar NMNAT3 nuclear. Se expresaron NMNAT3 marcada con hexahistidina o nucNMNAT3 en células HEK293T y se analizó la localización subcelular y su actividad enzimática. La NMNAT3 se distribuía fuera del núcleo, incluyendo una tinción puntuada brillante como se reseña anteriormente, y nucNMNAT3 se localizaba principalmente en el núcleo con alguna tinción puntuada en el citosol (Fig. 7B). Se midieron la actividad enzimática de NMNAT3 y nucNMNAT3 y ambas proteínas tienen una actividad enzimática comparable en comparación con la NMNAT1 (Fig. 7C). Se practicó entonces un ensayo de degeneración walleriana in vitro después de la sobreexpresión de estas dos enzimas NMNAT3, y se encontró que la sobreexpresión tanto de NMNAT3 como de nucNMNAT3 mostraba la misma extensión de retardo en la degeneración de neuritas que NMNAT1 (Fig. 7A, E). Se confirmó la expresión mediada por lentiviris de cada enzima por transferencia Western (Fig. 7D). Estos experimentos confirmaron que la NMNAT orientada a núcleo o citosol protege a las neuritas de la degeneración.

EJEMPLO 10

Este ejemplo ilustra que la aplicación exógena de sustratos de enzimas biosintéticas de NAD protege al axón frente a la degeneración.

Se ha mostrado anteriormente que el NAD aplicado exógenamente en el medio de cultivo muestra efecto de rescate axonal in vitro. Se ha mostrado aquí que la expresión de NmPRT muestra también protección axonal, sugiriendo que se usa NaM como sustrato para la síntesis de NAD en neuronas. Para determinar cuál sustrato mostrado en la Fig. 5 se usa para la síntesis de NAD en neuronas y para identificar si cualquiera de los precursores de NAD puede ser capaz de rescatar axones de forma similar o posiblemente mejor que NAD, se aplicaron Na, Nam, NmR, NaMN, NMN o NaAD a medios de cultivo y se practicó el ensayo de degeneración walleriana in vitro. Una aplicación de NMN 1 mM durante 24 horas antes de la transección de neuritas rescataba exitosamente las neuritas de la degradación. El análisis cuantitativo reveló que el tratamiento con NMN da como resultado la protección de neuritas en una extensión similar a la conseguida por NAD aplicado exógenamente (Fig. 8B). Estos resultados sugerían adicionalmente la posibilidad de que el suministro aumentado de otros sustratos biosintéticos de NAD tuviera la capacidad de rescatar neuritas de la degeneración. Se aplicó entonces exógenamente 1 mM de sustratos

biosintéticos de NAD, incluyendo Na, Nam, NaMN, NaAD y NmR, a las neuronas de DRG durante 24 horas y se practicó la transección de neuritas. Como se muestra en la Fig. 8A y B, el tratamiento con NaMN o NmR rescataba también las neuritas igual que NAD. NaAD mostraba una ligera protección, pero Na no conseguía rescatar neuritas, mientras que Na y Nam no tenían efecto. El análisis cuantitativo reveló que la aplicación exógena de NaMN, NMN, NmR o NAD 1 mM causaba un aumento comparable de neuritas intactas a las 48 horas después de la transección (Fig. 8B). Debido a que el efecto protector de NaMN es igual al de NMN, una etapa de síntesis de NAD a partir de NaAD por QNS es suficientemente activa para rescatar a las neuritas bajo suministro aumentado de NaAD. No obstante, la aplicación exógena de NaAD muestra menos aumento de las neuritas intactas a las 48 horas en comparación con NAD (Fig. 8B). Esto indica una incorporación insuficiente a la célula o inestabilidad de NaAD en las condiciones de ensayo. Estos experimentos sugieren que hay varios modos diferentes de rescatar neuritas, incluyendo la aplicación exógena de NMN, NaMN y NmR. Todos estos tratamientos parecen causar un suministro aumentado de NAD, y es consistente con los experimentos anteriores que muestran que la aplicación de NAD o la sobreexpresión de NMNAT1 rescatan a neuritas de la degeneración.

