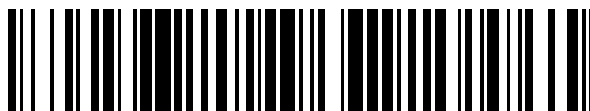


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 658**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2013 PCT/US2013/035831**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13155103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2013 E 13775928 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2841086**

54 Título: **Composiciones para su uso en el tratamiento de lesión neural inhibiendo la actividad de fosfatasas de la familia LAR**

30 Prioridad:

09.04.2012 US 201261621623 P

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY
(100.0%)
10900 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44106, US**

72 Inventor/es:

**LANG, BRADLEY, T.;
CREGG, JARED M.;
SILVER, JERRY y
WANG, YI-LAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 699 658 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones para su uso en el tratamiento de lesión neural inhibiendo la actividad de fosfatasa de la familia LAR

5 **Solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense n.º 61/621.623, presentada el 9 de abril de 2012.

10 **Campo técnico**

Esta divulgación se refiere a composiciones y métodos para inhibir o reducir la actividad, señalización y/o función de la familia de fosfatasa relacionadas con antígeno leucocitario común (LAR) y a métodos y composiciones para tratar enfermedades, trastornos y/o estados asociados con la actividad, señalización y/o función de fosfatasa de la familia LAR.

Antecedentes

La lesión de la médula espinal y otras lesiones del sistema nervioso central (SNC) pueden provocar discapacidad permanente o pérdida de movimiento (parálisis) y sensibilidad por debajo del sitio de la lesión. La recuperación tras una lesión del SNC es mínima, lo que conduce a un interés actual sustancial en posibles estrategias para superar este desafío. Un obstáculo fundamental al que se enfrentan los esfuerzos por mejorar la función neuronal tras una lesión es la incapacidad del SNC adulto para regenerarse.

Dos clases bien conocidas de inhibidores de la regeneración son inhibidores asociados a mielina (MAG, Nogo y OMGP); e inhibidores en tejido cicatricial formado por glía en el sitio de lesión (por ejemplo, proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG)). CSPG está implicado no sólo en lesión traumática, sino también en muchas otras enfermedades del SNC incluyendo neurodegeneración. Los ejemplos de receptores para inhibidores asociados a mielina incluyen Pir B y NgR.

Los CSPG presentan una barrera a la regeneración de axones, aunque ningún receptor específico para el efecto inhibitorio de CSPG se ha identificado previamente. Más específicamente, los CSPG muestran una regulación por incremento drástica tras lesión neural, tanto dentro de la matriz extracelular de tejido cicatricial como en la red perineuronal dentro de dianas más distantes de los axones cortados. La naturaleza inhibitoria de los CSPG no sólo se refleja en la formación de bulbos de retracción axónica distróficos que no pueden regenerarse a través de la lesión, sino también en la capacidad limitada del brote colateral de fibras exentas. Aunque se ha sabido durante casi dos décadas que los proteoglicanos sulfatados son contribuidores importantes a la naturaleza repulsiva de la cicatriz glial, el mecanismo inhibitorio preciso apenas se entendía. Por tanto, sigue existiendo la urgente necesidad de mecanismos que modulen la función de CSPG.

Sumario

Realizaciones descritas en el presente documento se refieren a métodos de inhibición y/o reducción de la actividad, señalización y/o función de la familia de fosfatasa relacionadas con antígeno leucocitario común (LAR) en una célula de un sujeto inducidas por proteoglicanos. Los métodos incluyen administrar a la célula un agente terapéutico que inhibe una o más de actividad catalítica, señalización y función de las fosfatasa de la familia LAR sin inhibir la unión a o activación las fosfatasa de la familia LAR por los proteoglicanos.

En algunas realizaciones, la fosfatasa de la familia LAR es una proteína tirosina fosfatasa receptora sigma (PTP_{σ}), y el agente terapéutico incluye un péptido terapéutico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos del dominio de cuña de PTP_{σ} . Por ejemplo, agente terapéutico puede incluir un péptido terapéutico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-33.

En otras realizaciones, la fosfatasa de la familia LAR es una proteína tirosina fosfatasa receptora sigma (PTP_{σ}), y el agente terapéutico puede incluir un péptido terapéutico al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homólogo a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. El péptido terapéutico puede incluir, por ejemplo, una sustitución conservativa de un aminoácido de al menos uno, dos, tres o cuatro del residuo 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 ó 13 de SEQ ID NO: 37.

En algunas realizaciones, la célula es una célula neural, célula glial, células progenitora glial o una célula progenitora neural.

En otras realizaciones, el agente terapéutico incluye un resto de transporte que está unido al péptido terapéutico y facilita la captación de los péptidos terapéuticos por la célula. Por ejemplo, el resto de transporte puede ser un resto de transporte Tat de VIH.

En todavía otras realizaciones, la célula está en un sujeto que está tratándose, y el agente terapéutico se administra de manera local o sistémica al sujeto que está tratándose.

En aún otras realizaciones, el péptido terapéutico se expresa en la célula.

Realizaciones en el presente documento también se refieren a métodos de tratamiento de enfermedades, trastornos y/o estados asociados con la activación y señalización de fosfatasa de la familia LAR. Los métodos incluyen administrar a una célula del sujeto un agente terapéutico que inhibe una o más de la actividad catalítica, señalización y función de las fosfatasa de la familia LAR sin inhibir la unión a o la activación las fosfatasa de la familia LAR por los proteoglicanos.

En algunas realizaciones, la enfermedad, el trastorno y/o el estado incluye al menos uno de una enfermedad, un trastorno y/o un estado del sistema nervioso.

En otras realizaciones, la enfermedad, el trastorno y/o el estado del sistema nervioso incluyen al menos uno de un trastorno neurológico, trastorno neuropsiquiátrico, lesión neural, trastorno de toxicidad neural, un dolor neuropático y trastornos degenerativos neurales.

Por ejemplo, el trastorno neurológico puede incluir al menos una de lesiones traumáticas o tóxicas en nervios periféricos o craneales, médula espinal o en el cerebro, nervios craneales, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, aneurisma cerebral y lesión de la médula espinal. El trastorno neurológico también puede incluir al menos una de enfermedad de Alzheimer, demencias relacionadas con enfermedad de Alzheimer, Parkinson, enfermedades de cuerpos difusos de Lewy, demencia senil, enfermedad de Huntington, síndrome de Gilles de la Tourette, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía sensorial y motora hereditaria, neuropatía diabética, parálisis supranuclear progresiva, epilepsia o enfermedad de Jakob-Creutzfeldt.

En algunas realizaciones, la lesión neural puede estar provocada por o asociada con al menos uno de epilepsia, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades autoinmunitarias, trastornos del sueño, trastornos autónomos, trastornos de la vejiga urinaria, estados metabólicos anómalos, trastornos del sistema muscular, enfermedades infecciosas y parasitarias, neoplasias, enfermedades endocrinas, enfermedades nutricionales y metabólicas, enfermedades inmunológicas, enfermedades de la sangre y los órganos formadores de sangre, trastornos mentales, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades de los órganos sensoriales, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades del sistema genitourinario, enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo, enfermedades del sistema musculoesquelético y tejido conjuntivo, anomalías congénitas o estados que se originan en el periodo perinatal.

Todavía otras realizaciones descritas en el presente documento se refieren a un agente terapéutico para promover al menos uno de crecimiento, motilidad, supervivencia y plasticidad de células neurales. El agente terapéutico incluye un péptido terapéutico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos del dominio de cuña de PTP σ . Por ejemplo, agente terapéutico puede incluir un péptido terapéutico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-33.

En otras realizaciones, el agente terapéutico puede incluir un péptido terapéutico al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homólogo a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37. El péptido terapéutico puede incluir, por ejemplo, una sustitución conservativa de un aminoácido de al menos uno, dos, tres, o cuatro del residuo 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 ó 13 de SEQ ID NO: 37.

Aún otras realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una composición farmacéutica. La composición farmacéutica incluye un agente terapéutico que comprende un péptido terapéutico sintético al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homólogo a SEQ ID NO: 37 y un resto de transporte que está unido al péptido terapéutico y facilita la captación de los péptidos terapéuticos por una célula.

En algunas realizaciones, el péptido terapéutico incluye una sustitución conservativa de un aminoácido de al menos uno del residuo 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 ó 13 de SEQ ID NO: 37.

En otras realizaciones, el péptido terapéutico incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-33 y 37.

- 5 En todavía otras realizaciones, el agente terapéutico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42-66 y 70.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 ilustra una fotografía de una neurona de DRG sensorial adulta en un ensayo puntual tras 5 días de exposición a un gradiente de CSPG.

Las figuras 2(A-D) ilustran fotografías de los conos de crecimiento de neuronas de DRG sensoriales adultas en un ensayo puntual expuestas a un gradiente de CSPG.

- 15 La figura 3 ilustra un gráfico que muestra la densidad de PTP σ de axones normales y distróficos y conos de crecimiento.

- 20 La figura 5 ilustra una fotografía de neuronas de DRG sensoriales adultas en un ensayo puntual expuestas a gradientes de CSPG y tratadas con un control de vehículo o ISP.

La figura 6 ilustra un gráfico que muestra cruzamientos de conos de crecimiento de neuronas de DRG sensoriales adultas en un ensayo puntual expuestas a gradientes de CSPG y tratadas con un control de vehículo o ISP.

- 25 Las figuras 7 (A-B) ilustran fotografías que muestran la movilidad de conos de crecimiento de neuronas de DRG sensoriales en un ensayo puntual expuestas a gradientes de CSPG tratadas con un control de vehículo o ISP.

- 30 La figura 8 ilustra un gráfico que muestra la puntuación de Basso, Beattie y Bresnahan para la locomoción tras la lesión de la médula espinal (SCI) de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido LAR en el día 1 hasta el día 77.

- 35 La figura 9 ilustra un gráfico que muestra la puntuación de Basso, Beattie y Bresnahan de las extremidades traseras para la locomoción tras SCI de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido LAR en el día 11.

- La figura 10 ilustra un gráfico que muestra los errores de pies/metros de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido LAR.

- 40 La figura 11 ilustra un gráfico que muestra los resbalones de pies/metros de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido LAR.

La figura 12 ilustra un gráfico que muestra el volumen y la frecuencia urinaria de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con ISP.

- 45 La figura 13 ilustra un gráfico que muestra frecuencia de micción de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido LAR.

- 50 La figura 14 ilustra fotografías que muestran la expresión de 5HT (densidad axónica) en médula espinal lumbar de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con ISP.

La figura 15 ilustra un gráfico que muestra la expresión de 5HT lumbar de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con ISP.

- 55 La figura 4 ilustra un diagrama esquemático de la familia LAR de fosfatasa transmembrana, LAR, RPTP σ , RPTPdelta y sus componentes de señalización.

Descripción detallada

- 60 Las realizaciones descritas en el presente documento no se limitan a la metodología, protocolos y reactivos, etc. particulares, y tales pueden variar. La terminología usada en el presente documento es para el fin de describir realizaciones particulares sólo, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones. Aparte de en los ejemplos de funcionamiento, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes o condiciones de reacción usados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos mediante el término "aproximadamente".

- 65 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tendrán los

significados que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en el presente documento son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, “uno o más de a, b y c” significa a, b, c, ab, ac, be o abc. El uso de “o” en el presente documento es el inclusivo o.

Tal como se usa en el presente documento, el término “administrar” a un paciente incluye dispensar, suministrar o aplicar un compuesto activo en una formulación farmacéutica a un sujeto mediante cualquier vía adecuada para el suministro del compuesto activo a la ubicación deseada en el sujeto (por ejemplo, para entrar en contacto de ese modo con una célula deseada tal como una neurona deseada), incluyendo administración en el líquido cefalorraquídeo o a través de la barrera hematoencefálica, suministro mediante o bien la vía parenteral o bien la oral, inyección intramuscular, inyección subcutánea o intradérmica, inyección intravenosa, administración bucal, suministro transdérmico y administración mediante la vía del tracto rectal, colónico, vaginal, intranasal o respiratorio. Los agentes pueden administrarse, por ejemplo, a un sujeto en coma, anestesiado o paralizado por medio de una inyección intravenosa o puede administrarse por vía intravenosa a un sujeto embarazado para estimular el crecimiento axónico en un feto. Las vías de administración específicas pueden incluir aplicación tópica (tal como mediante colirios, cremas o formulaciones erosionables que van a colocarse bajo el párpado, inyección intraocular en el humor acuoso o vítreo, inyección en las capas externas del ojo, tal como por medio de inyección subconjuntival o inyección subtenónica, administración parenteral o por medio de vías orales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo”, incluye AcM humanos y animales, y preparaciones de anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, incluyendo anticuerpos recombinantes (antisueros), anticuerpos quiméricos, incluyendo anticuerpos humanizados, anticuerpos antiidiotípicos y derivados de los mismos. Una porción o fragmento de un anticuerpo se refiere a una región de un anticuerpo que conserva al menos parte de su capacidad (especificidad y afinidad de unión) para unirse a un epítipo especificado. El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un parátipo de anticuerpo. Los epítipos formados por aminoácidos contiguos se conservan normalmente tras la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, al menos 5, o de 8 a 10, o aproximadamente de 13 a 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos de determinación de la conformación espacial de epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, 66 EPITOPE MAPPING PROTOCOLS IN METS. IN MOLECULAR BIO. (Morris, ed., 1996); Burke *et al.*, 170 J. Inf. Dis. 1110-19 (1994); Tigges *et al.*, 156 J. Immunol. 3901-10).

Tal como se usa en el presente documento, el término “crecimiento” axónico o “excrecencia” (también denominado en el presente documento “excrecencia neuronal”) incluye el proceso por el cual los axones o las dendritas se extienden a partir de una neurona. La excrecencia puede dar como resultado una nueva proyección neurítica o la extensión de un proceso celular previamente existente. La excrecencia axónica puede incluir la extensión lineal de un proceso axónico en cinco diámetros de célula o más. Los procesos de crecimiento neuronal, incluyendo neuritogénesis, pueden evidenciarse por la expresión de GAP-43 detectada mediante métodos tales como inmunotinción. “Estimulación del crecimiento axónico” significa promover la excrecencia axónica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “neuronas del sistema nervioso central (SNC)” incluye las neuronas del cerebro, los nervios craneales y la médula espinal.

Tal como se usa en el presente documento, el término “marchitamiento” se refiere a la retracción axónica que se produce como resultado de traumatismo en el axón.

Tal como se usa en el presente documento, una “proteína quimérica” o “proteína de fusión” es una fusión de una primera secuencia de aminoácidos que codifica para un polipéptido con una segunda secuencia de aminoácidos que define un dominio (por ejemplo, porción de polipéptido) foráneo para y no sustancialmente homólogo al dominio del primer polipéptido. Una proteína quimérica puede presentar un dominio foráneo, que se encuentra (aunque en una proteína diferente) en un organismo, que también expresa la primera proteína, o puede ser una fusión “entre especies”, “intergénica”, etc. de estructuras proteicas expresadas por diferentes clases de organismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término “entrar en contacto con neuronas” o “tratar neuronas” se refiere a cualquier modo de suministro o “administración” de agentes, o bien a células o bien a organismos completos, en el que el agente puede presentar su efecto farmacológico en neuronas. “Entrar en contacto con neuronas” incluye tanto métodos *in vivo* como *in vitro* de poner un agente de la invención en proximidad con una neurona. Los modos adecuados de administración pueden determinarlos los expertos en la técnica y tales modos de administración pueden variar entre agentes. Por ejemplo, cuando el crecimiento axónico de neuronas se estimula *ex vivo*, pueden administrarse agentes, por ejemplo, mediante transfección, lipofección, electroporación, infección con vectores virales o mediante adición a medio de crecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” de un agente o péptido terapéutico es una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico o farmacológico deseado, tal como una cantidad que puede activar el crecimiento de neuronas. Una cantidad eficaz de un agente tal como se define en el presente documento puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del agente para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del compuesto activo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Tal como se usa en el presente documento, el término una “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Un resultado terapéutico puede ser, por ejemplo, disminución de los síntomas, supervivencia prolongada, movilidad mejorada, y similares. No es necesario que el resultado terapéutico sea una “cura”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “expresión” se refiere al proceso mediante el cual el ácido nucleico se traduce en péptidos o se transcribe en ARN, que, por ejemplo, puede traducirse en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el ácido nucleico se deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir, si se selecciona un organismo o célula huésped eucariota apropiada, el corte y empalme del ARNm. Para ácido nucleico heterólogo que va a expresarse en una célula huésped, debe suministrarse inicialmente en la célula y luego, una vez en la célula, residir en última instancia en el núcleo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “terapia genética” implica la transferencia de ADN heterólogo a células de un mamífero, particularmente un ser humano, con un trastorno o estados para los que se busca terapia o diagnóstico. El ADN se introduce en las células diana seleccionadas de una manera tal que el ADN heterólogo se expresa y se produce un producto terapéutico codificado de ese modo. Alternativamente, el ADN heterólogo puede mediar de alguna manera en la expresión del ADN que codifica para el producto terapéutico; puede codificar para un, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media en, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. También puede usarse terapia genética para suministrar ácido nucleico que codifica para un producto génico para reemplazar a un gen defectuoso o complementar un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar para un compuesto terapéutico, tal como un inhibidor de factor de crecimiento del mismo, o un factor de necrosis tumoral o inhibidor del mismo, tal como un receptor para el mismo, que no se produce normalmente en el huésped mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un tiempo terapéuticamente útil. El ADN heterólogo que codifica para el producto terapéutico puede modificarse antes de su introducción en las células del huésped aquejado con el fin de potenciar o alterar de otra forma el producto o la expresión del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “gen” o “gen recombinante” se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica para un polipéptido, incluyendo tanto secuencias de exón como (opcionalmente) de intrón.

Tal como se usa en el presente documento, el término “secuencia de ácido nucleico heteróloga” es normalmente ADN que codifica para ARN y proteínas que no se producen normalmente *in vivo* por la célula en la que se expresa o que media en o codifica para mediadores que alteran la expresión de ADN endógeno afectando a la transcripción, traducción u otros procesos bioquímicos regulables. Una secuencia de ácido nucleico heteróloga puede denominarse también ADN foráneo. Cualquier ADN que un experto en la técnica reconocería o consideraría como heterólogo o foráneo para la célula en la que se expresa se abarca en el presente documento por ADN heterólogo. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ADN que codifica para proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que confiere resistencia a fármacos, ADN que codifica para sustancias terapéuticamente eficaces, tales como agentes anticancerígenos, enzimas y hormonas, y ADN que codifica para otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos. Anticuerpos que están codificados por ADN heterólogo pueden secretarse o expresarse sobre la superficie de la célula en la que se ha introducido el ADN heterólogo.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “homología” e “identidad” se usan de manera sinónima en todas partes y se refieren a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición en cada secuencia, que pueden alinearse para fines de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas o idénticas en esa posición. El grado de homología o identidad entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias.

Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno neurológico” incluye una enfermedad, trastorno o estado que afecta directa o indirectamente al funcionamiento normal o la anatomía del sistema nervioso de un sujeto. El término “accidente cerebrovascular” se reconoce en la técnica e incluye la disminución o pérdida súbita de la conciencia, sensibilidad y movimiento voluntario provocado por la rotura u obstrucción (por ejemplo, por un coágulo sanguíneo) de una arteria del cerebro. “Lesión cerebral traumática” se reconoce en la técnica e incluye el estado en el que un golpe traumático en la cabeza provoca daño al cerebro o a la médula espinal de conexión, con o sin penetración en el cráneo. Habitualmente, el traumatismo inicial puede dar como resultado un hematoma en

expansión, hemorragia subaracnoidea, edema cerebral, aumento de la presión intracraneal e hipoxia cerebral, lo que puede, a su vez, conducir a acontecimientos secundarios graves debido a bajo flujo de sangre cerebral.

Tal como se usa en el presente documento, el término “migración neuronal” se refiere a la capacidad de las células neuronales para migrar o de los procesos neuronales para migrar tal como una migración axonal o dendrítica.

Tal como se usan en el presente documento, las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” tal como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Tal como se usan en el presente documento, las frases “administración sistémica”, “administrado de manera sistémica”, “administración periférica” y “administrado de manera periférica” tal como se usa en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material aparte de directamente en un tejido diana (por ejemplo, el sistema nervioso central), de manera que entra en el sistema del animal y, por tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Tal como se usa en el presente documento, el término “paciente” o “sujeto” o “animal” o “huésped” se refiere a cualquier mamífero. El sujeto puede ser un ser humano, pero también puede ser un mamífero que necesita tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, aves de corral, cerdos, caballos, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares).

Tal como se usa en el presente documento, el término “neuronas del sistema nervioso periférico (SNP)” incluye las neuronas que residen o se extienden fuera del SNC. El SNP pretende incluir las neuronas que se entiende comúnmente que están clasificadas en el sistema nervioso periférico, incluyendo neuronas sensoriales y neuronas motoras.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de nucleótidos” se usan también de manera intercambiable en el presente documento.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “péptido” o “polipéptido” se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a compuestos que consisten en desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 90 residuos de aminoácido, incluidos, en los que el grupo amino de un aminoácido está unido al grupo carboxilo de otro aminoácido mediante un enlace peptídico. Un péptido, por ejemplo, puede derivarse de o retirarse de una proteína nativa mediante escisión enzimática o química, o puede prepararse usando técnicas de síntesis de péptidos convencionales (por ejemplo, síntesis en fase sólida) o técnicas de biología molecular (véase Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)). Un “péptido” puede comprender cualquier L y/o D-aminoácido adecuado, por ejemplo, α -aminoácidos comunes (por ejemplo, alanina, glicina, valina), aminoácidos distintos de α (por ejemplo, P-alanina, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, sarcosina, estatina) y aminoácidos poco comunes (por ejemplo, citrulina, homocitrulina, homoserina, norleucina, norvalina, ornitina). Los grupos funcionales amino, carboxilo y/u otros en un péptido pueden estar libres (por ejemplo, sin modificar) o protegidos con un grupo protector adecuado. Se conocen en la técnica grupos protectores adecuados para grupos amino y carboxilo, y medios para añadir o eliminar grupos protectores. Véase, por ejemplo, Green & Wuts, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons, 1991). Los grupos funcionales de un péptido también pueden derivatizarse (por ejemplo, alquilarse) usando métodos conocidos en la técnica.

