

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 448**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 14/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2014 PCT/FI2014/050491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014 E 14812998 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3010524**

54 Título: **La protamina en el tratamiento de las lesiones neuronales**

30 Prioridad:

18.06.2013 FI 20135667

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

06.07.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF HELSINKI (100.0%)
Yliopistonkatu 4
00014 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**RAUVALA, HEIKKI;
PAVELIEV, MIKHAIL;
KUJA-PANULA, JUHA;
ROUHIAINEN, ARI y
KULESSKAYA, NATALIA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 771 448 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

La protamina en el tratamiento de las lesiones neuronales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al tratamiento de lesiones neuronales. Específicamente, la presente invención se refiere a nuevos medios y mecanismos para promover el crecimiento de neurita y/o la regeneración neuronal en enfermedades en las que los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) tienen efectos adversos sobre la regeneración o el mantenimiento neuronal, tales como los daños del sistema nervioso.

Antecedentes de la invención

10 Las lesiones del sistema nervioso afectan a millones de personas cada año. Como consecuencia de esta alta incidencia de las lesiones neurológicas, la regeneración neuronal y su reparación se está convirtiendo en un campo de rápido crecimiento dedicado al descubrimiento de nuevas formas de recuperar la funcionalidad nerviosa después de sufrir una lesión. El sistema nervioso se divide en dos partes: el sistema nervioso central (SNC), que consiste en el cerebro y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (PNS), que consiste en los nervios craneales y espinales junto con sus ganglios asociados. Una lesión cerebral o daño cerebral es la destrucción o degeneración de
15 las células cerebrales en el cerebro de un organismo vivo. Las lesiones cerebrales se pueden clasificar teniendo en cuenta las diversas dimensiones. Las lesiones cerebrales primarias y secundarias son formas de clasificar los procesos lesivos que se producen en las lesiones cerebrales.

20 La regeneración postraumática del cerebro y la médula espinal es un problema médico importante sin resolver porque el cerebro y la médula espinal no son capaces de regenerarse como el sistema nervioso periférico. Mientras que los axones periféricos son capaces de regenerarse en pacientes después de sufrir una lesión nerviosa, los axones del cerebro y de la médula espinal no se regeneran debido a que se forman cicatrices gliales y por la consecuente acción inhibitoria de los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) en la cicatriz. Además, los factores que promueven la regeneración del nervio periférico, por ejemplo el factor de crecimiento nervioso, NGF, son incapaces de regenerar el cerebro y la médula espinal. El sistema nervioso central y el sistema nervioso
25 periférico son muy diferentes en sus reacciones al tratamiento farmacológico y a la capacidad de regeneración.

30 Identificar los mecanismos moleculares que guían el desarrollo neuronal ha sido un gran reto. La inhibición de los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) como un mecanismo para mejorar el crecimiento neuronal ha acaparado un considerable interés. Los CSPG han sido implicados en la inhibición de la regeneración de axones y dendritas tras los traumatismos del SNC (Silver and Miller, 2004). Los CSPG también son conocidos por ser parte de las cicatrices gliales que forman la post-lesión, actuando como una barrera para prevenir la extensión de los axones y el recrecimiento de estos. Se ha encontrado que los niveles de versicano, neurocano, brevicano y fosfatano (los CSPG medidos) están sobre-regulados después de una lesión de la médula espinal (Jones et al., 2003).

35 El documento WO2004/103299 describe un método para mejorar la recuperación funcional después de una lesión por una contusión en el sistema nervioso central. La invención descrita se dirige a un método de utilización de la condroitinasa (enzima degradante de sulfato de condroitina) para promover la recuperación funcional neurológica autónoma después de una lesión en la médula espinal o a ésta. Las composiciones útiles en el método incluyen formulaciones aceptables de condroitinasa. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la enzima degradante de glicosaminoglicano. Las enzimas degradantes del glicosaminoglicano pueden ser las
40 enzimas degradantes del sulfato de dermatán o del sulfato de condroitina. La recuperación funcional puede incluir funciones autónomas, funciones sensoriales, funciones motoras o similares.

45 El documento WO2005/087920 se refiere a la condroitinasa recombinante y modificada ABC I, su producción y sus usos. Las enzimas ABC I condroitinasa descritas son útiles para una variedad de propósitos, incluyendo métodos terapéuticos como promover la regeneración nerviosa, promover la recuperación por accidentes cerebrovasculares, el tratamiento de las lesiones de la médula espinal, el tratamiento de la enfermedad epitelial, el tratamiento de infecciones y el tratamiento del cáncer.

