

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 182**

51 Int. Cl.:

A61K 31/715 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2014 PCT/EP2014/055445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154537**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2014 E 14711957 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2978433**

54 Título: **Ácido polisiálico y su uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias**

30 Prioridad:

28.03.2013 EP 13161689

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

04.12.2019

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (50.0%)
Regina-Pacis-Weg 3
53113 Bonn, DE y
UNIVERSITÄT ZU KÖLN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NEUMANN, HARALD;
KOPATZ, JENS;
SHAHRAZ, ANAHITA;
KARLSTETTER, MARCUS y
LANGMANN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 734 182 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

Ácido polisialílico y su uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias

- 5 La presente invención se refiere a ácido polisialílico de bajo peso, para su uso como un medicamento, particularmente un uso en el tratamiento de procesos patológicos del sistema nervioso central (SNC) y la retina.

10 No existe una terapia curativa de las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC) y, por lo tanto, la mayoría de los tratamientos son sintomáticos. Esto incluye varias enfermedades del SNC y de la retina, que es una parte especializada del SNC. De acuerdo con la Clasificación de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10) de la OMS, estas incluyen enfermedades degenerativas de las neuronas motoras (Esclerosis lateral amiotrófica; CIE-10: G12.2), enfermedad de Parkinson (CIE-10: G20), enfermedad de Alzheimer (CIE-10: G30), esclerosis múltiple (CIE-10: G35) y degeneración de la mácula y el polo posterior (degeneración macular senil) (CIE-10: H35.3).

15 Varios datos demuestran que la inflamación sistémica mediada por citoquinas proinflamatorias liberadas por macrófagos tisulares es un factor causal que sostiene la progresión de la neurodegeneración en modelos animales y en enfermedades humanas. Se asumió que también las microglías podrían actuar como transductores de inflamación sistémica y efectores de neurodegeneración. También se sabe que la inflamación sistémica provocada por infecciones puede conducir a la progresión de la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer. Igualmente, los procesos inflamatorios contribuyen a la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica. Aunque las causas principales de las enfermedades neurodegenerativas son bastante diversas, existen pruebas sólidas de una notable convergencia en la amplificación del daño neuronal por un perfil inflamatorio único de la microglía. Aunque se puede suponer que las citoquinas proinflamatorias de macrófagos y de la microglía, en particular el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) y las especies reactivas de oxígeno tales como el superóxido, actúan como una fuerza impulsora del tejido inflamatorio y el daño neuronal, solo se dispone de opciones de terapia limitadas para prevenir daños en enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, el daño local continuo en los tejidos afectados sigue siendo un desafío importante.

30 El ácido oligosialílico y polisialílico son homopolímeros extendidos del ácido siálico. El ácido siálico es un derivado N u O-sustituido del ácido neuramínico. El ácido polisialílico (PSA) se encuentra en las glicoproteínas y es un componente de los polisacáridos capsulares de ciertas bacterias patógenas. En bacterias, los monómeros de ácido siálico del PSA pueden unirse mediante un enlace 2.8 o 2.9 para formar ácido polisialílico. En seres humanos, el monómero de ácido siálico de PSA está unido por un enlace 2.8 y está acetilado en la posición 5. El monómero de ácido siálico N-acetilado en la posición 5 por lo general se abrevia Neu5Ac. A pH neutro, los enlaces α (2 \rightarrow 8) dan como resultado una molécula lineal altamente flexible, mientras que a un pH bajo, la estructura química del polímero forma lactonas, dando como resultado una estructura más rígida. El número de monómeros en el ácido polisialílico puede llegar a 200, mientras que se ha encontrado que la longitud de cadena promedio de las cadenas de PSA endógenas en *E. coli* K1 es de aproximadamente 150 a 180 monómeros. La mayoría de las cadenas de PSA en la molécula de adhesión de células neurales de glicoproteína de mamífero (NCAM) consisten en un grado variable de monómeros de ácido siálico. Se han observado cadenas de ácido polisialílico extendidas en las glicoproteínas de neuroblastoma humano.

45 El documento US 2009/0010944 divulga métodos para producir un derivado de ácido oligosialílico alfa (2 \rightarrow 8) o (2 \rightarrow 9) aislado que tiene un extremo no reductor enriquecido para uno o más restos de-N-acetilo, y métodos de uso en la detección de la infección bacteriana por *E. coli* K1 y *N. meningitis*, y el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Además, el ácido polisialílico se ha utilizado para mejorar la farmacocinética de las proteínas. Por lo tanto, el ácido polisialílico con un peso molecular relativamente alto entre 20 kDa y 40 kDa se unió a proteínas recombinantes para mejorar su estabilidad y farmacocinética. Por ejemplo, Xenetic Biosciences PLC, Londres, R. U., comercializó una tecnología que utiliza ácido polisialílico polimérico natural para prolongar la semivida y mejorar la estabilidad de proteínas tales como el factor VIII recombinante.

55 H J Jennings et al., *J Immunol*, 1985, 134 (4) 2651-2657, describen "Determinant specificities of the groups B and C polysaccharides of *Neisseria meningitidis*". Jukka Häyrynen et al., *Molecular Immunology*, 39, 2002, 399-411, describen "High affinity binding of long-chain polysialic acid to antibody, and modulation by divalent cations and polyamines". Evans S V et al., *Biochemistry*, 1995, 34 (20), pp 6737-6744, describen "Evidence for the extended helical nature of polysaccharide epitopes. The 2.8 A resolution structure and thermodynamics of ligand binding of an antigen binding fragment specific for alpha-(2.8)-polysialic acid". Yasushi Shimoda et al., *Biochemistry*, 1994, 33 (5), pp 1202-1208 describen "Calcium Ion Binding of Three Different Types of Oligo/Polysialic Acids As Studied by Equilibrium Dialysis and Circular Dichroic Methods". El documento EP 0502550 A1 divulga un fármaco antiinflamatorio que comprende como componente eficaz al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido colomínico, productos de hidrólisis parcial del ácido colomínico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. El fármaco se usa como fármaco para enfermedades renales, un fármaco para la hepatitis, un inmunomodulador y un fármaco para inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos.

65 Aunque se identifican detalles crecientes de los complejos mecanismos de las enfermedades neurodegenerativas,

es casi imposible predecir si un compuesto puede presentar características pro o antiinflamatorias. Más aún cuando, por ejemplo, la microglía se ha implicado como un efector activo en las enfermedades neurodegenerativas, pero también puede iniciar efectos antiinflamatorios.

- 5 Por tanto, el objetivo subyacente de la presente invención era proporcionar compuestos que puedan utilizarse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias.

10 El problema se resuelve de acuerdo con la reivindicación 1 mediante un ácido polisialílico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) como se indica a continuación y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



15 en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 18 a 20

20 para su uso como un medicamento.

Además, la invención se refiere a un ácido polisialílico o una composición de polisacáridos de acuerdo con la reivindicación 2 y una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de enfermedades degenerativas y desmielinizantes del sistema nervioso central, y enfermedades retinianas degenerativas o inflamatorias.

25 La expresión "ácido polisialílico" de acuerdo con la invención se refiere a homopolímeros de ácido siálico que comprenden más de 10 monómeros. El ácido oligosialílico, por otra parte, comprende unos pocos monómeros, normalmente entre 2 y 10 monómeros.

30 Sorprendentemente, se encontró que el ácido polisialílico de acuerdo con la fórmula general (1) se puede usar para la prevención y/o el tratamiento de procesos patológicos del sistema nervioso central (SNC) y la retina. Se encontró que el ácido polisialílico de bajo peso molecular con un peso molecular entre aproximadamente 4,3 y 8 kDa o una longitud de cadena entre 14 y 26 monómeros, respectivamente, reducía la producción de mediadores proinflamatorios de la microglía y macrófagos tisulares sin interferir con la viabilidad de las células. Por el contrario, los ácidos siálicos con enlaces 2.8 con una longitud de entre 2 y 6 monómeros no mostraron ningún efecto, mientras que el ácido polisialílico de peso molecular más alto (> 12 kDa) atenuó la viabilidad celular de la microglía humana. Por consiguiente, los derivados del ácido polisialílico (1) son adecuados para tratar o prevenir enfermedades que involucran microglía o macrófagos inflamatorios. Se supone que el ácido polisialílico (1) puede prevenir la producción microglial o de macrófagos de citoquinas proinflamatorias o especies reactivas de oxígeno. Sin pretender quedar
40 ligado a una teoría especial, se supone que el ácido polisialílico (1) se puede unir a una proteína de membrana específica del linaje humano llamada lectina similar a la inmunoglobulina de unión a ácido siálico 11 (Siglec-11) que se expresa en la microglía y ciertos macrófagos tisulares.

45 El ácido monosacárido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) se denomina ácido 5-acetamido-2,4-dihidroxi-6-(1,2,3-trihidroxipropil) oxano-2-carboxílico de acuerdo con la nomenclatura IUPAC. Las unidades del monómero Neu5Ac del polisacárido de ácido polisialílico se unen entre sí mediante enlaces glicosídicos. Los monómeros de Neu5Ac pueden unirse mediante un enlace (2 → 8) o (2 → 9) para formar moléculas de ácido polisialílico. El ácido polisialílico (1) puede incluir monómeros con enlaces 2.8, o monómeros con enlaces 2.9, o monómeros con enlaces 2.8 y enlaces 2.9, por ejemplo, en orden alternativo o aleatorio. El ácido polisialílico (1) puede ser ácido polisialílico poli(enlace 2.8) o poli(enlace 2.9), preferentemente un ácido polisialílico poli(enlace 2.8). Preferentemente, los monómeros Neu5Ac están unidos por un enlace α (2 → 8). De acuerdo con la invención, el ácido polisialílico es ácido polisialílico poli(α (2 → 8) Neu5Ac)_n.

55 De acuerdo con la invención, n es un número entero en el intervalo de 16 a 24. En una realización preferida, n es un número entero en el intervalo de 18 a 20. Ventajosamente, el ácido polisialílico de tal longitud de cadena puede combinar buenos efectos en el tratamiento de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central y la retina con el potencial de no ser filtrado inmediatamente en la orina por el riñón y con el potencial de mantener su estructura lineal sin formación de estructuras terciarias.

60 El ácido polisialílico puede ser un polímero ramificado o no ramificado. El término "no ramificado" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de un polímero de ácido polisialílico de cadena lineal que comprende una secuencia lineal de monómeros Neu5Ac. El término "ramificado" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de un polímero de ácido polisialílico que está compuesto por una cadena principal con una o más cadenas laterales o ramas sustituyentes. Preferentemente, el ácido polisialílico es un polímero no ramificado. En una realización preferida, el ácido polisialílico forma un polímero lineal compuesto de monómeros Neu5Ac α(2.8 unidos). Los monómeros Neu5Ac unidos por un enlace 2.8 corresponden a la forma humana del ácido polisialílico. Para su
65

uso como un medicamento, la forma humana ventajosamente proporcionará la forma más compatible y eficaz de ácido polisiálico. Un polímero lineal compuesto de monómeros Neu5Ac $\alpha(2,8\text{-unidos})$ con una longitud de cadena entre 14 y 26 monómeros da como resultado una molécula altamente flexible que es capaz de proporcionar una buena capacidad de unión a su diana.

5 El ácido polisiálico poli($\alpha(2 \rightarrow 8) \text{Neu5Ac}$)_n(1) se puede estar libre o glicosídicamente unido. La expresión "unido glicosídicamente" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido del ácido polisiálico que se une a una molécula de sacárido adicional, o a otras moléculas capaces de formar un enlace glicosídico tal como aminoácidos. Preferentemente, el ácido polisiálico está en forma de polisacárido libre. El término "libre" de acuerdo con la
10 invención debe entenderse en el sentido del ácido polisiálico que no está unido a un sacárido u otra molécula adicional, pero es la propia molécula de ácido polisiálico poli($\alpha(2 \rightarrow 8) \text{Neu5Ac}$)_n(1).

En realizaciones adicionales, el ácido polisiálico puede unirse glicosídicamente a al menos un azúcar seleccionado del grupo que comprende glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa, manosa y xilosa.
15 El término "azúcar" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de monosacáridos y disacáridos, que comúnmente se conocen como azúcares. Ventajosamente, la glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa, manosa y xilosa son azúcares esenciales dentro del cuerpo humano. El ácido polisiálico puede comprender una molécula de azúcar terminal o estar unido glicosídicamente a dos o más moléculas de azúcar. Además, el ácido polisiálico o el ácido polisiálico a través de un azúcar unido glicosídicamente puede unirse
20 glicosídicamente a uno o más aminoácidos para formar glicoproteínas. El ácido polisiálico ligado glicosídicamente a una o más moléculas de azúcar o aminoácidos puede dar como resultado una farmacocinética mejorada. El término "aminoácido" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de aminoácidos alfa, moléculas que contienen tanto grupos funcionales amina como carboxilo unidos al mismo carbono, que se denomina el carbono alfa. Los aminoácidos preferidos son aminoácidos de origen natural, seleccionados del grupo que comprende glicina, alanina, serina, treonina, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, fenilalanina, tirosina, triptófano, leucina, valina, isoleucina, cisteína, metionina, histidina y/o prolina.

También son adecuadas sales farmacéuticamente aceptables del ácido polisiálico. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos
30 farmacéuticamente aceptables. Una sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales preferidas derivadas a partir de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, así como aminas cíclicas. Preferentemente, la sal farmacéuticamente aceptable se
35 selecciona del grupo que comprende sales de sodio, potasio, calcio o magnesio.

El ácido polisiálico de la presente divulgación puede derivar de fuentes naturales o sintéticas. Los métodos para la síntesis específica de oligo y polisacáridos utilizando las unidades de monosacáridos como precursores son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, el ácido polisiálico puede derivar de una fuente dietética.
40 Preferentemente, el ácido oligosiálico se puede obtener a partir de un polímero de ácido polisiálico, por ejemplo a partir de bacterias tales como E. coli K1. Se ha encontrado que la longitud de cadena promedio de las cadenas de ácido polisiálico endógeno en E. coli K1 es de aproximadamente 150 a 180 monómeros. El ácido polisiálico purificado producido por E. coli está disponible comercialmente y se puede usar para la fragmentación, por ejemplo calentando el ácido polisiálico precursor. La mezcla de reacción se puede purificar, a continuación, por métodos
45 convencionales, por ejemplo, mediante diálisis seguida de la separación de las fracciones deseadas que comprenden fragmentos de ácido polisiálico utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a una composición de polisacáridos que comprende un ácido polisiálico de acuerdo con la fórmula general (1) que se proporciona a continuación y/o las sales
50 farmacéuticamente aceptables del mismo: poli($\alpha(2 \rightarrow 8$ o $2 \rightarrow 9) \text{Neu5Ac}$)_n(1) en donde Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y n es un número entero en el intervalo de 14 a 26, en donde los fragmentos de ácido polisiálico en la composición tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y ≥ 90 % en peso a ≤ 100 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 %
55 en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el % en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico.

Porcentaje en peso, peso- % o p- % son sinónimos que se refieren a la concentración de un fragmento como el peso del fragmento dividido por el peso total de los fragmentos multiplicado por 100. El peso- % (o- %) de los fragmentos se calcula basándose en la cantidad del peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, si no se indica lo contrario. La cantidad total de todos los fragmentos de la composición no excede el 100 % en peso.

La expresión "peso molecular medio" del ácido polisiálico se entiende en esta solicitud como el promedio del peso molecular de los fragmentos de ácido polisiálico como se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.
65 El peso molecular de los fragmentos de ácido polisiálico se puede detectar en comparación con los patrones de peso molecular definido como se describe en esta solicitud. El número de monómeros de ácido polisiálico puede

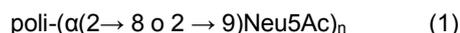
determinarse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico de alto rendimiento (HPLC).

En general, la longitud de la cadena de un polímero puede darse en unidades de monómero, como peso molecular, o ambos. Con referencia al polisacárido de ácido polisiálico, un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa corresponde a una longitud de cadena de $n = 14$ monómeros a $n = 26$ monómeros, mientras que un peso molecular entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa corresponde a una longitud de cadena de $n = 16$ monómeros a $n = 24$ monómeros.

En una composición de polisacáridos de este tipo que comprende el ácido polisiálico (1), el punto más alto del peso molecular puede ser de aproximadamente 5 kDa a 6,5 kDa.

El ácido polisiálico (1) puede ser ácido polisiálico poli(enlace 2.8) o poli(enlace 2.9), preferentemente un ácido polisiálico poli(enlace 2.8). Preferentemente, los monómeros Neu5Ac están unidos por un enlace α (2 \rightarrow 8). Preferentemente, el ácido polisiálico es ácido polisiálico poli(α (2 \rightarrow 8) Neu5Ac)_n. En una realización preferida, n es un número entero en el intervalo de 16 a 24. En una realización preferida adicional, n es un número entero en el intervalo de 18 a 20. Preferentemente, el ácido polisiálico es un polímero no ramificado. En una realización preferida, el ácido polisiálico forma un polímero lineal compuesto de monómeros Neu5Ac α (2.8 unidos). Preferentemente, el ácido polisiálico está en forma de polisacárido libre. En realizaciones adicionales, el ácido polisiálico puede unirse glicosídicamente a al menos un azúcar seleccionado del grupo que comprende glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa, manosa y xilosa. Además, el ácido polisiálico o el ácido polisiálico a través de un azúcar unido glicosídicamente puede unirse glicosídicamente a uno o más aminoácidos para formar glicoproteínas.

Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere a un ácido polisiálico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) que se proporciona a continuación y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:

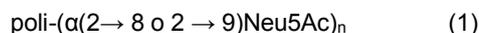


en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

o la composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1) en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y ≥ 90 % en peso a ≤ 100 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el % en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, para su uso como un medicamento.

El ácido polisiálico de acuerdo con la fórmula general (1) es capaz de prevenir la producción microglial o de macrófagos de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, representa un compuesto prometedor para la prevención y/o tratamiento de procesos patológicos del SNC y la retina. En particular, la presente invención se refiere a un ácido polisiálico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) que se proporciona a continuación y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

o la composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1), en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y ≥ 90 % en peso a ≤ 100 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el % en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad seleccionada de enfermedades degenerativas y desmielinizantes del sistema nervioso central, y enfermedades retinianas degenerativas o inflamatorias.

La expresión "tratamiento profiláctico" se refiere a prevenir o inhibir el desarrollo de una afección o trastorno clínico o retrasar la aparición de una etapa preclínica evidente de una afección o trastorno clínico. La expresión "tratamiento profiláctico" según la invención debe entenderse en el sentido de que el ácido polisiálico se puede aplicar antes de

que se manifiesten los síntomas de las enfermedades. Especialmente, la expresión "tratamiento profiláctico" debe entenderse en el sentido de un tratamiento médico. Se puede preferir usar los compuestos de acuerdo con la invención en un tratamiento profiláctico.

5 Sorprendentemente, se encontró que el ácido polisialílico (1) y la composición de polisacáridos que comprende el ácido polisialílico (1), respectivamente, pueden ser eficaces en una terapia antiinflamatoria microglial. En particular, el ácido polisialílico (1) demostró ser eficaz en la prevención de la activación microglial de la retina en un modelo animal de degeneración de la mácula. Por consiguiente, el ácido polisialílico (1) proporciona un nuevo enfoque para el tratamiento terapéutico y profiláctico de las enfermedades degenerativas o inflamatorias de la retina.

10 Una ventaja particular adicional del ácido polisialílico de acuerdo con la invención es que el ácido polisialílico (1) demostró ser eficaz en la prevención de los síntomas de la enfermedad en un modelo animal de esclerosis múltiple. En particular, hasta la fecha no existe una terapia satisfactoria para prevenir la pérdida de sinapsis, axones o neuronas, el ácido polisialílico (1) proporciona un posible uso nuevo y muy deseado en el tratamiento de enfermedades degenerativas, desmielinizantes e inflamatorias del sistema nervioso central.

