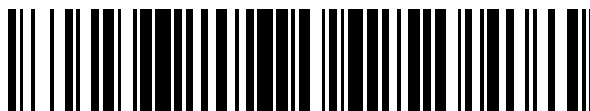


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 564**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2010** **E 15180776 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 2997974**

54 Título: **Método y composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

19.06.2009 EP 09305572

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

03.08.2018

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) (50.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

CNRS (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) (50.0%)

72 Inventor/es:

LEVEILLARD, THIERRY;

SAHEL, JOSÉ ALAIN;

VAN DORSSELAER, ALAIN y

PERROCHEAU, LUDIVINE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 677 564 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

Método y composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA para el tratamiento de un trastorno degenerativo. En particular, La invención se refiere a un agonista de BASIGINA para el tratamiento de un trastorno degenerativo.

10

Estado de la técnica

Los trastornos neurodegenerativos han representado un desafío durante muchos años, tanto en la investigación básica como en los contextos clínicos.

15

Como ejemplo de tal trastorno neurodegenerativo, la retinosis pigmentaria (RP) es una degeneración retiniana genéticamente heterogénea caracterizada por la degeneración secuencial de una población de neuronas que corresponde a los fotorreceptores bastones y conos. Los primeros signos clínicos de la RP son la ceguera nocturna y el estrechamiento del campo de visión periférico que empeora progresivamente hasta convertirse en "tipo túnel". Finalmente, la visión central se reduce a la ceguera completa en la mayoría de los casos. A nivel celular, los fotorreceptores bastones de la retina implicados en las visiones nocturnas y laterales se degeneran lentamente. Posteriormente, los fotorreceptores conos responsables tanto de la visión a color como de alto contraste, la agudeza visual, la percepción detallada y la visión con luz normal se ven afectados de manera similar. El ratón de degeneración retiniana 1 (rd1) es el modelo animal más estudiado para la retinosis pigmentaria. Este lleva una mutación recesiva en el gen de la subunidad beta de la cGMP fosfodiesterasa específica de bastones que conduce a la muerte de los fotorreceptores bastones por apoptosis (Carter-Dawson et al., 1978; Portera-Cailliau et al., 1994) seguida de la muerte de los conos supuestamente por falta de soporte trófico (Mohand-Said et al., 1998).

20

25

30

35

40

45

El gen RdCVF, también denominado tiorredoxina de tipo 6 (Txnl6) y nucleoredoxina 1 (Nxn1), codifica la proteína Q8VC33 UniProt, que tiene una similitud limitada con la superfamilia de la tiorredoxina y que ejerce actividad trófica sobre los fotorreceptores conos (Leveillard et al., 2004). Las tiorredoxinas (TXN), normalmente, son proteínas pequeñas que pueden estar implicadas en las actividades pleiotrópicas, tales como el control de oxidorreducción, la regulación de la apoptosis y la actividad de la citocina (Holmgren, 1985; Holmgren, 1989; ARNER and Holmgren, 2000). El sitio activo conservado de TXN contiene dos cisteínas distintas (CXXC) que contribuyen a una actividad de tiol-oxidorreductasa (Arner and Holmgren, 2000, Powis and Montfort, 2001) que cataliza la reducción de enlaces de disulfuro en múltiples proteínas de sustrato (Holmgren, 1979; Holmgren, 1979). El gen RdCVF codifica dos productos mediante un proceso de corte y empalme alternativo: una proteína de longitud completa y una proteína truncada C-terminal comparten similitudes con la TRX80. Esta última forma de tiorredoxina-1 humana (Txn) (Pekkari et al., 2000; Pekkari et al., 2005; Liu et al., 2005) no tiene actividad de tiolreductasa, pero está implicada en el control del crecimiento de los glóbulos sanguíneos mononucleares periféricos (Pekkari et al., 2000; Pekkari et al., 2003). De manera similar a la Txn, el RdCVF parece un gen bifuncional porque codifica tanto una forma larga (RdCVF-L, 217 aa, Q8VC33), que tiene una actividad de tiol-oxidorreductasa putativa (Jeffery, 1999; Jeffery, Trends Genet., vol.19(8):415-417, 2003), como una forma corta (RdCVF-S, 109 aa, Q91W38), con actividad trófica para los conos, pero sin actividad de oxidorreducción. Sin embargo, el receptor de RdCVF aún no se ha identificado.

Sigue existiendo la necesidad de hallar nuevos compuestos que puedan usarse en el tratamiento de los trastornos neurodegenerativos.

50

Objeto de la invención

Actualmente, los inventores han demostrado que la BASIGINA (también denominada HT7, 5A11, EMMPRIN o CD147) es el receptor de RdCVF.

55

Un primer objeto de la invención se refiere a un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, en el que dicho compuesto es un ácido nucleico que codifica la BASIGINA.

60

Otro objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA, tal como se ha descrito anteriormente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describe un método para la exploración de un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA, en particular, un agonista de BASIGINA, para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

65

También se describe el uso de la BASIGINA en un método para la exploración de un fármaco para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

Descripción detallada de la invención**Definiciones:**

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "BASIGINA", también conocida como HT7/5A11/EMMPRIN/CD147, se refiere a un elemento de la superfamilia de las inmunoglobulinas, con una estructura relacionada con la forma primordial putativa de la familia (Miyauchi et al., 1991; Kanekura et al., 1991). La BASIGINA es un receptor de membrana integral de tipo I que tiene muchos ligandos, incluyendo las proteínas de la ciclofilina (Cyp) Cyp-A y Cyp-B y determinadas integrinas. Se expresa mediante muchos tipos de células, incluyendo

10 células epiteliales, células endoteliales y leucocitos. La proteína BASIGINA humana contiene 269 aminoácidos que forman dos dominios similares a inmunoglobulina de tipo C2 fuertemente glucosilados en la parte extracelular N-terminal. También se ha caracterizado una segunda forma de BASIGINA que contiene un dominio adicional similar a inmunoglobulina en su parte extracelular.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA" se refiere a una molécula que da como resultado un aumento de la señalización a través de la BASIGINA, ya sea mediante la regulación ascendente de los niveles de BASIGINA presente sobre la superficie celular o mediante la estimulación de la cascada de señalización aguas abajo uniéndose a la BASIGINA. Los métodos para la evaluación del nivel de activación de la ruta de señalización de BASIGINA pueden incluir la medición de la cantidad de segundo mensajero aguas abajo en la ruta de señalización de BASIGINA.