15 **EJEMPLO 11**

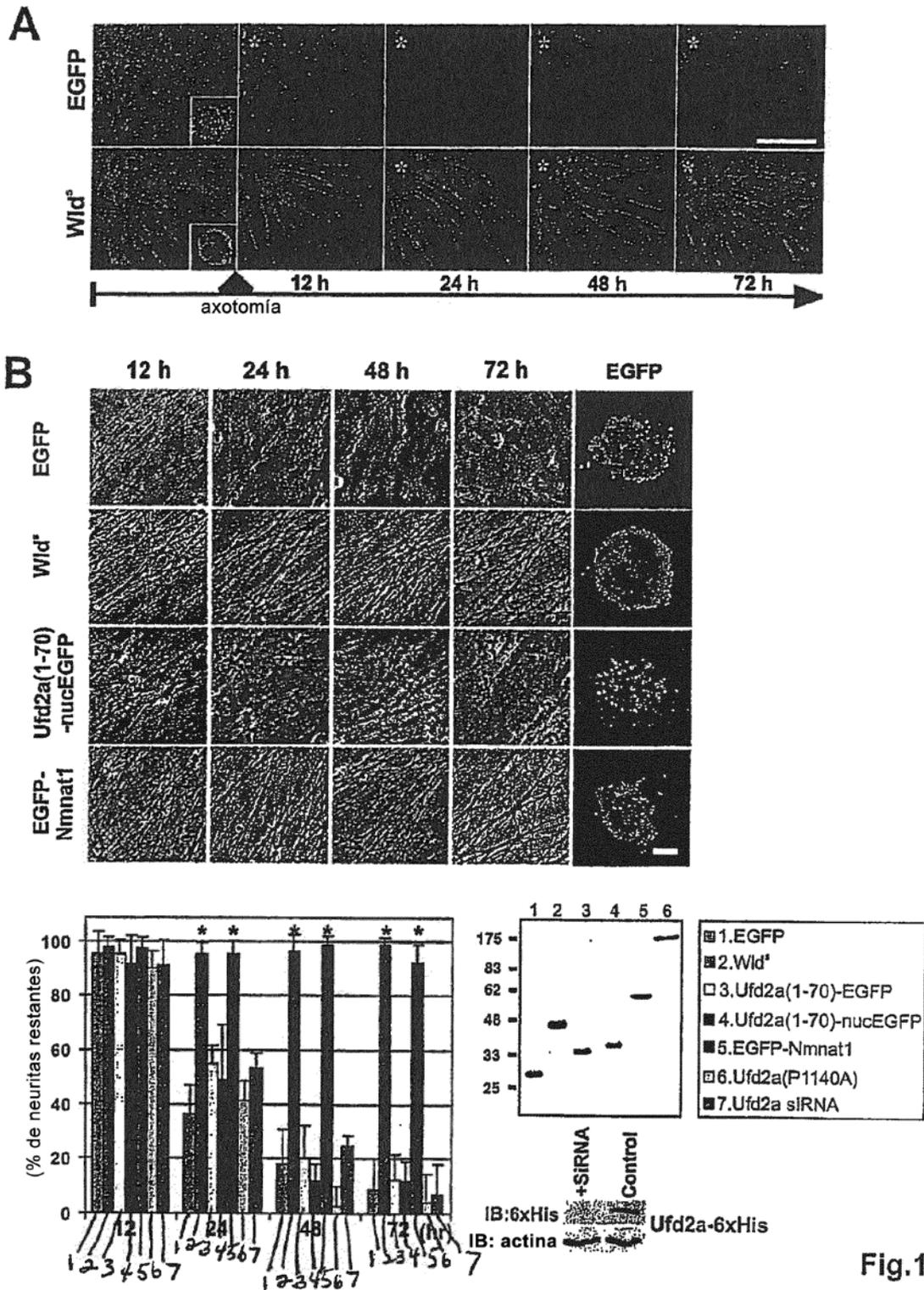
Este ejemplo demuestra que la aplicación intravítrea de sustratos biosintéticos de NAD retarda la degeneración axonal de células de ganglio retinal.