15 Se supone que las enfermedades degenerativas, desmielinizantes e inflamatorias del sistema nervioso central y las enfermedades degenerativas o inflamatorias de la retina están asociadas con la producción de TNF-alfa por la microglía o por macrófagos tisulares o la producción microglial de especies reactivas de oxígeno, que el ácido polisialílico (1) puede evitar. Sin pretender quedar ligado a una teoría especial, se supone que las enfermedades pueden estar asociadas con la microglía o macrófagos tisulares que expresan Siglec-11.

20 En una realización preferida, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y parasomnia. La expresión "esclerosis lateral amiotrófica" (CIE-10: G12.2) de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de una enfermedad inflamatoria y degenerativa progresiva de las neuronas motoras con mal pronóstico. La expresión "enfermedad de Parkinson" (CIE-10: G20) se refiere a una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas y conduce a trastornos extrapiramidales y del movimiento. El término "parasomnia" (CIE-10: F51.3/F51.4) de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de un trastorno del sueño que involucra movimientos, comportamientos, emociones, percepciones y sueños anormales y no naturales durante el sueño que con frecuencia se producen como signos prodromáticos de la enfermedad de Parkinson. La expresión "enfermedad de Alzheimer" (CIE-10: G30) de acuerdo con la invención, se refiere a una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central asociada con las placas beta-amiloides extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos de tau hiperfosforilada. La expresión "deterioro cognitivo leve" (CIE-10: G31.84) se refiere a un deterioro cognitivo asociado con frecuencia con la pérdida de memoria y frecuentemente visto como un estadio prodromático de la enfermedad de Alzheimer. La expresión "demencia con cuerpos de Lewy" (CIE-10: G31.8) se refiere a un tipo de demencia estrechamente asociada con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson.

30 Se pudo demostrar que el ácido polisialílico (1) fue eficaz en la prevención de la neurotoxicidad en un sistema de cocultivo de neuronas humanas y microglía humana. Además, se pudo demostrar que el ácido polisialílico (1) previno la liberación de superóxido en la microglía humana que se indujo por las beta-amiloides asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Además, se pudo demostrar que el ácido polisialílico (1) previno la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno de la microglía humana y previno el daño a las neuronas en un modelo de cocultivo de microglía-neurona humana de la enfermedad de Parkinson.

40 En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central se selecciona entre encefalopatía séptica, sepsis grave con afectación mental o episodios sépticos asociados con enfermedades neurodegenerativas, a menudo asociadas con la progresión de la enfermedad de Alzheimer. La expresión "encefalopatía séptica" o "sepsis grave" o "episodios sépticos" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de una reacción inflamatoria sistémica del cuerpo inducida por una infección microbiana o toxinas microbianas (CIE-10: R65). La sepsis grave se asocia con frecuencia con una encefalopatía que puede conducir a delirios y déficits cognitivos permanentes. Se pudo demostrar que el ácido polisialílico (1) fue eficaz en la prevención de la respuesta proinflamatoria inducida por un estado similar a la sepsis crónica mediante la aplicación repetida del polisacárido de la toxina bacteriana.

50 En una realización preferida, la enfermedad retiniana degenerativa o inflamatoria se selecciona de la degeneración de la mácula relacionada con la edad, la degeneración retiniana que incluye enfermedades hereditarias de la retina, uveítis y retinopatía diabética. Las expresiones "senil" o "degeneración macular relacionada con la edad" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de una enfermedad atrófica o exudativa (CIE-10: H35.3) de la retina con degeneración de la mácula y el polo posterior asociada con frecuencia con drusas. La degeneración macular relacionada con la edad es una enfermedad degenerativa de la mácula, una parte especializada de la retina necesaria para el color y la visión aguda. Esta enfermedad implica microglía activada. Además, los vasos neovasculares muestran una mayor filtración y un epitelio atrófico del pigmento retiniano asociado con los depósitos de drusas. La degeneración macular relacionada con la edad conduce a una pérdida significativa de neuronas de la retina y, por lo tanto, es una causa importante de ceguera legal. Ventajosamente, el ácido polisialílico (1) demostró

ser particularmente eficaz en la prevención de la activación microglial de la retina y la inflamación asociada a la filtración vascular en un modelo animal de degeneración macular. El término "uveítis" de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de "uveítis autoinmunitaria" (CIE-10: H20), una inflamación crónica de la úvea causada por una hiperreactividad del sistema inmunitario, que puede afectar a cualquier parte de la tracto uveal y la retina. La expresión "retinopatía diabética" (CIE-10: H36) de acuerdo con la invención debe entenderse en el sentido de cambios microvasculares diabéticos e inflamatorios de la retina que conducen a daño retiniano.

Una enfermedad desmielinizante preferida del sistema nervioso central es la esclerosis múltiple. La expresión "esclerosis múltiple" (CIE-10: G35) de acuerdo con la invención, debe entenderse en el sentido de una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central desencadenada por un ataque autoinmunitario dirigido contra proteínas de la mielina y que finalmente conduce a la degeneración axonal y la pérdida de neuronas. La expresión "enfermedad de Devic" (CIE-10: G36.0) de acuerdo con la invención, debe entenderse en el sentido de una enfermedad desmielinizante del nervio óptico y la médula espinal desencadenada por un ataque autoinmunitario dirigido contra antígenos gliales y que finalmente conduce a la degeneración axonal y la pérdida de neuronas. Por lo tanto, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Devic también pueden considerarse una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central. Ventajosamente, el ácido polisialílico (1) demostró ser eficaz en la mejora de los síntomas clínicos en un modelo animal de esclerosis múltiple.

El ácido polisialílico (1) puede ser ácido polisialílico poli(enlace 2.8) o poli(enlace 2.9), preferentemente un ácido polisialílico poli(enlace 2.8). Preferentemente, los monómeros Neu5Ac están unidos por un enlace α (2 \rightarrow 8). Preferentemente, el ácido polisialílico es ácido polisialílico poli(α (2 \rightarrow 8) Neu5Ac)_n. En una realización preferida, n es un número entero en el intervalo de 16 a 24. En una realización preferida adicional, n es un número entero en el intervalo de 18 a 20. Preferentemente, el ácido polisialílico es un polímero no ramificado. En una realización preferida, el ácido polisialílico forma un polímero lineal compuesto de monómeros Neu5Ac α (2.8 unidos). Preferentemente, el ácido polisialílico está en forma de polisacárido libre. En realizaciones adicionales, el ácido polisialílico puede unirse glicosídicamente a al menos un azúcar seleccionado del grupo que comprende glucosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, fucosa, manosa y xilosa. Además, el ácido polisialílico o el ácido polisialílico a través de un azúcar unido glicosídicamente puede unirse glicosídicamente a uno o más aminoácidos para formar glicoproteínas.

Se pudo demostrar que el ácido polisialílico (1) no mostró neurotoxicidad en neuronas humanas cultivadas. Ventajosamente, el ácido polisialílico (1) puede pasar la barrera hematoencefálica y alcanzar el parénquima del sistema nervioso central después de la aplicación sistémica. Por consiguiente, el ácido polisialílico (1) exhibe una farmacocinética y farmacotoxicología adecuadas para su uso en la terapia de enfermedades neurodegenerativas.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un ácido polisialílico (1) o la composición de polisacáridos que comprende el ácido polisialílico (1) de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica es particularmente utilizable en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad seleccionada de enfermedades degenerativas, desmielinizantes e inflamatorias del sistema nervioso central y enfermedades degenerativas o inflamatorias de la retina.

El vehículo farmacéutico puede ser, por ejemplo, un sólido, líquido o gas. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de formulación para formulaciones farmacéuticas. Los ejemplos de vehículos sólidos incluyen lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábiga, estearato de magnesio y ácido esteárico. Los ejemplos de vehículos líquidos son jarabe de azúcar, aceite de cacahuete, aceite de oliva y agua. Los ejemplos de vehículos gaseosos incluyen dióxido de carbono y nitrógeno. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y prepararse en condiciones estériles usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas en la técnica de farmacia.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para administración oral, dérmica, rectal, tópica y parenteral. Preferentemente, la composición farmacéutica se aplica por vía parenteral, oral o rectal, como aplicación local en la piel o en los ojos. La administración parenteral incluye particularmente inyección intravítrea, inyección subcutánea, inyección intravenosa o perfusión. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable o perfusión incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. Además, se puede incluir un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula como una solución inyectable estéril para administración parenteral. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra como una inyección intravítrea, inyección subcutánea, inyección intravenosa o perfusión.

La presente divulgación también se refiere al uso de un ácido polisialílico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) que se proporciona a continuación y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo:

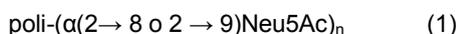


en la que:

- 5 Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

10 o una composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1), en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y ≥ 90 % en peso a ≤ 100 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el % en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, para la fabricación de un medicamento.

- 15 La presente divulgación se refiere particularmente al uso de un ácido polisiálico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) que se proporciona a continuación y/o sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



20 en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

25 o una composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1), en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y ≥ 90 % en peso a ≤ 100 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y ≥ 0 % en peso a ≤ 5 % en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el % en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad seleccionada del grupo que comprende enfermedades degenerativas, desmielinizantes e inflamatorias del sistema nervioso central y enfermedades degenerativas o inflamatorias de la retina.

35 A menos que se definan de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

- 40 Los Ejemplos que siguen sirven para ilustrar la invención con más detalle, pero no constituyen una limitación de la misma.

Las figuras muestran:

- 45 **Figura 1** la caracterización de los fragmentos de ácido polisiálico (PSA). La Figura 1A muestra un gel de poliacrilamida del educto PSA-180 después de la fragmentación tratada térmicamente que representa las diferentes fracciones después de la HPLC preparativa, y la Figura 1B muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida del educto PSA-180 y las fracciones agrupadas 2 a 6 (PSA-20) y 26 a 30 (PSA-60).
- 50 **Figura 2** los resultados de la determinación de la toxicidad del PSA-20 de bajo peso molecular en la microglía humana que expresa Siglec-11. La Figura 2A muestra la expresión en la superficie celular de Siglec-11 (Ac de Siglec-11) en las líneas microgliales humanas mediante citometría de flujo frente a un anticuerpo de isotipo irrelevante (Ac de isotipo control). La Figura 2B muestra la viabilidad celular determinada por un ensayo de MTT y normalizada al número de células después de 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de ácidos monosálico, oligosálico y polisiálico. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, ANOVA seguida de Bonferroni.
- 55 **Figura 3** transcritos del gen para TNF-alfa de la línea celular microglial humana después del tratamiento con lipopolisacáridos (LPS, 1 µg/ml) y diferentes concentraciones de ácidos monosálico, oligosálico y polisiálico durante 24 horas. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni.
- 60 **Figura 4** la liberación de superóxido (según lo detectado por DHE) de la célula microglial humana tratada con diferentes concentraciones de ácido polisiálico de bajo peso molecular (PSA-20; PSA marcado) y la adición de β_{1-42} amiloide fibrilar (A β , 10 µM). La Figura 4B muestra la liberación relativa de superóxido de microglía después del tratamiento con β_{1-42} amiloide (control, barras negras) en comparación con la microglía tratada con Trolox y SOD1. La Figura 4C muestra un cocultivo de la línea celular microglial humana teñida con anticuerpos dirigidos contra Iba1 y neuronas derivadas de células madre
- 65

5 pluripotentes inducidas humanas teñidas con anticuerpos dirigidos contra β tubulinaIII. La Figura 4D muestra la longitud relativa de las neuritas como una medida de neurotoxicidad en el cocultivo de microglía-neuronas humanas tratadas con ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20; PSA marcado). Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. **p < 0,01, ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 4E muestra células de un cocultivo de 48 h de microglía y neuronas humanas tratadas con β_{1-42} amiloide fibrilar (A β) o PSA-20 y A β y doble inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra la proteína del marcador microglial Iba1 y la proteína del marcador neuronal b-tubulina -III. Barra de escala: 100 μ m. La Figura 4F muestra la longitud relativa de las neuritas de las neuronas humanas y las neuronas después de la adición de microglía, β_{1-42} amiloide, o microglía y β_{1-42} amiloide después de 48 horas. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 4G muestra la longitud relativa de las neuritas de las neuronas humanas en un cocultivo de microglía-neuronas como se determina a partir de la inmunotinción neuronal. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni.

10

15 **Figura 5** el efecto del PSA-20 de bajo peso molecular sobre la producción inducida por lipopolisacáridos de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) de macrófagos humanos que expresan Siglec-11. La Figura 5A muestra la expresión en la superficie celular de Siglec-11 (Ac de Siglec-11) en las líneas de macrófagos humanas THP-1 mediante citometría de flujo frente a un anticuerpo de isotipo irrelevante (Ac de isotipo control). La Figura 5B muestra la transcripción génica de TNF-alfa después de la activación de la microglía por lipopolisacáridos (LPS) y el tratamiento con diferentes concentraciones de PSA-20 según lo determinado por qRT-PCR y normalizado a GAPDH. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. ***p < 0,001, ANOVA seguida de Bonferroni.

20

Figura 6 la reducción de las citoquinas proinflamatorias en el cerebro de ratones transgénicos Siglec-11 humanizados mediante tratamiento con PSA-20 de bajo peso molecular. La Figura 6A muestra el esquema de tratamiento, la Figura 6B los transcritos del gen para TNF-alfa según se determina desde el cerebro, y la Figura 6C los transcritos del gen para TNF-alfa según se determina a partir del tejido del bazo. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. p < 0,01, ANOVA seguida de Bonferroni.

25

Figura 7 el efecto del PSA-20 de bajo peso molecular en la microglía retiniana que expresa Siglec-11 y la filtración vascular en un modelo animal de degeneración macular. La Figura 7A muestra la detección de transcritos del gen Siglec-11 por RT-PCR en retina humana. La Figura 7B muestra el efecto del PSA-20 (PSA) sobre la liberación de superóxido microglial después de la estimulación con residuos de tipo drusas (residuos neurales). La Figura 7C muestra el efecto del PSA-20 en la liberación de superóxido microglial después de la estimulación con residuos tipo drusas obtenidos de células de epitelio pigmentario de la retina humanas y controles con Trolox. Los datos se presentan como media +/-EEM de al menos 3 experimentos independientes. ANOVA post Bonferroni *p \leq 0,05; ***p \leq 0,01. La Figura 7D muestra a las 48 horas después de la lesión con láser la relación de la microglía ameboide activada con la microglía total determinada mediante inmunotinción dirigida contra Iba-1 después de la inyección intravítrea de PSA-20 (3 μ g/por ojo) o vehículo control en ratones transgénicos Siglec-11 humanizados. La Figura 7E muestra a las 48 horas después de la lesión con láser la filtración vascular después de la inyección intravítrea de PSA-20 (3 μ g/por ojo) vehículo control en ratones transgénicos Siglec-11 humanizados. La Figura 7F muestra la angiografía con fluoresceína y la Figura 7G el análisis de la filtración vascular a las 48 horas después de la lesión con láser de la retina, y la inyección intravítrea de PSA-20 (3 μ g/por ojo) o vehículo control en ratones transgénicos Siglec-11 humanizados y control con un mayor número de retinas (n \geq 8) por grupo experimental. Los datos se presentan como media +/-EEM en la Fig7B y D y +/-DE para la Fig7E y Fig.7G. *p < 0,05, **p < 0,01.

30

Figura 8 la puntuación clínica de los ratones transgénicos Siglec-11 humanizados y los ratones de control de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental tratados con PSA-20 o vehículo control. La Figura 8A muestra la puntuación clínica como media +/-DE desde el día de la inmunización hasta el día 25 de los ratones tratados con PSA-20 o con vehículo control. La Figura 8B muestra la puntuación acumulada de la enfermedad desde el primer día de tratamiento hasta el día 25 de los ratones transgénicos Siglec-11 y de control tratados con PSA-20 o vehículo control. Los datos se presentan como la media +/-EEM. *p < 0,05, ***p < 0,01, ANOVA seguida de Bonferroni.

35

Figura 9 el efecto del PSA-20 en un modelo de enfermedad de Parkinson. La Figura 9A muestra a la izquierda imágenes de escaneo láser confocal de neuronas con microglía activada por LPS (microglía activada), ya sea sin tratar o tratadas con PSA-20 (PSA). Barra de escala: 100 μ m. A la derecha, La figura 9A muestra la longitud relativa cuantificada de las ramas de neuritas. Los datos se presentan como la media +/-EEM. ***p < 0,001, ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 9B muestra a la izquierda la reconstrucción 3D confocal de una célula microglial que ha ingerido residuos neurales, y a la derecha el porcentaje de fagocitosis para las células microgliales tratadas con PSA20 0,15 μ M, 0,5 μ M o 1,5 μ M contra células de control no tratadas. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 9C muestra a la izquierda la liberación relativa de superóxido de microglía desencadenada por residuos neurales con o sin tratamiento previo con PSA-20 contra células no tratadas (NT). *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 9C muestra a la derecha la liberación relativa de superóxido por residuos neurales con o sin pretratamiento con PSA-20 contra células no tratadas (UT) para células tratadas con Trolox y

40

45

50

55

60

65

SOD1 y células control.

Figura 10 farmacocinética y farmacotoxicología de PSA-20. La Figura 10A muestra la viabilidad celular de las neuronas humanas a las 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de PSA-20 contra un control no tratado (0). Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p<0,5, ANOVA seguida por T2 de Tamhane. La Figura 10B muestra los transcritos de genes para TNF- α de una línea celular microglial humana después del tratamiento con 1 μ g/ml de LPS y diferentes concentraciones de PSA-20 durante 24 horas y un control no tratado (NT). Los datos se presentan como la media +/-EEM. *p <0,05, **p < 0,01; ***p < 0,001; ANOVA seguida de Bonferroni. La Figura 10C muestra la cantidad de PSA-20 (μ g/ml) en suero y cerebro antes de la aplicación y a las 0,5, 1, 2, 4 y 8 horas después de la aplicación.

Ejemplo 1

Fragmentación y separación de ácido polisialílico

El ácido polisialílico α 2.8 purificado disponible comercialmente (250 mg, ácido polisialílico con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, R. U., Lipoxen, denominado, en el presente documento, PSA-180) producido por bacterias y purificado por varios procedimientos se utilizó para la fragmentación. En una etapa preparativa, las muestras se calentaron a 80 °C durante 30 minutos para inducir la hidrólisis espontánea. A continuación, el PSA se sometió a una columna de intercambio aniónico de 53 ml HRP de sefarosa (GE-Healthcare) y se separó mediante un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplado a un detector fotométrico de UV a 205/280 nm (Pharmacia Biotech) y utilizando un tampón NH_4HCO_3 2M como disolvente con un caudal de 4 ml/minuto (Tabla 1). El flujo continuo se recogió en 90 tubos con un volumen respectivo de 8 ml. Cada tres tubos consecutivos se agruparon para obtener 30 fracciones de PSA-180.