Los compuestos que activan la ruta de señalización de BASIGINA de acuerdo con la invención incluyen moléculas que aumentan los niveles de la proteína BASIGINA sobre la superficie celular, tales como el polipéptido de BASIGINA, un ácido nucleico que codifica la BASIGINA o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la

25 BASIGINA.

Los compuestos que activan la ruta de señalización de BASIGINA también pueden incluir agonistas de BASIGINA. Tal como se usa en el presente documento, el término "agonista de BASIGINA" se refiere a una molécula que activa la señalización a través del receptor de la BASIGINA, mediante la unión a BASIGINA. Los ejemplos de tales

30 agonistas de BASIGINA incluyen, pero sin limitación, ciclofilina A y ciclofilina B.

Típicamente, un agonista de BASIGINA no es RdCVF1 o RdCVF2.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento", significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o la afección a los que se aplica tal término, o revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir uno o más síntomas del trastorno o la afección a los que se aplica tal término.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno neurodegenerativo" se refiere a un trastorno asociado a la degeneración de las neuronas, tal como los trastornos degenerativos del sistema nervioso central, los

40 trastornos degenerativos retinianos o los trastornos degenerativos de las neuronas olfativas. Típicamente, los trastornos neurodegenerativos de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, alcoholismo, enfermedad de Alexander, enfermedad de Alper, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia-telangiectasia, enfermedad de Batten (también conocida como enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten), encefalopatía espongiiforme bovina (BSE), enfermedad de Canavan, síndrome de Cockayne, degeneración corticobasal,

45 enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, demencia asociada al VIH, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Krabbe, demencia del cuerpo de Lewy, enfermedad de Machado-Joseph (ataxia espinocerebelosa tipo 3), esclerosis múltiple, atrofia multisistémica, narcolepsia, neuroborreliosis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Pick, esclerosis lateral primaria, enfermedades priónicas, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Refsum, enfermedad de Sandhoffs, enfermedad de Schilder,

50 degeneración combinada subaguda de la médula espinal secundaria a anemia perniciososa, enfermedad de Spielmeyer-Vogt-Sjogren-Batten (también conocida como enfermedad de Batten), ataxia espinocerebelosa (múltiples tipos con características variables), atrofia muscular espinal, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski, tabes dorsal y trastornos degenerativos de la retina.

55 Agonistas y usos de los mismos

Un primer objeto de la invención se refiere a un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo, tal como se define en las reivindicaciones.

60 En un aspecto de la memoria descriptiva, dicho compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA es el polipéptido de BASIGINA humano al que se hace referencia en el número de acceso EAW61182 de Genpept o una variante del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad con EAW61182, preferentemente el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con EAW61182.

65 De acuerdo con la presente invención, dicho agonista de BASIGINA es un ácido nucleico que codifica la BASIGINA o un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la BASIGINA.

Un agonista de BASIGINA puede ser un agonista de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña (natural o no).

5 El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula (natural o no) de un tamaño comparable a aquellas moléculas orgánicas usadas generalmente en los productos farmacéuticos. El término excluye las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferentemente hasta 2000 Da y lo más preferentemente hasta aproximadamente 1000 Da.

10 Un agonista de BASIGINA puede consistir en un anticuerpo que activa la BASIGINA o un fragmento de anticuerpo que activa la BASIGINA.

15 Los anticuerpos dirigidos contra la BASIGINA se pueden sensibilizar de acuerdo con métodos conocidos mediante la administración del antígeno o epítipo adecuado a un animal hospedador seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra la BASIGINA se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero sin limitación, la técnica de los hibridomas originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Cote et al., 1983); y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985). Como alternativa, la técnica descrita para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.946.778) puede adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios anti-BASIGINA. Los agonistas de BASIGINA útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo anti-BASIGINA que incluyen, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que se pueden generar mediante la reducción de los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una rápida identificación de los fragmentos que tienen la especificidad deseada para la BASIGINA.

30 Los anticuerpos anti-BASIGINA humanizados y los fragmentos de anticuerpo de los mismos también se pueden preparar de acuerdo con las técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedores) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (RM) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las RM son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, opcionalmente, al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Los métodos para la preparación de anticuerpos humanizados son descritos, por ejemplo, por Winter (patente estadounidense n.º 5.225.539) y Boss (Celltech, patente estadounidense n.º 4.816.397).

50 Los agonistas de BASIGINA pueden seleccionarse entre aptámeros. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con elevada afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar mediante la evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, tal como se describe en Tuerk C. and Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante la síntesis química combinatoria del ADN. En esta biblioteca, cada elemento es un oligómero lineal, finalmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente restringidas presentadas por una proteína en plataforma, tal como la tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias mediante métodos de dos híbridos (Colas et al., 1996).

60 También se describe un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA, tal como se ha descrito anteriormente.

65

También se describe un método para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un agonista de BASIGINA, tal como se ha descrito anteriormente.