Pueden sintetizarse péptidos y ensamblarse para dar bibliotecas que comprenden unas cuantas especies moleculares demasiado diferenciadas. Tales bibliotecas pueden prepararse usando métodos bien conocidos de química combinatoria, y pueden examinarse tal como se describe en el presente documento o usando otros métodos adecuados para determinar si la biblioteca comprende péptidos que puedan antagonizar la interacción CSPG-PTP σ . Tales antagonistas peptídicos pueden entonces aislarse por medios adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, el término “peptidomimético”, se refiere a una molécula de tipo proteico diseñada para imitar a un péptido. Los peptidomiméticos normalmente surgen o bien de la modificación de un péptido existente, o bien diseñando sistemas similares que imitan a péptidos, tales como peptoides y β -péptidos. Independientemente del enfoque, la estructura química alterada está diseñada para ajustarse ventajosamente a las propiedades moleculares tales como estabilidad o actividad biológica. Estas modificaciones implican cambios en el péptido que no se producen de manera natural (tales como estructuras principales alteradas y la incorporación de aminoácidos no naturales).

Tal como se usa en el presente documento, el término “células progenitoras” son células producidas durante la diferenciación de una célula madre que tiene algunas, pero no todas, de las características de su progenie

diferenciada de manera terminal. Las células progenitoras definidas, tales como “células progenitoras neurales”, están destinadas a un linaje, pero no a un tipo de célula diferenciada de manera terminal o específica.

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula madre” significa una célula que puede experimentar autorrenovación (es decir, progenie con el mismo potencial de diferenciación) y también producir células de progenie que están más restringidas en el potencial de diferenciación. Dentro del contexto de la invención, una célula madre abarcaría también una célula más diferenciada que se ha desdiferenciado, por ejemplo, por transferencia nuclear, mediante fusiones con una célula madre más primitiva, mediante la introducción de factores de transcripción específicos o mediante cultivo en condiciones específicas. Véanse, por ejemplo, Wilmut *et al.*, *Nature*, 385:810-813 (1997); Ying *et al.*, *Nature*, 416:545-548 (2002); Guan *et al.*, *Nature*, 440:1199-1203 (2006); Takahashi *et al.*, *Cell*, 126:663-676 (2006); Okita *et al.*, *Nature*, 448:313-317 (2007); y Takahashi *et al.*, *Cell*, 131:861-872 (2007).

Tal como se usa en el presente documento, el término “retracción” se refiere al retroceso del axón lejos del sitio de lesión, tal como de donde se forma la cicatriz glial. En este caso, el extremo de los axones en regeneración deja de extenderse y se vuelve distrófico. Estos extremos distróficos pueden retroceder entonces desde la cicatriz glial y el sitio de lesión.

Una secuencia de polinucleótido (ADN, ARN) está “operativamente unida” a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de polinucleótido. El término “operativamente unida” incluye tener una señal de inicio apropiada (por ejemplo, ATG) en frente de la secuencia de polinucleótido que va a expresarse, y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de polinucleótido bajo el control de la secuencia de control de la expresión, y la producción del polipéptido deseado codificado por la secuencia de polinucleótido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “recombinante”, tal como se usa en el presente documento, significa que una proteína se deriva de un sistema de expresión eucariota o procariota.

Tal como se usa en el presente documento, el término “promotor específico de tejido” significa una secuencia de ácido nucleico que sirve como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada operativamente unida al promotor, y que afecta a la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en células específicas de un tejido, tal como células de células epiteliales. El término también cubre los denominados promotores “con pérdidas”, que regulan la expresión de un ácido nucleico seleccionado principalmente en un tejido, pero pueden provocar la expresión en otros tejidos también. El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN foráneo por una célula. Una célula se ha “transfectado” cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Se conocen generalmente en la técnica varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, *Virology* 52:456 (1973); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Chu *et al.*, *Gene* 13:197 (1981). Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno, tales como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico, en células huésped adecuadas. El término abarca procedimientos químicos, eléctricos y transfección mediada por virus.

Tal como se usa en el presente documento, el término “secuencia reguladora de la transcripción” es un término genérico usado en toda la memoria descriptiva para referirse a secuencias de ácido nucleico, tales como señales de iniciación, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteína con las que están operativamente unidas. En algunos ejemplos, la transcripción de un gen recombinante está bajo el control de una secuencia de promotor (u otra secuencia reguladora de la transcripción), que controla la expresión del gen recombinante en un tipo de célula en el que se pretende la expresión. También se entenderá que el gen recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras de la transcripción que son las mismas o que son diferentes de las secuencias que controlan la transcripción de la forma que se produce de manera natural de una proteína.

Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Vectores preferidos son los que pueden realizar uno o más de replicación y expresión autónomas de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos se denominan en el presente documento “vectores de expresión”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tipo natural” se refiere a la secuencia de polinucleótido que se produce de manera natural que codifica para una proteína, o una porción de la misma, o secuencia de proteína, o porción de la misma, respectivamente, tal como existe normalmente *in vivo*. Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). El término debe entenderse también que incluye, como equivalentes, análogos de o bien ARN o bien ADN producidos a partir de análogos de nucleótido y, tal como puede aplicarse a la realización que está describiéndose, polinucleótidos mono (sentido o antisentido) y bicatenarios.

Los agentes, compuestos, composiciones, anticuerpos, etc. usados en los métodos descritos en el presente

documento se considera que están purificados y/o aislados antes de su uso. Materiales purificados normalmente son “sustancialmente puros”, lo que significa que un ácido nucleico, polipéptido o fragmento del mismo, u otra molécula se ha separado de los componentes que la acompañan de manera natural. Normalmente, el polipéptido es sustancialmente puro cuando está al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, o incluso el 99%, en peso, libre de las proteínas y otras moléculas orgánicas con las que está asociado de manera natural. Por ejemplo, un polipéptido sustancialmente puro puede obtenerse mediante extracción a partir de una fuente natural, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula que no expresa normalmente esa proteína, o mediante síntesis química. Los “materiales aislados” se han retirado de su ubicación y entorno natural. En el caso de un dominio o fragmento proteico aislado o purificado, el dominio o fragmento está sustancialmente libre de secuencias de aminoácidos que flanquean a la proteína en la secuencia que se produce de manera natural. El término “ADN aislado” significa ADN que se ha liberado sustancialmente de los genes que flanquean al ADN dado en el genoma que se produce de manera natural. Por tanto, el término “ADN aislado” abarca, por ejemplo, ADNc, ADN genómico clonado y ADN sintético.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “porción”, “fragmento”, “variante”, “derivado” y “análogo”, cuando se refieren a un polipéptido de la presente invención, incluyen cualquier polipéptido que conserve al menos alguna actividad biológica a la que se hace referencia en el presente documento (por ejemplo, inhibición de una interacción tal como unión). Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden incluir moléculas de porción, fragmento, variante o derivado sin limitación, siempre que el polipéptido todavía cumpla su función. Los polipéptidos o porciones de los mismos de la presente invención pueden incluir fragmentos proteolíticos, fragmentos de delección y, en particular, o fragmentos que alcanzan más fácilmente el sitio de acción cuando se administran a un animal.

Esta solicitud se refiere a composiciones y métodos para inhibir y/o reducir la actividad, señalización y/o función de la familia de fosfatasa relacionadas con antígeno leucocitario común (LAR), tales como LAR y proteína tirosina fosfatasa receptora sigma ($PTP\sigma$), y a métodos y composiciones de tratamiento de enfermedades, trastornos y/o estados asociados con activación y señalización de fosfatasas de la familia LAR, tales como LAR y $RPTP\sigma$.

La familia de fosfatasas LAR consiste en tres miembros: la propia LAR, proteína tirosina fosfatasa receptora sigma ($PTP\sigma$) y proteína tirosina fosfatasa receptora delta ($PTP\delta$). $PTP\sigma$ y $PTP\delta$ (la propia LAR) se han implicado como receptores para proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG), un constituyente principal de la cicatriz glial y red perineuronal. Las cadenas laterales de azúcar de los CSPG pueden unirse a LAR y $PTP\sigma$ expresadas por células, tales como células neurales, e inhibir el crecimiento, la plasticidad, la regeneración de células neurales y el fallo del brote en las células neurales.

Se encontró que neuronas deficientes en $PTP\sigma$ mostraban una disminución de la inhibición en diversos ensayos mediados por CSPG y mostraban un aumento de la regeneración tras lesión neurológica, tal como tras lesión de la médula espinal y aplastamiento del nervio óptico. Los resultados en la deficiencia de LAR no fueron concluyentes, encontrándose fenotipos de regeneración tanto aumentada como disminuida. Puesto que los CSPG son el impedimento primario para la regeneración y plasticidad en el sistema nervioso adulto lesionado, pueden usarse inhibidores funcionales de esta familia de fosfatasas LAR como producto terapéutico para promover el crecimiento, la plasticidad, la regeneración y el brote de células neurales.

Por consiguiente, algunas realizaciones descritas en el presente documento se refieren a métodos de promoción del crecimiento, la motilidad, la supervivencia y/o la plasticidad de una célula que expresa una fosfatasa de la familia LAR (por ejemplo, células neurales, células progenitoras neurales, células madre neurales o células endoteliales) que están y/o pueden estar activadas potencialmente por proteoglicanos, tales como CSPG. El método puede incluir la administración a la célula de una cantidad de un agente terapéutico eficaz para inhibir uno o más de, actividad catalítica, señalización y/o función de las fosfatasas de la familia LAR. La inhibición de la actividad, señalización y/o función de las fosfatasas de la familia LAR puede usarse para promover el crecimiento, la motilidad, la supervivencia y la plasticidad celulares en estas células.

En determinadas realizaciones, las células que expresan una fosfatasa de la familia LAR incluyen células neurales y células gliales. Otros ejemplos de células incluyen células endoteliales. Todavía otros ejemplos de células que expresan una fosfatasa de la familia LAR, que pueden activarse por un proteoglicano pueden examinarse fácilmente usando ensayos conocidos.

La actividad, señalización y/o función de las fosfatasas de la familia LAR puede suprimirse, inhibirse y/o bloquearse de varios modos incluyendo: inhibición directa de la actividad del dominio intracelular de las fosfatasas de la familia LAR (por ejemplo, usando moléculas pequeñas, peptidomiméticos o polipéptidos dominantes negativos); activación de genes y/o proteínas que inhiben una o más de la actividad, señalización y/o función del dominio intracelular de las fosfatasas de la familia LAR (por ejemplo, aumentando la expresión o actividad de los genes y/o las proteínas); inhibición de genes y/o proteínas que son mediadores posteriores de las fosfatasas de la familia LAR (por ejemplo, bloqueando la expresión y/o actividad de los genes y/o proteínas mediadores); introducción de genes y/o proteínas que regulan negativamente una o más de actividad, señalización y/o función de fosfatasas de la familia LAR (por

ejemplo, usando vectores de expresión génica recombinantes, vectores virales recombinantes o polipéptidos recombinantes); o reemplazo génico con, por ejemplo, un mutante hipomórfico de las fosfatasa de la familia LAR (por ejemplo, mediante recombinación homóloga, sobreexpresión usando expresión génica recombinante o vectores virales, o mutagénesis).

El agente terapéutico que inhibe o reduce una o más de la actividad, señalización y/o función de la fosfatasa de la familia LAR puede incluir un agente que disminuye y/o suprime la actividad, señalización y/o función de la fosfatasa de la familia LAR sin inhibir la unión a o activación las fosfatasa de la familia LAR por proteoglicanos, tales como CSPG. Tales agentes pueden suministrarse de manera intracelular y una vez suministrados de manera intracelular promueven la capacidad de crecimiento intrínseca de una célula, tal como una neurona, activan la ruta de crecimiento de neuronas (por ejemplo, SNC) y pueden producir un efecto neurosaludable.

El efecto neurosaludable puede incluir una respuesta o resultado favorable para la salud o función de una neurona, de una parte del sistema nervioso o del sistema nervioso en general. Los ejemplos de tales efectos incluyen mejoras en la capacidad de una neurona o porción del sistema nervioso para resistir ataques, para regenerarse, para mantener una función deseable, para crecer o para sobrevivir. El efecto neurosaludable puede incluir la producción o el efecto de una respuesta de este tipo o mejora en la función o resiliencia dentro de un componente del sistema nervioso. Los ejemplos de producción de un efecto neurosaludable incluirían estimular la excrecencia axónica tras lesión en una neurona; hacer que una neurona sea resistente a la apoptosis; hacer que una neurona sea resistente a un compuesto tóxico tal como β -amiloide, amoniaco u otras neurotoxinas; revertir la atrofia neuronal relacionada con la edad o pérdida de función; revertir la pérdida relacionada con la edad de inervación colinérgica, revertir y/o reducir el marchitamiento y/o promover el brote neural.

Un posible mecanismo para la regulación, modulación y/o inhibición de familia de fosfatasa LAR implica la dimerización de la porción intracelular de la familia de fosfatasa LAR. En contraposición a tirosina cinasas receptoras, que son activas como dímeros e inactivas como monómeros, varias proteína tirosina fosfatasa (PTP) son inactivas en el estado dimerizado y activas como monómeros. Estas incluyen PTPalfa, PTP1B y CD45. Cada una de estas moléculas pueden cristalizarse en tanto su forma monomérica activa como su forma dimérica inactiva. Además, LAR y CD45 demuestran unión homofílica en condiciones oxidativas específicas, mientras que PTP σ puede dimerizarse en respuesta a la unión al ligando. Esto sugiere que ligandos para la familia de fosfatasa LAR pueden dirigir el estado de activación de la familia de fosfatasa LAR, tal como LAR y PTP σ . Por tanto, imitar la dimerización con terapias intracelulares dirigidas puede inactivar directamente la familia de fosfatasa LAR sin alteración de la matriz extracelular u otros ligandos.

Se encontró que miméticos de péptidos de la porción intracelular de la familia de fosfatasa LAR, cuando se administran dentro de una célula neural, pueden inhibir y/o reducir la actividad de LAR inducida por la activación de CSPG. Se encontró que la inhibición intracelular de la actividad, señalización y/o función de la familia LAR en respuesta a la activación por CSPG promovía la excrecencia de células neurales, incluyendo la restauración de la motilidad del cono de crecimiento, la extensión de procesos, el brote y la promoción de la supervivencia y plasticidad de células neurales así como inhibía el marchitamiento de células neurales.

En una realización, el agente terapéutico que inhibe o reduce una o más de la actividad, señalización y/o función de la fosfatasa de la familia LAR, puede incluir un péptido terapéutico o molécula pequeña que se une a y/o se compleja con el dominio intracelular de al menos una fosfatasa de la familia LAR para inhibir la actividad, señalización y/o función de la fosfatasa de la familia LAR. Por consiguiente, pueden usarse péptidos terapéuticos o moléculas pequeñas que se unen a y/o se complejan con el dominio intracelular de al menos una fosfatasa de la familia LAR de células neurales para promover el crecimiento, la motilidad, la supervivencia y la plasticidad celulares de estas células.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser un mimético de péptido del dominio con forma de cuña (es decir, dominio de cuña) del dominio catalítico intracelular de las fosfatasa de la familia LAR. El análisis estructural y de secuencia ha revelado que todos los miembros de la familia LAR contienen un motivo de hélice-bucle-hélice con forma de cuña de 24 aminoácidos conservado en el primer dominio catalítico intracelular que puede mediar potencialmente en la interacción homo/heterofílica con el receptor. La tabla 1 enumera las secuencias de aminoácidos de porciones intracelulares de miembros de la fosfatasa de la familia LAR que contienen el dominio de cuña. El dominio de cuña de 24 aminoácidos de estas porciones intracelulares de fosfatasa de la familia LAR se identifica mediante subrayado. Aunque la estructura específica del dominio de cuña se conserva a través de la mayoría de los dominios de cuña de la familia LAR, los aminoácidos exactos que constituyen los dominios de cuña varían entre proteínas y subfamilias individuales.

Tabla 1

Alineación de dominios de cuña de LAR				
Ratón	1338	PIPITDLADNIERLKANDGKLFSEQEYESIDPGQ	1370	SEQ ID NO: 1
Rata	1338	PIPITDLADNIERLKANDGKLFSEQEYESIDPGQ	1370	SEQ ID NO: 2

Ser humano	1347	PIPITDLADNIERLKANDGKLSQEYESIDPGQ	1379	SEQ ID NO: 3
Alineación de dominios de cuña de PTP σ				
Ratón	1347	PIPTDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESIDPG Q	1379	SEQ ID NO: 4
Rata	1303	PIPTDMAEHMERLKANDSLKLSQEYESIDPG Q	1335	SEQ ID NO: 5
Human	1368	PIPIADMAEHTERLKANDSLKLSQEYESIDPG Q	1400	SEQ ID NO: 6
Alineación de dominios de cuña de PTP δ				
Ratón	1326	PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESIDPGQ	1379	SEQ ID NO: 7
Human	1335	PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESIDPGQ	1367	SEQ ID NO: 8

Se encontró que los dominios de cuña de miembros de la familia LAR específicos se acoplaban en interacción o unión homofílica con su miembro de la familia LAR específico. Por ejemplo, el dominio de cuña de LAR podía interaccionar específicamente con LAR de longitud completa, y no otros miembros de la familia tales como PTP σ , en ensayos de inmunoprecipitación. Además, ensayos de unión *in vitro* mostraron que los péptidos de dominio de cuña (dominio de cuña + TAT de VIH) de PTP μ y LAR se agregaban de manera homofílica específicamente en lugar de unirse de manera promiscua entre sí. De particular interés, el dominio de cuña de LAR no podía unirse a sigma, mostrando especificidad incluso entre miembros similares de la familia.

Los miméticos de péptidos de estos dominios de cuña de la familia de fosfatasa LAR, cuando se expresan en células (por ejemplo, células neurales) o se conjugan con un resto de transporte intracelular, pueden usarse por tanto para suprimir la señalización de la familia LAR en una célula neural activada con CSPG y promover el crecimiento, la motilidad y la supervivencia celulares. La unión de estos péptidos terapéuticos a su dominio de cuña intacto de PTP específico puede potencialmente: (i) interferir con la capacidad de esa PTP para interaccionar con proteínas diana, tales como dianas de fosfatasa; (ii) interferir con la actividad que promueve interacciones intermoleculares entre la PTP y otro dominio contenido en la PTP, tal como el segundo dominio fosfatasa catalíticamente inactivo D2; impedir el acceso de proteínas al sitio activo de la fosfatasa; (iii) dejar fuera de competición a agentes de interacción normales del dominio de cuña; y/o (iv) inhibir estéricamente la actividad fosfatasa.

En algunas realizaciones, el mimético de péptido (es decir, péptido terapéutico) puede incluir, consistir esencialmente y/o consistir en de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos y tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95% o aproximadamente el 100% homóloga a una porción de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos de los dominios de cuña de fosfatasas de la familia LAR.

En otras realizaciones, el péptido terapéutico puede incluir, consistir esencialmente y/o consistir en de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos y tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 95%, o aproximadamente el 100% homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos consecutivos del dominio de cuña de PTP σ . Se encontró que un péptido (por ejemplo, péptido terapéutico) correspondiente a o sustancialmente homólogo al dominio de cuña de PTP σ con un portador citosólico podía aliviar la inhibición mediada por CSPG, permitiendo que las neuronas avanzaran sobre sustratos de CSPG en lugar de la inhibición típica. Este efecto era dependiente de la dosis y supeditado a la respuesta de la célula que expresa PTP σ . Los astrocitos, que no expresan PTP σ al nivel de proteína, no responden a la inactivación peptídica, mientras que la glía satélite, que sí expresa PTP σ , sí responde al péptido. Adicionalmente, este péptido puede administrarse de manera sistémica para promover la plasticidad y recuperación funcional tras la lesión grave de la médula espinal.

Tal como se muestra en la tabla 2, la secuencia de dominio de cuña de PTP σ está altamente conservada entre mamíferos superiores, con sólo un cambio de un único aminoácido en ratón y ratas (de treonina a metionina en la posición 6) que impide el 100% de homología.

Tabla 2

Alineación de dominios de cuña																											
0										1										2							
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4				
D	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K		S	Q	E	Y	W	S		<i>Xenopus</i>	SEQ ID NO: 9		
E	H	T	E	H		E		L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	<i>Anolis carolinensis</i>	SEQ ID NO: 10		
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Pez cebra	SEQ ID NO: 11		
E	L	A	E	H	T	E	L	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Tilapia	SEQ ID NO: 12		
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Pollo	SEQ ID NO: 13		
E	L	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Pinzón	SEQ ID NO: 14		
E	L	A	E	H	T	D	H	L	K	A	N	D	N	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Ornitorrinco	SEQ ID NO: 15		
E	M	A	E	H	T	E	H	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Demonio de Tasmania	SEQ ID NO: 16		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Hurón	SEQ ID NO: 17		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Gálago	SEQ ID NO: 18		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Tití	SEQ ID NO: 19		
D	M	A	E	H	M	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	RATA	SEQ ID NO: 20		
D	M	A	E	H	M	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Ratón	SEQ ID NO: 21		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Perro	SEQ ID NO: 22		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Cerdo	SEQ ID NO: 23		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Vaca	SEQ ID NO: 24		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Oveja	SEQ ID NO: 25		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Orca	SEQ ID NO: 26		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Mono ardilla	SEQ ID NO: 27		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Babuino	SEQ ID NO: 28		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Gorila	SEQ ID NO: 29		

D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Gibón	SEQ ID NO: 30
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Macaco	SEQ ID NO: 31
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Chimpancé	SEQ ID NO: 32
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	W	S	I	Ser humano	SEQ ID NO: 33
D	L	A	E	N	I	E	R	L	K	A	N	D	G	L	K	F	S	Q	E	Y	W	S	I	LAR (familia Lar)	SEQ ID NO: 34
E	L	A	E	H	I	E	R	L	K	A	N	D	N	L	K	F	S	Q	E	Y	W	S	I	Delta (familia Lar)	SEQ ID NO: 35
K	L	E	E	E	I	N	R	R	M	A	D	D	N	K	I	F	R	E	E	F	N	A	L	ptp alfa	SEQ ID NO: 36

Tal como se muestra en la tabla 2, la primera hélice alfa del dominio de cuña de PTP σ incluye los aminoácidos 1-10, la región de giro incluye los aminoácidos 11-14 y la segunda hélice alfa incluye los aminoácidos 15-24. Por ejemplo, la primera hélice alfa del dominio de cuña de human PTP σ tiene la secuencia de aminoácidos de DMAEHTERLK (SEQ ID NO: 67), el giro tiene la secuencia de aminoácidos de ANDS (SEQ ID NO: 68) y la segunda hélice alfa tiene la secuencia de aminoácidos de LKLSQEYESI (SEQ ID NO: 69).