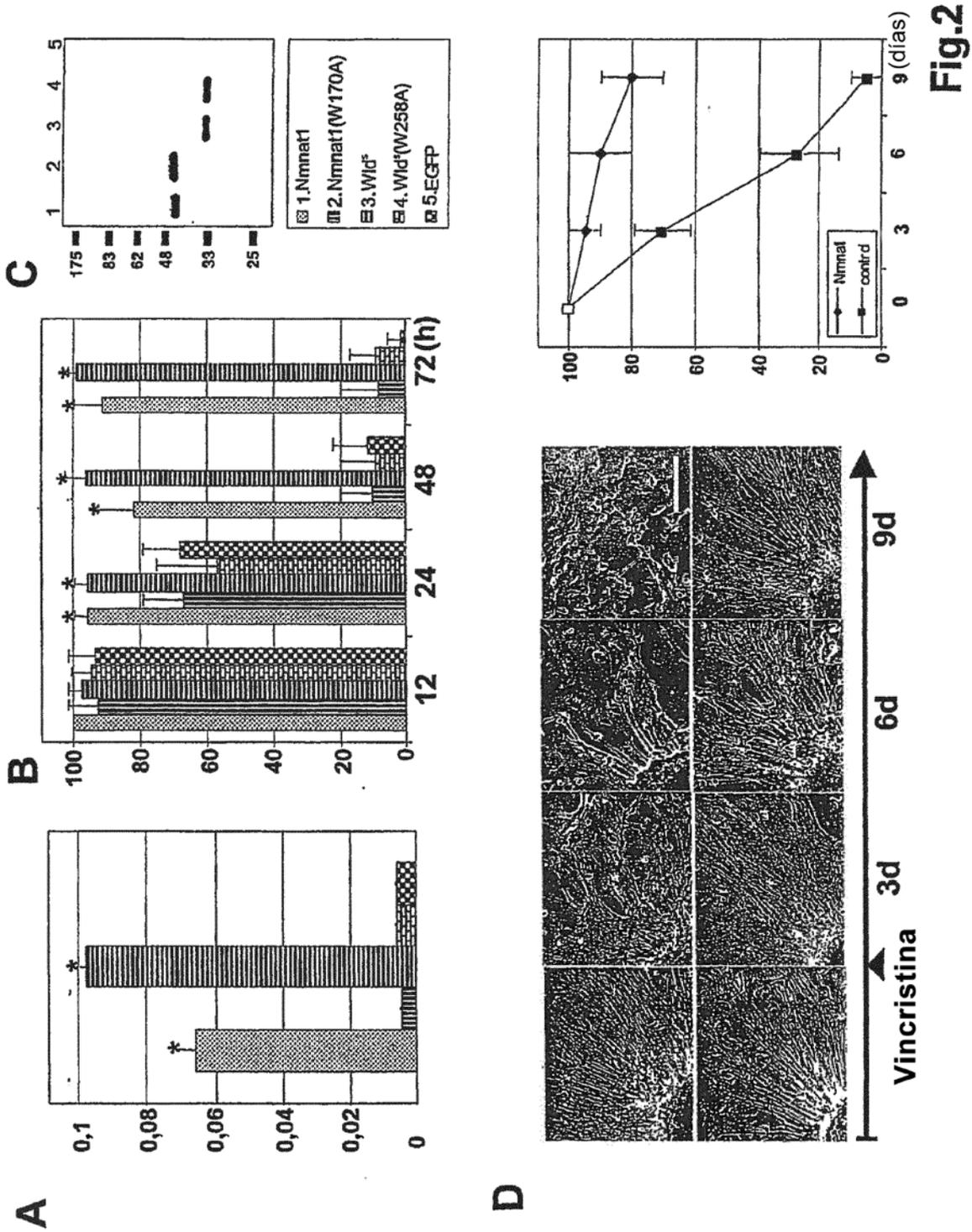
20 La transección de nervio óptico es un modelo in vivo que puede usarse para investigar los mecanismos que conducen a la degeneración walleriana y después a la muerte de células de ganglio retinal (RGC) observadas en enfermedades humanas tales como glaucoma. En la cepa de ratón C57BL/6J, la degeneración de nervio óptico durante la degeneración walleriana después de la axotomía se ralentiza drásticamente. Además, se usa la inyección intravítrea para cribar compuestos que protegen al axón de RGC de degeneración in vivo, y por tanto puede valorarse el efecto protector de axón de cada sustrato biosintético de NAD in vivo mediante inyección intraocular de compuestos que incluyen NAD, NMN, NmR y Nam. A partir del ensayo de degeneración walleriana in vitro, 1 mM de NAD, NMN y NmR en los medios de cultivo es suficiente para proteger al axón de la degeneración. Se inyectaron inicialmente 5 μ l de solución de NAD 100 mM o 1 M en el compartimento intravítreo izquierdo. Después de 24 horas de incubación, se transeccionó el nervio óptico izquierdo y se recogieron los nervios ópticos de control (derecho) y axotomizado (izquierdo) a los 3, 4 y 5 días después de la transección. Se midió la inmunorreactividad a neurofilamento del nervio óptico axotomizado y se normalizó frente al valor obtenido del lado derecho del nervio óptico. Se encontró que la inmunorreactividad a los 4 días después de la transección era de 77 ± 27 % y de 78 ± 22 % del nervio óptico no axotomizado en ratas inyectadas con NAD 1 M y 100 mM, respectivamente, mientras que el animal de control mostraba solo 7 ± 16 % (Fig. 9).