5 Los compuestos de la invención pueden administrarse en la forma de una composición farmacéutica, tal como se define a continuación.

Preferentemente, dicho compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA, preferentemente dicho agonista de BASIGINA, se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

10 Por la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del compuesto para tratar y/o prevenir el trastorno neurodegenerativo.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención lo decidirá el médico responsable dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el género y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o a la vez con el polipéptido específico empleado; y los factores similares bien conocidos en la práctica médica. Por ejemplo, dentro de la experiencia de la técnica se encuentra el inicio con dosis del compuesto a niveles más bajos de los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente a tratar. Un medicamento contiene, típicamente, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra, normalmente, a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 7 mg/kg de peso corporal al día.

15 Los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

20 Por tanto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una dosis eficaz de un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA, de acuerdo con las reivindicaciones.

Cualquier agente terapéutico de la invención puede combinarse con los excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, las matrices de liberación sostenida, tales como los polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

25 Los términos "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o negativa distinta cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea adecuado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el tratamiento dependerán, naturalmente, de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el género del paciente, etc.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, intranasal, parenteral, intraocular, intravenosa, intramuscular o subcutánea y similares.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estas pueden estar, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato de sodio o monosodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales) o composiciones secas especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

35 Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración usado, de la patología relevante o, como alternativa, de la duración de tratamiento deseada.

Además, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros productos sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y, actualmente, puede usarse cualquier otra forma.

65

Como alternativa, los compuestos que activan la ruta de señalización de BASIGINA puede identificarse, adicionalmente, mediante los métodos de exploración descritos más adelante en el presente documento.

Métodos de exploración:

5 También se describe un método para la exploración de un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA.

10 En particular, la memoria descriptiva describe un método para la exploración de un agonista de BASIGINA para el tratamiento de un trastorno neurodegenerativo.

15 Por ejemplo, el método de exploración puede medir la unión de un compuesto candidato a la BASIGINA o a las células o membranas que portan BASIGINA, o una proteína de fusión de la misma por medio de un marcador directa o indirectamente asociado al compuesto candidato. Como alternativa, un método de exploración puede implicar la medición o, cualitativa o cuantitativamente, la detección de la competencia de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, un antagonista).

20 Además, los métodos de exploración pueden someter a ensayo si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por un agonista de BASIGINA, usando sistemas de detección adecuados para las células que portan el receptor.

En una realización particular, el método de exploración descrito en el presente documento comprende la etapa que consiste en:

- 25 a) proporcionar una pluralidad de neuronas que expresan BASIGINA sobre su superficie;
 b) incubar dichas neuronas con un compuesto candidato;
 c) determinar si dicho compuesto candidato se une a y activa la BASIGINA; y
 d) seleccionar el compuesto candidato que se une a y activa la BASIGINA.

30 En una realización, el receptor de BASIGINA usado en el método de exploración puede ser sus ortólogos y derivados definidos en la presente memoria descriptiva.

35 En general, tales métodos de exploración implican la provisión de células adecuadas que expresen BASIGINA, sus ortólogos y derivados de los mismos sobre su superficie. En particular, se puede emplear un ácido nucleico que codifica la BASIGINA para transfectar células para expresar de ese modo el receptor. Tal transfección puede lograrse mediante los métodos bien conocidos en la técnica.

40 En una realización particular, las neuronas se seleccionan entre el grupo que consiste en fotorreceptores conos, neuronas, células de la retina, retinoblastoma y otras líneas celulares neuronales inmortalizadas de cualquier especie (ratón, ser humano...).

El método de exploración puede emplearse para la determinación de un agonista mediante el contacto de tales neuronas con los compuestos a explorar y la determinación de si tal compuesto activa el receptor.

45 La determinación de la activación de la BASIGINA puede evaluarse mediante la determinación de la viabilidad de las neuronas. Se considera que un compuesto aumenta la viabilidad de las neuronas si es positivo en uno cualquiera de los métodos descritos a continuación como ejemplos de actividad de rescate neuronal.

50 Como alternativa, la determinación de la activación de la BASIGINA puede determinarse mediante el análisis de la ruta de señalización molecular aguas abajo. De hecho, se ha demostrado que la estimulación de la BASIGINA por la ciclofilina A da como resultado la protección neuronal mediante la señalización a través de Erk1/2 (Boulos et al., *Neurobiology of Disease*, vol 25(1), p54-64, 2007). Por tanto, la determinación de la activación de la BASIGINA puede llevarse a cabo mediante el control del estado de fosforilación de Erk.

55 El compuesto candidato se puede seleccionar entre una biblioteca de compuestos previamente sintetizados, o una biblioteca de compuestos para los que se determina la estructura en una base de datos, o entre una biblioteca de compuestos que se han sintetizado *de novo* o compuestos naturales.

60 El compuesto candidato puede seleccionarse entre el grupo de (a) proteínas o péptidos, (b) ácidos nucleicos y (c) compuestos orgánicos o químicos (naturales o no). De manera ilustrativa, pueden obtenerse bibliotecas de ácidos nucleicos candidatos seleccionados previamente mediante la realización del método de SELEX descrito en los documentos US 5.475.096 y US 5.270.163. Adicionalmente, de manera ilustrativa, el compuesto candidato puede seleccionarse entre el grupo de anticuerpos dirigidos contra la BASIGINA.

65 Tal método puede usarse para explorar los agonistas de BASIGINA.

Además, la memoria descriptiva describe el uso del polipéptido de BASIGINA en un método para la exploración de un fármaco para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

La invención se ilustrará, adicionalmente, mediante las siguientes figuras y ejemplos.