El dominio de cuña también comparte homología de secuencia con los otros miembros de la familia LAR, LAR y PTPdelta. Es probable que estos aminoácidos sean necesarios para la estructura global del dominio de cuña. Los aminoácidos conservados incluyen una alanina en la posición 13, que marca el final de la primera hélice alfa y el inicio del giro, lo que hace que sea probablemente necesaria para el tamaño y la estructura de cuña general.

Puesto que las estructuras secundaria y terciaria generales del dominio de cuña permanecen constantes a través de la mayoría de PTP receptoras, pueden realizarse varias sustituciones conservativas en un péptido terapéutico que selecciona como diana el dominio de cuña de PTP σ para obtener resultados similares. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo apolar (hidrófobo), tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro, tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro, y/o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

Estas sustituciones conservativas pueden producirse en los dominios no únicos en o bien la hélice alfa o bien el giro, específicamente las posiciones 1-3 y 7-10 en la primera hélice alfa; 12 y 13 en el giro; y 15, 16, 18-24 en la segunda hélice alfa. Estos aminoácidos pueden ser necesarios para la estructura global del dominio de cuña, pero no necesarios para la especificidad de la unión de la cuña a PTP σ .

Los aminoácidos únicos para PTP σ , particularmente los aminoácidos expresados de manera diferencial en PTP σ frente a LAR, se encontró que eran necesarios para la especificidad de la unión al dominio de cuña. Estos incluyen un dominio EH en la posición 4 y 5 de la primera hélice alfa seguido por una treonina o una metionina (sustitución en rata y ratón) en la posición 6. En el giro, hay una serina única en la posición 14 en todos los mamíferos superiores. Finalmente, hay una leucina única en la posición 17 en la segunda hélice alfa. Los posibles papeles de estos aminoácidos únicos se comentarán a continuación.

El residuo de serina en el giro en la posición 14 es de particular interés debido a su localización en el dominio de cuña. Este aminoácido, ubicado en el giro entre hélices alfa, está ligeramente extendido desde la estructura secundaria y terciaria general de PTP σ , haciéndolo disponible para interacciones de unión. Además, la serina, debido a su grupo hidroxilo y la polaridad que contiene, se sabe que facilita varios acontecimientos de unión homofílicos y heterofílicos, tales como unión de hidrógeno entre serinas adyacentes. También se sabe que las serinas experimentan diversas modificaciones, tales como fosforilación, haciendo que la probabilidad de su necesidad de especificidad sea alta. Es posible que péptidos más pequeños que se centran en el giro en el dominio de cuña e incluyen la serina conservada puedan ofrecer mayor estabilidad con similar función. Tales péptidos pueden sintetizarse como bucles, con cisteínas en cualquier extremo para crear enlaces disulfuro.

Los aminoácidos únicos en la primera hélice alfa incluyen ácido glutámico en la posición 4, histidina en la posición 5 y treonina o metionina en la posición 6. Aunque la histidina está implicada en el dominio de cuña consenso, no se encuentra en LAR, PTPdelta, PTPmu o CD45. Ya que los tres de estos aminoácidos o bien están cargados o bien son polares, es probable que o bien esta secuencia o bien uno de sus componentes sea necesario para la especificidad de la cuña de PTP σ .

Adicionalmente, la segunda hélice alfa contiene una leucina única en la posición 17. Las leucinas se han implicado como las moléculas adhesivas críticas para la estructura tridimensional de cremalleras de leucina. En estas moléculas, que son estructuralmente similares a dominios de cuña, las leucinas de hélices alfa opuestas, ubicadas a intervalos de aproximadamente 7, interaccionan con regiones hidrófobas de la hélice alfa opuesta. Puesto que hay también una leucina en la primera hélice alfa, ubicada en la posición 9, se cree que esta leucina única es necesaria para la integridad de la estructura tridimensional global de la cuña de PTP σ .

Por consiguiente, en otras realizaciones, el péptido terapéutico puede incluir, consistir esencialmente en o consistir en de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 aminoácidos e incluir la secuencia de aminoácidos EHX₁ERLKANDSLKL (SEQ ID NO: 37), en la que X₁ es T o M. Un péptido terapéutico que incluye SEQ ID NO: 37 puede incluir al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco sustituciones conservativas de modo que el péptido terapéutico tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 65%, al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 75%, al menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homóloga a SEQ ID NO: 37.

En algunas realizaciones, las sustituciones conservativas pueden ser los residuos de aminoácido 4E, 5R, 6L, 7K, 9N, 10D, 12L o 13K de SEQ ID NO: 37. A modo de ejemplo, el residuo de aminoácido 4E puede sustituirse por D o Q, el residuo de aminoácido 5R puede sustituirse por H, L o K, el residuo de aminoácido 6L puede sustituirse por I, V o M, el residuo de aminoácido 7K puede sustituirse por R o H, el residuo de aminoácido 9N puede sustituirse por E o D, el residuo de aminoácido 10 D puede sustituirse por E o N, el residuo de aminoácido 12L puede sustituirse por I, V o M, y/o el residuo de aminoácido 13K puede sustituirse por R o H.

Los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento pueden someterse a otros diversos cambios, sustituciones, inserciones y deleciones en donde tales cambios proporcionan determinadas ventajas en su uso. En este sentido, los péptidos terapéuticos que se unen a y/o complejan con un dominio de cuña de la fosfatasa de la familia LAR pueden corresponderse con o ser sustancialmente homólogos con, en vez de ser idénticos a, la secuencia de un polipéptido mencionado en donde se hacen uno o más cambios y conserva la capacidad para inhibir o reducir una o más de la actividad, señalización y/o función de la fosfatasa de la familia LAR.

El polipéptido terapéutico puede estar en cualquiera de una variedad de formas de derivados de polipéptido, que incluyen amidas, conjugados con proteínas, polipéptidos ciclados, polipéptidos polimerizados, análogos, fragmentos, polipéptidos químicamente modificados, y derivados similares.

Se apreciará que la sustitución conservativa puede incluir también el uso de un residuo derivatizado químicamente en lugar de un residuo no derivatizado siempre que tal péptido presente la actividad de unión requerida.

“Derivado químico” se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente mediante reacción de un grupo secundario funcional. Tales moléculas derivatizadas incluyen por ejemplo, las moléculas en las que grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados químicos los polipéptidos que contienen uno o más derivados de aminoácido que se producen de manera natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplos: puede sustituirse prolina por 4-hidroxiprolina; puede sustituirse 5-hidroxilisina por lisina; puede sustituirse 3-metilhistidina por histidina; puede sustituirse homoserina por serina; y puede sustituirse ornitina por lisina. Los polipéptidos descritos en el presente documento también incluyen cualquier polipéptido que tenga una o más adiciones y/o deleciones o residuos en relación con la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se muestra en el presente documento, siempre que se mantenga la actividad requerida.

En todavía otras realizaciones, el agente terapéutico puede ser un inhibidor mimético o competitivo de una proteína posterior que se activa por la fosfatasa de la familia LAR. Se ha mostrado que varias proteínas y rutas posteriores actúan posteriormente de la familia LAR fuera de la actividad fosfatasa. De estas, caskina (Ckn) y proteína α de interacción con LAR (liprina- α) tienen papeles en tanto la formación de sinapsis como la guía axónica.

mCkn1 se une directamente a mLAR y mPTPR δ , y mCkn2 se une directamente a mLAR y mPTP σ en un sistema de interacción de dos híbridos de levadura. Se mapeó la interacción de Ckn con fosfatasas de la familia LAR en una región que contenía dos motivos alfa estériles (dominios SAM) que explican el fenotipo. El primer dominio SAM está conservado entre miembros de la familia de Ckn.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser un mimético de péptido o inhibidor competitivo de Ckn que inhibe la unión de la fosfatasa de la familia LAR/Ckn y mitiga la señalización de la familia LAR posterior. El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 75%, al

menos aproximadamente el 80%, al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90% o al menos aproximadamente el 95% homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos de una porción de mCkn1 y mCkn2. Ejemplos de péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos de una porción de mCkn1 y mCkn2 son SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40.

En otras realizaciones, el agente terapéutico puede ser un mimético de péptido o inhibidor competitivo de liprina-a que inhibe la unión de fosfatasa de la familia LAR/liprina-a, y mitiga la señalización de la familia LAR posterior. Los miembros de la familia de liprina desempeñan papeles críticos en el desarrollo y mantenimiento de sinapsis. La liprina-a puede actuar en la transducción de señales posteriores a las fosfatasas LAR. El examen de la interacción de 2 híbridos de levadura implica el primer dominio SAM de miembros de la familia de liprina- α como región de unión para miembros de la familia de fosfatasas LAR. El péptido puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos de una porción de liprina- α . Un ejemplo de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga a de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 aminoácidos consecutivos de una porción de liprina- α es SEQ ID NO: 41.

Similares a los péptidos terapéuticos descritos anteriormente que se unen a o se complejan con el dominio de cuña, los polipéptidos terapéuticos que son miméticos o inhibidores competitivos con mCkn1, mCkn2 o liprina- α pueden someterse a diversos cambios, sustituciones, inserciones y deleciones en donde tales cambios proporcionan determinadas ventajas en su uso. Por ejemplo, el polipéptido terapéutico puede estar en cualquiera de una variedad de formas de derivados de polipéptido, que incluyen amidas, conjugados con proteínas, polipéptidos ciclados, polipéptidos polimerizados, análogos, fragmentos, polipéptidos modificados químicamente, y derivados similares.

Uno o más de los péptidos de los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento también pueden estar modificados por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional y/o mediante técnicas de modificación química, que se conocen en la técnica. Pueden producirse modificaciones en el péptido incluyendo la estructura principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácido y los extremos amino o carboxilo terminales. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en grados iguales o variables en varios sitios en un péptido dado. Las modificaciones comprenden por ejemplo, sin limitación, acetilación, acilación, adición de grupo acetomidometilo (Acm), ADP-ribosilación, amidación, unión covalente a flavina, unión covalente a un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación (para referencia, véase Protein-structure and molecular properties, 2ª ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993).

Los péptidos y/o proteínas descritos en el presente documento pueden incluir también, por ejemplo, mutantes biológicamente activos, variantes, fragmentos, quimeras y análogos; los fragmentos abarcan secuencias de aminoácidos que tienen truncamientos de uno o más aminoácidos, en los que el truncamiento puede originarse a partir del extremo amino-terminal (extremo N-terminal), extremo carboxilo terminal (extremo C-terminal), o a partir del interior de la proteína. Los análogos de la invención implican una inserción o una sustitución de uno o más aminoácidos. Variantes, mutantes, fragmentos, quimeras y análogos pueden funcionar como inhibidores de las fosfatasas de la familia LAR (sin restringirse a los presentes ejemplos).

Los polipéptidos terapéuticos descritos en el presente documento pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los péptidos y/o proteínas pueden prepararse usando ADN recombinante. Por ejemplo, una preparación puede incluir cultivar una célula huésped (bacteriana o eucariota) en condiciones que proporcionan la expresión de péptidos y/o proteínas dentro de la célula.

La purificación de los polipéptidos puede realizarse mediante métodos de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, hidrofobicidad u otra técnica de purificación normalmente usada para la purificación de proteínas. La etapa de purificación puede realizarse en condiciones no desnaturalizantes. Por otro lado, si se requiere una etapa desnaturalizante, la proteína puede renaturalizarse usando técnicas conocidas en la técnica.

En algunas realizaciones, los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento pueden incluir residuos adicionales que pueden añadirse en cualquier extremo terminal de un polipéptido para el fin de proporcionar un "ligador" mediante el cual los polipéptidos pueden unirse y/o fijarse convenientemente a otros polipéptidos, proteínas, restos detectables, marcadores, matrices sólidas o portadores.

Los ligadores de residuos de aminoácido tienen habitualmente al menos un residuo y pueden tener 40 o más residuos, más a menudo de 1 a 10 residuos. Residuos de aminoácido típicos usados para la unión son glicina, tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico y aspártico, o similares. Además, un polipéptido sujeto puede diferir al

modificarse la secuencia mediante acilación terminal-NH₂, por ejemplo, acetilación, o amidación con ácido tioglicólico, mediante carboxilamidación terminal, por ejemplo, con amoníaco, metilamina, y modificaciones terminales similares. Las modificaciones terminales son útiles, tal como se conoce bien, para reducir la susceptibilidad mediante digestión con proteinasas, y por tanto sirven para prolongar la semivida de los polipéptidos en disoluciones, particularmente líquidos biológicos en donde pueden estar presentes proteasas. En este sentido, la ciclación de polipéptidos es también una modificación terminal útil, y se prefiere particularmente también debido a las estructuras estables formadas por ciclación y en vista de las actividades biológicas observadas para tales péptidos cíclicos tal como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el ligador puede ser un ligador peptídico flexible que une el péptido terapéutico con otros polipéptidos, proteínas y/o moléculas, tales como restos detectables, marcadores, matrices sólidas o portadores. Un ligador peptídico flexible puede tener aproximadamente 20 o menos aminoácidos de longitud. Por ejemplo, un ligador peptídico puede contener aproximadamente 12 o menos residuos de aminoácido, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En algunos casos, un ligador peptídico comprende dos o más de los siguientes aminoácidos: glicina, serina, alanina y treonina.

En algunas realizaciones, un agente terapéutico que comprende los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento puede proporcionarse en forma de una proteína conjugada o constructo de suministro de fármaco que incluye al menos un(os) subdominio(s) o resto(s) de transporte (es decir, restos de transporte) que está unido al péptido terapéutico. Los restos de transporte pueden facilitar la captación de los polipéptidos terapéuticos en un tejido o célula de mamífero (es decir, ser humano o animal) (por ejemplo, célula neural). Los restos de transporte pueden unirse covalentemente a los polipéptidos terapéuticos. La unión covalente puede incluir un enlace peptídico o un enlace lábil (por ejemplo, un enlace fácilmente escindible o sujeto a cambio químico en el entorno de la célula diana interior). Adicionalmente, los restos de transporte pueden reticularse (por ejemplo, reticularse químicamente, reticularse por UV) con el polipéptido terapéutico. Los restos de transporte también pueden unirse al polipéptido terapéutico con unión al polipéptido descrito en el presente documento.

Los restos de transporte pueden repetirse más de una vez en el agente terapéutico. La repetición de un resto de transporte puede afectar (por ejemplo, aumentar) la captación de los péptidos y/o las proteínas por una célula deseada. El resto de transporte también puede estar ubicado o bien en la región amino-terminal del péptido terapéutico o bien en su región carboxi-terminal o en ambas regiones.

En una realización, el resto de transporte puede incluir al menos una secuencia de péptido de transporte que permite que el polipéptido terapéutico una vez unido al resto de transporte penetre en la célula mediante un mecanismo independiente de receptor. En un ejemplo, el péptido de transporte es un péptido sintético que contiene una secuencia de suministro de proteína mediada por Tat y al menos una de SEQ ID NO: 9-33 y 37-41. Estos péptidos pueden tener, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-66 y 70-74.

Otros ejemplos de restos de transporte, subdominios y similares conocidos se describen en, por ejemplo, el documento de patente canadiense n.º 2.301.157 (Conjugados que contienen homeodominio de *Antennapedia*) así como en las patentes estadounidenses n.ºs 5.652.122, 5.670.617, 5.674.980, 5.747.641 y 5.804.604 (conjugados que contienen aminoácidos de proteína de VIH Tat; proteína de unión a ADN de virus del herpes simple-1 VP22, una etiqueta de histidina con una longitud que oscila entre 4 y 30 repeticiones de histidina, o un derivado de variación u homólogo del mismo que puede facilitar la captación del resto de carga activa mediante un proceso independiente de receptor).

Se ha mostrado también que una región de 16 aminoácidos de la tercera hélice alfa del homeodominio de *Antennapedia* permite que las proteínas (preparadas como proteínas de fusión) crucen membranas celulares (publicación internacional PCT número WO 99/11809 y solicitud canadiense n.º: 2.301.157. De manera similar, se mostró que la proteína Tat de VIH podría cruzar membranas celulares.

Además, el/los resto(s) de transporte puede(n) incluir polipéptidos que tienen una región rica en aminoácidos básicos covalentemente unidos a un resto de agente activo (por ejemplo, péptido inhibidor de fragmentos que contienen dominio intracelular). Tal como se usa en el presente documento, el término "región rica en aminoácidos básicos" se refiere a una región de una proteína con un alto contenido de los aminoácidos básicos tales como arginina, histidina, asparagina, glutamina, lisina. Una "región rica en aminoácidos básicos" puede tener, por ejemplo el 15% o más de aminoácidos básicos. En algunos casos, una "región rica en aminoácidos básicos" puede tener menos del 15% de aminoácidos básicos y todavía funcionar como una región de agente de transporte. En otros casos, una región de aminoácidos básicos tendrá el 30% o más de aminoácidos básicos.

El/los resto(s) de transporte puede(n) incluir además una región rica en prolina. Tal como se usa en el presente documento, el término región rica en prolina se refiere a una región de un polipéptido con el 5% o más (hasta el 100%) de prolina en su secuencia. En algunos casos, una región rica en prolina puede tener entre el 5% y el 15% de prolina. Adicionalmente, una región rica en prolina se refiere a una región de un polipéptido que contiene más prolina de lo que se observa generalmente en proteínas que se producen de manera natural (por ejemplo, proteínas codificadas por el genoma humano). Las regiones ricas en prolina de esta solicitud pueden funcionar como

región de agente de transporte.

En una realización, el péptido terapéutico descrito en el presente documento puede estar unido no covalentemente a un agente de transducción. Un ejemplo de un agente de transducción de polipéptidos unido no covalentemente es el sistema de suministro de proteínas Chariot (véase la patente estadounidense n.º 6.841.535; J Biol Chem 274(35):24941-24946; y Nature Biotech. 19:1173-1176).

En otras realizaciones, los péptidos terapéuticos pueden expresarse en células que están tratándose usando terapia génica para inhibir la señalización de la familia LAR. La terapia génica puede usar un vector que incluye un nucleótido que codifica para los péptidos terapéuticos. Un "vector" (denominado algunas veces "vehículo" de suministro génico o de transferencia génica) se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprende un polinucleótido que va a suministrarse a la célula. El polinucleótido que va a suministrarse puede comprender una secuencia codificante de interés en terapia génica. Los vectores incluyen, por ejemplo, vectores virales (tales como adenovirus (Ad), virus adenoasociados (VAA) y retrovirus), liposomas y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares que pueden mediar en el suministro de un polinucleótido a una célula diana.

Los vectores pueden comprender también otros componentes o funcionalidades que modulan adicionalmente el suministro génico y/o expresión génica, o que por lo demás proporcionan propiedades beneficiosas a las células seleccionadas como diana. Tales otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión o direccionamiento a las células (incluyendo componentes que median en la unión específica de tejido o tipo de célula); componentes que influyen en la captación del ácido nucleico de vector por la célula; componentes que influyen en la localización del polinucleótido dentro de la célula tras la captación (tal como agentes que median en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido. Tales componentes también podrían incluir marcadores, tales como marcadores detectables y/o seleccionables que pueden usarse para detectar o seleccionar células que han captado y están expresando el ácido nucleico suministrado por el vector. Tales componentes pueden proporcionarse como una característica natural del vector (tal como el uso de determinados vectores virales que tienen componentes o funcionalidades que median en la unión y captación), o pueden modificarse vectores para proporcionar tales funcionalidades.

Los marcadores seleccionables pueden ser positivos, negativos o bifuncionales. Los marcadores seleccionables positivos permiten la selección de células que portan el marcador, mientras que los marcadores seleccionables negativos permiten que las células que llevan el marcador se eliminen selectivamente. Se ha descrito una variedad de tales genes de marcadores, incluyendo marcadores bifuncionales (es decir, positivos/negativos) (véase, por ejemplo, Lupton, S., documento WO 92/08796, publicado el 29 de mayo de 1992; y Lupton, S., documento WO 94/28143, publicado el 8 de diciembre de 1994). Tales genes marcadores pueden proporcionar una medida añadida del control que puede ser ventajoso en contextos de terapia génica. Se conocen en la técnica una gran variedad de tales vectores y están disponibles generalmente.

Los vectores para su uso en el presente documento incluyen vectores virales, vectores a base de lípidos y otros vectores no virales que pueden suministrar un nucleótido que codifica para los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento a las células diana. El vector puede ser un vector dirigido, especialmente un vector dirigido que se une preferentemente a neuronas y. Los vectores virales para su uso en la solicitud pueden incluir los que presentan baja toxicidad para una célula diana e inducen la producción de cantidades terapéuticamente útiles del péptido terapéutico de una manera específica de célula.