35 Se inyectaron entonces 5 μ l de NMN, NmR y Nam 100 mM en el compartimento intravítreo izquierdo y se recogieron los nervios ópticos a los 4 días después de la transección del nervio óptico izquierdo. La inmunorreactividad obtenida a partir de nervio óptico inyectado con NMN y NmR era de 60 ± 25 y 72 ± 19 % del nervio no axotomizado. Los animales inyectados con Nam no mostraban ninguna diferencia con los animales de control. Estos resultados son consistentes con el estudio in vitro que mostraba que NAD, NMN y NmR tienen actividad de rescate de axón, pero Nam no. El estudio in vitro reveló que estas moléculas pequeñas que están implicadas en la ruta biosintética de NAD son herramientas útiles para rescatar al axón de la degeneración.

REIVINDICACIONES

1. Un agente para uso en el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero necesitado de ello, donde el agente es NAD o NaMN.
5
2. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente es mononucleótido de nicotinato (NaMN).
3. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el mamífero es un animal de compañía,
10 un animal agrícola o un animal exótico.
4. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el mamífero es un perro, un gato, una vaca o un caballo.
- 15 5. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el mamífero es un ser humano.
6. Un agente para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente es NAD.
7. Un agente para uso en el tratamiento o la prevención de una axonopatía en un mamífero necesitado
20 de ello, donde el agente es NAD o NaMN, y actúa aumentando la actividad de NAD en neuronas y/o células de soporte enfermas y/o lesionadas, y donde la axonopatía es hereditaria o congénita o está asociada a enfermedad neurodegenerativa, enfermedad neuronal motora, neoplasia, trastorno endocrino, enfermedad metabólica, deficiencia nutricional, aterosclerosis, una enfermedad autoinmunitaria, lesión mecánica, lesión inducida por productos químicos o fármacos, lesión térmica, lesión por radiación, compresión nerviosa, trastorno retinal o del
25 nervio óptico, disfunción mitocondrial, demencia progresiva, enfermedades desmielinizantes, isquemia y/o apoplejía, enfermedad infecciosa o enfermedad inflamatoria.