5

Descripción de las figuras

Figura 1: Unión específica para el cultivo enriquecido con conos: El péptido de RdCVF humano yodado se incubó con a. cultivos enriquecidos con conos de embrión de pollo, b. células epiteliales pigmentadas retinianas de cerdo, c. células Cos-1. La línea discontinua en a muestra la unión específica después de la competición con el péptido no marcado de ratón

10

Figura 2: Purificación del receptor de RdCVF mediante el ensayo de transferencia Far-Western: Fracciones de retina de pollo y fibroplastos embrionarios (CEF). S, solubles. M, fracciones de membrana. T, total. Tinción de tipo Coomassie en calles 2-4. Transferencia Far-Western en calles 5-14 con GST-RdCVFL, GST-RdCVF y GST, tal como se indica

15

Figura 3: Migración del receptor de BASIGINA en SDS-PAGE: Análisis mediante transferencia Western de extractos retinianos (tomados a partir del trabajo publicado)

20

Ejemplos

Ejemplo 1: Unión específica para el cultivo enriquecido con conos:

Material y métodos:

25

El RdCVF humano (hRdCVF) y el RdCVF de ratón (mRdCVF) se sintetizaron en GeneProt y se remultiplicaron (>90 % de pureza). El método de cloramina T se usó para marcar el hRdCVF con ^{125}I con una actividad específica de 2130 Ci/mmol. Las células de retina de pollo se aislaron y se cultivaron, tal como se ha descrito previamente (Adler and Hatlee, 1989; Fintz et al, 2003), con modificaciones menores. Las células se plaquearon en placas de 24 pocillos revestidas con poli-L-lisina a 3×10^5 células/cm² (6×10^5 /pocillo) y se cultivaron durante 24 h en un medio que contenía suero. Después de 24 horas, las células se enjuagaron tres veces y, a continuación, se añadieron 50 µl de un tampón de unión (control) o 50 µl de un tampón de unión que contenía mRdCVF no marcado (para determinar la unión no específica) a cada pocillo del cultivo. Después de la incubación durante 30 min a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de un tampón de unión que contenía [^{125}I]-hRdCVF a cada pocillo. Después de la incubación durante 90 min a temperatura ambiente, las placas se incubaron a 4 °C durante 45 min. Las células se enjuagaron tres veces y se solubilizaron con SDS al 1 %. La radioactividad de los extractos se contó usando un contador de gamma. La unión específica se midió mediante un ensayo de competición con RdCVF de ratón recombinante no marcado en exceso. El nivel de radioactividad se redujo parcialmente mediante mRdCVF 300 nM no marcado, lo que sugiere la presencia de sitios específicos, a pesar de que no se alcanzó la saturación en el intervalo de concentraciones de [^{125}I]-hRdCVF (0,05-0,5 nM, Figura 2a). En tres experimentos independientes, el mRdCVF 300 nM inhibió el 26 % (2,4 fmol/pocillo), el 32 % (1,2 fmol) y el 31 % (0,76 fmol) de la radioactividad medida en [^{125}I]-hRdCVF 0,5 nM.

30

35

40

Resultados:

45

En ausencia de células, no se observó ningún efecto inhibitorio de mRdCVF que sugiriera que la unión específica se había producido en las células. Se calculó una unión específica con un Kd de aproximadamente 150 pM y un Bmáx de 200 sitios/célula. La diferenciación celular parece estar implicada porque no se pudieron detectar sitios de unión a RdCVF en suspensiones de células nuevas. Aunque la falta de unión de células indiferenciadas puede estar reflejando la especificidad de la expresión putativa del receptor de RdCVF mediante conos, se aborda esto directamente mediante la comparación de la unión en conos de pollo con la de las células epiteliales pigmentadas retinianas (RPE) primarias de los cerdos. Ya que las células RPE no responden a la actividad trófica de RdCVF, se espera que estas no muestren ninguna unión a RdCVF específica. La radioyodación del péptido de RdCVF sintético se realizó con un protocolo alternativo al que se usó previamente (perlas de yodo en lugar de lactoperoxidasa). Se ha comparado la unión de [^{125}I]-hRdCVF y el efecto inhibitorio del RdCVF de ratón con las células enriquecidas con conos de retina de pollo, el epitelio pigmentado retiniano (RPE) de cerdo y las células de COS-1. La unión no específica es lineal para estos tres tipos de células examinadas. La unión específica se observó únicamente en el cultivo enriquecido con conos (Figura 1). Una comparación entre la unión de [^{125}I]-hRdCVF y el contenido de ATP en cuatro experimentos independientes muestra que existe una relación lineal entre la unión total y ATP. La IC50 se estimó en 35 nM (5,7 a 210 nM, límites de confianza del 95 %). Una estimación aproximada del número de sitios de unión saturables, obtenida mediante la extrapolación de los parámetros de unión, da 54.000 por célula (5.300 a 460.000, límites de confianza del 95 %). Esto confirma que una actividad de unión específica para RdCVF se expresa mediante conos.

50

65

Ejemplo 2: Purificación del receptor de RdCVF mediante el ensayo de transferencia Far-Western:**Material y métodos:**

5 Para purificar el receptor de RdCVF de las fracciones de membrana de la retina de pollo, se desarrolló un ensayo de transferencia Far-Western (Leveillard *et al.*, 1996). Las fracciones de proteína cargadas en geles de SDS se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas desnaturalizadas en la membrana se vuelven a naturalizar parcialmente mediante la incubación en serie en un tampón que contiene cantidades decrecientes de guanidina, el agente desnaturalizante. La proteína, usada en este caso como sonda, se produce en *E. coli* como una fusión de
 10 GST en el vector pGEX2TK. Anteriormente, se ha demostrado que la proteína de RdCVF producida usando este sistema de vectores tiene una actividad trófica hacia los conos de pollo (Leveillard *et al.*, 2004). Esta sonda se aplicó a las proteínas en la membrana (Figura 2).