Tabla 1. Condiciones de elución de la HPLC preparativa

volumen de elución de NH_4HCO_3		tiempo de elución de NH_4HCO_3	
en ml	en %	en minutos	en %
0	30	0	30
110	50	440	50
115	100	460	100
125	100	500	100
130	0	520	0
160	0	640	0

Se recogieron las fracciones obtenidas de la HPLC con la columna de intercambio aniónico de sefarosa. Las fracciones 2-6 se agruparon (etiquetadas, en el presente documento, como PSA-20). Las fracciones 26-30 se agruparon (etiquetadas, en el presente documento, como PSA-60). Para deshacerse de los residuos del tampón, las muestras se liofilizaron y se disolvieron en PBS o agua destilada. La cuantificación de la concentración del PSA-20 y PSA-60 se realizó con un método a base de ácido tiobarbitúrico. Por lo tanto, el ácido polisialílico se trató previamente con H_2SO_4 1 M a 80 °C durante 1 hora para hidrolizar el polímero en ácido n-acetilneuramínico sencillo (monómeros de ácido siálico). El volumen total de las muestras respectivas para esta primera etapa debe ser 50 μ l (compuesto de 10 μ l de la fracción que contiene PSA + 30 μ l de H_2O + 10 μ l de H_2SO_4 5M). Para la determinación de la concentración, se preparó una concentración patrón que contenía 0-50 μ g de ácido n-acetilneuramínico (Nacalai Tesque ING, Japón) por 50 μ l. Las muestras patrón y de prueba se trataron con 25 μ l de ácido peryódico 25 mM en H_2SO_4 0,125 M y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Después de la etapa de incubación, se agregaron 20 μ l de solución de arsenito de sodio al 2 % (en HCl 0,5 N) a cada muestra para reducir el exceso de peryodato. Después de 2 minutos a temperatura ambiente, se administraron a las muestras 200 μ l de ácido 2-tiobarbitúrico (0,1 M, pH 9). Posteriormente, se realizó una etapa de calentamiento (7,5 minutos a 99 °C) que causó la formación de un complejo de color rojo. La solución se enfrió en hielo durante 5 minutos y después se agitó con 500 μ l/butanol ácido de muestra (butan-1-ol más 5 % de HCl 12N). Una centrifugación rápida apoyó la separación de las fases. La intensidad de la fase superior colorida se midió mediante un espectrómetro a 549 nm. La cuantificación se realizó posteriormente basándose en el patrón de ácido n-acetilneuramínico.

Para el análisis, el PSA-180 y las distintas fracciones se cargaron en un gel de poli(acrilamida al 20 % (todos los componentes de Roth GmbH) y se separaron durante 4 horas por electroforesis a 130V. El gel se tiñó con solución de todos los tintes (Roth GmbH) durante la noche y posteriormente se lavó con agua destilada. En la Figura 1A se muestra un gel de poli(acrilamida de PSA-180 fragmentado antes y después de la separación por HPLC. El tratamiento térmico condujo a la hidrólisis espontánea de PSA-180 en fragmentos de varios tamaños. El PSA-180 fragmentado se muestra en la figura 1A. La separación de los fragmentos por tamaño se realizó por HPLC dando lugar a 30 fracciones. Las fracciones 2-6 (PSA-20) y las fracciones 26-30 (PSA-60) se agruparon respectivamente (Figura 1A). En la Figura 1B se muestra otro gel de poli(acrilamida de PSA-180, PSA-60 y PSA-20. El material original de PSA-180 tenía un tamaño molecular mayor entre 25 y 80 kDa. Las fracciones 26-30 tenían un peso molecular entre aproximadamente 14,2 y 34 kDa (PSA-60), como se puede ver en la figura 1B. Las fracciones

agrupadas 2-6 tenían un peso molecular entre 4,3 y 8,0 kDa. Este ácido polisialico de bajo peso molecular (PSA-20) también se muestra en la figura 1B.

5 Un peso molecular entre 4,3 y 8,0 kDa de la fracción PSA-20 corresponde a una longitud de cadena de $n = 14$ monómeros a $n = 26$ monómeros. Menos del 5 % de los fragmentos en la fracción PSA-20 tenía un peso molecular inferior a 4,3 kDa o superior a 8,0 kDa, respectivamente. El peso molecular medio de los fragmentos de ácido polisialico de la fracción PSA-20 estaba entre aproximadamente 4,9 ($n = 16$ monómeros) y 7,4 kDa ($n = 24$ monómeros).

10 Ejemplo 2

Fragmentación y separación del ácido polisialico preparado a partir de *E. coli* K1

15 La fragmentación y separación del ácido polisialico se repitió utilizando ácido polisialico $\alpha 2.8$ purificado con un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (PSA-180) preparado a partir de *E. coli* K1 como lo describe Bice I. et al., Eng. Life Sci. 2013, 13, No. 2, 140-148. La preparación utilizando HPLC preparativa se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Como se describe, las fracciones de HPLC 2 a 6 se agruparon y se denominaron PSA-20.

20 Para el análisis de tamaño de máximo, el PSA-20 y las distintas fracciones se cargaron en un gel de poli(acrilamida al 20 % (todos los componentes de Roth GmbH) y se separaron durante 4 h mediante electroforesis a 130V. Se usaron dextranos sulfatado de tamaños conocidos (TdB Consultancy) como patrones. Posteriormente, el gel se tiñó mediante un protocolo de Goldberg y Warner (Goldberg y Warner, 1997) durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con la solución Stains All (Tris 30 mM, isopropanol al 25 %, formamida al 7,5 % y 0,025 % (p/v) a pH 8,8). Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada incluyendo isopropanol al 25 % para aclarar el fondo. Como etapa adicional, el gel se tiñó con una solución de nitrato de plata (12 mM) durante 20 minutos y un revelador (carbonato de sodio 0,28 M más 0,15 % (v/v) en agua desionizada) durante 5 a 30 minutos. La reacción del revelador se detuvo con ácido acético al 10 %.

30 Para un análisis de la distribución de tamaños, el PSA-20 se sometió a una columna de intercambio aniónico HRP-Sepharose (GE-Healthcare) y se analizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplado a un detector fotométrico de UV a 205/280. nm (Pharmacia Biotech). El flujo continuo se analizó y mostró máximos distintos que dependen del número de monómeros de ácido siálico. El tiempo de retención mostró la longitud exacta del ácido polisialico. Se utilizó como control un patrón con una longitud definida de 6 polímeros de ácido N-acetilneuramínico (Nacalai Tesque ING, Japón).

35 La electroforesis en gel confirmó que las fracciones agrupadas 2 a 6 (PSA-20) tenían un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 ($n = 16$ monómeros) y 7,4 kDa ($n = 24$ monómeros). En total, el 90 % o más en peso de la fracción PSA-20 tenía una longitud de cadena de polímero entre $n = 14$ y $n = 26$ monómeros, según lo determinado por la HPLC analítica. Una longitud de cadena de $n = 14$ monómeros a $n = 26$ monómeros de la fracción PSA-20 corresponde a un peso molecular entre 4,3 y 8,0 kDa. Menos del 5 % en peso de los fragmentos en la fracción PSA-20 tenía menos de 14 monómeros (un peso molecular menor que 4,3 kDa) y menos del 5 % en peso de los fragmentos en la fracción PSA-20 tenía más de 26 monómeros (superior a 8,0 kDa), respectivamente.

45 Esto mostró que la preparación de PSA-20 era reproducible. En los experimentos descritos a continuación, se utilizó el PSA-20 preparado de acuerdo con el ejemplo 1.

Ejemplo 3

50 Determinación de la citotoxicidad de diferentes formas de ácido siálico en microglía

Se usó una línea de microglía humana derivada de células madre pluripotentes inducidas como se describe en el documento WO 2010/125110 para estudiar el efecto de las formas de ácido siálico con diferentes longitudes de cadena. Las células microgliales humanas se cultivaron en placas recubiertas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de poli-L-lisina (PLL, Sigma) en medio N2 que contenían medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) suplementado con N2 al 1 % (Invitrogen), L-glutamina 0,48 mM (Gibco) y opcionalmente 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se cultivaron con alta densidad y se dividieron a 1:2 cuando fue necesario.

60 Siglec-11 se detectó en las líneas de microglía humana mediante citometría de flujo, como se puede ver en la Figura 2A. Para el análisis de citometría de flujo, la línea de microglía humana derivada de células madre pluripotentes inducidas, que se generó a partir de células madre pluripotentes inducidas en el laboratorio de los presentes inventores, se tiñó para la expresión proteica de Siglec-11 utilizando un anticuerpo primario de cabra anti Siglec-11 humana biotinilado (R&D Systems) seguido de un anticuerpo secundario marcado con PE fluorescente conjugado con estreptavidina (Dianova, Alemania). Las muestras de control se incubaron con anticuerpos de control. El análisis por citometría de flujo confirmó la expresión de Siglec-11 en la mayoría de las células microgliales, como se puede ver en la Figura 2A.

El efecto de diferentes longitudes y fracciones de los ácidos oligosíalicos y ácidos polisíalicos sobre las líneas microgliales humanas se analizó mediante la determinación de la viabilidad celular normalizada al número de células y después del tratamiento con ácido siálico monomérico (AS, peso molecular de 0,3 kDa, Nacalai Tesque ING, Japón) y ácidos siálicos que consisten en 3 monómeros (Tri-AS; peso molecular de 0,9 kDa, Nacalai Tesque ING, Japón) y ácidos siálicos que consisten en 6 monómeros (Hexa-AS; peso molecular de 1,9 kDa, Nacalai Tesque ING, Japón), PSA con un número de monómeros de ácido siálico entre 14 y 26 (PSA-20; bajo peso molecular de PSA entre 4,3 y 8 kDa para > 90 % de la sustancia) y PSA con una longitud entre 46 y 110 de monómeros de ácido siálico (PSA-60; peso molecular medio de PSA entre 14,2 y 34 kDa para > 90 % de la sustancia).

10 Las células microgliales se cultivaron en medio como se describe anteriormente y se trataron en cultivo con las diferentes formas de ácido siálico.

15 La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio, Millipore) después de 24 horas de tratamiento con distintas formas de ácido siálico con diferente longitud de cadena y normalizadas al número de células. La absorbancia de luz del formazán púrpura en células vivas se determinó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm (Perkin Elmer, Envision Multiplate Reader). Como puede verse en la figura 2B, el monómero de ácido siálico (AS), el ácido oligosíalico con 3 (Tri-AS) o 6 (Hexa-SA) monómeros y el ácido polisíalico de bajo peso molecular (PSA-20) no afectaron la actividad metabólica de las células microgliales. Sin embargo, la actividad metabólica de las células se redujo significativamente después de la adición de ácido polisíalico de peso molecular medio (PSA-60) a una concentración de 0,15 μ M, 0,5 μ M y 1,5 μ M. Además, la actividad metabólica de las células se redujo significativamente después de la adición de ácido polisíalico de alto peso molecular (PSA-180) a una concentración de 0,15 μ M, 0,5 μ M y 1,5 μ M.

25 Por consiguiente, se pudo demostrar que el PSA-20 de bajo peso molecular no causó signos de toxicidad en la microglía humana que expresa Siglec-11, mientras que el ácido polisíalico de peso molecular medio (PSA-60) y el ácido polisíalico de alto peso molecular (PSA-180) estaban afectando la viabilidad de las células microgliales humanas, un efecto no deseado de un agente medicinal potencial.

30 Ejemplo 4

Determinación del efecto de diferentes formas de ácido siálico sobre la producción del factor de necrosis tumoral alfa de la microglía humana activada

35 Para analizar si el ácido polisíalico podría interferir con un fenotipo proinflamatorio de la microglía humana, la microglía humana cultivada se activó con lipopolisacáridos (LPS) y se determinó el efecto de las distintas formas de ácido siálico, incluidas las fracciones de ácido oligosíalico y polisíalico sobre la transcripción génica de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa inducida por la toxina bacteriana LPS. Se usó una línea de microglía humana derivada de células madre pluripotentes inducidas como se describe en el documento WO 2010/125110 para estudiar el efecto de las formas de ácido siálico con diferentes longitudes de cadena. Las células microgliales humanas se cultivaron en placas recubiertas con 5 μ g/ml de poli-L-lisina (PLL, Sigma) en medio N2 que contenían medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) suplementado con N2 al 1 % (Invitrogen), L-glutamina 0,48 mM (Gibco) y opcionalmente 100 μ g/ml de penicilina/estreptomina (Gibco). Las células se cultivaron con alta densidad y se dividieron a 1:2 cuando fue necesario. La línea de microglía derivada de células madre pluripotentes inducida humana se trató con lipopolisacáridos (LPS, 1 μ g/ml, Invitrogen) y formas de ácido siálico con diferente longitud de cadena durante 24 horas. Los transcritos génicos para el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa y se normalizaron a GAPDH. En detalle, el aislamiento de ARN se realizó utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen) y la transcripción con el sistema de síntesis SuperScript First-Strand (Invitrogen). RT-PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos (GAPDH):

50 CTGCACCACCAACTGCTTAG (SEQ ID NO: 1) y TTCAGCTCAGGGATGACCTT (SEQ ID NO: 2); TNF α :
GACAAGCCTGTAGCCCATGT (SEQ ID NO: 3) y
AGGACCTGGGAGTAGATGAGG (SEQ ID NO: 4)) se realizó utilizando la mezcla maestra de PCR verde SYBR con los epradientes S de Mastercycler (Eppendorf). Los resultados se normalizaron a GAPDH. Se realizó la cuantificación mediante el método delta-CT.

55 Tal como puede observarse en la figura 3, el ácido siálico como ácido neuramínico monomérico (AS) no cambió significativamente la transcripción génica inducida por LPS de TNF- α . Igualmente, el ácido siálico con una longitud de 3 o 6 (Tri-AS, Hexa-AS) tampoco cambió significativamente la transcripción génica inducida por LPS de TNF- α . Por el contrario, el PSA de bajo peso molecular (PSA-20) tuvo un efecto dependiente de la dosis sobre la microglía humana estimulada por LPS, como se puede ver en la Figura 3. PSA-20 a una concentración de 0,15 μ M, 0,5 μ M y 1,5 μ M redujeron la transcripción génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α . También el PSA de tamaño medio (PSA-60) tuvo un efecto significativo en la prevención de la transcripción del gen de la citoquina TNF- α inducida por LPS, como se puede ver en la Figura 3. Sin embargo, no se observó un efecto antiinflamatorio significativo del ácido polisíalico de alto peso molecular (PSA-180) en la transcripción del gen de la citoquina TNF- α inducida por LPS, como se puede ver en la Figura 3.

Por consiguiente, se puede observar que el ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) previene la producción de citoquinas proinflamatorias de la microglía humana.

- 5 La siguiente tabla 2 resume los resultados de la determinación de la citotoxicidad y el efecto de los diferentes ácidos siálicos sobre la producción inducida por lipopolisacáridos de la producción de factor de necrosis tumoral alfa de la microglía humana según se determina en los Ejemplos 3 a 4.

Tabla 2: Criterios de selección para uso terapéutico de ácidos siálicos

Células microgliales humanas tratadas con	Número de monómeros (máximo)	Viabilidad intacta de la microglía humana	Efecto antiinflamatorio sobre TNF-alfa de la microglía humana activada por LPS	Idoneidad para la terapia antiinflamatoria microglial
AS	1	Sí	No	No
Tri-AS	3	Sí	No	No
Hexa-AS	6	Sí	No	No
PSA-20	20	Sí	Sí	Sí
PSA-60	60	No	Sí	No
PSA-180	180	No	No	No

- 10 Como se puede ver en los Ejemplos 3 a 4 y el resumen en la tabla 2, los fragmentos de ácido siálico son más pequeños que el ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20), denominados, monómero (AS), trímero (Tri-AS) y hexámero (Hexa-AS) de ácido siálico, no causaron signos de toxicidad en la microglía humana, pero tampoco tuvo efecto antiinflamatorio en la liberación de TNF-alfa en la microglía humana. Por otro lado, el ácido polisialílico de peso molecular medio (PSA-60) y el ácido polisialílico de alto peso molecular (PSA-180), los que tienen mayor peso molecular y longitud de cadena, afectaron la viabilidad de la microglía humana. Como consecuencia, solo los fragmentos de ácido polisialílico de bajo peso molecular que tienen una longitud de cadena en el intervalo de 14 a 26 monómeros (PSA-20) demostraron ser adecuados para la terapia antiinflamatoria microglial y un uso terapéutico en seres humanos.

20 Ejemplo 5

Determinación del efecto del ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) sobre la producción de oxígeno reactivo de la microglía humana y sobre la neurotoxicidad mediada por la microglía en un sistema modelo de cultivo de la enfermedad de Alzheimer desencadenado por β_{1-42} amiloide

- 25 La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que comienza con la acumulación extracelular de péptido β_{1-42} amiloide agregado y progresa mediante la activación de la microglía, la producción de especies reactivas de oxígeno y la pérdida de sinapsis y neuritas. Como los modelos de roedores en animales solo son capaces de modelar parcialmente la enfermedad humana, como un sistema modelo adecuado de enfermedad de Alzheimer, se utilizaron neuronas humanas cultivadas conjuntamente y microglía humana a la que se añadió el péptido β_{1-42} amiloide fibrilar, que es capaz de estimular las células de la microglía, asociado a la enfermedad de Alzheimer. Se usó la línea celular de microglía humana derivada de células madre pluripotentes inducidas como se describe en el Ejemplo 4.

- 35 a) Determinación del efecto del ácido polisialílico de bajo peso molecular sobre la producción de superóxido de células microgliales humanas

La línea celular microglial humana se trató con péptido beta-amiloide fibrilar asociado a la enfermedad de Alzheimer ($A\beta$) para imitar la señalización inflamatoria del tejido cerebral de la enfermedad de Alzheimer. Para obtener los componentes fibrilares de $A\beta$, el péptido beta-amiloide sintético (beta 1-42 amiloide, Bachem/Brucker, 10 μM) se preincubó a 37 °C durante al menos tres días. Las células microgliales humanas se trataron con las diferentes concentraciones de 0,15 μM , 0,5 μM o 1,5 μM de ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) durante 60 minutos, seguido de incubación durante 15 minutos con $A\beta$ fibrilar. Después, se añadió dihidroetidio (DHE) 30 μM y se incubó a 37 °C durante 15 minutos para medir la producción de radicales del anión superóxido. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % más glutaraldehído al 0,25 % y se analizaron mediante microscopía confocal. Para la cuantificación de la intensidad de la tinción con DHE, se obtuvieron seis imágenes de cada experimento y se analizaron mediante el software ImageJ (NIH). Se restó el fondo y se compararon los valores medios de las intensidades de tinción. Las células se fijaron y la intensidad de DHE se cuantificó mediante microscopía confocal.

- 50 La Figura 4A muestra el efecto de diferentes concentraciones de PSA-20 sobre la liberación de superóxido inducida por beta-amiloide ($A\beta$) asociado a la enfermedad de Alzheimer. El ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) redujo la liberación de superóxido inducida por $A\beta$ a una concentración de 1,5 μM (Figura 4A).

- 55 Para confirmar la especificidad de la medición de DHE, se repitió la determinación del efecto del PSA-20 sobre la producción de superóxido en células microgliales humanas. Como control, se añadió al sistema el eliminador de

radicales Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua. Además, como control adicional, se añadió superóxido dismutasa-1 (SOD1) en el medio. El superóxido ya no debe ser detectable por el colorante DHE después de la transformación exitosa de superóxido por SOD1.

5 Las células microgliales humanas se cultivaron solas y la producción de especies reactivas de oxígeno se analizó después del tratamiento con las placas de la enfermedad de Alzheimer asociadas a β_{1-42} amiloide fibrilar. Para medir la producción relativa de superóxido por las células microgliales, las células se colocaron en placas de cultivo de 4 cámaras. Después de 24 horas, se trataron células microgliales humanas con 1,5 μM de ácido polisialico de bajo peso molecular (PSA-20) durante 60 minutos, seguido de incubación durante 15 minutos con β_{1-42} amiloide fibrilar
10 10 μM . Las placas de control se trataron con PSA-20 1,5 μM y Trolox 40 μM o PSA-20 1,5 μM y 20 $\mu\text{g/ml}$ de superóxido dismutasa-1 (SOD1, Serva). Después, las células se lavaron 2 veces con tampón Krebs-HEPES y posteriormente se incubaron durante 15 minutos con una solución DHE 30 μM (diluida en tampón Krebs-HEPES). Finalmente, las células se lavaron 2 veces con tampón Krebs-HEPES y se fijaron durante 15 minutos con glutaraldehído al 0,25 % y PFA al 4 %. En total, se recogieron al azar seis imágenes por grupo experimental
15 mediante microscopía de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus). Todas las células de las imágenes recogidas se analizaron mediante el software Image J (NIH).