Los ejemplos de vectores virales son los derivados de adenovirus (Ad) o virus adenoasociados (VAA). Pueden usarse vectores virales tanto humanos como no humanos y el vector viral recombinante puede ser de replicación defectuosa en seres humanos. Cuando el vector es un adenovirus, el vector puede comprender un polinucleótido que tiene un promotor operativamente unido a un gen que codifica para los péptidos terapéuticos y es de replicación defectuosa en seres humanos.

Otros vectores virales que pueden usarse en el presente documento incluyen vectores basados en virus del herpes simple (VHS). Los vectores de VHS con uno o más genes tempranos inmediatos (IE) delecionados son ventajosos porque son generalmente no citotóxicos, persisten en un estado similar a la latencia en la célula diana y permiten una transducción de células diana eficaz. Los vectores de VHS recombinantes pueden incorporar aproximadamente 30 kb de ácido nucleico heterólogo.

Retrovirus, tales como lentivirus y retrovirus de tipo C, también podrían usarse en la solicitud. Por ejemplo, los vectores retrovirales pueden basarse en virus de leucemia murina (VLM). Véase, por ejemplo, Hu y Pathak, Pharmacol. Rev. 52:493-511, 2000 y Fong *et al.*, Crit. Rev. Ther. Drug Portador Syst. 17:1-60, 2000. Los vectores basados en VLM pueden contener hasta 8 kb de ADN heterólogo (terapéutico) en lugar de los genes virales. El ADN heterólogo puede incluir un promotor específico de tejido y un ácido nucleico que codifica para el péptido terapéutico. En métodos de suministro a células neurales, también puede codificar para un ligando para un receptor específico de tejido.

Vectores retrovirales adicionales que podrían usarse son vectores basados en lentivirus de replicación defectuosa, incluyendo vectores basados en inmunodeficiencia humana (VIH). Véanse, por ejemplo, Vigna y Naldini, J. Gene Med. 5:308-316, 2000 y Miyoshi *et al.*, J. Virol. 72:8150-8157, 1998. Los vectores lentivirales son ventajosos porque pueden infectar tanto células que se dividen activamente como células que no se dividen.

Los vectores lentivirales para su uso en la solicitud pueden derivarse de lentivirus humanos y no humanos (incluyendo VIS). Los ejemplos de vectores lentivirales incluyen secuencias de ácido nucleico requeridas para la propagación del vector así como un promotor específico de tejido operativamente unido a un ácido nucleico que codifica para péptido terapéutico. Estas primeras pueden incluir las LTR virales, un primer sitio de unión, un tramo de polipurina, sitios att y un sitio de encapsidación.

En algunos aspectos, puede emplearse un vector lentiviral. Se ha demostrado que los lentivirus pueden transducir diferentes tipos de neuronas del SNC (Azzouz *et al.*, (2002) J Neurosci. 22: 10302-12) y pueden usarse en algunas realizaciones debido a su gran capacidad de clonación.

Un vector lentiviral puede empaquetarse en cualquier cápside lentiviral. La sustitución de una proteína de partícula por otra de un virus diferente se denomina "pseudotipado". La cápside del vector puede contener proteínas de la envuelta viral de otros virus, incluyendo virus de leucemia murina (VLN) o virus de estomatitis vesicular (VSV). El uso de proteína G de VSV produce un alto título de vector y da como resultado una mayor estabilidad de las partículas de virus de vector.

Vectores basados en alfavirus, tales como los producidos a partir de virus del bosque de Semliki (VBS) y virus Sindbis (SIN) también podrían usarse en la solicitud. El uso de alfavirus se describe en Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 y Perri *et al.*, Journal of Virology 74:9802-9807, 2000.

Vectores de alfavirus de replicación defectuosa, recombinantes son ventajosos porque pueden producir expresión génica heteróloga (terapéutica) de alto nivel, y pueden infectar una amplia gama de células diana. Pueden dirigirse replicones de alfavirus a tipos de células específicas presentando en su superficie de virión un ligando heterólogo funcional o dominio de unión que permitiría una unión selectiva a células diana que expresan una pareja de unión relacionada. Los replicones de alfavirus pueden establecer latencia, y por tanto expresión de ácido nucleico heterólogo a largo plazo en una célula diana. Los replicones pueden presentar también expresión de ácido nucleico heterólogo transitoria en la célula diana.

En muchos de los vectores virales compatibles con métodos de la solicitud, pueden incluirse más de un promotor en el vector para permitir que el vector se exprese más de un gen heterólogo. Además, el vector puede comprender una secuencia, que codifica para un péptido señal u otro resto, que facilita la expresión del péptido terapéutico a partir de la célula diana.

Para combinar las propiedades ventajosas de sistemas de dos vectores virales, pueden usarse vectores virales híbridos para suministrar un ácido nucleico que codifica para un péptido terapéutico a una neurona, célula o tejido diana. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas convencionales para la construcción de vectores híbridos. Tales técnicas pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, en Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y. o cualquiera de varios manuales de laboratorio que comentan la tecnología de ADN recombinante. Pueden usarse genomas de VAA bicatenarios en cápsides adenovirales que contienen una combinación de IRT adenovirales y de VAA para transducir células. En otra variación, un vector de VAA puede colocarse en un vector adenoviral "cobarde", "dependiente de auxiliar" o "de alta capacidad". Se comentan vectores híbridos de adenovirus/VAA en Lieber *et al.*, J. Virol. 73:9314-9324, 1999. Se comentan vectores híbridos de retrovirus/adenovirus en Zheng *et al.*, Nature Biotechnol. 18:176-186, 2000. Los genomas retrovirales contenidos dentro de un adenovirus pueden integrarse dentro del genoma de la célula diana y efectuar expresión génica estable.

Se contemplan además otros elementos de secuencia de nucleótidos, que facilitan la expresión del péptido terapéutico y la clonación del vector. Por ejemplo, la presencia de potenciadores en el sentido de 5' del promotor o terminadores en el sentido de 3' de la región codificante, por ejemplo, pueden facilitar la expresión.

Según otra realización, un promotor específico de tejido puede fusionarse con nucleótidos que codifican para los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento. Al fusionar tal promotor específico de tejido dentro del constructo adenoviral, la expresión transgénica se limita a un tejido particular. La eficacia de la expresión génica y el grado de especificidad proporcionado por promotores específicos de tejido puede determinarse usando el sistema adenoviral recombinante de la presente solicitud. Se conocen bien en la técnica promotores específicos de neuronas, tales como los promotores y vectores de cadena β de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF- β).

Además de métodos basados en vectores virales, también pueden usarse métodos no virales para introducir un ácido nucleico que codifica para un péptido terapéutico en una célula diana. Se proporciona una revisión de métodos no virales de suministro de genes en Nishikawa y Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001. Un ejemplo de un

método de suministro de genes no viral según la solicitud emplea ADN de plásmido para introducir un ácido nucleico que codifica para un péptido terapéutico en una célula. Se conocen generalmente en la técnica métodos de suministro de genes basados en plásmidos.

5 Pueden diseñarse moléculas de transferencia de genes sintéticas para formar agregados multimoleculares con ADN de plásmido. Estos agregados pueden diseñarse para unirse a una célula diana. Pueden usarse anfífilos catiónicos, incluyendo lipopoliaminas y lípidos catiónicos, para proporcionar transferencia de ácido nucleico independiente de receptor a células diana.

10 Además, pueden mezclarse lípidos catiónicos o liposomas catiónicos preformados con ADN de plásmido para generar complejos de transfección de células. Se revisan métodos que implican formulaciones de lípidos catiónicos en Felgner *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 772:126-139, 1995 y Lasic y Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996. Para el suministro de genes, también puede acoplarse ADN a un péptido catiónico anfipático (Fominaya *et al.*, J. Gene Med. 2:455-464, 2000).

15 Pueden usarse métodos que implican componentes tanto basados en virus como no basados en virus según la solicitud. Por ejemplo, se describe un plásmido basado en virus de Epstein Barr (VEB) para el suministro de genes terapéuticos en Cui *et al.*, Gene Therapy 8:1508-1513, 2001. Adicionalmente, se describe un método que implica un adjunto policatiónico/ligando/ADN acoplado a un adenovirus en Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994.

20 Adicionalmente, el ácido nucleico que codifica para los péptidos terapéuticos puede introducirse en la célula diana transfectando las células diana usando técnicas de electroporación. Las técnicas de electroporación se conocen bien y pueden usarse para facilitar la transfección de células usando ADN de plásmido.

25 Pueden suministrarse *in vivo* vectores que codifican para la expresión de los péptidos terapéuticos a la célula diana en forma de una preparación inyectable que contiene un portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, según sea necesario. Otros portadores farmacéuticos, formulaciones y dosificaciones pueden usarse también según la presente solicitud.

30 Cuando la célula diana incluye una neurona que está tratándose, tal como neuronas quiescentes o durmientes, el vector puede suministrarse mediante inyección directa en una cantidad suficiente para que el péptido terapéutico se exprese en un grado que permita una terapia altamente eficaz. Al inyectar el vector directamente en o alrededor de la periferia de la neurona, es posible dirigir la transfección del vector de manera bastante eficaz, y minimizar la pérdida de los vectores recombinantes. Este tipo de inyección permita la transfección local de un número deseado de células, especialmente en un sitio de lesión en el SNC, maximizando de ese modo la eficacia terapéutica de la transferencia de genes, y minimizando la posibilidad de una respuesta inflamatoria a las proteínas virales. Pueden usarse otros métodos de administración del vector a las células diana y dependerán del vector específico empleado.

40 El péptido terapéutico puede expresarse durante cualquier periodo de tiempo adecuado dentro de la célula diana, incluyendo expresión transitoria y expresión estable, a largo plazo. En un aspecto de la solicitud, el ácido nucleico que codifica para el péptido terapéutico se expresará en cantidades terapéuticas durante un periodo de tiempo definido eficaz para inducir la actividad y el crecimiento de las células transfectadas. En otro aspecto de la solicitud, el ácido nucleico que codifica para el péptido terapéutico se expresará en cantidades terapéuticas durante un periodo de tiempo definido eficaz para restaurar la función perdida en una neurona seleccionada como diana tras una lesión en el SNC.

45 Una cantidad terapéutica es una cantidad que puede producir un resultado médicamente deseable en un animal o ser humano tratado. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, la dosificación para cualquier animal o ser humano depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, la composición particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que están administrándose simultáneamente. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente dosificaciones específicas de proteínas y ácidos nucleicos usando los métodos experimentales descritos más adelante.

50 Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden además estar modificados (por ejemplo, modificados químicamente). Tal modificación puede diseñarse para facilitar la manipulación o purificación de la molécula, para aumentar la solubilidad de la molécula, para facilitar la administración, dirigir a la ubicación deseada, aumentar o disminuir la semivida. Varias modificaciones se conocen en la técnica y puede aplicarlas el profesional experto.

60 En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos y las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden suministrarse a neuronas del SNC y/o el SNP. Tales neuronas pueden estar lesionadas o enfermas. Tales neuronas pueden ser alternativamente neuronas sanas, no lesionadas. Tales neuronas pueden estar ubicadas en el sitio de lesión, o en un sitio incidente a la lesión. Las neuronas que van a seleccionarse como diana para la administración terapéutica, suministro/contacto de los agentes y composiciones descritas en el presente documento serán neuronas a partir de las cuales se cree que la

excrecencia neuronal es beneficiosa para el sujeto. Tal determinación está dentro de la capacidad del profesional experto a través de no más que experimentación de rutina.

Los agentes terapéuticos y las composiciones farmacéuticas terapéuticas descritos en el presente documento pueden también administrarse a células no neuronales del SNC y/o el SNP, tales como a células no neuronales que proporcionan soporte a células neurales. Tales células incluyen, sin limitación, células gliales (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos, ependimocitos, glía radial en el SNC; y células Schwann, células gliales satélite, células gliales entéricas en el SNP).

En los métodos de tratamiento dados a conocer en el presente documento, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico al sujeto. En una realización, se administra una formulación que incluye el agente terapéutico al sujeto en el periodo desde el momento de, por ejemplo, una lesión al sistema nervioso hasta aproximadamente 100 horas después de que se haya producido la lesión, por ejemplo en el plazo de 24, 12 ó 6 horas desde el momento de la lesión.

En una realización, la administración es específica para una o más ubicaciones específicas dentro del sistema nervioso del sujeto. El modo de administración preferido puede variar según el agente particular escogido y la diana particular.

Cuando los agentes terapéuticos se administran a un sujeto, pueden administrarse mediante cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos), por vía sistémica, o mediante administración parenteral. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa, intraarticular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. El agente también puede administrarse por vía oral, por vía transdérmica, por vía tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales) o por vía rectal. La administración puede ser local o sistémica tal como se indica.

Se contemplan tanto administración local como sistémica en el presente documento. Las características deseables de administración local incluyen lograr concentraciones locales eficaces del agente terapéutico así como evitar efectos secundarios adversos a partir de la administración sistémica del agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico puede administrarse mediante introducción en el líquido cefalorraquídeo del sujeto. En determinados aspectos, el agente terapéutico puede introducirse en un ventrículo cerebral, la zona lumbar, o la cisterna magna. En otro aspecto, el agente terapéutico puede introducirse localmente, tal como en el sitio de lesión de los nervios o la médula espinal, en un sitio de dolor o degeneración neural, o por vía intraocular en contacto con células neurorretinales.

Las formulaciones farmacéuticamente aceptables pueden suspenderse en vehículos acuosos e introducirse a través de jeringas hipodérmicas convencionales o usando bombas de infusión.

En otra realización, el agente terapéutico puede administrarse a un sujeto por vía intratecal. Tal como se usa en el presente documento, el término "administración intratecal" se pretende que incluya administrar un agente terapéutico directamente en el líquido cefalorraquídeo de un sujeto, mediante técnicas que incluyen inyección cerebroventricular lateral a través de una trepanación o punción cisternal o lumbar o similares (descritas en Lazorthes *et al.*, 1991, y Ommaya, 1984). El término "región lumbar" se pretende que incluya el área entre la tercera y cuarta vértebra lumbar (espalda inferior). El término "cisterna magna" se pretende que incluya el área donde termina el cráneo y empieza la médula espinal en la parte posterior de la cabeza. El "ventrículo cerebral" *diez-n* se pretende que incluya las cavidades en el cerebro que son continuas con el canal central de la médula espinal. Puede lograrse administración de agente terapéutico a cualquiera de los sitios mencionados anteriormente mediante inyección directa del agente terapéutico o mediante el uso de bombas de infusión. Pueden usarse bombas implantables o bombas externas y catéter.

Para inyección, el agente terapéutico puede formularse en disoluciones líquidas, normalmente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, el agente terapéutico puede formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. También se incluyen las formas liofilizadas. La inyección puede ser, por ejemplo, en forma de una inyección en bolo o infusión continua (tal como usando bombas de infusión) del agente terapéutico.

En una realización, el agente terapéutico puede administrarse mediante inyección cerebroventricular lateral en el cerebro de un sujeto, habitualmente en el plazo de 100 horas de cuando se produce una lesión (dando como resultado un estado caracterizado por excrecencia axónica aberrante de neuronas del sistema nervioso central) (tal como en el plazo de 6, 12, 24 ó 100 horas, inclusive, desde el momento de la lesión). La inyección puede realizarse, por ejemplo, a través de una trepanación hecha en el cráneo del sujeto. En otra realización, el agente terapéutico puede administrarse a través de una derivación insertada quirúrgicamente en el ventrículo cerebral de un sujeto, habitualmente en el plazo de 100 horas de cuando se produce una lesión (por ejemplo, en el plazo de 6, 12 ó 24 horas, inclusive, desde el momento de la lesión). Por ejemplo, la inyección puede realizarse en los ventrículos laterales, que son mayores, aunque también puede realizarse inyección en los ventrículos más pequeños tercero y

cuarto. En aún otra realización, el agente terapéutico puede administrarse mediante inyección en la cisterna magna, o zona lumbar de un sujeto, en el plazo de 100 horas de cuando se produce una lesión (tal como en el plazo de 6, 12 ó 24 horas, inclusive, desde el momento de la lesión).

- 5 Un medio adicional de administración al tejido intracraneal implica la aplicación al epitelio olfativo, con posterior transmisión al bulbo olfativo y transporte a porciones más próximas del cerebro. Tal administración puede ser preparaciones nebulizadas o pulverizadas.

- 10 En otra realización, el agente terapéutico puede administrarse a un sujeto en el sitio de lesión, habitualmente en el plazo de 100 horas de cuando se produce una lesión (por ejemplo, en el plazo de 6, 12 ó 24 horas, inclusive, del momento de la lesión).

- 15 En una realización adicional, se usan composiciones oftálmicas de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento para prevenir o reducir el daño a los tejidos de retinales y de la papila óptica, así como para potenciar la recuperación funcional tras daño a los tejidos oculares. Los estados oftálmicos que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, retinopatías (incluyendo retinopatía diabética y fibroplasia retrolental), degeneración macular, isquemia ocular, glaucoma. Otros estados que van a tratarse con los métodos de la invención incluyen daño asociado con lesiones a tejidos oftálmicos, tales como lesiones por isquemia-reperfusión, lesiones fotoquímicas, y lesiones asociadas con cirugía ocular, particularmente lesiones a la retina o papila óptica por exposición a la luz o instrumentos quirúrgicos. Las composiciones oftálmicas también pueden usarse como un adjunto a la cirugía oftálmica, tal como mediante inyección vítrea o subconjuntiva tras cirugía oftálmica. Los agentes terapéuticos pueden usarse para el tratamiento agudo de estados temporales, o pueden administrarse de manera crónica, especialmente en el caso de enfermedad degenerativa. Las composiciones oftálmicas también pueden usarse de manera profiláctica, especialmente antes de cirugía ocular o procedimientos oftálmicos no invasivos u otros tipos de cirugía.

- 25 En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede administrarse a un sujeto durante un periodo de tiempo prolongado para producir excrecencia axónica óptima o brote y/o inhibir el marchitamiento. El contacto mantenido con el compuesto activo puede lograrse, por ejemplo, mediante administración repetida del/de los compuesto(s) activo(s) durante un periodo de tiempo, tal como una semana, varias semanas, un mes o más. La formulación farmacéuticamente aceptable usada para administrar el/los agente(s) terapéutico(s) también puede formularse para proporcionar administración mantenida del compuesto activo a un sujeto. Por ejemplo, la formulación puede administrar el compuesto activo durante al menos una, dos, tres o cuatro semanas, inclusive, tras la administración inicial al sujeto. Por ejemplo, un sujeto que va a tratarse según la presente invención, se trata con el compuesto activo durante al menos 30 días (o bien mediante administración repetida o bien mediante el uso de un sistema de administración mantenida, o ambos).

- 40 La administración mantenida del agente terapéutico puede demostrarse mediante, por ejemplo, el efecto terapéutico continuado del agente terapéutico a lo largo del tiempo (tal como la administración mantenida de los agentes puede demostrarse mediante crecimiento axónico continuado en neuronas del SNC en un sujeto). Alternativamente, la administración mantenida del agente terapéutico puede demostrarse detectando la presencia de los agentes terapéuticos *in vivo* a lo largo del tiempo.

- 45 Los enfoques para la administración mantenida incluyen el uso de una cápsula polimérica, una minibomba para administrar la formulación, un implante biodegradable, o células autólogas transgénicas implantadas (véase la patente estadounidense n.º 6.214.622). Los sistemas de bomba de infusión implantables (por ejemplo, bombas INFUSAID (Towanda, PA)); véase Zierski *et al.*, 1988; Kanoff, 1994) y bombas osmóticas (comercializadas por Alza Corporation) están disponibles comercialmente y se conocen por lo demás en la técnica. Otro modo de administración es por medio de una bomba de infusión externamente programable e implantable. Los sistemas de bomba de infusión y sistemas de depósito también se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.368.562 y n.º 4.731.058.

- 55 Los vectores que codifican para los péptidos terapéuticos pueden a menudo administrarse con menor frecuencia que los otros tipos de agentes terapéuticos. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un vector de este tipo puede oscilar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 5 ó 10 mg/kg, inclusive; administrarse a diario, cada semana, cada dos semanas, cada mes o con menor frecuencia.

- 60 La capacidad de administrar o expresar los péptidos terapéuticos permite la modulación de la actividad celular en varios tipos celulares diferentes. Los péptidos terapéuticos pueden expresarse, por ejemplo, en una célula de corazón por medio de promotores específicos del corazón para modular las contracciones (o excitabilidad) del corazón, en la médula espinal por medio del promotor HB9 para modular la actividad neuronal motora tras lesión de la médula espinal, y en células neurales o áreas del cerebro afectadas por enfermedades degenerativas, tales como enfermedad de Parkinson, para controlar la excitabilidad en el área del cerebro de las células nerviosas de elección.

- 65 En algunas realizaciones, las neuronas derivadas del sistema nervioso central o periférico pueden ponerse en contacto con los agentes terapéuticos *ex vivo* para promover la excrecencia axónica *in vitro*. Por consiguiente, pueden aislarse neuronas de un sujeto y hacerse crecer *in vitro*, usando técnicas bien conocidas en la técnica, y

después tratarse para modular la excreciencia axónica. Brevemente, puede obtenerse un cultivo neuronal permitiendo que las neuronas migren fuera de los fragmentos del tejido neural adherente a un sustrato adecuado (tal como una placa de cultivo) o desagregando del tejido, tal como mecánica o enzimáticamente, para producir una suspensión de neuronas. Por ejemplo, pueden usarse las enzimas tripsina, collagenasa, elastasa, hialuronidasa, ADNasa, pronasa, dispasa, o diversas combinaciones de las mismas. Se describen métodos para aislar tejido neuronal y la desagregación de tejido para obtener células aisladas en Freshney, CULTURE OF ANIMAL CELLS, A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE, (3ª ed., 1994). Tales células pueden ponerse en contacto posteriormente con los agentes terapéuticos en cantidades y durante una duración de tiempo tal como se describió anteriormente. Una vez se ha logrado modulación de la excreciencia axónica en las neuronas, estas células pueden volver a administrarse al sujeto, tal como mediante implantación.