Resultados:

15 Se han buscado las proteínas que interactúan con RdCVF en la membrana y las fracciones solubles de la retina embrionaria de pollo y se ha sometido a ensayo la expresión restringida de tejido usando la fracción de membrana de fibroblastos embrionarios de pollo (CEF). Se han usado tanto las proteínas de RdCVF largas como cortas como sondas, así como GST. Cuando la proteína GST se usó como control negativo, se pudieron detectar dos bandas no
 20 específicas (* = 37, 28 kDa en la calle 14). Curiosamente, se hallaron varias proteínas de interacción específicas en las fracciones de membrana de la retina de pollo (+ - 100, 75 y 45 kDa en la calle 6 para GST-RdCVFL de retina de pollo). La banda a 50 kDa corresponde probablemente a una proteína soluble que contamina la fracción de membrana, ya que está enriquecida en la calle 5. La banda a aproximadamente 60 kDa, detectada en la calle 6, tiene un intervalo de expresión más amplio, ya que también se detecta en la fracción de membrana de fibroplastos
 25 embrionarios de pollo (triángulo en la calle 8). Usando los mismos extractos, la isoforma corta detecta una banda específica menor de 45 kDa en la fracción de membrana de la retina de pollo (+ en la calle 10). La tinción de tipo Coomassie de estas fracciones muestra que no existe ninguna banda prominente a 45 kDa (calles 2-4). Tomados en conjunto, estos resultados indican la existencia de una proteína de interacción con RdCVF candidata en la fracción de membrana de la retina de pollo que migra a 45 kDa. Adicionalmente, aunque no es cuantitativo, el ensayo
 30 muestra que esta interacción es de mayor afinidad con la isoforma corta (calle 10) que la larga (calle 6) de RdCVF. Se ha demostrado que el efecto trófico está mediado por la isoforma corta y no larga (Léveillard *et al.*, 2004 y los datos no mostrados), lo que refuerza el interés en esta proteína de 45 kDa.

35 Se ha realizado un análisis proteómico de la banda a 45 kDa de la fracción de membrana de la retina de pollo (calle 3). Debido a la purificación limitada (fraccionamiento de membrana y página de SDS), cada banda contiene muchas proteínas. Se identificaron un total de 144 proteínas usando MS/MS para al menos un péptido coincidente. El análisis de 111 proteínas con secuencia cubierta en al menos 5 % muestra que 58 proteínas se identificaron como proteína del genoma de *Gallus gallus* y se consideraron para un análisis posterior. Dentro de tal lista, la presencia de la arrestina, la vimentina y la subunidad alfa de transducina de tipo cono indica la presencia de proteínas retinianas
 40 dentro de esta fracción, pero también indica que el protocolo de purificación no permite la retirada de todas las proteínas solubles. Se estableció una lista corta de 33 proteínas candidatas retirando los candidatos poco probables como las tres proteínas retinianas citadas y otras proteínas abundantes y muy probablemente contaminantes como la enolasa, creatina cinasa, beta actina, ATPasa mitocondrial, factor de iniciación de traslación, aldolasa, glucosa 3P deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa, piruvato cinasa, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas descritas en Casuvoglu *et al.* (2003). La abundancia de proteínas unidas a la membrana interna de las células como la
 45 proteína G probablemente refleja la abundancia de proteínas asociadas a los receptores de la superficie celular en la preparación.

50 Entre la lista de las 33 proteínas candidatas, 3 proteínas contienen un dominio de transmembrana (TM), un criterio que se ha retenido para la selección de un receptor de la superficie celular. Uno de aquellos fue el precursor de la glicoproteína HT7 de la superficie celular conocido como BASIGINA (gi|69992).

Ejemplo 3: Migración del receptor de BASIGINA en SDS-PAGE.

55 La glicoproteína de la superficie celular BASIGINA se identificó originalmente como una proteína de barrera hematoencefálica idéntica al antígeno 5A11 que media el reconocimiento célula-célula en la retina aviar (Fadool and Linser, 1993), un anticuerpo monoclonal generado mediante la inmunización de ratones con células vivas disociadas de la retina de pollo embrionaria aislada del día 7 (Linser and Perkins, 1987). Aquellas células son muy similares a la retina de pollo embrionaria del día 6 usada como sistema de cultivo enriquecido en conos (Fintz *et al.*, 2003;
 60 Leveillard *et al.*, 2004). La migración de esta glicoproteína en SDSPAGE es muy similar a la proteína que interactúa con RdCVF, tal como se observa en una figura tomada del trabajo de Fadool and Linser (Fig. 3). Curiosamente, en tal informe, los autores muestran que el anticuerpo BASIGINA (clon 5A11) inhibe la reagregación de células de la retina *in vitro*, lo que sustenta el papel de la BASIGINA en las interacciones célula-célula. Se han identificado dos clones que codifican la BASIGINA a partir de una biblioteca de expresión construida con ARN preparado a partir de
 65 estos cultivos enriquecidos en conos. La presencia de estos dos clones de un total de 1000 EST secuenciados dentro del marco de una colaboración continua con el Génoscope (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Mus->

[musculusdegenerationof.html](#)) indica que lo más probablemente la BASIGINA se expresa mediante conos.

Ejemplo 4: Actividad de rescate neuronal de los agonistas de BASIGINA

5 Los agonistas de BASIGINA descritos en la presente invención se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para rescatar neuronas de acuerdo con los siguientes protocolos:

1) Actividad de rescate de conos

10 El cultivo primario es un sistema de cultivo celular primario enriquecido con conos de embrión de pollo (60-80 % de conos), tal como se describe en Fintz et al. (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, vol 44(2): 818-825, 2003).