La Figura 4B muestra la liberación relativa de superóxido después del tratamiento con β_{1-42} amiloide de microglía en comparación con la microglía tratada adicionalmente con Trolox y SOD1. * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Bonferroni.
20 Como se puede ver en la Figura 4B, el tratamiento de microglía con β_{1-42} amiloide estimuló la producción de superóxido, mientras que PSA-20 1,5 μM impidió la estimulación inducida por β_{1-42} amiloide de la producción de superóxido. Trolox eliminó las moléculas de superóxido activadas por β_{1-42} amiloide. Además, la superóxido dismutasa-1 (SOD1) neutralizó la liberación de superóxido activada por β_{1-42} amiloide, indicando que los radicales se produjeron en la membrana celular. Los controles Trolox y SOD1 confirmaron, por lo tanto, que DHE detectó la
25 producción extracelular de superóxido.

Esto muestra que el PSA-20 actuó como neuroprotector en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer humano e inhibió completamente la producción de superóxido de células microgliales humanas que fue estimulada por la placa de la enfermedad de Alzheimer asociada a β_{1-42} amiloide fibrilar.
30

b) Determinación del efecto del ácido polisialico de bajo peso molecular (PSA-20) sobre la neurotoxicidad microglial.

A continuación, la línea microglial humana se cultivó conjuntamente durante 24 horas con neuronas derivadas de células madre pluripotentes inducidas y se evaluó el efecto del ácido polisialico de bajo peso molecular (PSA-20; 1,5 μM) sobre la neurotoxicidad microglial. Las neuronas humanas se generaron a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (células iPS). La diferenciación *in vitro* en neuronas se llevó a cabo utilizando un protocolo corto modificado, que se utilizó para inducir precursores neurales primitivos. En detalle, las células iPS se cultivaron sobre células alimentadoras para formar pequeñas colonias. El siguiente medio se cambió a medio de inducción neural en presencia de LIF y tres moléculas pequeñas CHIR99021 (inhibidor de GSK-3 β) y SB431542 (inhibidor de TGF- β y receptores de activina), y el compuesto E (inhibidor de γ -secretasa) durante 10 días. Para expandir los precursores neurales, las células se disociaron a células sueltas mediante accutase y se colocaron en placas de cultivo celular recubiertas con poli-L-ornitina/fibronectina con medio de inducción en presencia de factor inhibidor de la leucemia (LIF), CHIR99021 y SB431542. Para inducir la diferenciación hacia neuronas, las células precursoras neurales se disociaron con accutase y se agregaron a placas de cultivo celular recubiertas con poli-L-ornitina/laminina en medio de inducción neural hasta que las células se unieron y formaron pequeñas colonias. Después, se cambió el medio a medio de diferenciación neuronal con factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF) durante 2 semanas. El medio se cambió cada dos días. Para los experimentos de cocultivo, se rasparon células microgliales humanas y se agregaron a las neuronas con una proporción de 1:4 microglía: neurona en medio de diferenciación neuronal durante 24 horas con y sin PSA-20 1,5 μM . Las células se lavaron, se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se bloquearon y permeabilizaron con una solución que contiene albúmina de suero bovino 10x (BSA) y suero de cabra normal al 5 % (nGS) y TritonX-100 al 0,1 % durante 60 min. A continuación, las células se inmunotñieron con los primeros anticuerpos (β -tubulina III para neuronas e Iba-1 para células microgliales) durante la noche a 4 °C, seguidos de anticuerpos secundarios durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron diez fotografías aleatorias para cada condición mediante microscopía de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus) y se midió la longitud de las ramas neuronales mediante el software Neuron J (NIH).
35
40
45
50
55

La Figura 4C muestra una inmunotñición del cocultivo. Las células cocultivadas se fijaron con paraformaldehído y se inmunotñieron conjuntamente con anticuerpos dirigidos contra la proteína marcadora microglial Iba1 y la proteína marcadora neuronal β tubulinaIII, seguidas de los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia. La Figura 4D muestra la longitud de neurita relativa determinada a partir de la inmunotñición neuronal con anticuerpos dirigidos contra β tubulinaIII después de 24 horas de cocultivo y adición de PSA-20 (PSA). La línea microglial humana redujo la longitud relativa de la neurita. El PSA-20 previno completamente el efecto neurotóxico de la microglía humana sobre las neuronas humanas como se ve en la Figura 4D.
60
65

c) Determinación del efecto del ácido polisialico de bajo peso molecular sobre la neurotoxicidad microglial en un

tiempo de cocultivo de 48 horas.

Se obtuvieron microglías derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSdM) a partir de células iPS. Se utilizó la línea iPSdM-1 en este estudio generada a partir del clon iLB-C-35m-r1 (Bonn). iPSdM-1 (denominada, en el presente documento, microglía o células microgliales) se cultivaron en medio N2 que consiste en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) suplementado con N2 al 1 % (Invitrogen), L-glutamina 0,48 mM (Gibco) y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco). Las células se cultivaron con alta densidad y se dividieron a 1:5. Después de la división, las células se recuperaron y se unieron nuevamente a las nuevas placas.

Se usaron células madre pluripotentes (iPS) inducidas humanas (Foreskin-1, WiCell) para la generación de células madre neurales primitivas (pNSC) y su diferenciación en neuronas de acuerdo con un protocolo modificado, que se usó para obtener precursores neurales primitivos a partir de células madre embrionarias humanas. En resumen, las células iPS se cultivaron sobre células alimentadoras para formar pequeñas colonias. A continuación, el medio se cambió a medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal; GIBCO) en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF; Millipore, 10 ng/ml) y tres moléculas pequeñas CHIR99021 (inhibidor de GSK-3β, Axon Medchem, 4 µM) y SB431542 (inhibidor de los receptores de TGF-β y activina; Axon Medchem, 3 µM) y Compuesto E (inhibidor de la γ-secretasa; Axon Medchem, 0,1 µM) durante 10 días. Para inducir la diferenciación hacia neuronas, las pNSC se disociaron con accutase (PAA) y se cultivaron en placas de cultivo celular recubiertas con poli-L-ornitina (Sigma, 0,15 mg/ml) más laminina (Sigma, 1 µg/ml) en medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal, más LIF, CHIR99021 y SB431542) hasta que las células se unieron y formaron pequeñas colonias. Después, el medio se cambió a medio de diferenciación neuronal (DMEM/F12, más suplementos de N2 y B27, GIBCO) en presencia de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; 10 ng/ml) y factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF; Prospec, 10 ng/ml) durante 2 semanas. El medio que contenía los factores neurotróficos se cambió cada dos días.

En un experimento de cocultivo, se agregaron células microgliales (línea microglial iPSdM1 derivada de células iPS humanas) en una proporción de 1:5 de microglía a neuronas y β₁₋₄₂ amiloide fibrilar 1 µM a las neuronas derivadas de células iPS con o sin PSA-20 preparadas de acuerdo con el Ejemplo 2 durante 48 horas. En un experimento de control sin PSA-20, se agregaron células microgliales, β₁₋₄₂ amiloide fibrilar 1 µM o células microgliales y β₁₋₄₂ amiloide fibrilar 1 µM a las neuronas derivadas de células iPS durante 48 horas, mientras que un monocultivo de neuronas derivadas de células iPS sirvieron como control.

Las células se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído (PFA) al 4 %, se bloquearon y permeabilizaron durante 60 minutos con una solución que contenía albúmina de suero bovino (BSA al 10 %) y suero normal de cabra (5 % de nGS) y TritonX-100 al 0,1 %. A continuación, se realizó inmunotinción con anticuerpos policlonales de conejo anti Iba1 (Dako) y monoclonales anti-β-tubulina-III (Sigma) durante la noche a 4 ° C seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 dirigido contra IgG de conejo (Molecular Probes) y anticuerpo de cabra Cy3 conjugado dirigido contra IgG de ratón (Dianova) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se recogieron diez imágenes al azar de cada configuración experimental mediante microscopía de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus) y las longitudes totales de las ramas neuronales de neuritas teñidas con β-tubulina-III se determinaron mediante el software NIH ImageJ/NeuronJ.

La Figura 4E muestra las células del cocultivo prolongado de microglía y neuronas humanas tratadas con β₁₋₄₂ amiloide fibrilar (Aβ) o PSA-20 y Aβ y doble inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra la proteína del marcador microglial Iba1 y la proteína del marcador neuronal b-tubulina -III. Barra de escala: 100 µm. Como se puede ver en la Figura 4E, la pérdida de neuritas observada en los cultivos de β₁₋₄₂ amiloide tratados se evitó mediante la adición de PSA-20.

La Figura 4F muestra la longitud relativa de las neuritas de las neuronas humanas y las neuronas después de la adición de microglía, β₁₋₄₂ amiloide, o microglía y β₁₋₄₂ amiloide después de 48 horas como se determina por la inmunotinción neuronal del experimento de control sin PSA-20. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p <0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. Como se puede ver en la Figura 4F, la adición de microglía redujo la longitud relativa de la neurita. Mientras que β₁₋₄₂ amiloide solo no afectó la longitud relativa de la neurita, β₁₋₄₂ amiloide fibrilar agregado al cocultivo microglía-neurona redujo aún más la longitud relativa de la neurita. En detalle, la longitud relativa de las neuritas se redujo de 1 +/- 0,03 a 0,76 +/- 0,02 después de la adición de microglía, y de 0,64 +/- 0,03 después de la adición de microglía y β₁₋₄₂ amiloide. β₁₋₄₂ amiloide solo no tuvo efecto reductor de neuritas en la concentración aplicada.

La Figura 4G muestra la longitud relativa de las neuritas de las neuronas humanas en el cocultivo de microglía-neuronas como se determina a partir de la inmunotinción neuronal. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p <0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. Como se puede ver en la Figura 4G, el PSA-20 no interfirió con el efecto general de reducción de las neuritas de la microglía, pero inhibió completamente el efecto de reducción de las neuritas de β₁₋₄₂ amiloide fibrilar. En detalle, la adición de β₁₋₄₂ amiloide fibrilar redujo la longitud relativa de las neuritas de 0,76 +/- 0,02 a 0,64 +/- 0,03, mientras que el tratamiento con PSA-20 antagonizó este efecto neurotóxico (0,82 +/- 0,03). Por consiguiente, la reducción inducida por β₁₋₄₂ amiloide en la longitud relativa de las neuritas fue antagonizada por el PSA-20.

En resumen, se pudo demostrar que el PSA-20 previno la neurotoxicidad de β_{1-42} amiloide asociado a la enfermedad de Alzheimer en un modelo de cultivo de cerebro humano. Además, el PSA-20 inhibió completamente el estrés oxidativo inducido por la incubación de la microglía humana con β_{1-42} amiloide asociado a la enfermedad de Alzheimer.

5

Ejemplo 6

Determinación del efecto del ácido polisialílico de bajo peso molecular sobre la producción de citoquinas proinflamatorias de macrófagos humanos

10

La línea de monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202) se cultivó en medio RPMI con FCSal 10 %, piruvato de sodio al 1 % y penicilina/estreptomina (100X) al 1 % (todo Gibco, Invitrogen) en 75 ml de matraces de cultivo celular (Sarstedt). Para la diferenciación en macrófagos tisulares, la línea se cultivó durante 3 horas en un medio de cultivo celular normal que contenía forbol 12- miristato 13-acetato 0,5 μ M (Sigma) y posteriormente en medio sin forbol 12- miristato 13-acetato durante al menos 24 horas.

15

Se realizó un análisis por citometría de flujo para analizar la expresión de Siglec-11 sobre el Siglec-11 expresado en la línea de macrófagos humanos. Las células THP-1 se inmunotifieron con anticuerpos específicos de Siglec-11 conjugados con biotina (R&D Systems) seguidos de estreptavidina- FITC. Se usó un anticuerpo de isotipo irrelevante (anticuerpo de isotipo control; R&D Systems) como control (Ac de isotipo control). Se analizaron las células por citometría de flujo (FACS, BD). Como puede verse en la figura 5A, la expresión de Siglec-11 (Ac de Siglec-11 se detectó en una subpoblación de la línea de macrófagos humanos THP-1 mediante citometría de flujo.

20

La Figura 5B ilustra el efecto del PSA de bajo peso molecular (PSA-20) en la citoquina proinflamatoria TNF-alfa. La línea celular de macrófagos humanos THP-1 se trató con lipopolisacáridos (LPS, 1 μ g/ml) y PSA-20 (diferentes concentraciones) durante 24 horas. Los transcritos génicos para el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) se determinaron mediante RT- PCR cuantitativa y se normalizaron a GAPDH. En detalle, el aislamiento de ARN se realizó utilizando el Mini Kit RNeasy (Qiagen) y la transcripción con el sistema de síntesis SuperScript First-Strand (Invitrogen). RT-PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos (GAPDH: CTGCACCACCAACTGCTTAG (SEQ ID NO: 1) y TTCAGCTCAGGGATGACCTT (SEQ ID NO: 2); TNF α : GACAAGCCTGTAGCCCATGT (SEQ ID NO: 3) y AGGACCTGGGAGTAGATGAGG (SEQ ID NO: 4)) se realizó utilizando la mezcla maestra de PCR verde SYBR con los eprgradientes S de Mastercycler (Eppendorf). Los resultados se normalizaron a GAPDH. Se realizó la cuantificación mediante el método delta-CT. Como puede verse en la figura 5B, el ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) redujo la transcripción génica inducida por LPS de TNF-alfa a una concentración de 0,15 μ M y 0,5 μ M.

25

30

35

Por consiguiente, los ejemplos 5 y 6 muestran que el ácido polisialílico de bajo peso molecular PSA-20 tiene amplios efectos antiinflamatorios de la microglía y otros macrófagos tisulares. En el Ejemplo 5, PSA-20 evita la producción microglial de superóxido de las especies reactivas de oxígeno. En el Ejemplo 6, PSA-20 evita la producción de la citoquina proinflamatoria TNF-alfa en macrófagos humanos. Además, el ejemplo 5 ilustra que el PSA-20 de bajo peso molecular previene la producción microglial inducida por beta amiloide de especies reactivas de oxígeno y la neurotoxicidad, sugiriendo, así, un efecto beneficioso de PSA-20 para prevenir la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer.

40

45

Ejemplo 7

Determinación del efecto del ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias en el cerebro de ratones expuestos sistemáticamente por toxinas bacterianas en un modelo animal de encefalopatía séptica

50

Con frecuencia, la sepsis se asocia con un estado hiperinflamatorio que se caracteriza por una disfunción de los fagocitos junto con un aumento del estrés oxidativo y la activación del complemento. Un estado hiperinflamatorio durante la sepsis se desencadena por productos liberados de bacterias, tales como lipopolisacáridos bacterianos (LPS), así como productos de células dañadas. Las células inmunitarias tales como los macrófagos y las células microgliales y sus mediadores inflamatorios, tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), están implicados en la encefalopatía séptica.

55

Se usaron ratones transgénicos Siglec-11 humanizados (Wang Y, 2009,dissertation,UniversityBonn,nombree uniforme del recurso: urn:nbn:de:hbz:5N-18095) que expresan Siglec-11 humana bajo el promotor Iba1 en microglía y ratones control compañeros de camada de tipo silvestre en este experimento. Para el análisis de transcripción génica, se aisló ARN de cerebros con Trizol seguido del Mini Kit RNeasy (Qiagen). La transcripción inversa del ARN se realizó con la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y los cebadores de hexámeros aleatorios (Roche Molecular Biochemicals). La RT- PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos se realizó con mezcla maestra de PCR verde SYBR (Applied Biosystems) utilizando el Sistema de Detección de Secuencias ABI 5700 (Perkin Elmer) y el protocolo de amplificación para el Sistema de Detección de Secuencias ABI 5700. Se utilizaron los siguientes cebadores: cebador directo para TNF α : 5'- TCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3' (SEQ ID NO: 5), cebador inverso para

60

65

TNF α : 5'- AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3' (SEQ ID NO: 6), cebador directo para GAPDH: 5'- ACAACTTTGGCATTGTGGAA-3' (SEQ ID NO: 7), cebador inverso para GAPDH: 5'- GATGCAGGGATGATGTTCTG-3' (SEQ ID NO: 8). La especificidad de amplificación fue confirmada por el análisis de las curvas de fusión. Los resultados se analizaron con el sistema de detección de secuencias ABI 5700 v.1.3 después de establecer la eficacia de reacción para cada par de cebadores. Se realizó la cuantificación mediante el método delta-CT.

La Figura 6A muestra el esquema de tratamiento para ratones transgénicos Siglec-11 humanizados (Siglec11) y ratones de control compañeros de camada (ratones de control). Los ratones se trataron por vía intraperitoneal con 4x lipopolisacáridos (LPS de *Salmonella abortus equi* forma S (ENZO Life Science), 1 μ g por gramo de peso corporal) o 4x LPS (1 μ g por gramo de peso corporal) más 4 x PSA-20 (1 μ g por gramo de peso corporal) o 4x PBS. LPS, PBS y PSA-20 se aplicaron diariamente durante 4 días. Los ratones fueron analizados 24 horas después de la última aplicación.

Los transcritos génicos para TNF-alfa se determinaron a partir del tejido cerebral total mediante qRT- PCR 24 horas después de la última aplicación. La Figura 6B muestra los transcritos del gen normalizados del cerebro de ratones transgénicos Siglec-11 y ratones de control tratados con PSA-20 o vehículo control. Los ratones transgénicos Siglec-11 tratados con PSA-20 mostraron niveles reducidos de transcripción génica de TNF-alfa en el tejido cerebral. La Figura 6C muestra los transcritos génicos para TNF-alfa en el bazo según lo determinado por qRT- PCR 24 horas después de la última aplicación. No se observó ningún cambio en el nivel de transcripción en el bazo.

En resumen, se pudo demostrar que el PSA-20 redujo el aumento de la transcripción génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el cerebro, previniendo así la inflamación cerebral. Por consiguiente, el PSA-20 puede prevenir la inflamación cerebral y la encefalopatía séptica después de la aplicación sistémica en un modelo animal de sepsis subletal.

Ejemplo 8

Inyección intravítrea de ácido polisiálico de bajo peso molecular (PSA-20) en un modelo animal de degeneración macular retiniana.

En estos experimentos se utilizaron retina humana, microglía humana y ratones transgénicos Siglec-11 humanizados (Wang Y, 2009, dissertation, Universidad de Bonn, nombre uniforme del recurso: urn:nbn:de:hbz: 5N-18095) y ratones control compañeros de camada.

a) Análisis de la transcripción génica de Siglec-11 en la retina humana

En primer lugar, se analizó la transcripción génica de Siglec-11 en la retina humana. Se aisló el ARN total de la retina humana a partir de biopsias. La transcripción inversa del ARN se realizó usando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y los cebadores de hexámeros aleatorios (Roche Molecular Biochemicals). El ADNc se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) durante 35 ciclos. Para la reacción se utilizaron 1 μ g de cada ADNc analizado. El programa de PCR utilizado fue, desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, desnaturalización a 94 °C durante 90 segundos, hibridación a 62,5 °C durante 1 min, extensión a 68 °C durante 1 min y extensión final a 68 °C durante 10 min. La secuencia del cebador fue directo ACAGGACAGTCCTGGAAACCT (SEQ ID NO: 9) e inverso AGGCAGGAACAGAAAGCGAGCAG (SEQ ID NO: 10), dando como resultado un producto de PCR de 352 pb. El cebador se usó en una concentración de 10 μ M. Las muestras de ADNc analizadas derivaron de los cerebros de un ratón de control C57BL/6 y un ratón transgénico Siglec-11, así como de retina humana. El ARN retiniano no transcrito sirvió como control de PCR negativo. Como se observa en la Figura 7A, se detectaron transcritos génicos para Siglec-11 en la retina humana.

b) Determinación del efecto de PSA-20 sobre microglía estimulada con residuos celulares neuronales

En segundo lugar, se analizó el efecto de PSA-20 sobre microglía estimulada con residuos celulares neuronales. Las drusas que contienen residuos celulares es una de las características de la degeneración macular senil. Para estudiar el efecto del material degenerado en la microglía de la retina, se prepararon residuos neuronales mediante lisis hipotónica y mecánica de neuronas humanas derivadas de células madre pluripotentes inducidas. Después, se trató la línea microglial humana derivada de células madre pluripotentes inducidas y se analizó el efecto del PSA-20. La liberación de superóxido se determinó mediante el tinte fluorescente DHE. Después de la adición de residuos neuronales y PSA-20 o vehículo control (PBS), se añadió dihidroetidio (DHE) 30 μ M y se incubó a 37 °C durante 30 minutos para medir la producción de radicales del anión superóxido. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % más glutaraldehído al 0,25 % y se analizaron mediante microscopía confocal. Para la cuantificación de la intensidad de la tinción con DHE, se obtuvieron seis imágenes de cada experimento y se analizaron mediante el software ImageJ (NIH). Se restó el fondo y se compararon los valores medios de las intensidades de tinción. Las células se fijaron y la intensidad de DHE se cuantificó mediante microscopía confocal. Tal como se muestra en la Figura 7B, la adición de residuos neurales incrementó la producción microglial de superóxido. El PSA-20 evitó el aumento microglial de la producción de superóxido inducida por residuos neuronales celulares como se ve en la

Figura 7B.