La capacidad de un agente para promover la regeneración neural en un sujeto puede evaluarse usando cualquiera de una variedad de procedimientos y ensayos conocidos. Por ejemplo, la capacidad de un agente para restablecer la conectividad y/o función neural tras una lesión, puede determinarse histológicamente (o bien cortando el tejido neuronal y observando las ramificaciones neuronales, o mostrando transporte citoplásmico de colorantes). También pueden valorarse los agentes monitorizando la capacidad del agente para restaurar completa o parcialmente el electroretinograma tras daño a la retina neural o nervio óptico; o para restaurar completa o parcialmente una respuesta pupilar a la luz en el ojo dañado.

Otras pruebas que puede usarse incluyen pruebas convencionales de función neurológica en sujetos humanos o en modelos animales de lesión espinal (tal como pruebas de reflejos convencionales, pruebas urológicas, pruebas urodinámicas, pruebas para apreciación del dolor profundo y superficial, ubicación propiosensible de las extremidades posteriores, ambulación y pruebas de potencial evocado). Además, la conducción de impulsos nerviosos puede medirse en un sujeto, tal como midiendo potenciales de acción de conducción, como indicación de la producción de un efecto neurosaludable.

Los modelos animales que pueden usarse en el presente documento incluyen el modelo de rata de transacción parcial, que somete a prueba qué tan bien puede un compuesto potenciar la supervivencia y el brote del fragmento restante intacto de una médula espinal totalmente transectada. Por consiguiente, tras la administración de un agente candidato, estos animales pueden evaluarse para determinar la recuperación de una determinada función, tal como qué tan bien pueden las ratas manipular gránulos de alimentos con los antebrazos (a los que se les había cortado la médula espinal relevante al 97%).

Otro modelo animal que puede usarse en los ensayos incluye el modelo de rata de accidente cerebrovascular. La administración a estos animales de los agentes puede usarse para valorar si un compuesto, vía de administración o dosificación dados, proporciona un efecto neuroregenerativo, tal como aumentar el nivel de función, o aumentar la tasa de retención de la función o el grado de retención de función en los animales de prueba.

También pueden usarse evaluaciones neurológicas convencionales usadas para valorar el progreso en pacientes humanos tras un accidente cerebrovascular para evaluar la capacidad de un agente para producir un efecto neurosaludable en un sujeto. Tales evaluaciones neurológicas convencionales son rutinarias en las técnicas médicas, y se describen en, por ejemplo, "Guide to Clinical Neurobiology" editado por Mohr y Gautier (Churchill Livingstone Inc. 1995).

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden usarse para tratar enfermedades, trastornos o estados asociados con elementos del sistema nervioso, incluyendo los componentes centrales, somáticos, autonómicos, simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso, tejidos neurosensoriales dentro del ojo, la oreja, la nariz, la boca u otros órganos, así como tejidos gliales asociados con células neuronales y estructuras. Los trastornos neurológicos pueden provocarse por una lesión a una neurona, tal como una lesión mecánica o una lesión debido a un compuesto tóxico, por el crecimiento o desarrollo anómalo de una neurona, o por la regulación errónea, tal como regulación por disminución, de una actividad de una neurona. En una realización, los agentes terapéuticos pueden aplicarse a un nervio dañado, el sitio de daño del nervio o el sitio de reparación del daño del nervio. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos se aplican al sitio de reparación del nervio primario. El daño al nervio puede representar una transección del nervio (neurotmesis), en el que el nervio está parcial o totalmente separado o una pequeña región dañada y extirpada quirúrgicamente.

Los trastornos neurológicos pueden afectar perjudicialmente a las funciones del sistema nervioso tales como la función sensorial (la capacidad para sentir cambios dentro del cuerpo y el medio exterior); la función integradora (la capacidad de interpretar los cambios); y la función motora (la capacidad para responder a la interpretación iniciando una acción tal como una contracción muscular o secreción glandular).

Los ejemplos de trastornos neurológicos lesiones traumáticas o tóxicas a nervios periféricos o craneales, médula espinal o al cerebro, nervios craneales, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, aneurisma cerebral y lesión de la médula espinal. Otros trastornos neurológicos incluyen trastornos cognitivos y neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, demencias relacionadas con enfermedad de Alzheimer, (tales como enfermedad de Pick), de Parkinson y otras enfermedades de cuerpos difusos de Lewy, demencia senil, enfermedad de Huntington,

síndrome de Gilles de la Tourette, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía sensorial y motora hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth), neuropatía diabética, parálisis supranuclear progresiva, epilepsia, y enfermedad de Jakob-Creutzfeldt. Los trastornos de la función autónoma incluyen hipertensión y trastornos del sueño.

También van a tratarse con agentes terapéuticos descritos en el presente documento los trastornos neuropsiquiátricos, tales como depresión, esquizofrenia, trastorno esquizoafectivo, psicosis de Korsakoff, obsesión, trastornos de ansiedad, o trastornos fóbicos, trastornos del aprendizaje o memoria (tales como amnesia y pérdida de memoria relacionada con la edad), trastorno por déficit de atención, trastorno distémico, trastorno depresivo mayor, obsesión, trastorno obsesivo-compulsivo, trastornos por uso de sustancias psicoactivas, ansiedad, fobias, trastorno de pánico, trastorno afectivo bipolar, síndromes de dolor psicogénico y trastornos alimentarios. Otros ejemplos de trastornos neurológicos incluyen lesiones al sistema nervioso debido a una enfermedad infecciosa (tal como meningitis, fiebres altas de diversas etiologías, VIH, sífilis o síndrome postpolio) y lesiones al sistema nervioso debido a electricidad (incluyendo contacto con electricidad o rayos, y complicaciones de la terapia psiquiátrica electroconvulsiva). Los trastornos neurológicos asociados con estados oftálmicos incluyen daño a la retina y al nervio óptico, glaucoma y degeneración macular relacionada con la edad.

El cerebro en desarrollo es una diana para la neurotoxicidad en el sistema nervioso central en desarrollo durante muchas fases del embarazo así como durante la infancia y segunda infancia, y los métodos de la invención pueden utilizarse en la prevención o el tratamiento de déficits neurológicos en embriones o fetos en el útero, en lactantes prematuros, o en niños que necesitan tal tratamiento, incluyendo aquellos con defectos de nacimiento neurológicos. Los trastornos neurológicos adicionales incluyen, por ejemplo, los enumerados en HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE (Braunwald *et al.*, McGraw-Hill, 2001) y en la AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION'S DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS DSM-IV (American Psychiatric Press, 2000).

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento también pueden usarse en un método para tratar un estado médico asociado con una lesión neural. El estado médico puede referirse a cualesquiera trastornos del movimiento, epilepsia, enfermedades cerebrovasculares, enfermedades autoinmunitarias, trastornos del sueño, trastornos autónomos, trastornos de la vejiga urinaria, estados metabólicos anómalos, trastornos del sistema muscular, enfermedades infecciosas y parasitarias, neoplasias, enfermedades endocrinas, enfermedades nutricionales y metabólicas, enfermedades inmunológicas, enfermedades de la sangre y los órganos formadores de sangre, trastornos mentales, enfermedades del sistema nervioso, enfermedades de los órganos sensoriales, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades del sistema respiratorio, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades del sistema genitourinario, enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo, enfermedades del sistema musculoesquelético y tejido conjuntivo, anomalías congénitas, determinados estados que se originan en el periodo perinatal, y síntomas, signos y estados mal definidos.

La enfermedad cerebrovascular tratable puede estar provocada por estados que incluyen, pero no se limitan a, aneurismas, accidentes cerebrovasculares, arritmia, infarto de miocardio, lesión por isquemia-reperusión y hemorragia general.

Las enfermedades autoinmunitarias tratables incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple.

Los trastornos del sueño tratables mediante la presente solicitud pueden estar provocados por estados que incluyen, pero no se limitan a, apnea del sueño y parasomnias.

Los trastornos autónomos tratables mediante la presente solicitud pueden estar provocados por estados que incluyen, pero no se limitan a, trastornos gastrointestinales, que incluyen, pero no se limitan a trastornos de motilidad gastrointestinal, náuseas, vómitos, diarrea, hipo crónico, enfermedad de reflujo gastroesofágico y hipersecreción de ácido gástrico, insuficiencia autonómica; epiforesis excesiva, rinorrea excesiva; y trastornos cardiovasculares incluyendo, pero sin limitarse a disritmias y arritmias cardíacas, hipertensión y enfermedad del seno carotídeo.

Los trastornos de la vejiga urinaria tratables mediante la presente solicitud pueden estar provocados por estados que incluyen, pero no se limitan a, lesión de la médula espinal y vejiga espástica o flácida.

Los estados metabólicos anómalos tratables mediante la presente solicitud pueden estar provocados por estados que incluyen, pero no se limitan a, hipertiroidismo o hipotiroidismo.

Los trastornos del sistema muscular tratables mediante la presente solicitud pueden incluir, pero no se limitan a, distrofia muscular, y espasmos del tracto respiratorio superior y la cara.

Los agentes terapéuticos también pueden usarse para tratar dolor neuropático provocado por estados que incluyen, pero no se limitan a, migrañas, incluyendo migrañas con aura, migrañas sin aura, migrañas menstruales, variantes de migraña, migrañas atípicas, migrañas complicadas, migrañas hemipléjicas, migrañas transformadas y migrañas diarias crónicas, cefaleas tensionales episódicas, cefaleas tensionales crónicas, cefaleas por rebote analgésico, cefaleas en racimos episódicas, cefaleas en racimos crónicas, variantes de racimo, hemicráneas paroxismales

crónicas, hemicránea continua, cefalea postraumática, dolor de cuello postraumático, neuralgia posherpética que implica la cabeza o cara, dolor por fractura de la columna vertebral secundaria a osteoporosis, dolor artrítico en la columna vertebral, cefalea relacionada con enfermedad cerebrovascular y accidente cerebrovascular, cefalea debido a trastorno vascular, distrofia simpática refleja, cervicalgia (que puede deberse a diversas causas, incluyendo, pero sin limitarse a, muscular, discogénica o degenerativa, incluyendo artrítica, relacionada con la postura o metastásica), glosodinia, carotidinia, cricoidinia, otalgia debido a lesión del oído medio, dolor gástrico, ciática, neuralgia maxilar, dolor laríngeo, mialgia de los músculos del cuello, neuralgia trigeminal (a veces también denominada tic doloroso), cefalea post-punción lumbar, cefalea de baja presión del líquido cerebroespinal, trastorno articular temporomandibular, dolor facial atípico, neuralgia ciliar, neuralgia paratrigeminal (a veces también denominada síndrome de Raeder); neuralgia petrosal, síndrome de Eagle, hipertensión intracraneal idiopática, dolor orofacial, síndrome de dolor miofascial que implica la cabeza, el cuello y hombros, neuralgia migrañosa crónica, cefalea cervical, parálisis paratrigeminal, neuralgia SPG (a veces también denominada cefalea de la mitad inferior, síndrome de neuralgia facial inferior, neuralgia de Sluder y síndrome de Sluder), carotidinia, neuralgia vidiana, causalgia y/o una combinación de lo anterior.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cefalea” puede referirse a migrañas, cefaleas tensionales, cefaleas en racimos, neuralgia trigeminal, cefaleas secundarias, cefaleas de tipo tensional, cefaleas crónicas y episódicas, cefaleas por uso excesivo de medicación/rebote, cefaleas de hemicrania paroxismal crónicas, cefaleas continuas hemicranias, cefalea postraumáticas, cefaleas posherpéticas, cefaleas vasculares, cefaleas relacionadas con distrofia simpática refleja, cefaleas por cervicalgia, cefaleas por carotidinia, cefaleas ciáticas, cefaleas trigeminales, cefaleas occipitales, cefaleas maxilares, cefaleas ciliares, cefaleas paratrigeminales, cefaleas petrosales, cefalea de Sluder, cefaleas vidianas, cefaleas de baja presión en el LCR, cefaleas de la ATM, cefaleas por causalgia, cefaleas miofasciales, todas las cefaleas primarias (por ejemplo, cefalea punzante primaria, cefalea por tos primaria, cefalea por esfuerzo primario, cefalea primaria asociada con actividad sexual, cefalea hipnótica y nueva cefalea diaria persistente), todas las cefalalgias autonómicas trigeminales (por ejemplo, hemicranias paroxismales episódicas, SUNCT, todos los TAC probables y SUNA), cefaleas crónicas diarias, neuralgia occipital, dolor facial atípico, dolor trigeminal neuropático y cefaleas de tipo misceláneo.

En todavía otras realizaciones, los agentes terapéuticos pueden usarse para promover la supervivencia, plasticidad y/o crecimiento de células madre o células progenitoras. Las células madre pueden incluir cualquier célula madre que expresa un receptor LAR fosfatasa, incluyendo célula madre o células progenitoras neurales. Los agentes terapéuticos pueden administrarse a la célula madre o células progenitoras *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Cuando se administran *ex vivo* o *in vitro* a las células madre o células progenitoras, la célula madre o progenitora puede entonces trasplantarse a un sujeto para aplicaciones terapéuticas.

Para la célula madre/progenitora neural, por ejemplo, puede emplearse un método de trasplantar una(s) célula(s) madre/progenitora(s) neural(es) a un área deseada que se usa generalmente en el campo de medicina regenerativa junto con la administración del agente terapéutico a las células o área. Más específicamente, puede ejemplificarse, por ejemplo, un método de trasplantar una(s) célula(s) madre/progenitora(s) neural(es) a un área de interés mediante: inyección de células madre/progenitoras neurales en solución salina tamponada con fosfato con el agente terapéutico; y adición/inyección de la suspensión celular resultante al área.

En otras realizaciones, los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden aplicarse a un injerto de nervio. El injerto puede incluir cualquier tejido destinado para implantación dentro de un ser humano o animal. Diversos tipos de injerto se abarcan dentro de la invención objeto, tales como autoinjertos, isoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. El tamaño (por ejemplo, longitud y diámetro) del injerto no es crítico. Por ejemplo, la longitud del injerto de nervio puede ser desde aproximadamente 1 centímetro hasta aproximadamente 10 centímetros, o más de aproximadamente 10 centímetros. El diámetro del injerto de nervio puede coincidir con el de cualquier nervio dañado o parte de un nervio, según sea necesario. El injerto de nervio puede ser un segmento estructuralmente completo de nervio para acortar un espacio a lo largo de la longitud del nervio del receptor o para reemplazar el extremo distal, es decir, para injertos de extremo a extremo. Alternativamente, el injerto de nervio puede ser un segmento de nervio parcial, o de forma excéntrica (por ejemplo, un colgajo de nervio), y destinado a reconstruir un nervio lacerado que tiene alguna alteración estructural, pero que mantiene su continuidad física.

Cuando los agentes terapéuticos se aplican a un injerto de nervio, puede tratarse todo el injerto. Los agentes terapéuticos pueden aplicarse a todo el injerto de nervio, en bloque. El tratamiento en bloque puede aplicarse a injertos de nervios vivos (frescos) o previamente congelados. Los agentes terapéuticos también pueden aplicarse a un injerto de nervio antes, durante o después de la implantación. Los agentes terapéuticos pueden aplicarse a cualquier porción del injerto, tal como el extremo o extremos que van a unirse al muñón de un nervio dañado. Si el agente terapéutico se aplica al nervio dañado, el agente terapéutico puede aplicarse a cualquier área del nervio dañado que promueve la reparación del nervio dañado, tal como en el sitio de daño o adyacente al sitio de daño.

El agente terapéutico puede colocarse en un medio de cultivo para aplicación al injerto de nervio. El medio de cultivo puede ser medio no definido, medio definido, o medio definido complementado con suero, por ejemplo. Las realizaciones descritas en el presente documento también pueden incluir disoluciones en almacenamiento para el almacenamiento de injertos de nervios antes de la implantación. La disolución en almacenamiento contiene un

medio de cultivo y al menos un agente terapéutico. La disolución en almacenamiento también puede incluir otros agentes biológicamente activos, tales como los factores de crecimiento descritos a continuación.

En otras realizaciones, se sabe que una lesión de la médula espinal, tal como hemisección C2, conduce a un aumento de proteoglicanos inhibidores dentro de la matriz extracelular y la red perineuronal ipsilateral con respecto a la hemisección, pero distal con respecto a la lesión de médula espinal, a nivel del núcleo motor frénico. Tal como se comenta en la solicitud de patente estadounidense 10/754,102, que se incorpora en el presente documento como referencia, el tratamiento con condroitinasa ABC (ChABC) degrada estas moléculas de matriz potencialmente inhibidoras.

Se contempla en el presente documento que modificar enzimáticamente (por medio de condroitinasa: ChABC) matrices extracelulares en las PNN que rodean a las neuronas motoras combinadas con la administración de los agentes terapéuticos puede maximizar la capacidad de brote y el impacto funcional de fibras nerviosas restantes. Se contempla además que potenciar y/o propiciar un brote de fibra total mucho mayor en combinación con potenciar la salida fisiológica de las neuronas en sí actuará de forma sinérgica para mejorar la lesión de la médula espinal. Por tanto, en otra realización, a los sujetos se les puede administrar condroitinasa ABC además de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento para propiciar una recuperación incluso más potenciada que cualquier tratamiento usado solo. En algunas realizaciones, las inyecciones en bolo de ChABC en la vecindad de una lesión del SNC pueden promover la función motora en un sujeto.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir además administración o puesta en contacto de una célula (por ejemplo, una neurona) con un agente que bloquea inhibidores de la regeneración, por ejemplo, un compuesto que inhibe el bloqueo derivado de mielina de generación neural. Inhibidores conocidos de excrecencia neuronal (por ejemplo, de regeneración en un sitio de lesión del SNC) son inhibidores derivados de mielina (por ejemplo, Nogo- A, MAG, OMgp, Ehprin B3, Sema 4D y Sema 5A), inhibidores derivados de astrocitos (por ejemplo, CSPG, KSPG, Ephrin B2 y Slit), inhibidores derivados de fibroblastos (por ejemplo, Sema 3A). El segundo agente puede ser un antagonista para cualquiera de estos inhibidores. En una realización, la célula se pone en contacto además con uno o más de tales agentes. En una realización, el agente inhibe un inhibidor de mielina de regeneración neural (por ejemplo, glicoproteína asociada con mielina (MAG), Nogo, mielina de oligodendrocitos glicoproteína (OMgp)). Se dan a conocer inhibidores de MAG en la patente estadounidense n.º 5.932.542. Se dan a conocer inhibidores de Nogo en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0215691. Se dan a conocer inhibidores de OMgp en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2008/0188411. La célula puede ponerse en contacto con este agente antes, después y/o simultáneamente con el agente que inhibe la interacción de CSPG con PTP σ .

En algunas realizaciones, la célula también puede ponerse en contacto con el agente que activa la ruta de crecimiento de neuronas (por ejemplo, SNC). Algunos agentes incluyen pero no se limitan a factores neurotróficos tales como inosina, manosa, gulosa, o glucosa-6-fosfato, tal como se describe en Li *et al.*, 23 J. Neurosci. 7830 (2003); Chen *et al.*, 99 PNAS 1931 (2002); y Benowitz *et al.*, 273 J. Biol. Chem. 29626 (1998). TGF- β 946; y oncomodulina tal como se describe en Yin *et al.*, 23 J. Neurosci. 2284 (2003), son también agentes. Además, pueden usarse los factores de crecimiento de polipéptidos tales como BDNF, NGF, NT-3, CNTF, LIF y GDNF. En una realización, los métodos, que incluyen un agente que estimula la excrecencia neuronal, comprenden además poner en contacto neuronas (por ejemplo, SNC) con un modulador cAMP que aumenta la concentración de cAMP intracelular (por ejemplo, cAMP) y/o poliaminas (Cai *et al.*, 35 Neuron 711 (2002)). Por ejemplo, la capacidad de células ganliónicas retinales de rata maduras de responder a manosa requiere cAMP elevado (Li *et al.*, 2003).

La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no se pretende que limite el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1

Este ejemplo muestra que la exposición a largo plazo a CSPG provoca que los conos de crecimiento se colapsen, se estabilicen y se adhieren en exceso. En este ejemplo, un ensayo puntual usado para medir CSPG indujo estabilización de neuronas sensoriales adultas.

Método

Se obtuvieron neuronas del ganglio de la raíz dorsal sensorial (DRG) de ratas hembras adultas y se hicieron crecer en gradientes del agregado de proteoglicano de sulfato de condroitina tal como se describió previamente. Se recubrieron placas de lapso de tiempo delta-T con fondo de vidrio con poli-L-lisina (PLL) y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Se crearon puntos disolviendo agregado 2 mg/ml en calcio y disolución salina tamponada con disolución de Hanks libre de magnesio (HBSS). Se colocaron ocho puntos de 2 μ l en una mitad de cada plato y se les proporcionó tiempo suficiente para que secan sobre el vidrio. Se recubrieron finalmente las placas en laminina 10 μ g/ml durante 3 horas a 37°C. Tras la incubación, se añadieron seis mil neuronas DRG disociadas adultas a cada placa en medios neurales basales A complementados con Glutamax, pen/estrep y B27. Se permitieron crecer las células durante 4-6 días.

Inmediatamente antes del inicio del lapso de tiempo, se sellaron las placas delta T con un cubreobjetos de vidrio. Se realizó microscopía de lapso de tiempo 100x con un objetivo calentado y una fase calentada para mantener las células a 37 grados. Se obtuvieron imágenes cada 30 segundos y se unieron juntas para crear una película de lapso de tiempo. Se monitorearon el cono de crecimiento y la dinámica filopodial y se cuantificaron manualmente con Metamorph.

Resultados

Las figuras 1 y 2(A-D) muestran que neuronas sensoriales adultas expuestas a gradientes del agregano CSPG se estabilizaron en una región particular del borde del punto y se sobreadherieron al sustrato, lo que conduce a una falta de formación de conos de crecimiento, extensiones filopodiales y motilidad. Se anclaron en su sitio 22 de 24 conos de crecimiento examinados (92 por ciento) y no fueron móviles a los 4-6 días *in vitro*.