Después de 7 días de incubación con o sin el compuesto de ensayo, un período durante el que se degeneran estas células posmitóticas, se puntúa la viabilidad de las células en el cultivo usando el ensayo Live/Dead (sondas moleculares) y una plataforma de recuento celular, tal como se ha descrito previamente (Leveillard et al., 2004).

15

2) Actividad de rescate de neuronas sensibles olfativas

Los ratones adultos se sacrifican mediante decapitación. La parte posterior del tabique nasal se disecciona libre de la cavidad nasal y se coloca inmediatamente en un DMEM helado que contiene 50 µg/ml de gentamicina (Eurobio; Gibco) y 10 (v/v) de suero de ternera fetal (eurobio). El cartílago del tabique se retira y la mucosa olfativa se incuba durante 30 min a 37 °C en una solución de dispasa II de 2,4 U/ml (Roche). El epitelio olfativo se separa cuidadosamente de la lámina propia subyacente bajo el microscopio de disección y se tritura suavemente aproximadamente 20 veces para separar las células. La suspensión celular resultante se transfiere a un tubo cónico de 50 ml y la dispasa se inactiva mediante la adición de 40 ml de HBSS sin calcio y magnesio. La suspensión celular se centrifuga a 700 rpm durante 5 min y la pella que contiene las células se vuelve a suspender en un medio compuesto por DMEM que contiene insulina (10 µg/ml, Sigma), transferina (10 µg/ml, Sigma), selenio (10 µg/ml, Sigma), suero fetal de ternera (5 %), ácido ascórbico (200 µM). Las células se plaquearon en cubreobjetos de vidrio estériles de 12 mm revestidos con 5 µg/cm² de colágeno IV humano (Sigma); proporcionando de este modo un cultivo primario de neuronas sensibles olfativas (OSN).

20
25
30

Después de 4 días de cultivo con o sin el compuesto de ensayo, las células se fijaron y se marcaron con tubulina III y se recontaron.

35 3) Actividad de rescate de células Purkinje

Después de la decapitación del ratón en el día posnatal 1-3, los cerebros se diseccionan en solución de sal equilibrada de Grey fría que contiene 5 mg/ml de glucosa y se retiran las meninges. Las fracciones parasagitales cerebelosas (35 ° o 250 µm de espesor) se cortan en un triturador de tejido McIlwain y se transfieren a una membrana de insertos de cultivo Millipore de 30 mm con un tamaño de poro de 0,4 µm (Millicel; Millipore, Bedford, MA). Las fracciones se mantienen en cultivo en placas de 6 pocillos que contienen 3 ml de medio a 35 ° en una atmósfera del 5 % de CO₂ humidificado. El medio está compuesto del 50 % de medio basal con sales de Earle (Invitrogen), el 25 % de HBSS (Invitrogen), el 25 % de suero de caballo (Invitrogen), L-glutamina (1 mM) y 5 mg/ml de glucosa (Stoppini et al, J Neurosci Methods, vol 37(2), p173-82, 1991).

40
45

Después de 4 días de cultivo con o sin el compuesto de ensayo, las células se fijaron y se marcaron con tubulina III y se recontaron.

50 4) Actividad de rescate de neuronas corticales

La preparación libre de suero de los cultivos primarios corticales de ratón se realiza con el ratón en el día posnatal 1. Después de la retirada de las meninges, las cortezas enteras se disocian mecánicamente en una solución de glucosa salina tamponada con fosfato sin cationes divalentes añadidos (NaCl 100 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 7,9 mM, glucosa 33 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y se vuelven a suspender en un medio Neurobasal (Invitrogen) que contiene el 2 % de suplemento B27 (Gibco), glutamina 0,5 mM; y glutamato 25 µM. Después, se cultivan las células sobre cubreobjetos revestidos con poli-oritina para producir cultivos altamente enriquecidos en neuronas corticales.

55

Después de 4 días de cultivo con o sin el compuesto de ensayo, las células se fijaron y se marcaron con tubulina III y se recontaron.

60

Referencias

Arner and Holmgren, Eur. J. Biochem., vol.267(20), p:6102-6109, 2000.
65 Carter-Dawson et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 17(6), p:489-498, 1978.
Holmgren, J. Biol. Chem., vol.254(18), p:9113-9119, 1979.

- Holmgren, J. Biol. Chem., vol.254(19), p:9627-9632, 1979.
Holmgren, Annu. Rev. Biochem., vol. 54, p:237-271, 1985.
Holmgren, J. Biol. Chem., vol.264(24), p:13963-13966, 1989;
Jeffery, Trends Biochem. Sci., vol.24(1):8-11, 1999.
5 Jeffery, Trends Genet., vol.19(8):415-417, 2003.
Leveillard et al., Nat. Genet. vol. 36(7), p:755-759, 2004).
Liu et al., Blood, vol.105(4):1606-1613, 2005.
Mohand-Said et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, vol.95(14), p:8357-8362, 1998).
Pekkari et al., J. Biol. Chem., vol.275(48), p:37474-37480, 2000.
10 Pekkari et al., FEBS Lett., vol.539(1-3):143-148, 2003.
Pekkari et al., Blood, vol.105(4), :1598-1605, 2005.
Portera-Cailliau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, vol.91(3), p:974-978, 1994.
Powis and Montfort, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., vol.41, p:261-295, 2001.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA para su uso en un método de tratamiento de un trastorno neurodegenerativo retiniano, en el que dicho compuesto es un ácido nucleico que codifica la BASIGINA.
2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico codifica el polipéptido al que se hace referencia en el número de acceso EAW61182 de Genpept.
- 10 3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho trastorno degenerativo retiniano se selecciona entre el grupo que consiste en retinosis pigmentaria, degeneración macular relacionada con la edad, síndrome Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia giratoria, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Refsum, enfermedad de Stargardt o síndrome de Usher.
- 15 4. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad degenerativa retiniana es la retinosis pigmentaria.
- 20 5. Una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de un trastorno neurodegenerativo que comprende un compuesto que activa la ruta de señalización de BASIGINA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