La determinación del efecto de PSA-20 sobre microglía estimulada con residuos celulares neuronales se repitió como se describe anteriormente, pero utilizando Trolox (ácido 6- hidroxí-2,5,7,8- tetrametilcroman-2- carboxílico), un análogo de la vitamina E soluble en agua como control para eliminar la producción de superóxido. Además, se expuso a las microglía con los residuos como se describe anteriormente, pero se aplicaron más residuos tipo drusas en lugar de los residuos neurales.

Para obtener residuos tipo drusas de la retina, se trataron células ARPE-19 de epitelio pigmentario de retina humana con ácido okadaico 80 nM durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂, se centrifugaron, se lavaron tres veces con PBS y el sedimento se congeló a -20 °C. La microglía humana cultivada se incubó con 5 µg/µl de residuos epiteliales de pigmento retiniano y 30 µM de dihidroetidio (DHE, Invitrogen) con o sin 10 µg/ml de PSA-20 durante 30 minutos a 37 °C. El vehículo control se realizó utilizando PBS solamente. Como control, se añadió el eliminador de radicales Trolox (40 µM). Las células se fijaron y la liberación de superóxido se cuantificó por la intensidad del colorante DHE. La Figura 7C muestra el efecto de PSA-20 (PSA20) sobre la liberación de superóxido microglial después de la estimulación con residuos tipo drusas y controles Trolox. Como se puede ver en la Figura 7C, la adición de residuos neurales tipo drusas incrementó la producción microglial de superóxido, mientras que PSA-20 previno completamente el aumento microglial en la producción de superóxido. En detalle, PSA-20 redujo la producción relativa de superóxido de las células microgliales humanas estimuladas con residuos neurales tipo drusas de 1,38 +/- 0,02 a 0,92 +/-0,22. Esto muestra que PSA-20 previno completamente el estallido oxidativo de la microglía humana expuesta con residuos tipo drusas.

c) Determinación del efecto de PSA-20 en un modelo animal de degeneración macular

Se indujo un modelo animal de degeneración macular por tecnología láser. El daño experimental de la retina del ratón usando un láser es un modelo animal bien aceptado para la degeneración macular relacionada con la edad. La coagulación con láser y el daño directo de la membrana de Bruch conducen rápidamente a la activación de la microglía y del complemento e inducen filtración vascular. La angiografía de fluorescencia es un método establecido para detectar filtraciones vasculares en la retina.

En estos experimentos se utilizaron ratones transgénicos Siglec-11 humanizados (Wang Y, 2009, dissertation, Universidad de Bonn, nombre uniforme del recurso: urn:nbn:de:hbz:5N-18095) y ratones control compañeros de camada.

Se indujeron tres puntos de coagulación con láser de argón (125 mW, 100ms, 100 µm, Viridis, Quantel Medical, Francia) en la retina de los ratones. Directamente posteriormente, a los ratones se les inyectó por vía intravítrea con PSA-20 (3 µg/por ojo) o un vehículo control de PBS.

El tejido retiniano se analizó 48 horas después de la lesión con láser mediante inmunohistoquímica. Por tanto, la inmunotinción de montaje completa se realizó con un anticuerpo policlonal de conejo anti molécula ionizada adaptadora de unión a calcio 1 (Iba1) y seguido por anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (FITC) dirigido contra la inmunoglobulina de conejo (IgG). Se recogieron imágenes confocales de la capa plexiforme interna de la retina y se determinó el porcentaje de la microglía ameboide activada en relación con la microglía positiva a Iba1 total dentro y fuera de la lesión con láser de los ratones Siglec-11 tratados con PSA-20 y los ratones de control. Mientras que la microglía mostró una morfología ameboide activada dentro de la lesión con láser después de la inyección de un vehículo control (PBS), la activación microglial se suprimió dentro de la lesión con láser después de la inyección de ácido polisialico de bajo peso molecular PSA-20 en ratones transgénicos Siglec-11 como se ve en Figura 7D. No se observó ningún efecto de PSA-20 sobre la inmunorreactividad de Iba1 microglial en ratones normales. La activación microglial se redujo significativamente en los ratones transgénicos Siglec-11 tratados con PSA-20 como se ve en la Figura 7D.

Para determinar la filtración vascular mediada por inflamación, se realizó una angiografía con fluoresceína 48 horas después de la lesión por coagulación con láser de la retina. En detalle, los animales anestesiados se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,1 ml de fluoresceína al 2,5 % en NaCl estéril al 0,9 %. Se tomaron imágenes de la angiografía de etapa tardía once minutos después de la inyección con fluoresceína en un angiógrafo de retina Spectralis HRA2 (Heidelberg Engineering) para visualizar la filtración de los vasos. Las imágenes de angiografía se exportaron desde el software Heidelberg Eye Explorer como archivos jpeg. Las intensidades de píxeles de 6 regiones de interés (roi) por imagen se cuantificaron con ImageJ y se restó la fluorescencia de fondo.

48 horas antes de la angiografía, se indujeron tres puntos de coagulación con láser de argón (125 mW, 100ms, 100 µm, Viridis, Quantel Medical, Francia) en la retina de los ratones transgénicos Siglec-11 o compañeros de camada. A los ratones se les inyectó por vía intravítrea con PSA-20 (3 µg/por ojo) o un vehículo control de PBS. Los animales Siglec11 inyectados con PSA-20 mostraron una filtración vascular significativamente reducida (según lo determinado por la angiografía) en comparación con los ratones Control y Siglec11 inyectados con PBS como se ve en la Figura 7E. Los grupos estadísticamente significativos se determinaron mediante ANOVA de una vía y la prueba t de Student.

Para confirmar la significancia y la confiabilidad de este efecto del PSA-20 en la reducción de la filtración vascular, la determinación se repitió como se describe anteriormente, pero con un número mayor de al menos 8 retinas por grupo experimental y con un evaluador ciego.

- 5 De nuevo, el daño por láser de las retinas se indujo en los ratones transgénicos Siglec-11 humanizados o en los controles de compañeros de camada como se describe anteriormente. Posteriormente, se inyectó por vía vítrea PSA-20 o un vehículo control de PBS. Para determinar la filtración vascular mediada por inflamación, se realizó una angiografía con fluoresceína 48 horas después de la coagulación con láser de la retina. La Figura 7F muestra las angiografías y la Figura 7G un análisis de la filtración vascular de la retina a la derecha. Los puntos de datos
10 individuales indican ojos individuales analizados. Los datos se analizaron mediante ANOVA ordinario de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los animales transgénicos Siglec-11 inyectados con PSA-20 mostraron una filtración vascular significativamente reducida según lo determinado por la angiografía en comparación con los controles de compañeros de camada y ratones Siglec-11 inyectados con PBS (Fig. 7F). En detalle, la filtración vascular se redujo de 117,8 +/-7,8 a 84,07 +/-8,2 después del tratamiento con PSA-20 de ratones
15 transgénicos Siglec-11. Por consiguiente, PSA-20 redujo significativamente la filtración vascular en los ratones transgénicos Siglec-11 dañados por láser.

d) Determinación de la expresión fisiológica de ácido oligo/polisiálico en retinas humanas

- 20 Las retinas humanas se analizaron para determinar la expresión fisiológica de ácido oligo/polisiálico mediante inmunotinción de ácido polisiálico de cadena larga (PSA- NCAM), PSA de cadena corta (CD56) y trímeros de ácido siálico (A2B5). Las retinas se cortaron y se congelaron a -80 °C. Para la tinción, los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y se lavaron 2 veces en PBS. Los cortes se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) al 10 %, suero de cabra al 5 % (Invitrogen) y Triton- X-100 al 0,1 % durante 20-30
25 minutos. Los cortes se incubaron en uno de los siguientes anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C: anti Iba1 de conejo (1:1000, Wako), anti PSA- NCAM de ratón (1:500, ácido polisiálico, Millipore), anti CD56 de rata (1:200, ácido oligosíalico, BD Pharmingen) o anti A2B5 de ratón (1:200, ácido trisiálico, Invitrogen). Los cortes se lavaron con PBS 3 veces y después se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (Jackson) durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de 3 etapas de lavado en PBS, los cortes se incubaron
30 con el tinte nuclear TO- PRO® yoduro (1:2000, life technologies) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se montaron con Moviol. Los núcleos celulares se contratiñeron con TO- PRO® (tinción nuclear). Se usó un anticuerpo de isotipo correspondiente como control. Se analizaron imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Las tres especies de ácido siálico se expresaron débilmente en la retina externa, pero se encontró una expresión fuerte en la capa plexiforme interna (IPL), la capa de células ganglionares (GCL) y la capa de fibra
35 nerviosa de la retina humana. El ácido oligo/polisiálico se detectó en la capa plexiforme interna y en la capa de células ganglionares. Esto muestra que el ácido polisiálico es un componente normal de la retina, lo que permite que PSA-20 imite esta función.

- 40 En resumen, se pudo demostrar que el PSA-20 aplicado por vía intravítrea en un modelo animal de degeneración macular evitó la activación patógena de la microglía y redujo la filtración vascular. Sin pretender quedar ligado a una teoría específica, se supone que el ácido polisiálico es un componente neuroprotector normal de la retina, lo que permite que PSA-20 imite esta función. Por consiguiente, PSA-20 puede prevenir la activación de la microglía retiniana y la filtración vascular asociada a la degeneración en un modelo animal de degeneración macular.

45 Ejemplo 9

Inyección intraperitoneal de ácido polisiálico de bajo peso molecular (PSA-20) en un modelo animal de esclerosis múltiple.

- 50 Se indujo una encefalomiелitis autoinmunitaria experimental en ratones transgénicos Siglec-11 humanizados (ratones Siglec-11 humanizados) y ratones control compañeros de camada (ratones de control normal). Por tanto, se inmunizaron ratones adultos transgénicos Siglec-11 humanizados de 6-8 semanas de edad hembra (Wang et al. 2009, dissertation, University Bonn, nombre uniforme del recurso: urn:nbn:de:hbz:5N-18095) y ratones de control
55 compañeros de camada con 100 µg de glicoproteína MOG de oligodendrocitos de mielina (aminoácidos 35-55; SeqLab) en adyuvante incompleto de Freund (ambos DIFCO; BD GmbH, Heidelberg, Alemania). Se inyectó toxina Pertussis (200 ng; List Biological Laboratories, Epsom, R.U.) en los días 0 y 2 de la inmunización. Los signos clínicos se puntuaron de la siguiente manera: 0, sin signos clínicos; 1, cola lacia completa; 2, cola lacia completa y debilidad de las extremidades posteriores; 3, paraparesia de al menos un miembro posterior; 4, paraparesia completa del miembro posterior y debilidad de las extremidades anteriores; y 5, parálisis de extremidades anteriores y posteriores
60 o moribundo. Solo se utilizaron para los experimentos los ratones con inicio de la enfermedad (puntuación clínica de >= 1) hasta el día 20.

- El PSA-20 de bajo peso molecular (1 µg por g de peso corporal) se aplicó por vía intraperitoneal a los ratones el día del inicio de la enfermedad (puntuación clínica al menos 1) y diariamente durante los siguientes tres días
65 consecutivos. Como se puede ver en la Figura 8A, los ratones transgénicos Siglec-11 humanizados tratados con PSA-20 mostraron signos clínicos mejorados a partir del día 14 en comparación con los ratones tratados con

vehículo control. Se determinó la puntuación acumulada de la enfermedad desde el primer día de tratamiento hasta el día 25. Como se observa en la Figura 8B, el tratamiento con PSA-20 mejoró los signos clínicos de la enfermedad.

Por consiguiente, los ejemplos 7 a 9 muestran que el ácido polisialílico de bajo peso molecular (PSA-20) tiene efectos terapéuticos beneficiosos en un intervalo de concentración micromolar en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias del SNC y la retina. Tal como se ve en el ejemplo 7, PSA-20 previene la respuesta proinflamatoria del cerebro después de una exposición sistémica con la toxina bacteriana LPS, sugiriendo, así, un efecto terapéutico beneficioso en las encefalopatías sépticas y la progresión de la enfermedad de Alzheimer asociada a la inflamación sistémica. Tal como se ve en el ejemplo 8, PSA-20 previene en la retina la activación microglial, la producción de superóxido por microglía y la filtración vascular asociada a la inflamación en un modelo animal de degeneración macular. Tal como se ve en el ejemplo 9, PSA-20 previene los síntomas de la enfermedad en un modelo animal de esclerosis múltiple. De forma interesante, todos los efectos del PSA-20 en los modelos animales se observaron en ratones transgénicos Siglec-11 humanizados.

15 **Ejemplo 10**

Tratamiento de la neurodegeneración inducida por el estrés oxidativo asociado a la enfermedad de Parkinson en un sistema modelo de cultivo humano con PSA-20

20 La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas e implica microglía activada y aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. El aumento del estrés oxidativo en el cerebro en la enfermedad de Parkinson es una característica principal. Asimismo, se describió la neurodegeneración por fagocitosis primaria (denominada fagoptosis). Las aplicaciones de toxinas como LPS se usan como modelos animales para la enfermedad de Parkinson. Como los modelos animales de roedores tienen una capacidad limitada para modelar enfermedades neurodegenerativas humanas crónicas debido a las diferencias de especie entre roedores y seres humanos, el sistema de modelo de cultivo de neuronas humanas y de la microglía humana inducida por toxinas humanas y residuos, se utiliza recientemente como reemplazo de modelos animales de la enfermedad de Parkinson inducida por la toxina LSP.

30 Como sistema de modelo de la enfermedad de Parkinson, se utilizaron neuronas humanas y microglía humana, que se estimularon con la toxina lipopolisacárido (LPS). Ambas, las neuronas humanas y la microglía humana se obtuvieron a partir de células madre pluripotentes inducidas. Se determinó la pérdida de neuritas por el daño oxidativo microglial. Además, se determinó la fagocitosis y el estallido oxidativo de la microglía estimulada por células neuronales degeneradas (residuos neurales).

35 Cultivo de células

Se obtuvieron microglía derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSdM) a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPS). La línea 1 de iPSdM microglial (iPSdM-1) se utilizó en este estudio generada a partir del clon iLB- C-35m- r1 (Bonn). iPSdM-1 (denominada, en el presente documento, microglía o células microgliales) se cultivaron en medio N2 que consiste en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) suplementado con N2 al 1 % (Invitrogen), L-glutamina 0,48 mM (Gibco) y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco). Se usaron células madre pluripotentes (iPS) inducidas humanas (Foreskin-1, WiCell) para la generación de células madre neurales primitivas (pNSC) y su diferenciación en neuronas de acuerdo con un protocolo modificado, que se usó para obtener precursores neurales primitivos a partir de células madre embrionarias humanas. En resumen, las células iPS se cultivaron sobre células alimentadoras para formar pequeñas colonias. A continuación, el medio se cambió a medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal; GIBCO) en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF; Millipore, 10 ng/ml) y tres moléculas pequeñas CHIR99021 (inhibidor de GSK-3β, Axon Medchem, 4 µM) y SB431542 (inhibidor de los receptores de TGF-β y activina; Axon Medchem, 3 µM) y Compuesto E (inhibidor de la γ-secretasa; Axon Medchem, 0,1 µM) durante 10 días. Para inducir la diferenciación hacia neuronas, las pNSC se disociaron con accutase (PAA) y se cultivaron en placas de cultivo celular recubiertas con poli-L-ornitina (Sigma, 0,15 mg/ml) más laminina (Sigma, 1 µg/ml) en medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal, más LIF, CHIR99021 y SB431542; GIBCO) hasta que las células se unieron y formaron pequeñas colonias. Después, el medio se cambió a medio de diferenciación neuronal (DMEM/F12, más suplementos de N2 y B27, GIBCO) en la presencia de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Prospect, 10 ng/ml) y factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF; 10 ng/ml) durante 2 semanas. El medio que contenía los factores neurotróficos se cambió cada dos días.

60 a) Determinación de los efectos neuroprotectores de PSA-20 en un sistema de cocultivo de microglía- neurona inducida por la toxina LPS humana

Las neuronas humanas derivadas de células iPS se cultivaron conjuntamente con microglía humana normal y activada previamente por lipopolisacárido (LPS) (microglía activada) durante 48 horas sin o con PSA-20 1,5 µM. En la microglía activada, el estrés oxidativo descrito en la enfermedad de Parkinson se indujo por 1 µg/ml de la toxina LPS. Se añadieron células microgliales humanas a las neuronas humanas sin o con PSA-20 durante 48 horas en una proporción de 1:5 (microglía: neurona). Después, las células se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído

(PFA, Sigma) al 4 %, se bloquearon y permeabilizaron con una solución que contiene albúmina de suero bovino al 10 % (BSA) y suero de cabra normal al 5 % (nGS, Dianova, Hamburgo) y TritonX-100 al 0,1 %. (para tinción de núcleos TritonX-100 al 0,5 %, Sigma) durante 60 minutos. A continuación, las células se inmunotifieron con anticuerpo monoclonal anti β - tubulina- III y policlonales de conejo anti ival (Dako) durante la noche a 4 °C seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa488 dirigido contra IgG de conejo (Molecular Probes) y anticuerpo de cabra Cy3 conjugado dirigido contra IgG de ratón (Dianova) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se tomaron 10 imágenes por condición por experimento mediante microscopía de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus). La medición de las ramas neuronales se realizó mediante el software ImageJ/Neuron J (NIH) y se cuantificaron las longitudes relativas de las ramas neurales. La Figura 9A muestra a la izquierda imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes de neuronas sin microglía, con microglía normal y con microglía activada con LPS, ya sea sin tratar o tratadas con PSA-20 (PSA). A la derecha, La figura 9A muestra la longitud relativa cuantificada de las ramas de neuritas. Los datos se presentan como la media +/-EEM. ***p < 0,001, ANOVA seguida de Bonferroni.

Como se puede ver en la Figura 9A, las imágenes confocales demostraron que la adición de la microglía normal a las neuronas redujo la longitud relativa de las ramas neuronales, que se redujo aún más después de la adición de microglía preactivada por LPS (microglía activada). El tratamiento del cocultivo con PSA-20 antagonizó la reducción de la longitud de las ramas de las neuritas relativa inducida por la microglía activada. En detalle, la longitud relativa de las neuritas disminuyó en el sistema de cocultivo de 0,76 +/- 0,01 a 0,64 +/- 0,01 después de la adición de microglía activada por toxina. La aplicación adicional de PSA-20 previno este efecto neurotóxico y después la longitud relativa de las neuritas fue de 0,91 +/- 0,02. Esto muestra que PSA-20 actuó como neuroprotector en un sistema de cocultivo modelo de enfermedad de Parkinson del estrés oxidativo desencadenado por LPS humano.

b) Determinación de los efectos protectores de PSA-20 en la fagocitosis microglial

Las microglía humanas se expusieron a residuos neuronales marcados con fluorescencia y se determinó la captación de los residuos en las células mediante microscopía confocal y reconstrucción 3D.