Ejemplo 2

Este ejemplo muestra que la expresión de LAR es mayor en conos de crecimiento estabilizados que en conos móviles. En este ejemplo, se llevó a cabo el ensayo de puntos en cubreobjetos de vidrio con unas pocas alteraciones de la técnica usada para microscopía de lapso de tiempo. Tras el tratamiento con PLL, se secaron los cubreobjetos y se recubrieron con una pequeña cantidad de nitrocelulosa para aumentar las interacciones adhesivas necesarias para la formación de puntos. Tras el secado de nitrocelulosa, se sembraron 4 puntos sobre cada cubreobjetos (una en cada cuadrante) usando agregano 700 µg/ml, laminina 5 µg/ml disuelta en HBSS. Tras secar, los cubreobjetos se recubrieron en laminina 5µg/ml a 37°C durante 3 horas. Se añadieron 2.000 neuronas adultas del ganglio de la raíz dorsal disociada a cada cubreobjetos en medios neurales basales A complementados con Glutamax, pen/estrep y B27. Además, se añadieron péptidos a la concentración requerida en el momento de la siembra. Se permitió que las células crecieran durante 5 días antes de la fijación en paraformaldehído al 4%.

Se fijaron portaobjetos y se tiñeron para anti-PTPσ de cabra (1:100, R&D systems) y anti-tubulina B₃ de ratón (Invitrogen, 1:500). Se obtuvieron imágenes de axones y conos de crecimiento a 100x. Se analizó la densidad de PTPσ en el cono de crecimiento y compartimentos axonales en ImageJ (N=40 para cada neurona distrófica y no distrófica).

La figura 3 muestra que la densidad de PTPσ se concentró significativamente en conos de crecimiento estabilizados y distróficos frente a conos de crecimiento móviles sobre laminina.

Ejemplo 3

Tal como se ilustra esquemáticamente en la figura 4, la familia de fosfatasa relacionadas con el antígeno leucocitario (LAR) consiste en tres miembros: el propio LAR, proteína tirosina fosfatasa receptora Sigma (RPTPσ) y proteína tirosina fosfatasa receptora delta (PPTPδ). Informes recientes han mostrado una interacción de unión entre LAR o RPTPσ y las cadenas laterales de azúcares de proteoglicano de sulfato de condroitinas (CSPG), moléculas que son altamente inhibitoras del crecimiento, plasticidad y regeneración neural. Además, el análisis de cristalografía y secuencia muestra que los tres miembros de la familia contienen el mismo dominio de unión y bolsillo de unión, lo que proporciona evidencia de que RPTPδ también puede ser un receptor funcional para CSPG. El análisis estructural y de secuencia ha revelado que todos los miembros de la familia LAR contienen un motivo hélice-bucle-hélice en forma de cuña en el primer dominio catalítico intracelular que media en la interacción del receptor homo/heterofílico. Usando miméticos peptídicos de este dominio de cuña marcado con una secuencia TAT localizadora citosólica, la actividad LAR se abolió con éxito en los paradigmas de señalización de neurotrofina. Se utilizó NIH BLAST para identificar la secuencia ortóloga en RPTPσ y RPTPδ y se diseñó un dominio de cuña péptido para cada diana. Los péptidos se acuñaron con péptido de bloqueo LAR intracelular (ILP), péptido de bloqueo intracelular de Sigma (ISP) y péptido de bloqueo delta intracelular (IDP). De manera interesante, este dominio está altamente conservado entre vertebrados superiores, lo que indica una región funcionalmente importante.

Cuña de PTPσ de rata y ratón: DMAEHMERLKDLSLKLSQEYESI (SEQ ID NO: 20 y 21).

Cuña de PTPσ de ser humano: DMAEHTERLKDLSLKLSQEYESI (SEQ ID NO: 33)

El péptido se marcó conjugado con HIV-TAT para crear péptidos de bloqueo de la función:

HIV-TAT

NH₂GRKKRRQRRRCDMAEHMERLKDLSLKLSQEYESI-NH₂PTPσ ratón/rata (SEQ ID NO: 53 y 54).

NH₂GRKKRRQRRRCDMAEHTERLKDLSLKLSQEYESI-NH₂PTPσ ser humano (SEQ ID NO: 66).

NH₂GRKKRRQRRRC~~DL~~ADNIERLKANDGLKFSQEYESI-NHSLAR (SEQ ID NO: 55).

NH₂GRKKRRQRRRC~~EL~~ADHIERLKANDNLKFSQEYESI-NH₂PTPdelta (SEQ ID NO: 56).

5 NH₂GRKKRRQRRRC~~CI~~REDDSLMLYALAEKKESNMHES-NH₂ Aleatorizado de Sigma (SEQ ID NO: 57).

Estos péptidos se encargaron de Genscript y se disolvieron en agua y se almacenaron a largo plazo a -80°C. Se añadieron péptidos a los medios en el momento de siembra neuronal.

10 Después de 5 días *in vitro*, se fijaron las células y se tiñeron para anti-tubulina B₃ de ratón (verde). Se contó el número de procesos que abarcaban completamente el gradiente y se normalizaron frente al número cuerpos de células neuronales sobre cada punto individual.

Resultados

15 Las figuras 5-7 muestran que el dominio de cuña péptido para PTP σ (ISP) permite que las neuronas amplíen los procesos que cruzan los gradientes de CSPG. El tratamiento era dependiente de la dosis, con un cruce óptimo a 2,5 μ M. Además, el péptido LAR (ILP) también permite que las neuronas tengan gradientes transversales de CSPG (figura 6). Ni el control de vehículo ni el péptido ISP-TAT aleatorizado permitieron extensiones neuronales a través
20 del gradiente. En el lapso de tiempo, el tratamiento con ISP evitó la estabilización axonal y sobreadhesión, lo que permite que conos de crecimiento amplíen los filopodios y permanezcan móviles. El 65% de los conos de crecimiento analizados era aún móviles a los 4-6 días *in vitro*, en contraposición con el 8% en la condición de control.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe métodos de generar una lesión contusiva moderada/grave de la médula espinal con el dispositivo de Infinite Horizon en ratas hembra adultas Sprague-Dawley para ensayos de lesión de la médula espinal (SCI) usados en los ejemplos 5-8. En resumen, se anestesiaron las ratas profundamente con un cóctel de ketamina/xilazina. Una vez debajo, se afeitó la espalda y se esterilizó con iodina y etanol. Usando una entrada dorsal, se expusieron las vértebras lumbares 7-10 mediante una incisión de la piel y en los segmentos 8 y 9 se realizó una laminectomía para exponer la médula espinal intacta. Se estabilizaron la columna vertebral y médula espinal en un marco esterotáxico antes del impacto contusivo. Finalmente, las ratas se sometieron a una contusión de Infinite Horizon de 250 kd centrada en la línea media sin tiempo de permanencia. Tras la sutura muscular y el
35 grapado de la piel, se colocaron los animales sobre una almohadilla caliente a 37°C y se les permitió un amplio acceso a los alimentos y al agua al despertarse de la cirugía. Se monitorizó el dolor, y los animales con dolor recibieron una dosis baja de Marcaine en el sitio de inyección. Se proporcionaron solución salina y gentamicina (antibiótico) durante 5 días tras la cirugía para evitar infecciones de la vejiga. Este experimento se realizó de principio a fin 3 veces. N=15 ISP, N=11 vehículo y N=6 ILP.

40 Se dividieron aleatoriamente los animales en tres grupos, control de vehículo, ISP o ILP. Se disolvió en primer lugar péptido ISP o ILP liofilizado en agua estéril a una concentración de 2,5 mM. Para crear tratamientos individuales para cada animal, el péptido se diluyó adicionalmente hasta una concentración de 5 μ M en una disolución de vehículo de DMSO al 5% en solución salina estéril. Se tomaron alícuotas de 25 ml de cada tratamiento (ILP, ISP o
45 vehículo) en 50 tubos Eppendorf individuales, conteniendo cada uno 500 μ l. Se almacenaron los fármacos a -20 y se descongelaron inmediatamente antes de su uso. Cada animal recibió 500 μ l de o bien vehículo, ISP 5 μ M o bien ILP 5 μ M por vía subcutánea en la espalda por encima de la lesión cada día, empezando 1 día después de la lesión y durando 7 semanas (49 tratamientos, 11 μ g/rata/día).

Ejemplo 5

Este ejemplo muestra movimientos de las extremidades posteriores y patrones locomotores según la escala Basso, Beattie y Bresnahan para locomoción posterior a SCI de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI
55 tratados con péptido LAR.

Métodos

Se permitió que los animales vagaran libremente sobre una mesa durante tres minutos, mientras que sus movimientos de extremidades posteriores y patrones locomotores estaban clasificándose por un observador ciego según la escala Basso, Beattie y Bresnahan para locomoción posterior a SCI (Basso *et al*, 1995). Se realizó el comportamiento en los días tras la lesión 1, 4, 7 y después semanalmente durante 10 semanas adicionales. Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante mediciones repetidas de ANOVA de 2 factores.

Resultados

65

Las figuras 8 y 9 muestran que tras un período inicial de choque espinal, todos los grupos de tratamiento recuperaron el movimiento básico de las extremidades posteriores 2 semanas después de la lesión, con un promedio de puntuación de BBB de 9 (soporte de peso de la extremidad posterior sin pisada). En el transcurso de las próximas 10 semanas, tanto los animales tratados con vehículo como los animales tratados con péptido LAR se recuperaron solo un poco más allá de este punto, recuperando en promedio la capacidad para tomar la ocasional paso ponderado. En promedio, los animales tratados con ISP continuaron recuperándose, alcanzando una puntuación de 12 a las 6 semanas (pisada uniforme con coordinación de extremidad delantera y extremidad posterior ocasional) y más de 13 en 7 semanas (entre coordinación frecuente y uniforme). Individualmente, los animales alcanzaron una puntuación de 19, que es una locomoción casi perfecta con la cola en alto, separación de los dedos uniforme en los pasos y colocación correcta de la pata. Los animales adicionales alcanzaron puntuaciones casi normales de 18,5 y 18. 7 de 15 animales recuperaron al menos pisada coordinada frecuente.

Ejemplo 6

Este ejemplo muestra los resultados de la prueba de caminata sobre rejilla de animales con SCI tratados con vehículo y los animales con SCI tratados con péptido LAR.

Métodos

Se permitió que los animales vagaran libremente sobre una rejilla de alambre (100 cm x 75 cm, con huecos de 1cm² en el alambre) 12 semanas tras la lesión de la médula espinal. Mientras una cámara superior rastreaba y calculaba la distancia total recorrida (Ethovision), un observador ciego contó manualmente el número de errores de pie. Los datos se presentan como el número total de errores del pie izquierdo y derecho por metro recorrido. La prueba de caminata sobre rejilla se realizó solo una vez para evitar que los animales entrenen y mejoren artificialmente (fenómeno de rehabilitación).

Resultados

Se usó la prueba de caminata sobre rejilla para medir la recuperación de la coordinación sensorimotora y el equilibrio. Las figuras 10 y 11 muestran que en promedio, los animales tratados con vehículo cometieron 6 errores de pie por metro recorrido sobre la rejilla. El tratamiento con ILP condujo a una mejora muy ligera insignificante en errores de pie en la prueba de caminata sobre rejilla. Los animales tratados con ISP cometieron significativamente menos errores de pie que los animales tratados con vehículo y tratados con ILP en promedio. Además, varios animales cometieron menos de 3 errores de pie, lo que sugiere una recuperación casi completa de este comportamiento.

Ejemplo 7

Este ejemplo muestra recuperación de la función urinaria de animales con SCI tratados con vehículo y animales con SCI tratados con péptido ISP.

Métodos (jaulas metabólicas):

Se colocaron los animales en jaulas metabólicas durante la noche durante un ciclo de oscuridad (16 horas). Se separó la orina y se recogió en una jeringa conectada a un transductor de fuerza. El aumento en la fuerza correspondiente a cada vacío individual se representó gráficamente en Spike 2. Los gráficos se muestrearon en Excel y se confirmaron manualmente para contar el número total de huecos y el volumen promedio de cada hueco.

(Urodinámica)

En un experimento terminal, se anestesiaron los animales con uretano a las 14 semanas tras la lesión. Esta anestesia evita los movimientos excesivos mientras se conservan los reflejos de la vejiga. Se insertó un catéter a través de la uretra y en la vejiga para permitir una perfusión lenta con solución salina. Además, se insertaron dos electrodos a través de la vagina en el esfínter uretral externo para medir la actividad muscular. Tanto la actividad muscular como presión (medida a través del catéter) se representaron gráficamente en Spike 2.

Resultados

Se midió la recuperación del comportamiento urinario con jaulas metabólicas. Se colocaron los animales en jaulas metabólicas durante un ciclo de oscuridad a las 4, 8 y 12 semanas tras la lesión donde se midieron las micciones por medio de un transductor de fuerza. La figura 12 muestra que aunque no se observó recuperación significativa en promedio a las 4 u 8 semanas, ISP condujo a un aumento significativo en la frecuencia de huecos a las 12 semanas tras la lesión. Aunque los animales no sometidos previamente a experimentación orinan dos veces a la hora en promedio, los animales tratados con vehículo y tratados con ILP tienen una frecuencia significativamente disminuida, una vez cada dos horas, con volumen/hueco significativamente aumentado. El tratamiento con ISP aumentó significativamente la frecuencia tras la lesión de huecos en dos veces en promedio, alcanzando múltiples animales

niveles de frecuencia de micción normales (sin experimentación).

Para someter a prueba si los animales tenían control total de la contractilidad de los músculos de la vejiga y del músculo del esfínter, los animales se sometieron a análisis de urodinámica temporales a las 14 semanas tras la lesión. Bajo urodinámica y perfusión lenta de solución salina en la vejiga, los animales no sometidos previamente a experimentación contraen los músculos de la vejiga lo que conduce a un aumento intenso en la presión en la vejiga (trazo superior). La caída de la presión corresponde al estallido del esfínter uretral externo, que ayuda a expulsar la orina de los animales. Ambos de estos comportamientos se pierden por completo después de una lesión de la médula espinal, donde el aumento gradual de la presión en la vejiga conduce finalmente a que se alcance un máximo y se salga la solución salina. El esfínter uretral externo ocasionalmente estalla, pero no se correlaciona con las contracciones del detredor de la vejiga que conducen a la evacuación inadecuada de la orina (diseneración del esfínter detractor). Las figuras 13(A-B) muestran que tras el tratamiento con ISP, muchos animales recuperaron las contracciones coordinadas de la vejiga con estallido del esfínter uretral externo en patrón (marcado por flechas rojas).

La recuperación más allá de la de los animales tratados con vehículo se definió como mayor que dos desviaciones estándar mejor que la media del vehículo (micción y BBB). Se colocaron los animales en cada grupo. 13 de 15 animales mostraron mejoras de comportamiento significativas, recuperando 4 animales una función significativa en los tres comportamientos.

Ejemplo 8

Este ejemplo muestra la expresión de 5HT de animales con SCI tratados con vehículo y los animales con SCI tratados con péptido ISP.

Métodos

Los animales se perfundieron transcárdialmente con paraformaldehído al 4% y se diseccionó la columna vertebral. Después de un día adicional en PFA, las médulas espinales se diseccionaron y se sometieron a crioprotección durante 3-7 días en el 30% de sacarosa. El segmento correspondiente a L1-L3 se incrustó y las secciones transversales de 20 µM se colocaron en portaobjetos.

Los portaobjetos se bloquearon con suero de cabra al 5% y se sondaron con un anticuerpo primario contra 5HT (1:500, Immunostar). Después de un lavado e incubación con el anticuerpo secundario apropiado, los portaobjetos se cubrieron y se sellaron. Se tomaron imágenes en un microscopio fluorescente a 2x con exposición, ganancia, gamma y desplazamiento idénticos para hacer comparaciones entre portaobjetos.

Para el análisis de densidad axónica, se describió la materia gris y se calculó la intensidad de píxeles media en ImageJ. Dado que se observó una tinción mínima en las columnas dorsales, la intensidad de píxel de esta región se restó como fondo interno de cada sección individual. Se analizó una sección seleccionada al azar cada 200 µm en una distancia total de 2 cm (10 segmentos). Se eliminó la intensidad de píxel más alta y más baja, con los 8 restantes promediados.

Resultados

5HT es un neurotransmisor crítico en la médula espinal cuya función es controlar la ganancia y la excitabilidad de las redes motoras. Cuando se combina con otros tratamientos, los agonistas 5HT pueden aumentar significativamente los comportamientos motores después de una lesión de la médula espinal. Se realizó tinción para determinar la expresión de 5HT en la médula espinal lumbar, múltiples segmentos por debajo del nivel de lesión. La médula espinal lumbar contiene los marcapasos para la locomoción de las extremidades posteriores y el control de la vejiga y contiene las neuronas motoras de las piernas y los músculos de la vejiga. La figura 14 muestra que en animales no sometidos previamente a experimentación, la expresión de 5HT, o densidad axónica, fue muy alta, con patrones de tinción uniformes en la materia gris izquierda y derecha. A mayor aumento, puede observarse que las fibras penetran en la materia blanca. 14 semanas después de la lesión de la médula espinal, la expresión de 5HT es significativamente menor en los animales de control tratados con vehículo, y solo quedan unos pocos parches pequeños en la materia gris. El tratamiento con ISP condujo a un aumento dramático en la tinción con 5HT en toda la materia gris. La tinción fue notablemente robusta y varió mucho de una sección a otra en parches discretos no uniformes en toda la materia gris. Este patrón sugiere brote y/o regeneración de 5HT en centros de salida de motor ahorrados. El aumento en la expresión 5HT se correlacionó bien con la recuperación del comportamiento, ya que los dos animales que no responden a ISP no mostraron un aumento dramático en la expresión 5HT. La cuantificación mostró nuevamente que la expresión de 5HT en la materia gris aumentó significativamente (figura 15).

Ejemplo 9

Se identificaron varias proteínas y rutas que actúan aguas abajo de la familia LAR fuera de la actividad fosfatasa (figura 4). De estas, Caskina (Ckn) y la proteína de interacción con LAR α (Liprina-a) tienen papeles críticos tanto en

la formación de sinapsis como en la guía axónica. mCkn1 se une directamente a mLAR y mPTPR δ , y mCkn2 se une directamente a mLAR y mPTP σ en un sistema de interacción de dos híbridos de levadura. Se mapeó la interacción de Ckn con fosfatasa de la familia LAR en una región que contenía dos motivos alfa estériles (dominios SAM) dominio que justifica el fenotipo. Se creó un mapa de homología para miembros de la familia Ckn de *Drosophila*, ratón, rata y ser humano usando BLAST para alinear las secuencias de registro de proteína tal como se muestra en la tabla 3.

La tabla 3 muestra que el primer dominio SAM se conserva entre miembros de la familia Ckn. Se diseñó un péptido de 20 aminoácidos que se supone que actúa como un pequeño competidor de molécula de la unión de fosfatasa/Ckn de la familia LAR, y mitiga la señalización de la familia LAR aguas abajo. El trabajo en el sistema *Drosophila* identifica la región C-terminal de dCkn según sea necesario para eventos de señalización aguas abajo. Se diseñaron péptidos de 20 aminoácidos para mCkn1 y mCkn2 que pueden actuar potencialmente como pequeños competidores de molécula para dianas aguas abajo, aunque estas dianas.

Tabla 3

Alineación del extremo C-terminal de Caskina1				
dCkn	888	VSVNVLNDIGNMANLTDELDAMLEEEKRV	917	SEQ ID NO: 75
mCkn1	1376	STGSILEDIGSMFDDLADQLDAMLE	1400	SEQ ID NO: 76
rCkn1	1406	STGSILEDIGSMFDDLADQLDAMLE	1430	SEQ ID NO: 77
hCkn1	1325	STGSILEDIGSMFDDLADQLDAMLE	1349	SEQ ID NO: 38
Alineación del extremo C-terminal de Caskina2				
dCkn	888	VSVNVLNDIGNMANLTDELDAMLEEEKRV	317	SEQ ID NO: 78
mCkn2	1177	STKHILDDISTMF DALADQLDAMLD	1201	SEQ ID NO: 79
rCkn2	1176	STKHILDDISTMF DALADQLDAMLD	1200	SEQ ID NO: 80
hCkn2	1178	STKHILDDISTMF DALADQLDAMLD	1202	SEQ ID NO: 39
Alineación del dominio SAM de Caskina				
dCkn	284	PTIARMTPEDLTAIGIKNPHHRERIKQRID	313	SEQ ID NO: 81
mCkn1	519	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKITAEIS	548	SEQ ID NO: 82
mCkn2	517	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKIASEIA	546	SEQ ID NO: 83
rCkn1	503	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKITAEIS	532	SEQ ID NO: 84
rCkn2	517	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKIASEIA	546	SEQ ID NO: 85
hCkn1	419	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKIAAEIS	448	SEQ ID NO: 40
hCkn2	518	PTISRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKIASEIA	547	SEQ ID NO: 86
Péptidos de bloqueo de la función aguas abajo				
<u>TAT</u> -Caskina1/2_SAM	NH ₂ -GRKKRRQRRRMTPEDLTAIGVTKPGHRKKI-NH ₂			SEQ ID NO: 71
<u>TAT</u> -Caskina1_C	NH ₂ -GRKKRRQRRRLEDIGSMFDDLADQLDAMLE			SEQ ID NO: 72
<u>TAT</u> -Caskina2_C	NH ₂ -GRKKRRQRRRLDDISTMF DALADQLDAMLD			SEQ ID NO: 73

Los miembros de la familia Liprina desempeñan papeles en el desarrollo y mantenimiento de las sinapsis (se plantea la hipótesis de que Liprina-a puede actuar en la transducción de señales aguas abajo de LAR fosfatasa. La selección de interacción de 2 híbridos de levadura implica el primer dominio SAM de miembros de la familia Liprina-a como región de unión para miembros de la familia LAR fosfatasa. Se diseñó un péptido de 20 aminoácidos que corresponde a una región idéntica dentro del primer dominio SAM de los 4 miembros de la familia Liprina-a (tabla 4). Es interesante que los 4 ortólogos de Liprina-a conserven esta región idéntica a través de la evolución, lo que implica que esta región es funcionalmente importante. Se plantea la hipótesis de que este pequeño competidor de molécula puede usarse para alterar las interacciones de LAR-Liprina- α_{1-4} , alterando la señalización aguas abajo de miembros de la familia LAR fosfatasa.