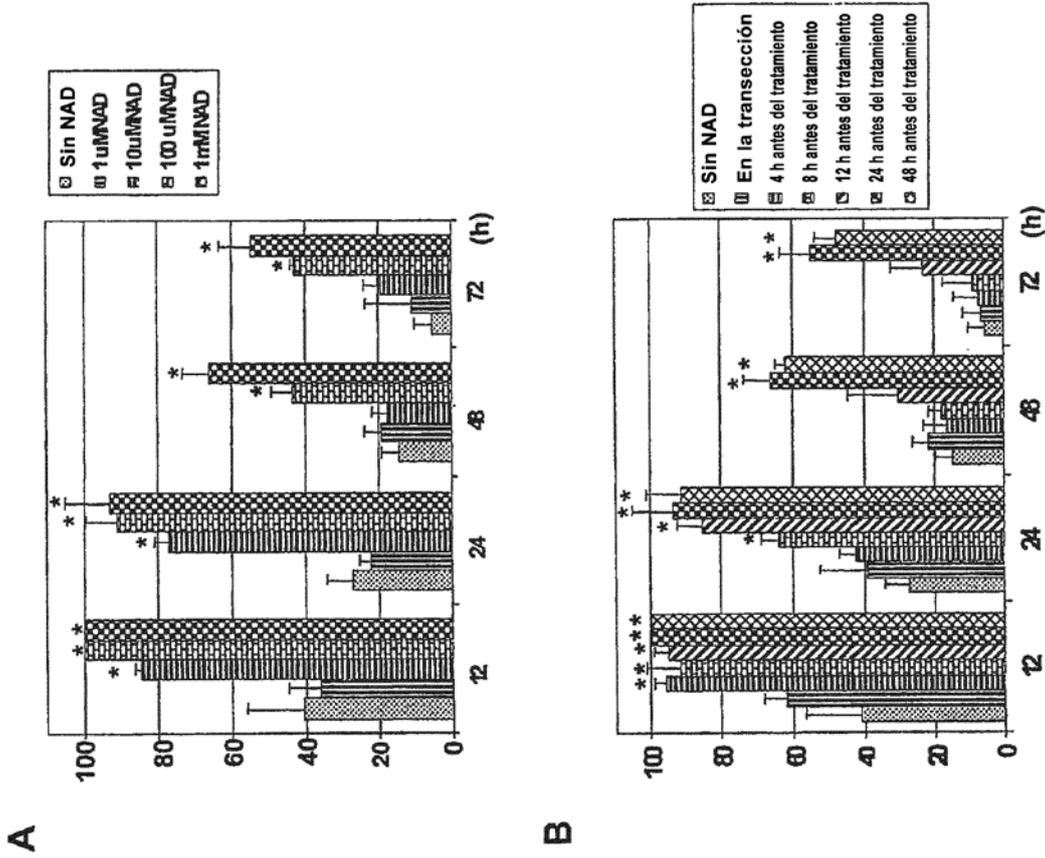


Fig.3

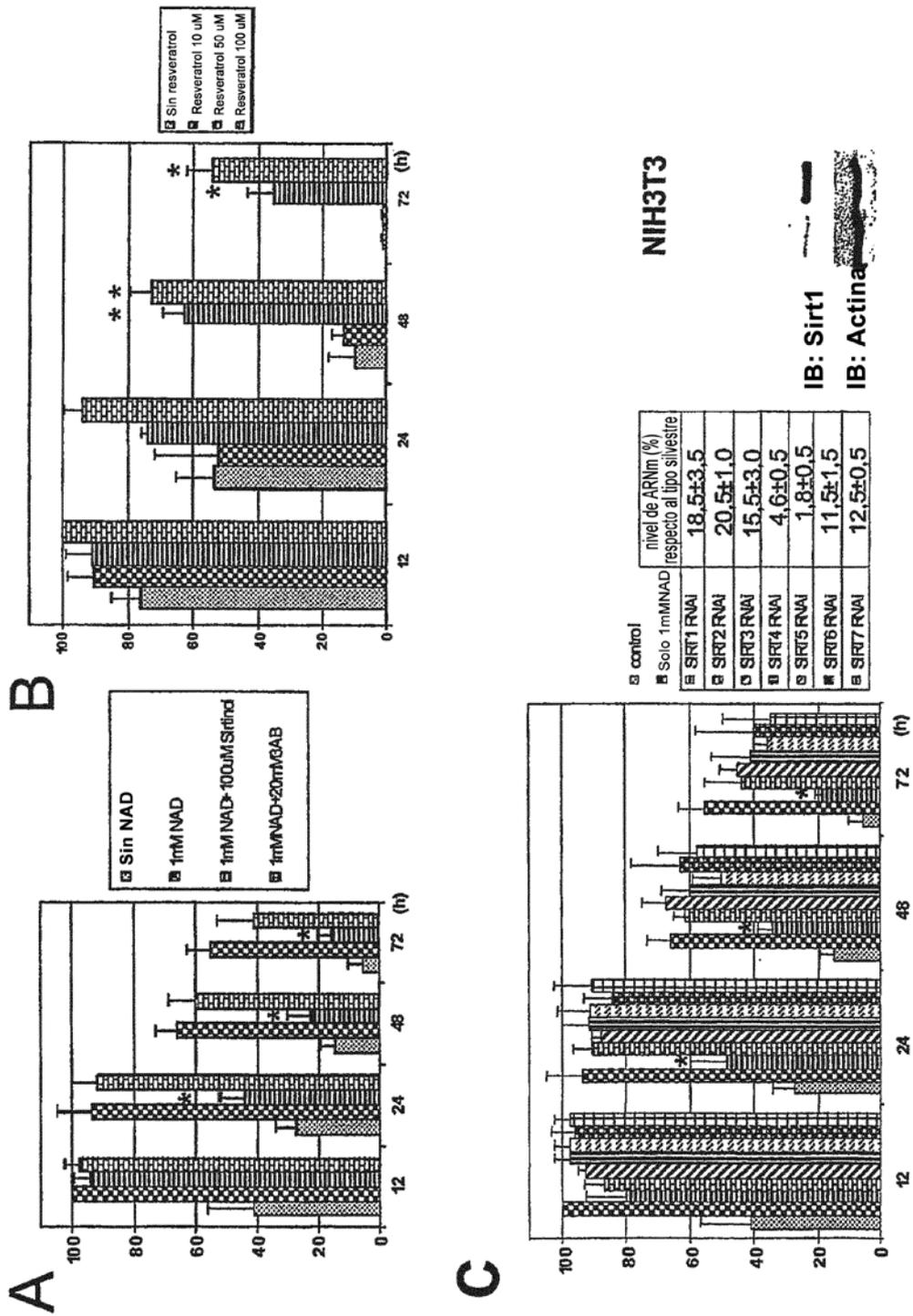