50 Otros enfoques para la inhibición de CSPG se han centrado en el uso de moléculas/agentes que inhiben la interacción de CSPG con su receptor RPTP σ . El documento WO2011/022462 describe el uso de fragmentos solubles de RPTP que unen CSPGs, actuando así como inhibidores competitivos para evitar que los CSPG se unan al RPTP en la neurona. La célula neural se puede asociar con una lesión o condición neurodegenerativa. El documento WO2012/112953 describe métodos para poner en contacto una neurona con un agente que une RPTP σ , para inducir así el crecimiento neuronal de la neurona. El agente puede inducir la agrupación en clústeres de RPTP σ y/o inhibir la unión de CSPG a RPTP σ . Ejemplos de agentes adecuados son heparán sulfato proteoglicano, sulfato de heparano, oligosacáridos de sulfato de heparano, u oligosacáridos de heparina.

55 Con respecto a las lesiones del sistema nervioso, hay importantes poblaciones de pacientes con necesidades significativas no satisfechas, para las que se requieren desesperadamente nuevas opciones de tratamiento. Actualmente no hay ningún tratamiento para recuperar la función nerviosa humana después de sufrir una lesión en el sistema nervioso central. Hasta el momento, los mecanismos de las lesiones secundarias se han basado

predominantemente en tratamientos neuroprotectores. Sin embargo, los compuestos y enfoques, que han sido probados en ensayos clínicos hasta ahora, han fracasado decepcionantemente por no demostrar una clara eficacia. En consecuencia, el uso de estrategias neuroprotectoras, como la opción de tratamiento principal para lesiones del sistema nervioso central sigue en cuestión y, por lo tanto, se requieren enfoques novedosos. Encontrar mecanismos y medios para promover la regeneración nerviosa es importante también clínicamente, ya que es parte de la patogénesis de muchas enfermedades. En la búsqueda de agentes neuroestimulantes que promuevan la regeneración nerviosa, se requieren modelos bien definidos y, también, métodos de análisis.

Breve descripción de la invención

Por lo tanto, un objetivo de la descripción es proporcionar nuevos medios y mecanismos para promover el crecimiento de las neuritas y/o la regeneración neuronal, por ejemplo, en lesiones del sistema nervioso.

Otro objeto de la descripción es proporcionar un método para promover el crecimiento de las neuritas y/o la regeneración neuronal.

Los objetos de la descripción se logran mediante el uso novedoso de protamina o un péptido o un fragmento de los mismos. Además, los objetos se logran proporcionando un método novedoso para promover el crecimiento neuronal mediante el contacto de la neurona con protamina, o un péptido o un fragmento de los mismos. Las realizaciones de la invención se describen en las reivindicaciones.

La invención se basa en la sorprendente realización y hallazgo inesperado de que la protamina cambia la matriz CSPG de la regeneración que inhibe a la estructura de activación de la regeneración. Aunque el sulfato de protamina puede unir a la heparina, y se utiliza durante la cirugía de bypass cardiopulmonar para neutralizar los efectos anticoagulantes, no se han identificado otros usos clínicos de la protamina para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas u otras.

Por otra parte, la presente solicitud describe, sorprendentemente, que la protamina promueve el crecimiento de neuritas y/o la regeneración neuronal mediante el aumento de la cantidad de condroitina sulfato proteoglicano, CSPG, unión a su receptor RPTP σ . Se puede esperar que la protamina secuestre los CSPG de RPTP σ , a través de la interacción de sus residuos básicos con las cadenas laterales del sulfato cargadas negativamente, pero los presentes inventores encontraron que lo contrario era cierto. A través de este novedoso mecanismo, se puede afirmar que la protamina puede promover el crecimiento de neuritas mediante la modulación de la matriz CSPG que conduce a su mayor unión de epítomos de sulfato de condroitina a RPTP σ . Por lo tanto, la protamina y el novedoso mecanismo de acción son ventajosos y útiles para el tratamiento de lesiones neuronales.

Además, sorprendentemente, se ha encontrado que los nuevos péptidos de la presente descripción, que son derivados de la protamina, promueven efectos de crecimiento de neuritas que son comparables a la protamina natural.

Una ventaja de la invención es que la protamina promueve la regeneración del SNC mediante la conversión de la cicatriz glial enriquecida con CSPG en un ambiente favorable para el crecimiento de axones y dendritas en el SNC adulto. Además, el sulfato de protamina ya ha sido clínicamente aprobado por la FDA y, por lo tanto, se han abordado los problemas de seguridad/ toxicidad.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá con mayor detalle mediante realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1. La alineación de las secuencias de protamina en humanos (UniProtKB P04553), salmón (UniProtKB P69014), ratón (UniProtKB P02319), rata (UniProtKB P10118), caballo (UniProtKB P15341), orca asesina (UniProtKB P24713) y ovejas (UniProtKB P68038) muestran una similitud significativa. Los aminoácidos se resaltan con más del 70% de identidad (negro) y semejanza (gris).