Para recibir los residuos, las células madre neuronales se incubaron con ácido okadaico 40 nM (Sigma) durante 24 horas. Después, los residuos celulares se recogieron y se centrifugaron. Los residuos se lavaron con PBS y se tificaron con sondas moleculares "Dil Derivatives for Long- Term Cellular Labeling" (Invitrogen) de acuerdo con el manual del proveedor. Las células microgliales se incubaron previamente durante 1 hora con una concentración de 0,15 μ M, 0,5 μ M o 1,5 μ M de PSA-20, seguido de 1 hora de incubación con 5 μ g/ml de residuos neuronales previamente conservados. Las células se fijaron e incubaron con un anticuerpo anti ival (Wako, Japón) seguido de un anticuerpo conjugado con Alexa488 secundario (sondas moleculares). Para el análisis, las imágenes se escanearon al azar y las reconstrucciones en 3D se obtuvieron con un microscopio de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus). Para determinar la proporción de células que ingirieron material marcado con fluorescencia, se obtuvieron seis imágenes por grupo experimental y todas las células en las imágenes se cuantificaron utilizando el software Image J (NIH).

La Figura 9B muestra a la izquierda la reconstrucción 3D confocal representativa de una célula microglial que ha ingerido residuos neuronales. Se realizó la cuantificación de la captación de residuos neuronales en las células microgliales. La Figura 9B a la derecha muestra el porcentaje de fagocitosis para las células microgliales tratadas con 0,15 μ M, 0,5 μ M o 1,5 μ M de PSA20 contra células de control no tratadas. Los datos se presentan como media +/-EEM de n = 3 experimentos independientes. *p < 0,05, ANOVA seguida de Bonferroni. Como se puede ver en las imágenes confocales, se observó una ingesta manifiesta de residuos neuronales en la microglía. Después del tratamiento con PSA-20, se redujo el número de microglía que mostraba la captación de residuos neuronales. En detalle, PSA-20 0,5 μ M y 1,5 μ M redujeron el porcentaje de microglía que ingirió residuos neuronales del 32 % +/- 0,02 al 25 % +/- 0,02 % y al 22 % +/- 0,01, respectivamente, previniendo la captación de residuos neuronales a una concentración de 1,5 μ M significativamente. Esto demuestra que PSA-20 previno la fagocitosis primaria de la microglía.

c) Determinación de la fagocitosis asociada al estallido oxidativo

Para medir la producción relativa de superóxido por las células microgliales, las células microgliales humanas se colocaron en placas de cultivo de 4 cámaras. Después de 24 horas, las células se trataron con 5 mg/ml de residuos neuronales durante 15 minutos con o sin 1 hora de incubación previa con PSA-20 a concentraciones de 0,15 μ M, 0,5 μ M o 1,5 μ M. Después, las células se lavaron 2 veces con tampón Krebs- HEPES. Para detectar la liberación de superóxido, las células se incubaron posteriormente durante 15 minutos con una solución de dihidroetidio (DHE) de tinte fluorescente sensible a superóxido 30 μ M diluida en tampón Krebs- HEPES. Finalmente, las células se lavaron 2 veces con tampón Krebs-HEPES y se fijaron durante 15 minutos con glutaraldehído al 0,25 % y PFA al 4 %. En total, se recogieron al azar seis imágenes por grupo experimental mediante microscopía de escaneo láser confocal (Fluoview 1000, Olympus). Todas las células de las imágenes recogidas se analizaron mediante el software Image J (NIH).

La Figura 9C muestra a la izquierda la liberación relativa de superóxido de microglía desencadenada por residuos neurales con o sin tratamiento previo con PSA-20 contra células no tratadas (NT). * $p < 0,05$, ANOVA seguida de Bonferroni. Como se puede ver en la Figura 9C, el tratamiento de la microglía con residuos neurales estimuló la producción de superóxido de $1 \pm 0,06$ a $1,5 \pm 0,08$, mientras que la liberación de superóxido desencadenada por residuos neurales se inhibió mediante PSA-20 $0,5 \mu\text{M}$ y $1,5 \mu\text{M}$. En particular, PSA-20 $1,5 \mu\text{M}$ redujo la estimulación de la producción de superóxido inducida por residuos de $1,5 \pm 0,08$ a $0,9 \pm 0,05$.

Para confirmar el efecto, se usó Trolox como eliminador de superóxido y superóxido dismutasa-1 (SOD1) como modificador de superóxido en un experimento de control como se describe anteriormente usando PSA-20 $1,5 \mu\text{M}$ pero agregando Trolox $40 \mu\text{M}$ o $20 \mu\text{g/ml}$ de (SOD1) en el medio. La Figura 9C muestra a la derecha la liberación relativa de superóxido por residuos neurales con o sin pretratamiento con PSA-20 contra células no tratadas (UT) para células tratadas con Trolox y SOD1 y controles. Como se puede ver en la Figura 9C, el eliminador de radicales Trolox y la superóxido dismutasa SOD1 neutralizaron la liberación de superóxido desencadenada por los restos neurales y, como controles, confirmaron que el DHE detectó una producción extracelular de superóxido.

En resumen, se pudo demostrar que el PSA-20 previno la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno de la microglía humana. Además, El PSA-20 previno el daño mediado por el estrés oxidativo a las neuronas en un sistema de cocultivo de microglía- neurona humanas. Debido a que las neuronas están dañadas en la enfermedad de Parkinson por el estrés oxidativo microglial, PSA-20 es una composición de molécula adecuada para terapia.

Ejemplo 10

Determinación de farmacocinética y farmacotoxicología de PSA-20

La mayoría de los fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas fallan debido a la neurotoxicidad o al acceso limitado al parénquima cerebral. Para evaluar cualquier efecto neurotóxico de PSA-20, se usaron neuronas derivadas de células madre pluripotentes (iPS) para detectar cualquier efecto tóxico de PSA-20. Además, se usaron microglías derivadas de células iPS humanas para detectar la concentración eficaz de PSA-20 con respecto a la modulación negativa de los transcritos del gen TNF- α inducida por LPS. Para determinar la biodisponibilidad de PSA-20 en el cerebro, se aplicó intraperitonealmente PSA-20 conjugado con biotina y se analizó la concentración en el suero y el tejido cerebral después de diferentes períodos de tiempo.

a) Determinación del efecto de PSA-20 sobre la viabilidad celular de las neuronas derivadas de células iPS humanas mediante el ensayo MTT.

Se usaron células madre pluripotentes (iPS) inducidas humanas (Foreskin-1, WiCell) para la generación de células madre neurales primitivas (pNSC) y su diferenciación en neuronas de acuerdo con un protocolo modificado, que se describió para obtener precursores neurales primitivos a partir de células madre embrionarias humanas. En resumen, las células iPS se cultivaron sobre células alimentadoras para formar pequeñas colonias. A continuación, el medio se cambió a medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal; GIBCO) en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF; Millipore, 10 ng/ml) y tres moléculas pequeñas CHIR99021 (inhibidor de GSK-3 β , Axon Medchem, $4 \mu\text{M}$) y SB431542 (inhibidor de los receptores de TGF- β y activina; Axon Medchem, $3 \mu\text{M}$) y Compuesto E (inhibidor de la γ -secretasa; Axon Medchem, $0,1 \mu\text{M}$) durante 10 días. Para inducir la diferenciación hacia neuronas, las pNSC se disociaron con accutase (PAA) y se cultivaron en placas de cultivo celular recubiertas con poli- L- ornitina (Sigma, $0,15 \text{ mg/ml}$) más laminina (Sigma, $1 \mu\text{g/ml}$) en medio de células madre neurales (DMEM/F12: Neurobasal, más LIF, CHIR99021 y SB431542) hasta que las células se unieron y formaron pequeñas colonias. Después, el medio se cambió a medio de diferenciación neuronal (DMEM/F12, más suplementos de N2 y B27, GIBCO) en presencia de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; Prospect, 10 ng/ml) y factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF; 10 ng/ml) durante 2 semanas. El medio que contenía los factores neurotróficos se cambió cada dos días.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo con bromuro de (3- (4,5- dimetilazol-2- il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) (Millipore). Las células se trataron durante 24 horas con PSA-20 5 nM , 15 nM , 50 nM , 150 nM , 500 nM , $1,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ o $150 \mu\text{M}$. Después de 20 horas de estimulación, se añadieron $10 \mu\text{l}$ de reactivo MTT y se cultivaron las células durante 4 horas. Después, las células se lisaron con isopropanol que contenía HCl 1 M $0,04 \text{ M}$ para medir el tinte formazán. La absorbancia de luz del formazán púrpura se determinó mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm (Perkin Elmer, Envision Multiplate Reader). Todos los valores se compararon con células de control no estimuladas para recibir los cambios relativos de la viabilidad celular.

La Figura 10A muestra la viabilidad celular de las neuronas humanas a las 24 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de PSA-20 contra un control no tratado (0). Los datos se presentan como media \pm EEM de $n = 3$ experimentos independientes. * $p < 0,5$, ANOVA seguida por T2 de Tamhane. Como se puede ver en la Figura 10A, la viabilidad celular no se redujo después de la adición de diferentes concentraciones de PSA-20. Incluso a concentraciones relativamente altas de $150 \mu\text{M}$, no se observó interferencia con la viabilidad de las células

neuronales.

b) Determinación de la mitad de la concentración efectiva máxima que conduce a una reducción de los transcritos del gen TNF- α inducida por LPS en un 50 %

Se obtuvieron microglías derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSdM) a partir de células iPS. Se utilizó la línea iPSdM-1 en este estudio generada a partir del clon iLB-C-35m-r1 (Bonn). iPSdM-1 (denominada, en el presente documento, microglía o células microgliales) se cultivaron en medio N2 que consiste en medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco) suplementado con N2 al 1 % (Invitrogen), L-glutamina 0,48 mM (Gibco) y 100 μ g/ml de penicilina/estreptomina (Gibco). Las células se cultivaron con alta densidad y se dividieron a 1:5. Después de la división, las células se recuperaron y se unieron nuevamente a las nuevas placas.

Las células se trataron durante 24 horas con 1 μ g/ml de lipopolisacáridos (LPS) y PSA-20 5 nM, 15 nM, 50 nM, 150 nM, 500 nM, 1,5 μ M, 5 μ M, 15 μ M, 50 μ M o 150 μ M. Para el análisis de transcripción génica de TNF- α , se recogió el ARN de las células mediante el sistema de kit RNeasy (Quiagen). La transcripción inversa del ARN se realizó utilizando la transcriptasa inversa Super Script III (Life Technologies) y los cebadores aleatorios de hexámeros (Roche). La RT-PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos se realizó con Mezcla Maestra de PCR verde SYBR (Qiagen) utilizando el sistema de detección de secuencias ABI 5700 (PerkinElmer). La qRT-PCR se ejecutó durante 40 ciclos con una Tm de 60 °C usando el mismo cebador que para la PCR. El método $\Delta\Delta$ CT con GAPDH como patrón interno se realizó para la cuantificación de qRT-PCR.

La Figura 10B muestra los transcritos de genes para TNF- α de una línea celular microglial humana después del tratamiento con 1 μ g/ml de LPS y diferentes concentraciones de PSA-20 durante 24 horas contra un control no tratado (NT). Los datos se presentan como la media \pm EEM. *p < 0,05, **p < 0,01; ***p < 0,001; ANOVA seguida de Bonferroni. Como se puede ver en la Figura 10B, una concentración de 0,05 μ M o concentraciones más altas redujeron la transcripción génica inducida por LPS de TNF- α . La CE50 en microglía humana se determinó a 0,09 μ M. Una comparación de la concentración tóxica con la concentración eficaz para determinar el índice terapéutico confirmó que PSA-20 mostró un índice terapéutico relativamente alto en este sistema de cultivo humano.

c) Determinación de PSA-20 biotinilado en suero y cerebro después de la aplicación intraperitoneal

En primer lugar, PSA-20 se conjugó con biotina y se estableció un ELISA sensible para detectar PSA-20 biotinilado. El PSA-20 se acopló con una molécula de biotina en el sexto átomo de carbono del ácido siálico en el extremo de las cadenas de PSA-20. Por tanto, el extremo de PSA-20 se oxidó a un aldehído mediante metaperyodato de sodio. A continuación, la biotina acoplada a hidrazida se conjugó a temperatura ambiente con el grupo aldehído para formar un enlace de hidrazona. La purificación se llevó a cabo con una columna de desalación (HiTrap Desalting Column GE Healthcare).

Se aplicó PSA-20 conjugado con biotina (10 μ g por g de peso corporal) en ratones adultos mediante aplicación intraperitoneal. Se utilizó un método ELISA para detectar PSA-20 biotinilado en el suero y el cerebro. Para el ELISA, las placas bloqueadas previamente recubiertas con NeutrAvidin (Thermo Scientific) se lavaron tres veces con PBST (PBS + Tween-20 al 0,05 %). Después del lavado, se aplicaron el homogeneizado de plasma y cerebro, así como las concentraciones definidas de PSA-20 biotinilado como patrón durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces y se incubaron con un anticuerpo monoclonal dirigido contra los ácidos oligosíalicos (anti CD56 de ratón de rata, BD Pharmingen número 556325) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa se lavó tres veces y se incubó con inmunoglobulina anti- ratón de cabra conjugada con peroxidasa- HRP (Jackson ImmunoResearch). Después, las placas se lavaron y se incubaron con 100 μ l de reactivo TMB durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de HCl IN y la señal se detectó con un lector ELISA.

El suero y el tejido cerebral de un ratón se analizaron antes de la aplicación y a las 0,5, 1, 2, 4 y 8 horas después de la aplicación. El nivel más alto de PSA-20 se detectó en el suero a las 0,5 horas y en el cerebro a las 2 horas. El tiempo medio de PSA-20 en el suero y en el cerebro se estimó entre 2 y 3 horas. La biodisponibilidad de PSA-20 en el cerebro en relación con el suero se estimó entre 1 y 3 %. La Figura 10C muestra la cantidad de PSA-20 (μ g/ml) en suero y cerebro a las 0,5, 1, 2, 4 y 8 horas después de la aplicación. Como se puede ver en la Figura 10C, se detectó PSA-20 en el suero y en el cerebro. La concentración máxima de PSA-20 en el suero fue de 0,5 horas, mientras que la concentración máxima en el cerebro fue de 2 horas.

En resumen, PSA-20 no mostró neurotoxicidad en neuronas humanas cultivadas. Además, PSA-20 pasó la barrera hematoencefálica y alcanzó el parénquima del sistema nervioso central después de la aplicación sistémica. Por consiguiente, PSA-20 exhibe una farmacocinética y farmacotoxicología adecuadas para su uso en la terapia de enfermedades neurodegenerativas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RHEINISCHE FRIEDRICH- WILHELMS UNIVERSITÄT BONN, UNIVERSITÄT ZU KÖLN

<120 > Ácido polisialico y su uso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias

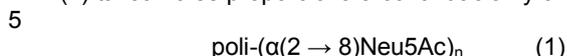
<130> UD 40613 / SAM
 <150> EP 13161689.8
 <151> 28/03/2013
 5 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.3
 10 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> cebador directo
 <400> 1
 20 ctgcaccacc aactgcttag 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> cebador inverso
 <400> 2
 30 ttcagctcag ggatgacctt 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo
 40 <400> 3
 gacaagcctg tagcccatgt 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> cebador inverso
 50 <400> 4
 aggacctggg agtagatgag g 21
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> cebador directo
 60 <400> 5
 tcttctatt cctgctgtg g 21
 65 <210> 6
 <211> 20

ES 2 734 182 T3

	<212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> cebador inverso	
	<400> 6 agggtctggg ccatagaact	20
10	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> cebador directo	
20	<400> 7 acaacttgg cattgtggaa	20
25	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> cebador inverso	
	<400> 8 gatgcagga tgatgttctg	20
35	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> cebador directo	
	<400> 9 acaggacagt cctggaaaac ct	22
45	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> cebador inverso	
	<400> 10 aggcaggaac agaaagcgag cag	23

REIVINDICACIONES

1. Un ácido polisiálico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) tal como se proporciona a continuación y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



en la que:

10 Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 18 a 20,

para su uso como un medicamento.

15 2. Un ácido polisiálico libre o unido glicosídicamente ramificado o no ramificado de acuerdo con la fórmula general (1) tal como se proporciona a continuación y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



20 en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

25 o una composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1), en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y $\geq 90\%$ en peso a $\leq 100\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y $\geq 0\%$ en peso a $\leq 5\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y $\geq 0\%$ en peso a $\leq 5\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el $\%$ en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico, para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad seleccionada de enfermedades degenerativas y desmielinizantes del sistema nervioso central, y enfermedades retinianas degenerativas o inflamatorias.

35 3. El ácido polisiálico o composición de polisacáridos para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, demencia con cuerpos de Lewy, enfermedad de Parkinson y parasomnia.

40 4. El ácido polisiálico o composición de polisacáridos para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad ocular o retiniana degenerativa o inflamatoria se selecciona de la degeneración macular relacionada con la edad, la degeneración retiniana que incluye enfermedades hereditarias de la retina, uveítis y retinopatía diabética.

5. El ácido polisiálico o composición de polisacáridos para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central es la esclerosis múltiple o enfermedad de Devic.

45 6. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un ácido polisiálico de acuerdo con la fórmula general (1) tal como se indica a continuación y/o las sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



50 en la que:

Neu5Ac es ácido N-acetilneuramínico y
n es un número entero en el intervalo de 14 a 26,

55 o una composición de polisacáridos que comprende el ácido polisiálico (1), en donde los fragmentos de ácido polisiálico tienen un peso molecular medio entre aproximadamente 4,9 kDa y 7,4 kDa, y $\geq 90\%$ en peso a $\leq 100\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre aproximadamente 4,3 kDa y 8 kDa, y $\geq 0\%$ en peso a $\leq 5\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 3 kDa y 4,3 kDa, y $\geq 0\%$ en peso a $\leq 5\%$ en peso de los fragmentos tienen un peso molecular entre 8 kDa y 9,5 kDa, en donde el $\%$ en peso de los fragmentos se basa en el peso total de los fragmentos de ácido polisiálico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad seleccionada de enfermedades degenerativas y desmielinizantes del sistema nervioso central, y enfermedades retinianas degenerativas o inflamatorias.