Fig.4

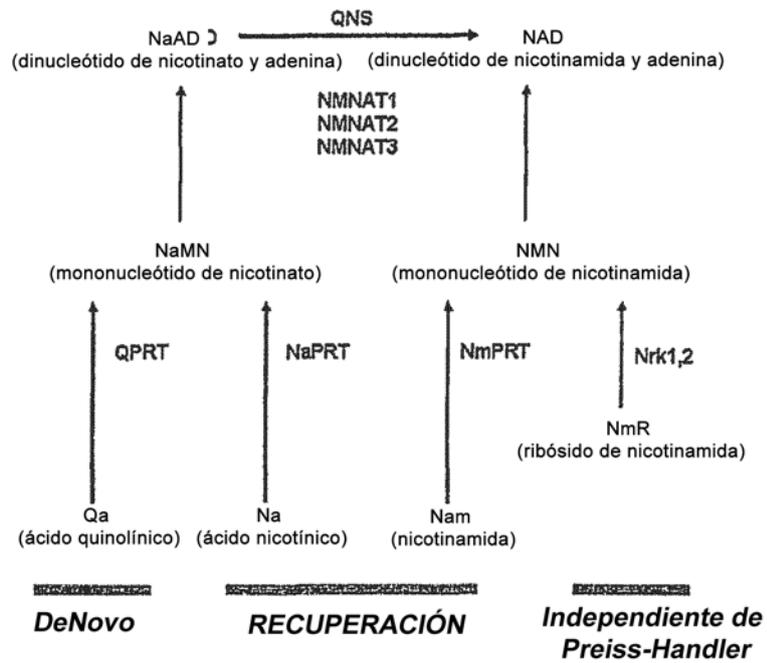


Figura 5

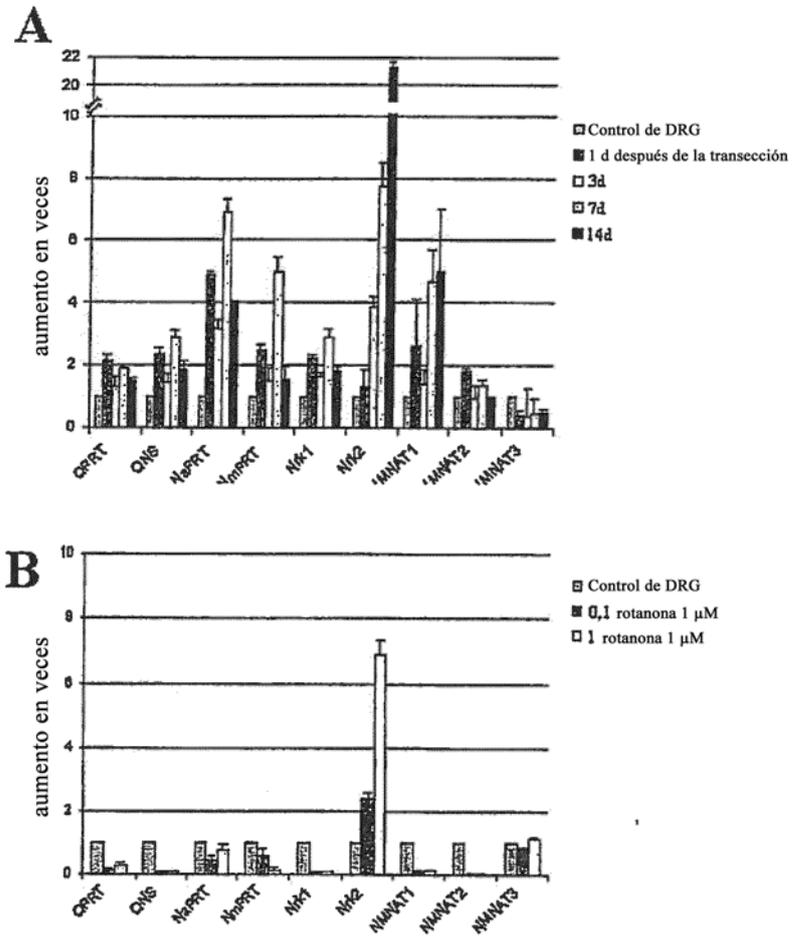