Figura 2. La protamina promueve el crecimiento de neuritas en sustrato recubierto de CSPG en neuronas corticales de rata in vitro. El proteoglicano del sulfato de condroitina evita la unión y el crecimiento de neuritas en las neuronas corticales de ratas embrionarias. La protamina supera la acción inhibitoria del agrecano, promoviendo la unión neuronal y el crecimiento de neuritas en el sustrato recubierto de agrecano in vitro.

Figura 3. Los péptidos derivados de la protamina promueven el crecimiento de neuritas en sustrato recubierto de CSPG en neuronas corticales de rata in vitro. El proteoglicano de sulfato de condroitina agrecano previene la unión y el crecimiento de las neuritas en las neuronas corticales de rata embrionaria (Figura 3A). El péptido 2 (SEQ ID NO:3), Péptido 12 (SEQ ID NO: 10) y también la protamina pegilada superan la acción inhibitoria del agrecano, promoviendo la unión neuronal y el crecimiento de neuritas en el sustrato agrecanado in vitro.

El proteoglicano de sulfato de condroitina agregano evita la unión y el crecimiento de neuritas en las neuronas hipocampales de ratas embrionarias (Figura 3B). El péptido 3 (SEC ID NO:4) supera la acción inhibitoria del agregano, promoviendo la unión neuronal y el crecimiento de neuritas en el sustrato recubierto de agregano in vitro.

5 Figura 4. La protamina aumenta la cantidad de uniones de agreganos a RPTP σ . Se utilizó RPTP σ mutante con un sitio de enlace CSPG defectuoso como control negativo.

Figura 5. El péptido 12 (señalado en la figura como protamina corta) mejora la recuperación funcional según lo evaluado por las pruebas de comportamiento de la rejilla vertical (A) y el cilindro (B).

Descripción detallada de la invención

10 La presente descripción se refiere a un uso de protamina o un fragmento de ésta para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso en un sujeto. Específicamente, la presente descripción se refiere a un uso de la protamina o un fragmento de la misma como terapia antiCSPG en enfermedades en las que los CSPG restringen la regeneración o el mantenimiento neuronal. Según la descripción, la protamina promueve el crecimiento de neuritas y la unión neuronal en sustrato recubierto de CSPG al superar la acción inhibitoria de CSPG (Figura 2). Además, según una realización de la descripción, la protamina aumenta la interacción del proteoglicano de condroitina sulfato (CSPG) con el receptor proteína tirosina fosfatasa sigma (RPTP σ) (Figura 4), promoviendo así el crecimiento de neuritas.

La presente descripción se refiere también a un péptido de protamina que consiste en una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3, o su variante. Además, la presente descripción se refiere al uso de un péptido de protamina que consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 3 como medicamento.

20 La presente descripción se refiere también al uso de un péptido de protamina que consiste en una secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 o su variante en el tratamiento de lesiones neuronales en un sujeto.

Según la presente descripción, la protamina o un péptido o fragmento de la misma se utilizan en el tratamiento de trastornos neuronales, que incluyen una enfermedad, trastorno, o condición directa o indirectamente que afecta al funcionamiento normal o anatomía del sistema nervioso de un sujeto. El trastorno puede ser una lesión neuronal, que puede ser aguda o crónica. Ejemplos de lesiones agudas son las que resultan de cirugías, traumatismos, compresiones, contusiones, transecciones u otras lesiones físicas, lesiones farmacológicas vasculares u otros daños, incluyendo los daños hemorrágicos o isquémicos. Una lesión neuronal crónica puede ser el resultado de un estrés continuado, inflamaciones/ estrés oxidativo dentro de un tejido neural causado por una enfermedad, enfermedades degenerativas u otras enfermedades neurológicas.

30 Según la presente descripción, la protamina o un péptido o fragmento de la misma son beneficiosos en todas las enfermedades en las que la matriz CSPG es inhibitoria para la regeneración o el mantenimiento de axones y dendritas. En una realización, la enfermedad es una lesión neuronal seleccionada de un grupo que consiste en enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, lesión del nervio periférico, lesión ocular y quemaduras en la piel. Preferiblemente, la lesión neuronal es TBI o SCI.

35 Las protaminas son pequeñas proteínas nucleares ricas en arginina que tienen reemplazadas las histonas al final de la fase haploide de la espermatogénesis y se cree que son esenciales para la condensación de espermatozoides y la estabilización del ADN. La protamina ha demostrado ser capaz de condensar el ADN plasmídico eficientemente para su entrega en varios tipos diferentes de células. El sulfato de protamina es una forma de sal comúnmente utilizada de la protamina.