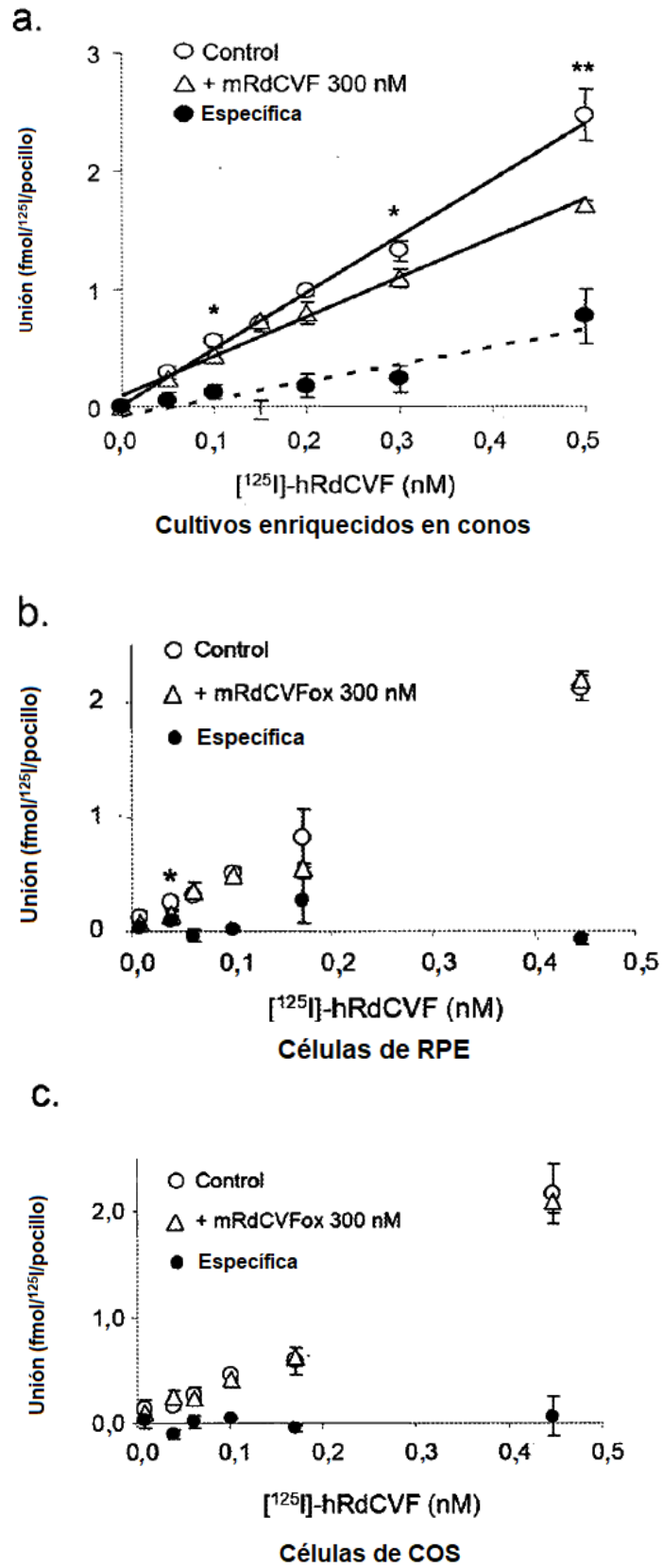


Figura 1

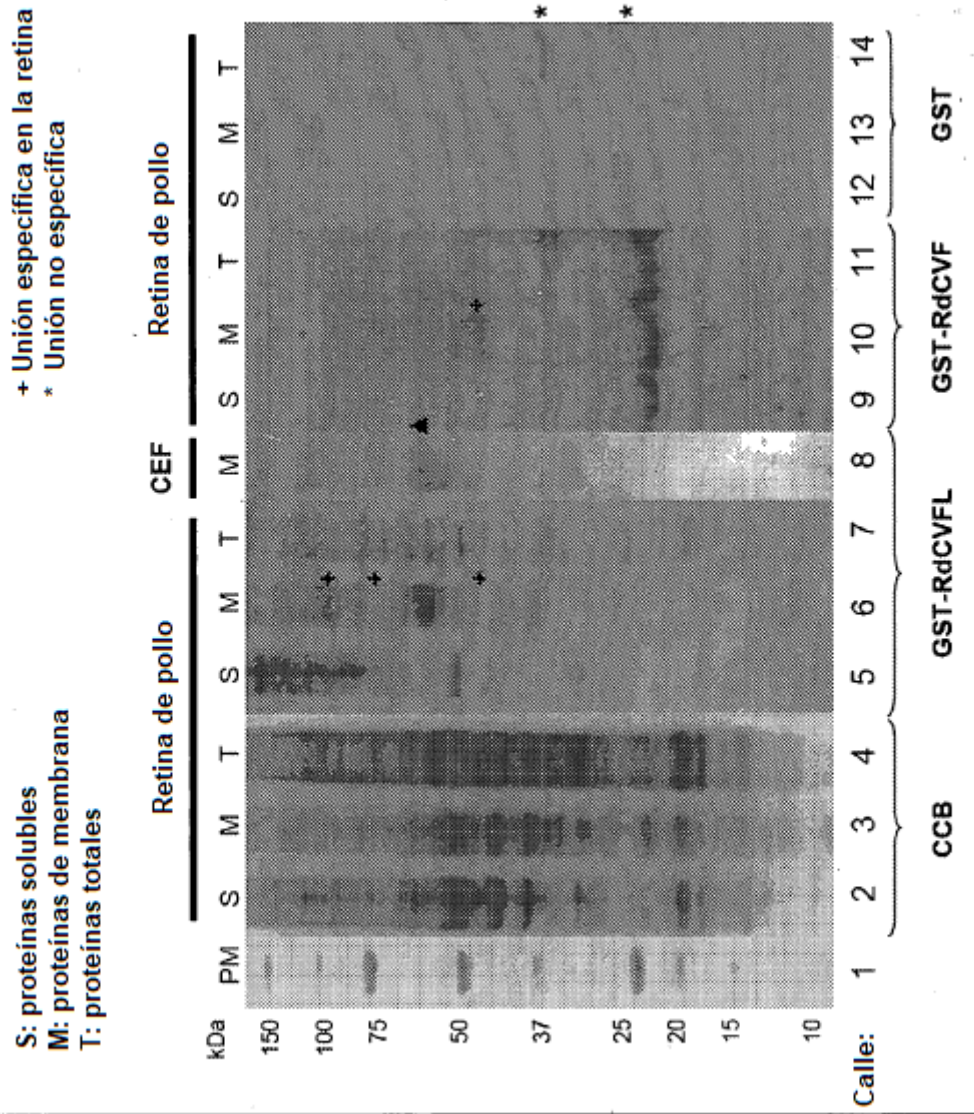