FIGURA 6

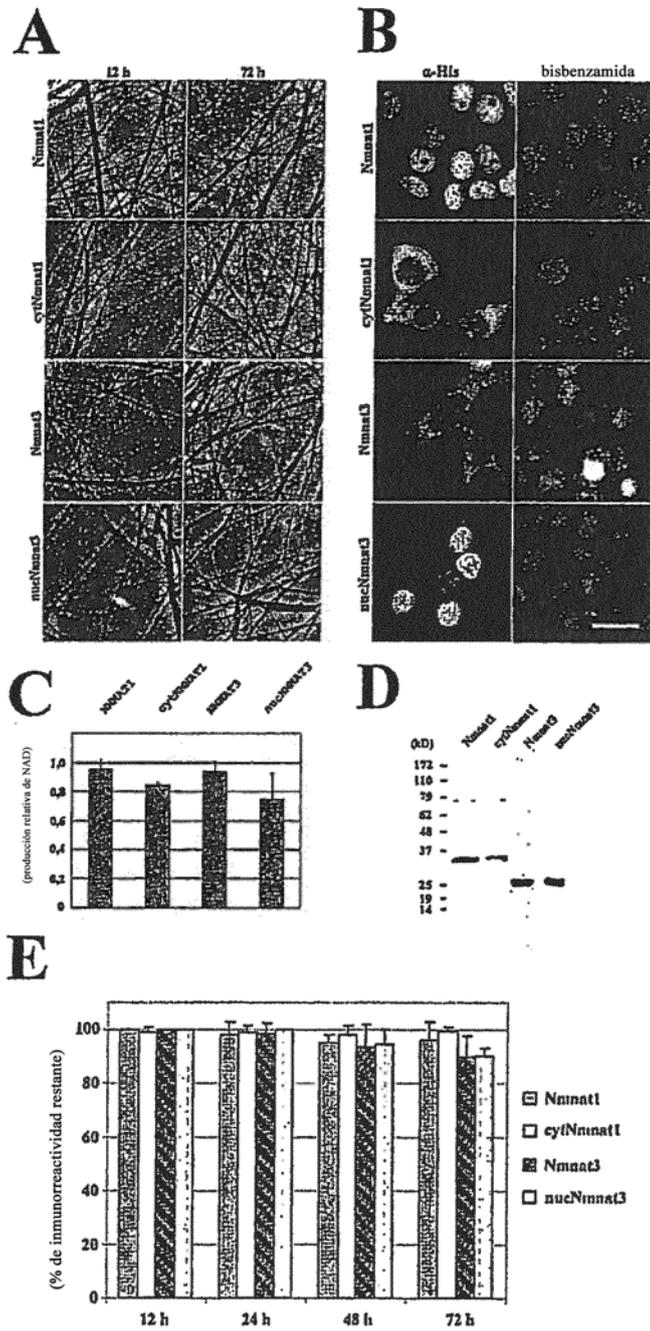


Figura 7