60

Figura 1A

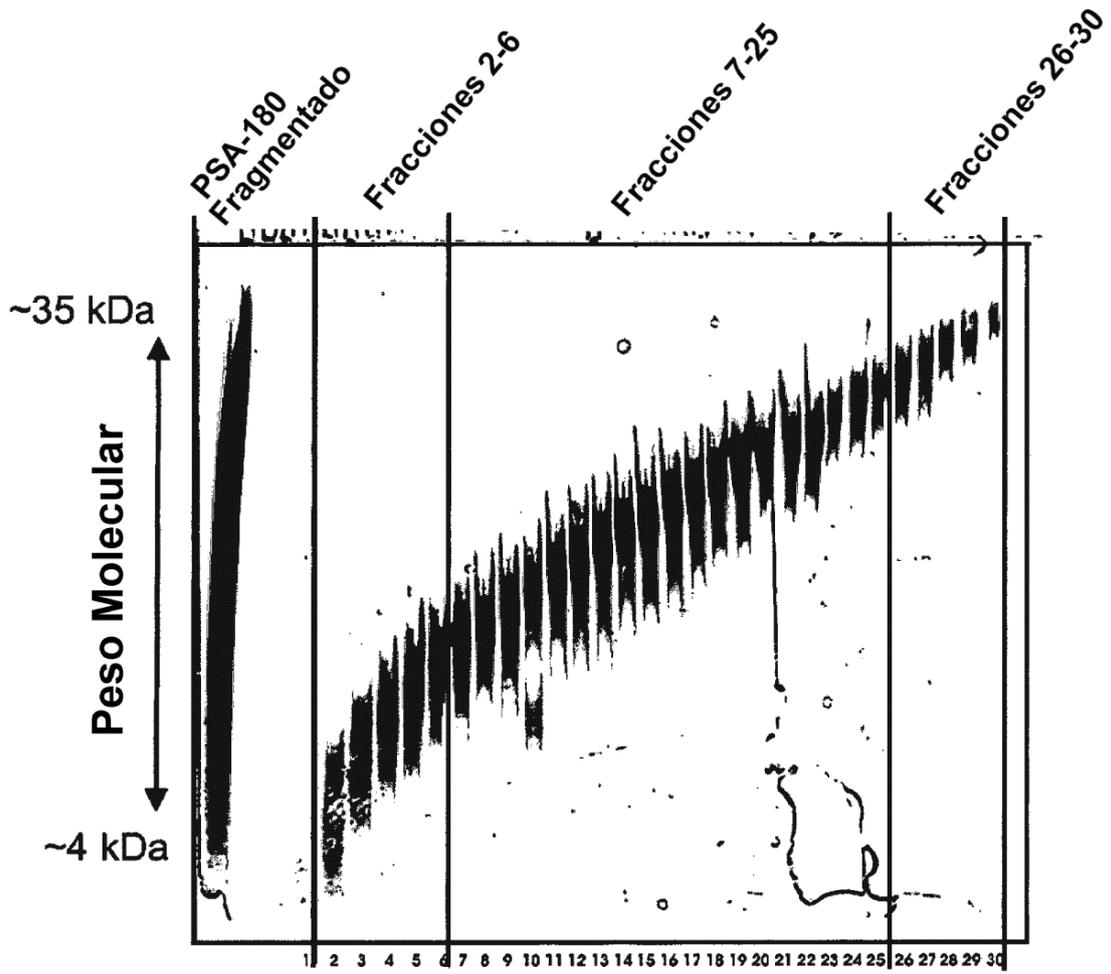


Figura 1B

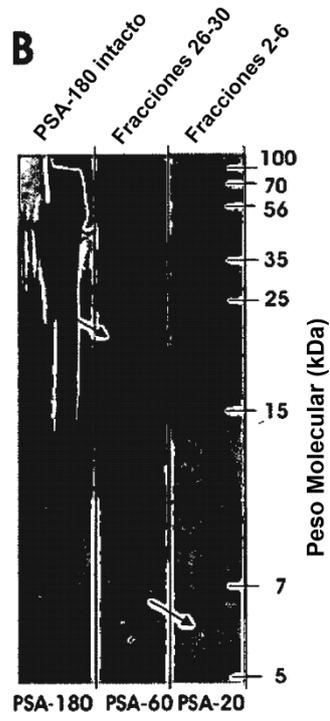


Figura 2A

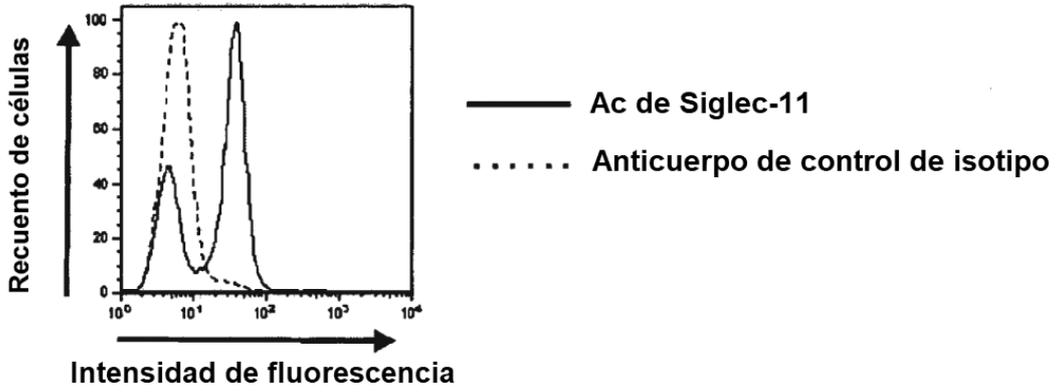


Figura 2B

B

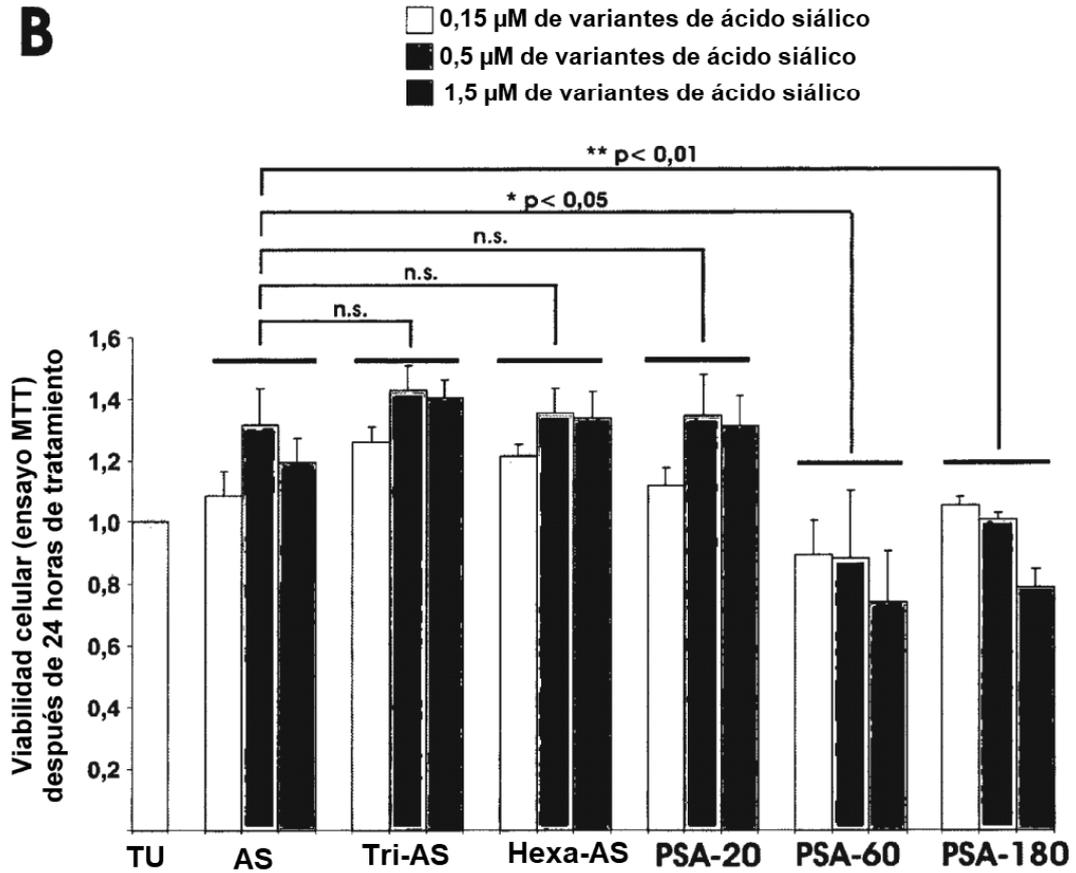


Figura 3

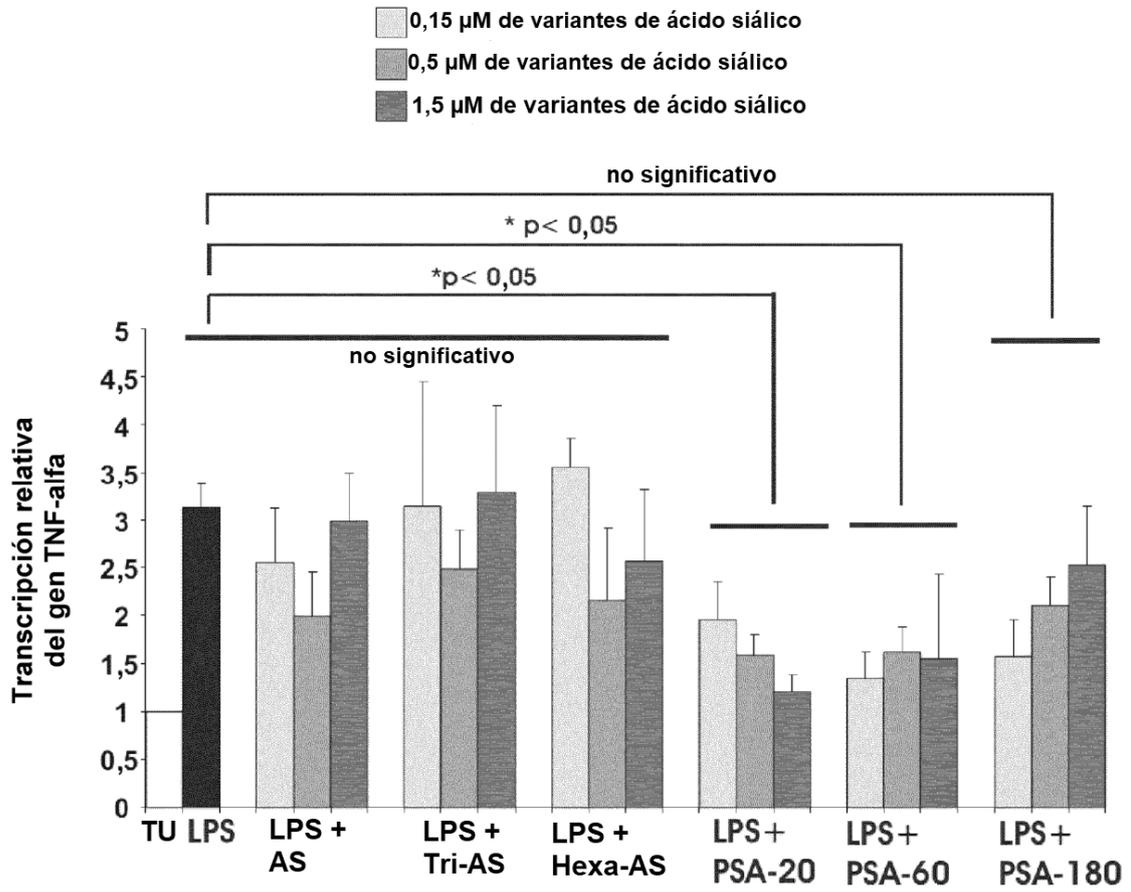


Figura 3

Figura 4

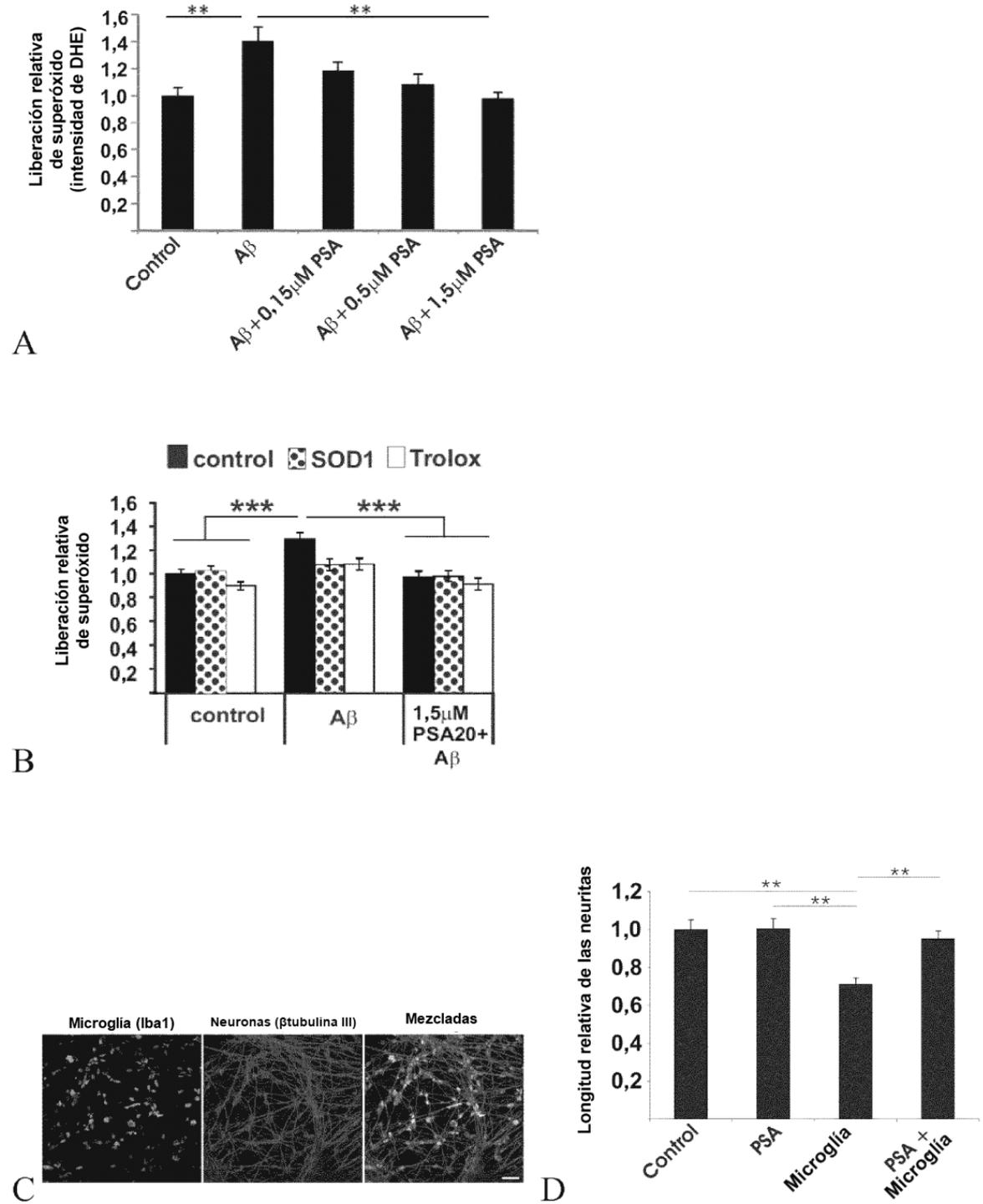


Figura 4

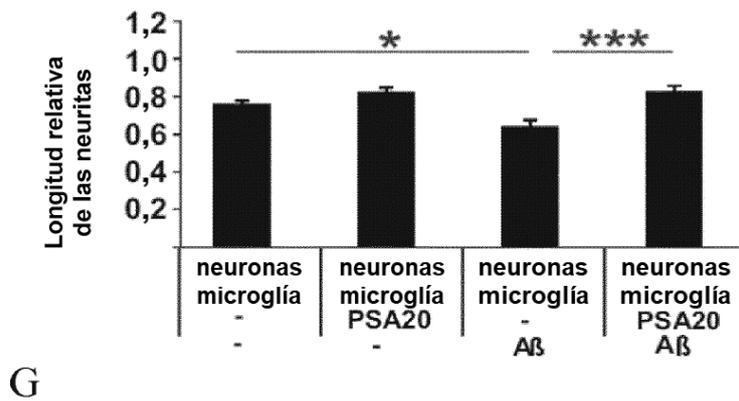
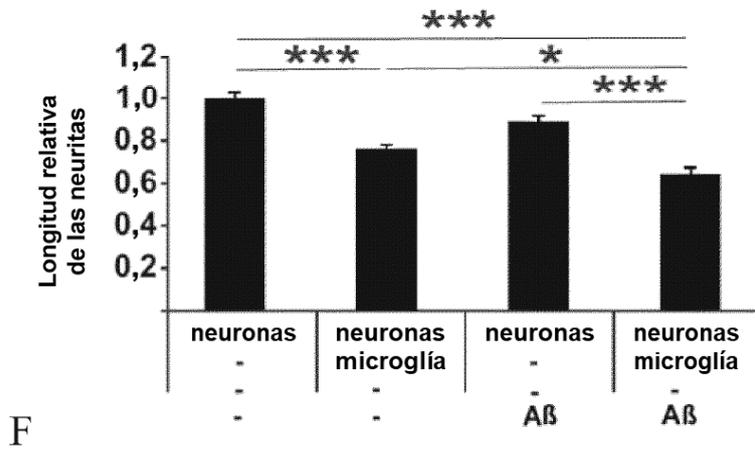
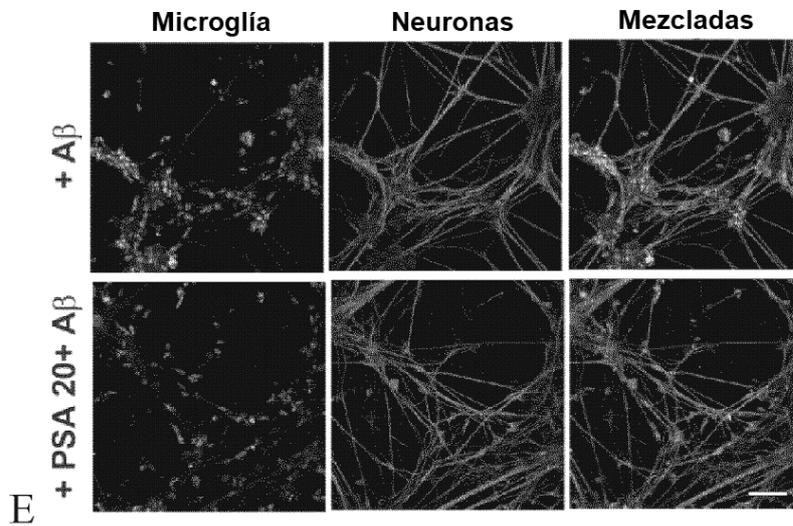