Figura 2

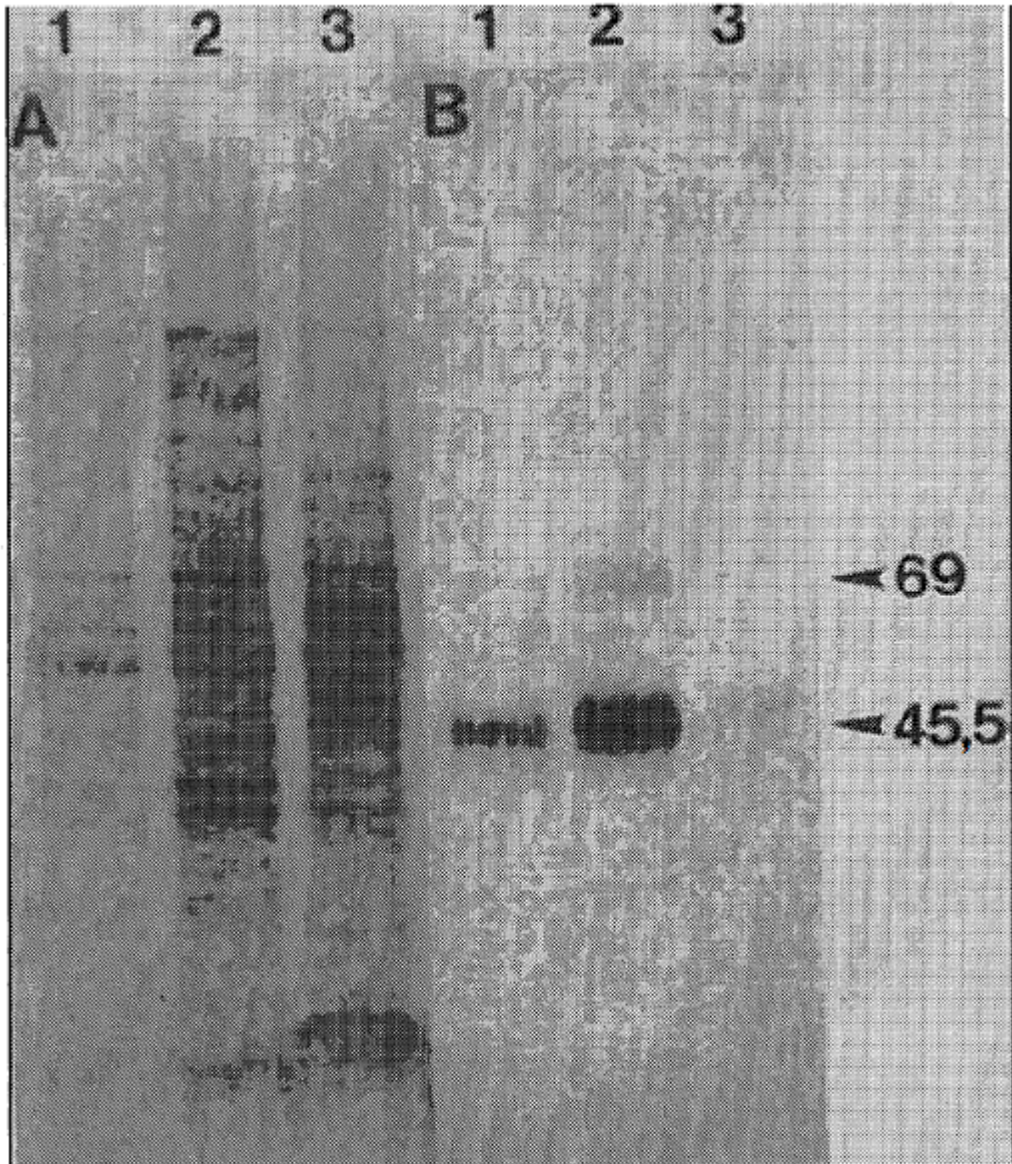


Figura 3