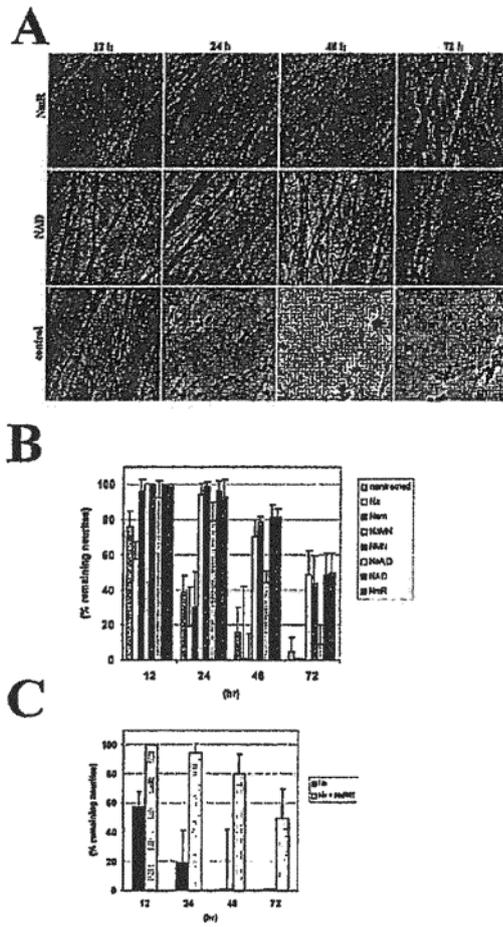


Figura 8

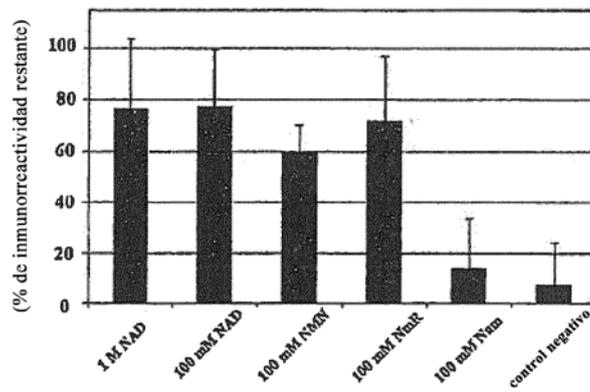


Figura 9