Tabla 4

Alineación de SAM alfa de Liprina					
mLa1	921	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	950	SEQ ID NO: 41	
mLa2	906	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	935	SEQ ID NO:87	
mLa3	898	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMANLSD	927	SEQ ID NO:88	
mLa4	803	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	833	SEQ ID NO:89	
rLa1	666	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	695	SEQ ID NO:90	
rLa2	907	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	936	SEQ ID NO:91	
rLa3	896	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMANLSD	925	SEQ ID NO:92	
rLa4	697	WLELWGMPAWYVAACRANVKSGAIMSALSD	726	SEQ ID NO:93	
Péptidos de bloqueo de la función aguas abajo					
TAT-Liprina alfa 1		NH ₂ -GRKKRRQRRRGMPAWYVAACRANVKSGAIM-NH ₂		SEQ ID NO: 74	

Lista de secuencias

- 5 <110> Case Western Reserve University
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INHIBIR LA ACTIVIDAD DE FOSFATASAS DE LA FAMILIA LAR
- <130> C 9757/RN
- 10 <140> Documento EP 13775928.8
<141> 09-04-2013
- <150> Documento US 61/621.623
<151> 09-04-2012
- 15 <160> 93
<170> PatentIn versión 3-5
- 20 <210> 1
<211> 33
<212> PRT
<213> Ratón
- <400> 1
Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala
1 5 10 15
- Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
20 25 30
- 25 Gln
- <210> 2
<211> 33
<212> PRT
- 30 <213> Coronavirus de rata
- <400> 2
Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala
1 5 10 15
- Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
20 25 30
- Gln

ES 2 699 658 T3

<210> 3
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3
 Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

Gln

10

<210> 4
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Ratón

<400> 4
 Pro Ile Pro Ile Thr Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

15

Gln

<210> 5
 <211> 33
 <212> PRT

20

<213> Coronavirus de rata

<400> 5
 Pro Ile Pro Ile Thr Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

Gln

25

<210> 6
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 6
 Pro Ile Pro Ile Ala Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

Gln

35

<210> 7
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Ratón

ES 2 699 658 T3

<400> 7

Pro Ile Pro Ile Leu Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala
1 5 10 15

Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
20 25 30

Gln

<210> 8

5 <211> 33

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Pro Ile Pro Ile Leu Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala
1 5 10 15

Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
20 25 30

10 Gln

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

15 <213> *Xenopus borealis* (PTP sigma)

<400> 9

Asp Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Ser Gln Glu Tyr Glu Ser
20

20 <210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> *Anolis carolinensis* (PTP Sigma)

25 <400> 10

Asp His Thr Glu His Glu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser
1 5 10 15

Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 11

<211> 24

30 <212> PRT

<213> *Pez cebra* (PTP Sigma)

<400> 11

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

35 <210> 12

<211> 24

<212> PRT

ES 2 699 658 T3

<213> Tilapia (PTP sigma)

<400> 12

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

5

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Pollo (PTP Sigma)

10

<400> 13

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

15

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> *Fringilla coelebs*

<400> 14

Glu Leu Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

20

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

25

<213> *Ornithorhynchus anatinus*

<400> 15

Glu Leu Ala Glu His Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

30

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> *Sarcophilus harrisii*

35

<400> 16

Glu Met Ala Glu His Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

40

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> *Mustela putorius*

<400> 17

ES 2 699 658 T3

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

<210> 18
 <211> 24
 5 <212> PRT
 <213> *Galago alleni*

<400> 18
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

10 <210> 19
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> *Callithrix aurita*

<400> 19
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

20 <210> 20
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Rattus rattus*

<400> 20
 Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

25 <210> 21
 <211> 24
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

<400> 21
 Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

35 <210> 22
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

40 <400> 22
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

5 <210> 23
<211> 24
<212> PRT
<213> *Sus barbatus*

<400> 23
Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

10 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 24
<211> 24
<212> PRT
15 <213> *Bos primigenius*

<400> 24
Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

20 <210> 25
<211> 24
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

25 <400> 25
Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 26
<211> 24
30 <212> PRT
<213> *Orcinus orca*

<400> 26
Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

35 <210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> *Saimiri sciureus*

40 <400> 27
Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20

<210> 28
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Papio hamadryas*
 5
 <400> 28
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20
 <210> 29
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Primate calicivirus*
 <400> 29
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20
 <210> 30
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Primate calicivirus*
 <400> 30
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20
 <210> 31
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Macaca radiata*
 <400> 31
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20
 <210> 32
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Pan troglodytes*
 <400> 32
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20
 <210> 33
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 699 658 T3

<400> 33
 Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

5 <210> 34
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Lar de rata

10 <400> 34
 Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

15 <210> 35
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> PTP Delta de rata

<400> 35
 Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

20 <210> 36
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> PTP Alfa de rata

25 <400> 36
 Lys Leu Glu Glu Glu Ile Asn Arg Arg Met Ala Asp Asp Asn Lys Ile
 1 5 10 15

Phe Arg Glu Glu Phe Asn Ala Leu
 20

30 <210> 37
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> X es T o M

<220>
 <221> misc feature
 <222> (3)..(3)
 40 <223> Xaa es T o M

<400> 37
 Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu
 1 5 10

45 <210> 38
 <211> 20
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val Thr Lys Pro Gly His
1 5 10 15

Arg Lys Lys Ile
20

5

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 39

Leu Glu Asp Ile Gly Ser Met Phe Asp Asp Leu Ala Asp Gln Leu Asp
1 5 10 15

Ala Met Leu Glu
20

15

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

Leu Asp Asp Ile Ser Thr Met Phe Asp Ala Leu Ala Asp Gln Leu Asp
1 5 10 15

20

Ala Met Leu Asp
20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg Ala Asn Val Lys Ser
1 5 10 15

Gly Ala Ile Met
20

30

<210> 42

<211> 33

<212> PRT

<213> *Xenopus borealis*

35

<400> 42

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Ser Gln Glu Tyr Glu
20 25 30

Ser

<210> 43

<211> 32

40

<212> PRT

<213> *Anolis carolinensis* (PTP Sigma)

ES 2 699 658 T3

<400> 43

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp His Thr Glu His
1 5 10 15

Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
20 25 30

5 <210> 44
<211> 35
<212> PRT
<213> *Danio rerio*

10 <400> 44
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

15 <210> 45
<211> 35
<212> PRT
<213> *Tilapia nilotica*

<400> 45
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Leu Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

20 <210> 46
<211> 35
<212> PRT
<213> *Gallus gallus*

25 <400> 46
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

30 <210> 47
<211> 35
<212> PRT
<213> *Fringilla coelebs*

35 <400> 47

ES 2 699 658 T3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 48

<211> 35

<212> PRT

<213> *Ornithorhynchus anatinus*

<400> 48

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Asp His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 49

<211> 35

<212> PRT

<213> *Sarcophilus harrisii*

<400> 49

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu His Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 50

<211> 35

<212> PRT

<213> *Mustela putorius*

<400> 50

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 51

<211> 35

<212> PRT

<213> *Galago alleni*

<400> 51

ES 2 699 658 T3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 52

<211> 35

<212> PRT

<213> *Callithrix argentata*

<400> 52

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 53

<211> 35

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 53

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 54

<211> 35

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 54

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Met Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 55

<211> 35

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 55

ES 2 699 658 T3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 56

<211> 35

<212> PRT

<213> *Sus barbatus*

<400> 56

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> *Bos primigenius*

<400> 57

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 58

<211> 35

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<400> 58

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 59

<211> 35

<212> PRT

<213> *Orcinus orca*

<400> 59

ES 2 699 658 T3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile

35

5 <210> 60
<211> 35
<212> PRT
<213> *Saimiri boliviensis*

10 <400> 60
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

15 <210> 61
<211> 35
<212> PRT
<213> *Papio hamadryas*

<400> 61
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

20 <210> 62
<211> 35
<212> PRT
<213> *Primate calicivirus*

25 <400> 62
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

30 <210> 63
<211> 35
<212> PRT
<213> *Primate calicivirus*

ES 2 699 658 T3

<400> 63

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 64

<211> 35

<212> PRT

<213> *Macaca arctoides*

<400> 64

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 65

<211> 35

<212> PRT

<213> Chimpancé (PTP Sigma)

<400> 65

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 66

<211> 35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His
1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr
20 25 30

Glu Ser Ile
35

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68
 Ala Asn Asp Ser
 1
 10 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 69
 Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 1 5 10
 <210> 70
 20 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> X es T o M
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <223> Xaa es T o M
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca de manera natural
 <400> 70
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu His Xaa Glu Arg
 1 5 10 15
 Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu
 20 25
 <210> 71
 40 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Met Thr Pro Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Thr Ala Ile Gly Val Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile
 45 20 25 30
 <210> 72
 <211> 31
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72

ES 2 699 658 T3

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Leu Glu Asp Ile Gly
1 5 10 15

Ser Met Phe Asp Asp Leu Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Glu
20 25 30

<210> 73

<211> 31

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Leu Asp Asp Ile Ser
1 5 10 15

Thr Met Phe Asp Ala Leu Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Asp
20 25 30

10

<210> 74

<211> 31

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 74

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Gly Met Pro Ala Trp
1 5 10 15

Tyr Val Ala Ala Cys Arg Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met
20 25 30

20

<210> 75

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 75

Val Ser Val Asn Val Leu Asn Asp Ile Gly Asn Met Ala Asn Leu Thr
1 5 10 15

Asp Glu Leu Asp Ala Met Leu Glu Glu Glu Lys Arg Val
20 25

<210> 76

30

<211> 25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 76

Ser Thr Gly Ser Ile Leu Glu Asp Ile Gly Ser Met Phe Asp Asp Leu
1 5 10 15

Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Glu
20 25

35

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

40

<213> *Rattus rattus*

<400> 77

ES 2 699 658 T3

Ser Thr Gly Ser Ile Leu Glu Asp Ile Gly Ser Met Phe Asp Asp Leu
1 5 10 15

Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Glu
20 25

<210> 78

<211> 29

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 78

Val Ser Val Asn Val Leu Asn Asp Ile Gly Asn Met Ala Asn Leu Thr
1 5 10 15

Asp Glu Leu Asp Ala Met Leu Glu Glu Glu Lys Arg Val
20 25

10

<210> 79

<211> 25

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 79

Ser Thr Lys His Ile Leu Asp Asp Ile Ser Thr Met Phe Asp Ala Leu
1 5 10 15

Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Asp
20 25

<210> 80

20

<211> 25

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 80

Ser Thr Lys His Ile Leu Asp Asp Ile Ser Thr Met Phe Asp Ala Leu
1 5 10 15

Ala Asp Gln Leu Asp Ala Met Leu Asp
20 25

25

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 81

Pro Thr Ile Ala Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Ile
1 5 10 15

Lys Asn Pro His His Arg Glu Arg Ile Lys Gln Arg Ile Asp
20 25 30

35

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 82

ES 2 699 658 T3

Pro Thr Ile Ser Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile Thr Ala Glu Ile Ser
20 25 30

<210> 83

<211> 30

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 83

Pro Thr Ile Ser Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile Ala Ser Glu Ile Ala
20 25 30

10

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

15

<400> 84

Pro Thr Ile Ser Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile Thr Ala Glu Ile Ser
20 25 30

20

<210> 85

<211> 30

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 85

Pro Thr Ile Ser Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val
1 5 10 15

25

Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile Ala Ser Glu Ile Ala
20 25 30

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 86

Pro Thr Ile Ser Arg Met Thr Pro Glu Asp Leu Thr Ala Ile Gly Val
1 5 10 15

Thr Lys Pro Gly His Arg Lys Lys Ile Ala Ser Glu Ile Ala
20 25 30

35

<210> 87

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 87

ES 2 699 658 T3

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ser Ala Leu Ser Asp
20 25 30

<210> 88

<211> 30

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 88

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ala Asn Leu Ser Asp
20 25 30

10

<210> 89

<211> 30

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 89

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ser Ala Leu Ser Asp
20 25 30

20

<210> 90

<211> 30

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 90

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ser Ala Leu Ser Asp
20 25 30

25

<210> 91

<211> 30

<212> PRT

30

<213> *Rattus rattus*

<400> 91

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ser Ala Leu Ser Asp
20 25 30

35

<210> 92

<211> 30

<212> PRT

<213> *Rattus rattus*

40

<400> 92

ES 2 699 658 T3

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ala Asn Leu Ser Asp
20 25 30

<210> 93

<211> 30

5 <212> PRT

<213> *Rattus rattus*

<400> 93

Trp Leu Glu Leu Trp Gly Met Pro Ala Trp Tyr Val Ala Ala Cys Arg
1 5 10 15

Ala Asn Val Lys Ser Gly Ala Ile Met Ser Ala Leu Ser Asp
20 25 30

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente terapéutico para su uso en el tratamiento de una lesión neural promoviendo al menos uno de crecimiento, motilidad, supervivencia y plasticidad de células neurales, que comprende: un péptido terapéutico sintético que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 65% idéntica a SEQ ID NO: 37.
- 10 2. Agente terapéutico para su uso según la reivindicación 1, incluyendo el péptido terapéutico una sustitución de un aminoácido de al menos uno del residuo 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 ó 13 de SEQ ID NO: 37 por otro aminoácido, en el que el residuo de aminoácido 4E se sustituye por D o Q, el residuo de aminoácido 5R se sustituye por H, L o K, el residuo de aminoácido 6L se sustituye por I, V o M, el residuo de aminoácido 7K se sustituye por R o H, el residuo de aminoácido 9N se sustituye por E o D, el residuo de aminoácido 10D se sustituye por E o N, el residuo de aminoácido 12L se sustituye por I, V o M, y/o el residuo de aminoácido 13K se sustituye por R o H.
- 15 3. Agente terapéutico para su uso según la reivindicación 1, incluyendo el péptido terapéutico SEQ ID NO: 37.
- 20 4. Agente terapéutico para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un resto de transporte que está unido al péptido terapéutico y facilita la captación de los péptidos terapéuticos por la célula.
- 25 5. Agente terapéutico para su uso según la reivindicación 4, en el que el resto de transporte es un resto de transporte Tat de VIH.
- 30 6. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una lesión neural que comprende:
un agente terapéutico que incluye un péptido terapéutico sintético que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 65% idéntica a SEQ ID NO: 37, en el que el péptido terapéutico RN:KWO inhibe uno o más de la actividad catalítica, señalización o función de PTP σ , y un resto de transporte que está unido al péptido terapéutico y facilita la captación de los péptidos terapéuticos por una célula.
- 35 7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, incluyendo el péptido terapéutico una sustitución de un aminoácido de al menos uno del residuo 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12 ó 13 de SEQ ID NO: 37 por otro aminoácido, en el que el residuo de aminoácido 4E se sustituye por D o Q, el residuo de aminoácido 5R se sustituye por H, L o K, el residuo de aminoácido 6L se sustituye por I, V o M, el residuo de aminoácido 7K se sustituye por R o H, el residuo de aminoácido 9N se sustituye por E o D, el residuo de aminoácido 10D se sustituye por E o N, el residuo de aminoácido 12L se sustituye por I, V o M, y/o el residuo de aminoácido 13K se sustituye por R o H.
- 40 8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, incluyendo el péptido terapéutico una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-33 y 37.
9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el resto de transporte es un resto de transporte Tat de VIH.
- 45 10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el agente terapéutico es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 42-66 y 70.