Figura 5A

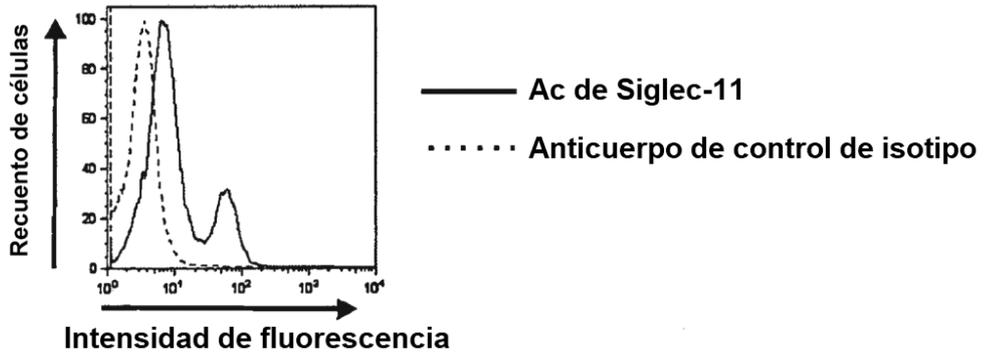


Figura 5B

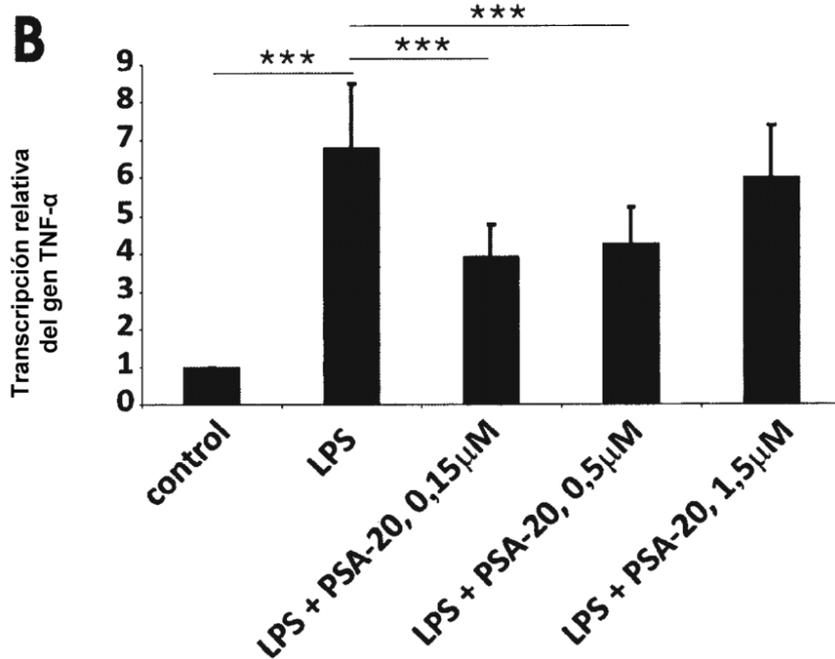


Figura 6

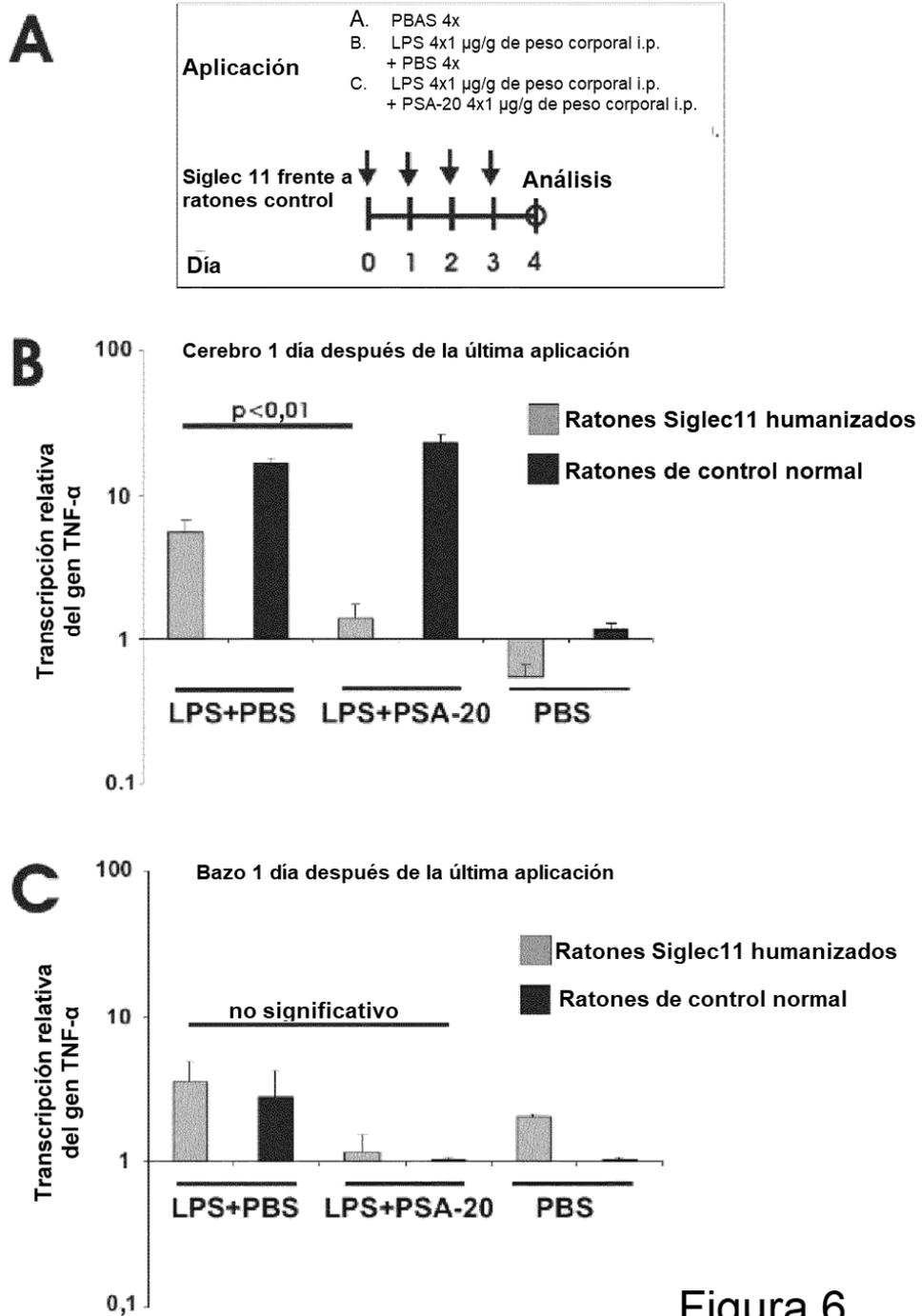


Figura 6

Figura 7

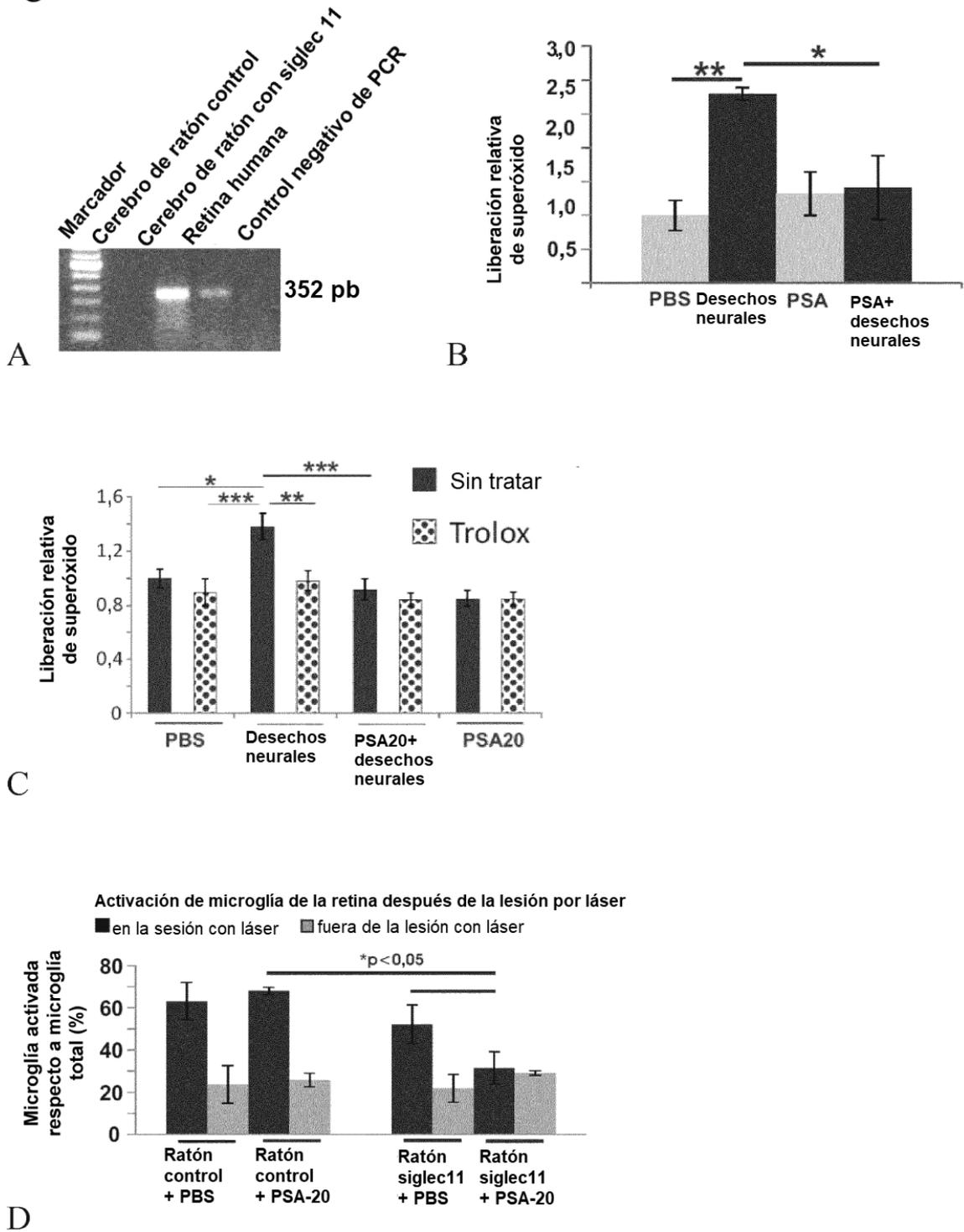


Figura 7

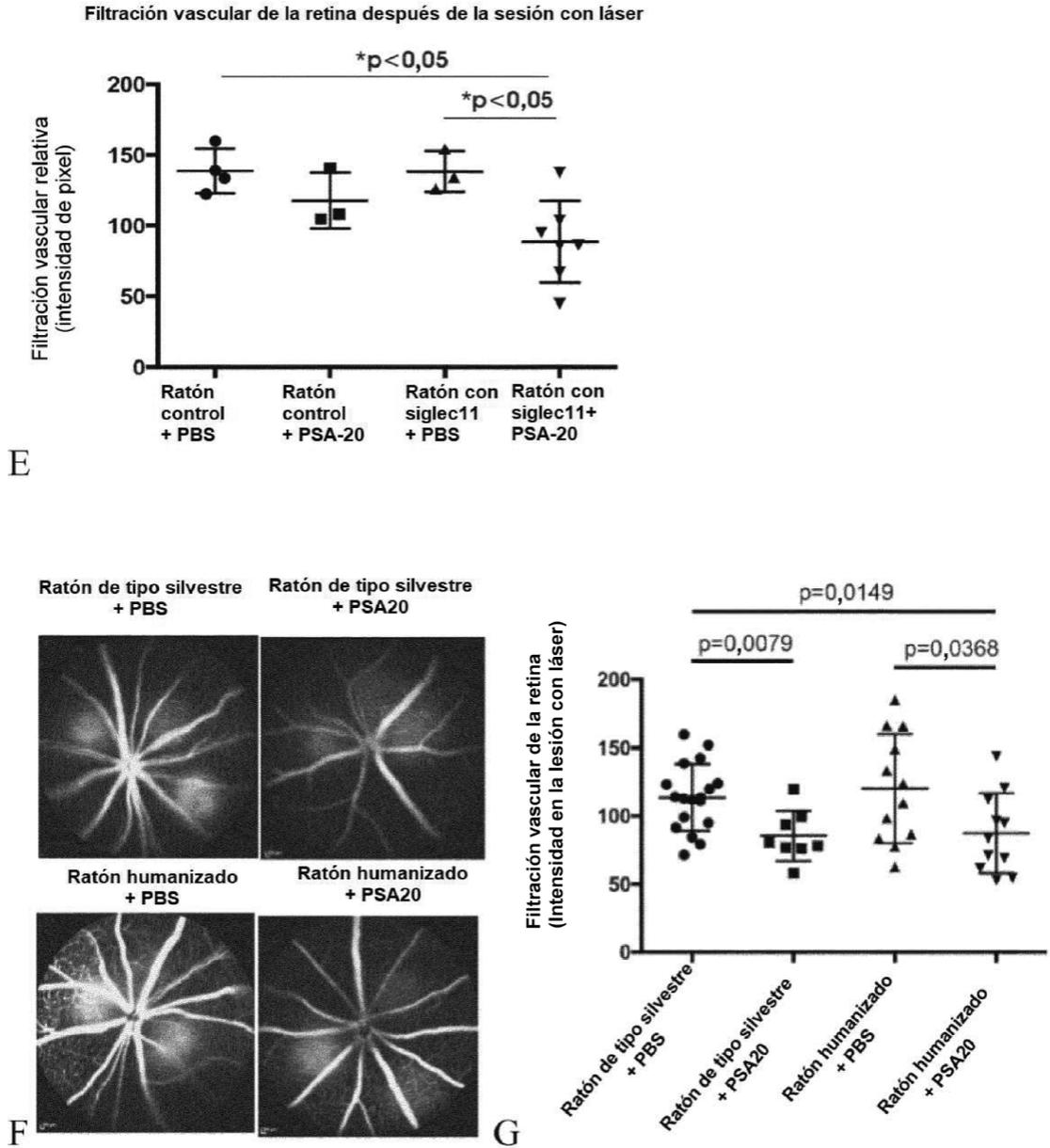


Figura 8

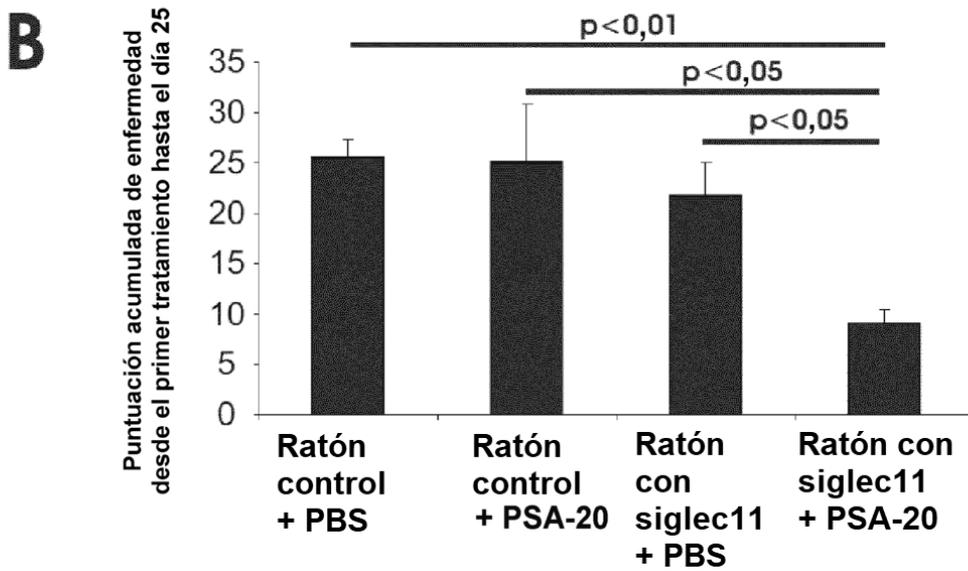
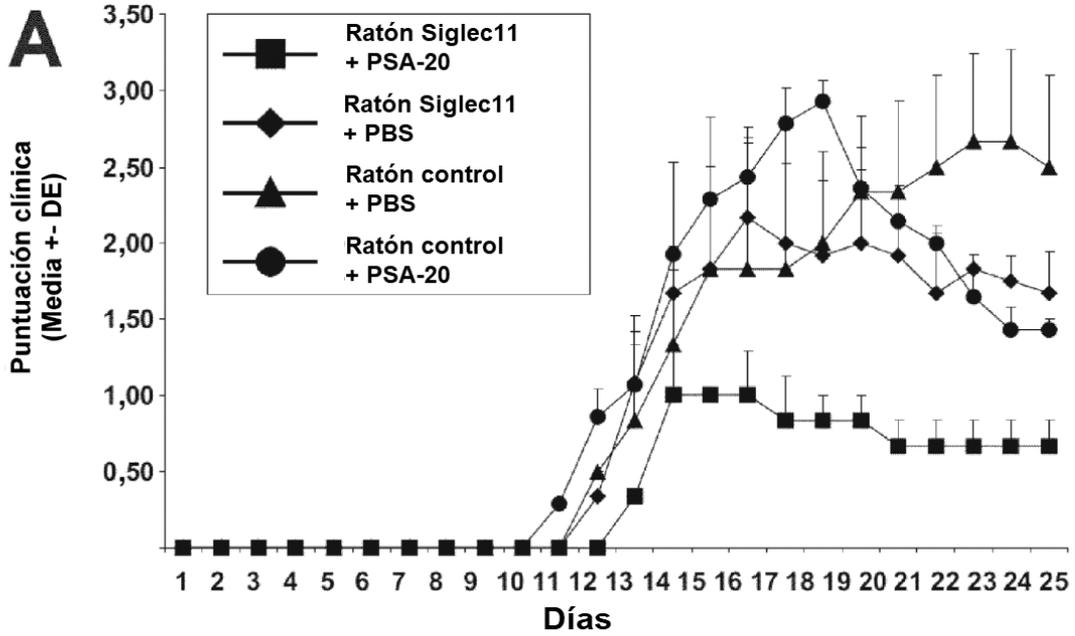


Figura 8

Figura 9

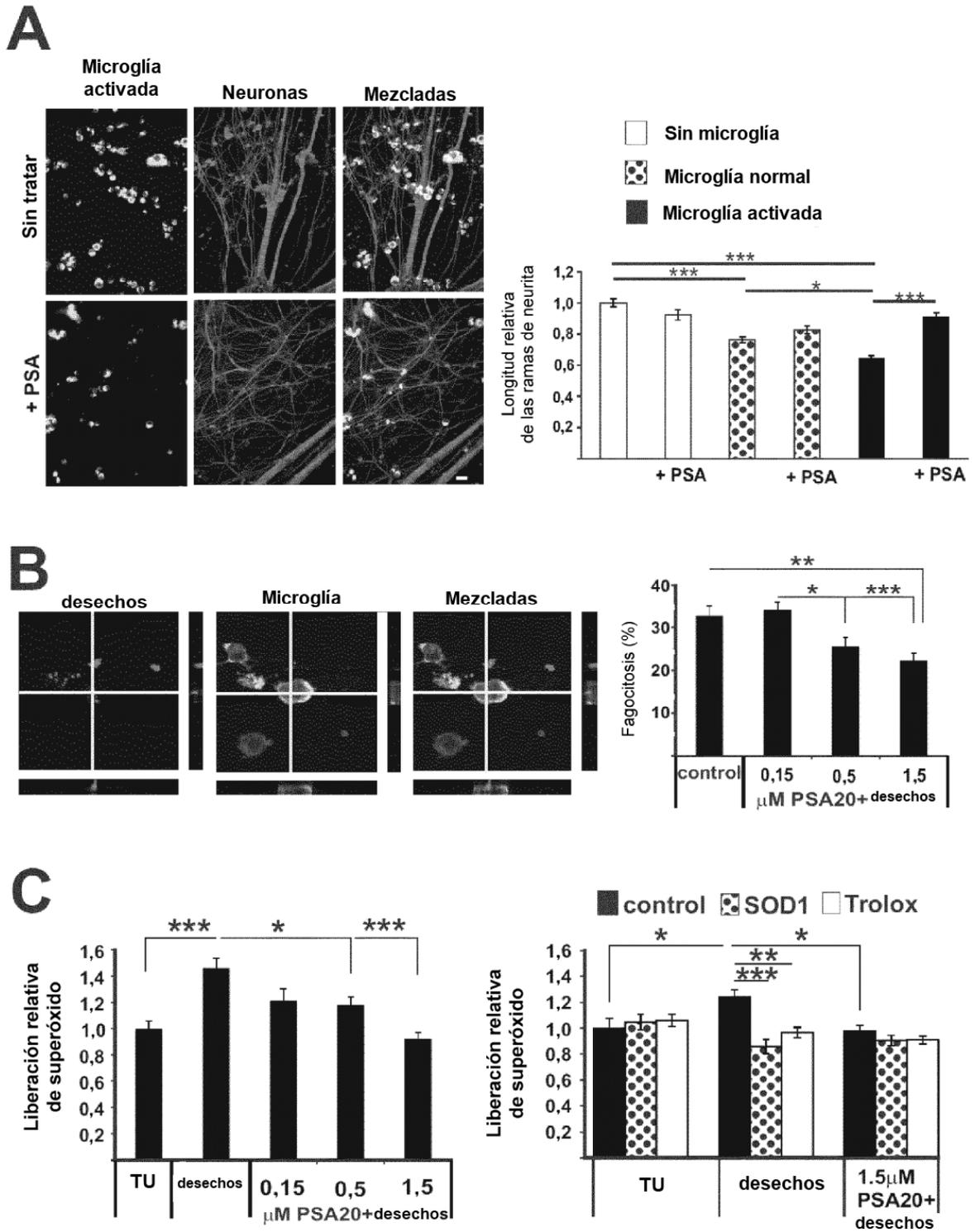


Figura 10