**Neuronas de DRG sensoriales adultas
5 días de exposicion a gradiente**



Fig. 1

Gradientes de CSPG inducen estabilización

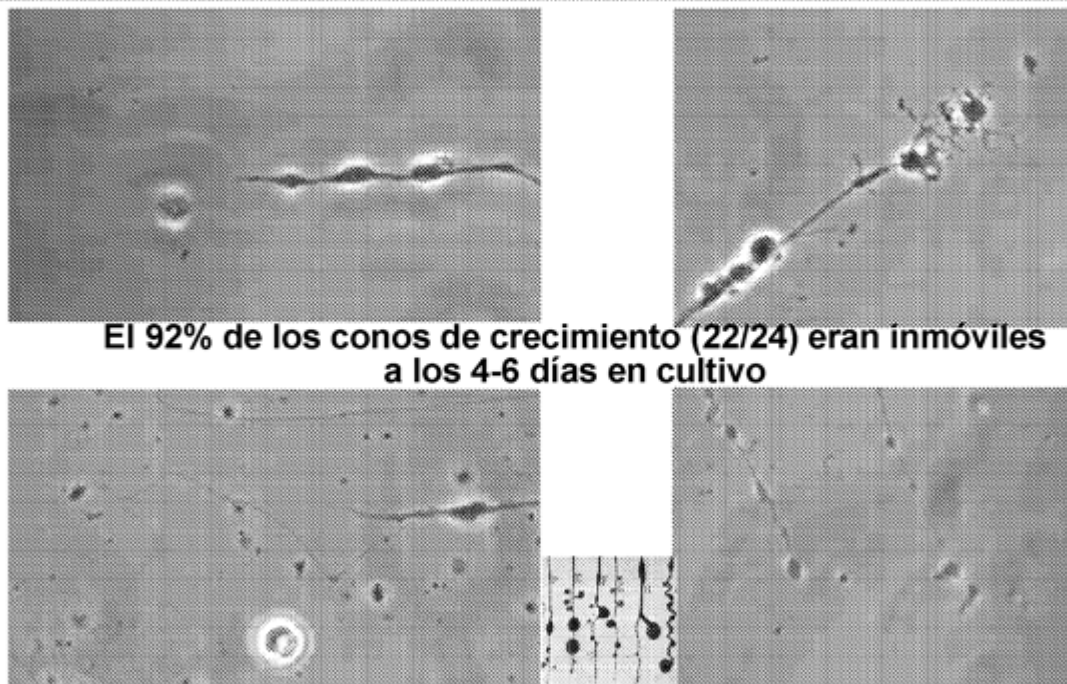


Fig. 2

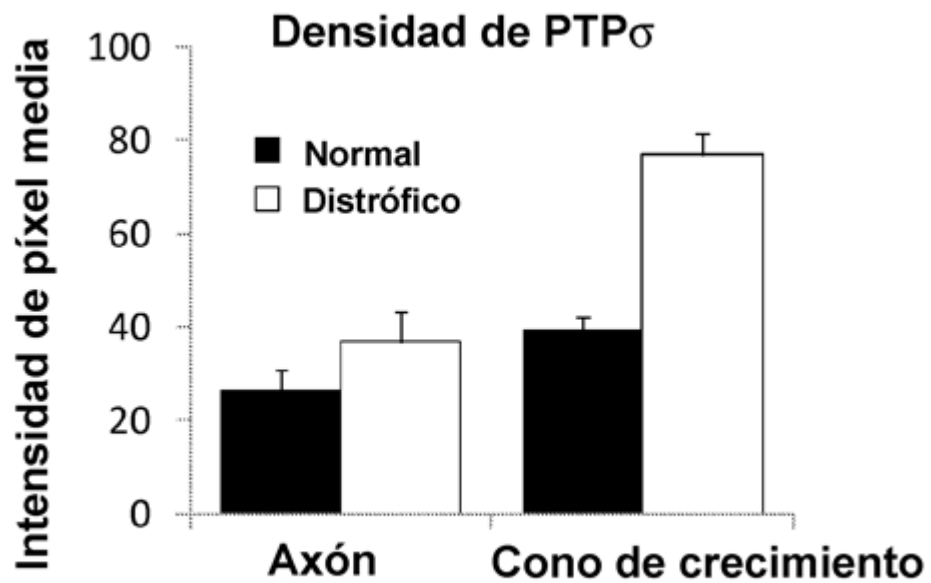


Fig. 3

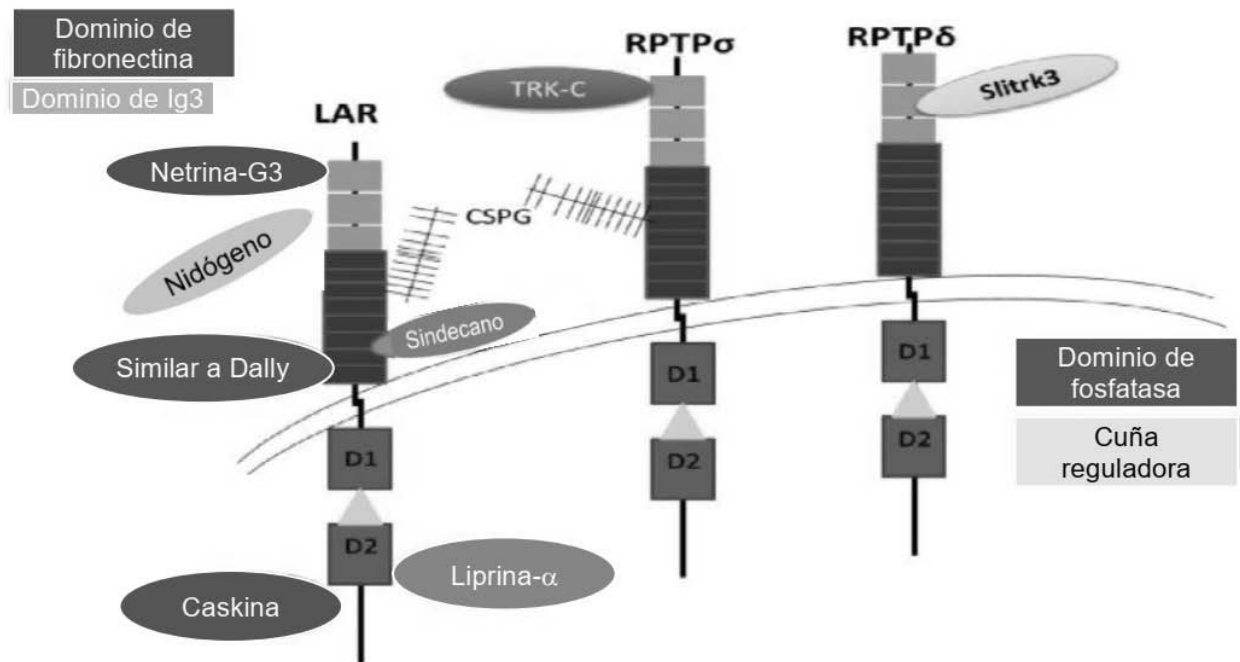


Fig. 4

ISP alivia la inhibición por proteoglicanos *in vitro*

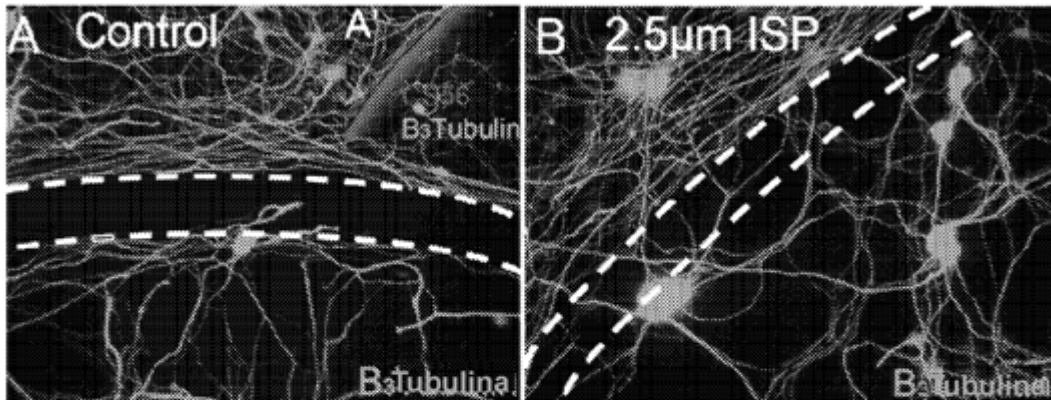


Fig. 5

Cruzamientos de puntos neuronales/células en punto

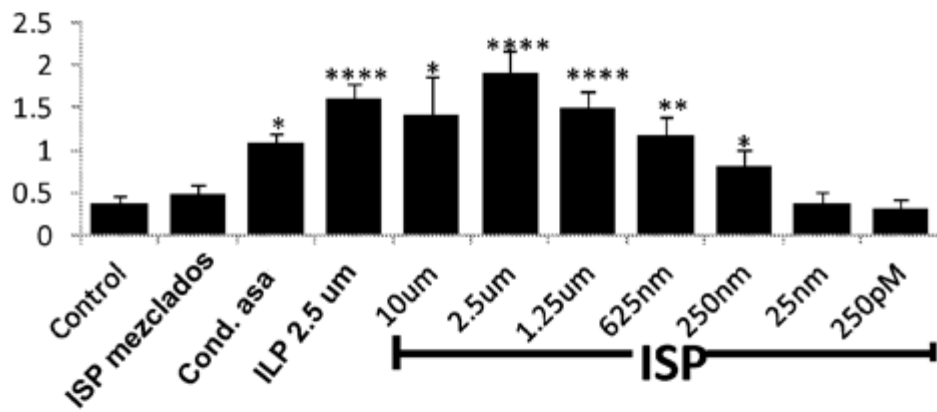


Fig. 6

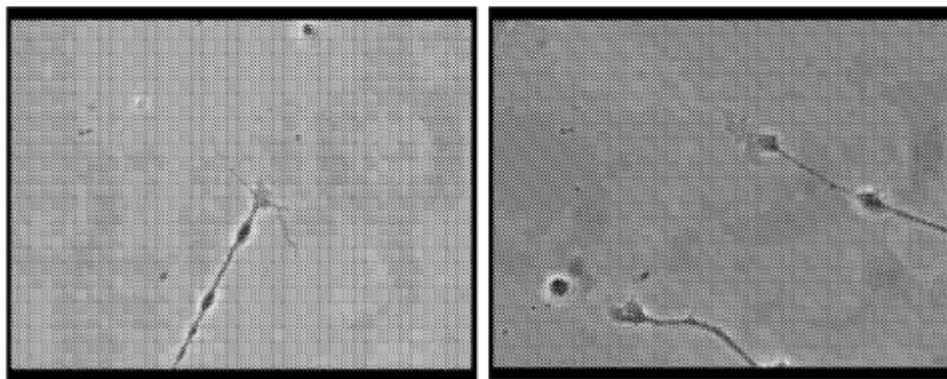
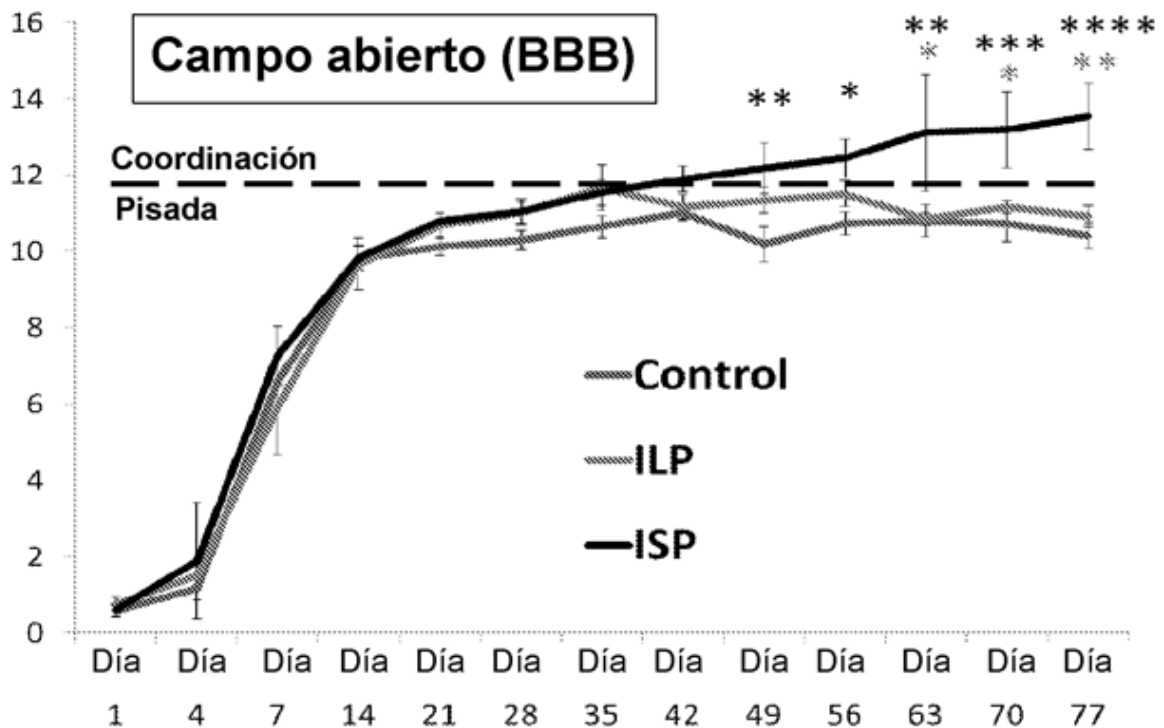


Fig. 7



- BBB es la escala de recuperación locomotora convencional tras SCI
 - 0 = Paraplejia completa
 - 21 = Locomoción normal
 - 12, 13, 14 = Coordinación de las extremidades superiores/inferiores ocasional, frecuente y constante, respectivamente
- Los animales alcanzaron una puntuación máxima de 19
 - Coordinación constante, distancia de los dedos constante, la cola se mantenía alta de manera constante y la colocación de los dedos es paralela en el contacto inicial y el levantamiento

Fig. 8

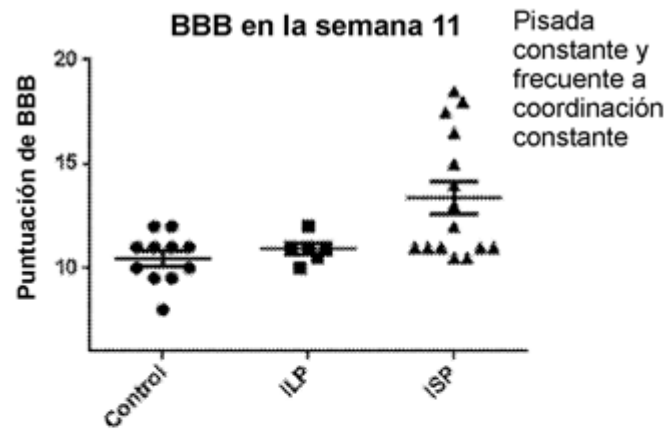


Fig. 9

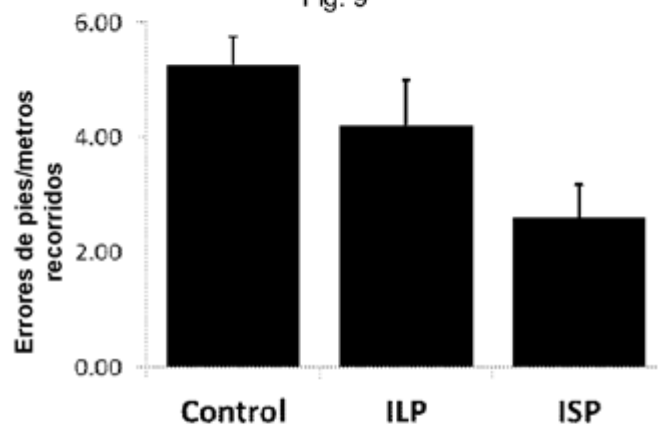


Fig. 10

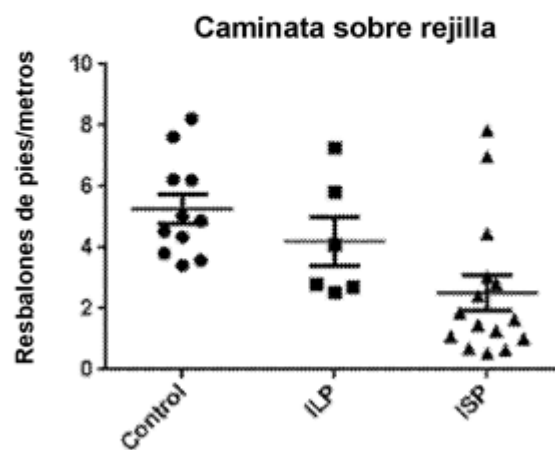


Fig. 11

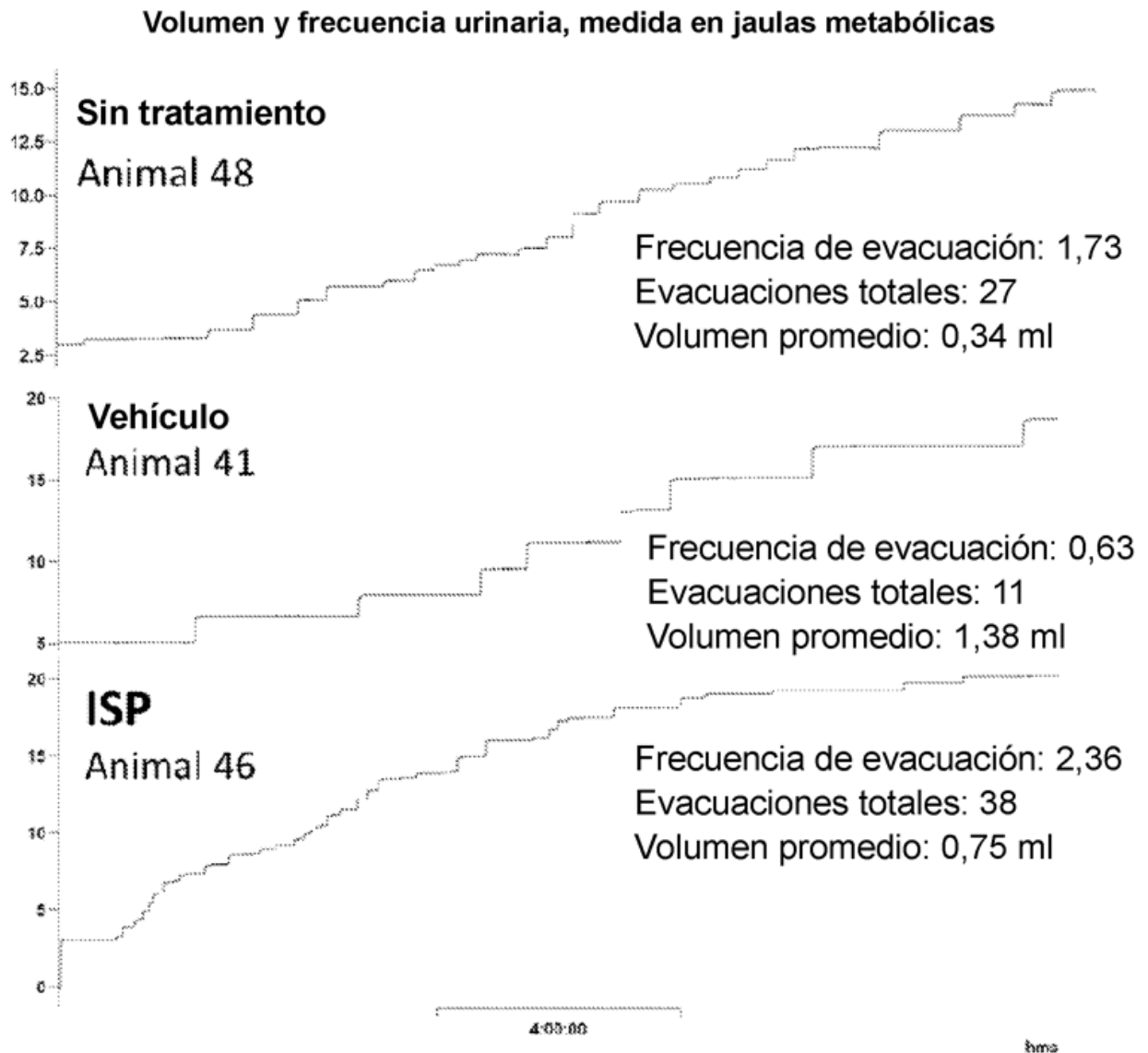
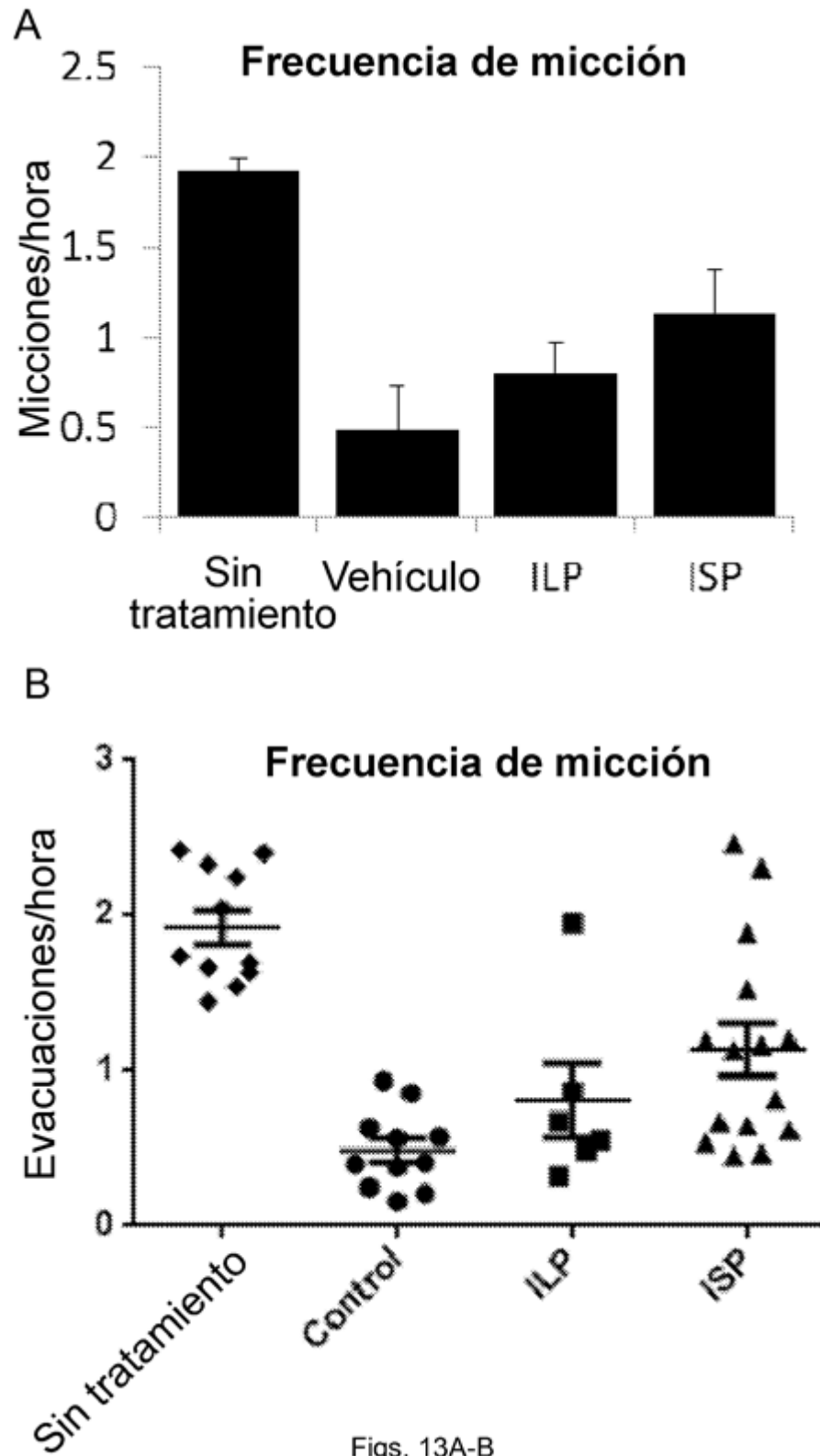


Fig. 12



Figs. 13A-B

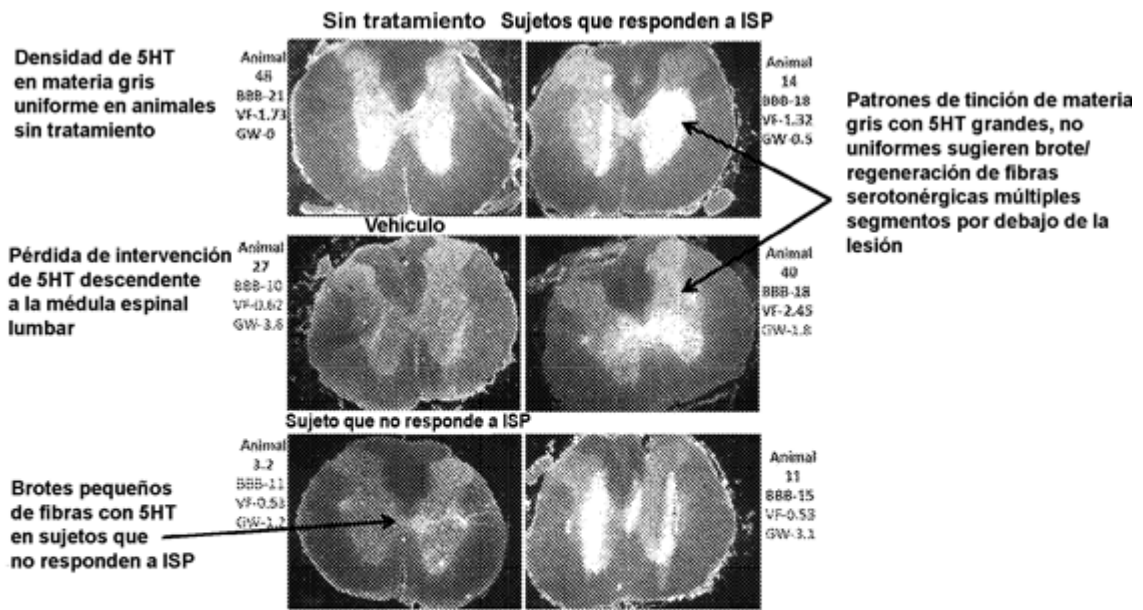


Fig. 14

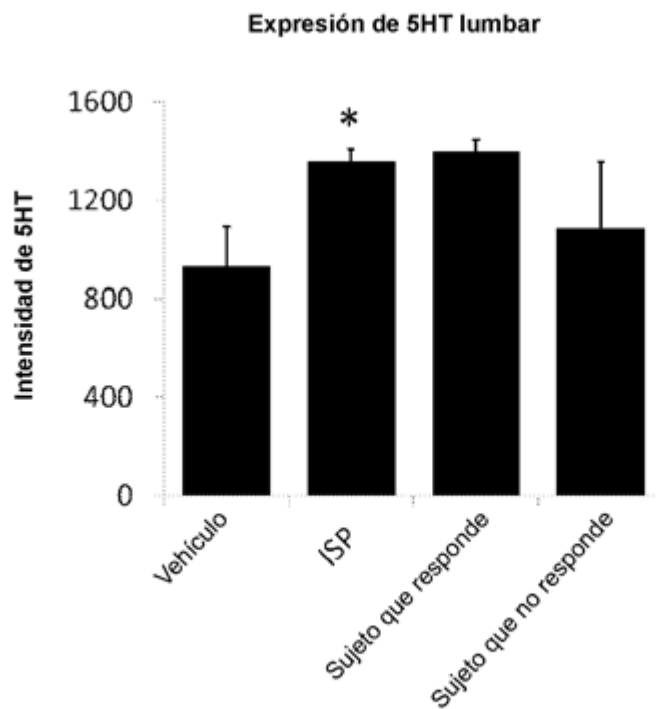


Fig. 15