40 Se han determinado secuencias genéticas y proteicas para protaminas de numerosas especies de vertebrados. Los ratones, los humanos y ciertos peces tienen dos o más protaminas diferentes, mientras que los espermatozoides de los conejos, por ejemplo, tienen una sola forma. Las dos protaminas humanas son denominadas PRM1 (UniProtKB P04553) y PRM2 (UniProtKB P04554), mientras que ejemplos protamínicos de peces incluyen salmón del salmón (UniProtKB P69014), clupeína de arenque (UniProtKB P69010) e iridina de la trucha arco iris (UniProtKB P02328). La Figura 1 muestra una alineación secuencial de protaminas derivadas de diferentes especies y demuestra la cantidad significativa de conservación a lo largo de las secuencias de aminoácidos.

50 El sulfato de protamina puede unir la heparina y se utiliza obligatoriamente durante la cirugía de bypass cardiopulmonar para neutralizar los efectos anti-coagulación de la heparina. Se estima que más de dos millones de pacientes están expuestos a la interacción con heparina-protamina al año, administrándose 1 mg de sulfato de protamina (i.v.) por cada 100 UI de heparina activa. La neutralización de la protamina de la heparina puede causar un aumento en la presión arterial pulmonar y una disminución en la presión arterial sistólica y diastólica, el consumo de oxígeno miocárdico, la salida cardíaca, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular sistémica. Estos múltiples efectos cardiovasculares se median a través de la activación del complemento, la liberación de histamina, la producción de tromboxano y óxido nítrico, y la formación de anticuerpos (Carr y Silverman). Puesto que la protamina es un péptido altamente catiónico, puede unirse a la heparina para formar un par de iones estable, que no tienen actividad anticoagulante. El complejo de heparina-protamina es luego eliminado y descompuesto por el sistema reticuloendotelial.

La protamina también se ha utilizado en la transferencia de genes, purificación de proteínas y en los cultivos de tejidos como retitulador para la transducción viral.

Según la presente descripción, la protamina puede tener, por ejemplo, una secuencia establecida por SEQ ID NO: 1 o cualquier otra secuencia similar. La presente descripción se refiere también al uso de fragmentos de protamina. Como se utiliza en el presente documento, "un fragmento" se refiere a cualquier parte de la protamina que es lo suficientemente largo como para tener la actividad deseada del crecimiento de las neuritas. En una realización preferida, la protamina o un fragmento de la misma es nativa, es decir, una proteína en su estado natural, inalterada por el calor, los productos químicos, la acción enzimática o las exigencias de la extracción.

Según la presente descripción, "una variante" del péptido de protamina puede comprender sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o inserciones, y todavía funcionar de una manera sustancialmente similar al péptido de protamina definido anteriormente.

Los péptidos de la presente descripción y sus variantes pueden fusionarse con otras proteínas, polipéptidos o péptidos (N- o C-terminal), o conjugarse con otras sustancias. Los péptidos de la presente descripción también pueden estar unidos o conjugados con sustancias que mejoren su capacidad para pasar a través de la barrera hematoencefálica. Según una realización, también se abarcan péptidos que exhiben al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el péptido que tiene SEQ ID NO:3. Si dos moléculas de aminoácidos tienen secuencias de aminoácidos que son al menos, por ejemplo, un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% "idénticas", se puede determinar utilizando algoritmos informáticos conocidos como el programa "FASTA", utilizando por ejemplo, los parámetros predeterminados como en Pearson et al. (1988) PNAS USA 85: 2444.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "crecimiento de neuritas" o "sobrecrecimiento de neuritas" incluye el proceso por el cual los axones o las dendritas se prolongan desde una neurona a otra. El crecimiento puede resultar en una nueva proyección neurítica o en la extensión de un proceso celular preexistente. El crecimiento de neuritas puede incluir la extensión lineal de un proceso axonal por cinco diámetros celulares o más. Las "neuronas del sistema nervioso central (SNC)" incluyen las neuronas del cerebro, los nervios craneales y la médula espinal. La invención se refiere no sólo a las neuronas del SNC, sino también a las neuronas periféricas que emiten proyecciones (axones) en el SNC, por ejemplo, las neuronas ganglionales de la raíz dorsal.

Como se utiliza en este documento, la expresión "lesión cerebral" es la destrucción o degeneración de las células cerebrales en el cerebro de un organismo vivo. Las lesiones cerebrales pueden ser el resultado de impactos directos en la cabeza. Tales lesiones son, por ejemplo, lesiones cerebrales traumáticas y lesiones de la médula espinal. La presente invención también se puede utilizar en el tratamiento de otros trastornos neuronales, que incluyen enfermedades, trastornos o condiciones que afectan, directa o indirectamente, al funcionamiento normal o la anatomía del sistema nervioso de un sujeto. El trastorno puede ser una lesión neuronal, que puede ser aguda o crónica. Ejemplos de lesiones agudas son las que resultan de una cirugía, traumatismo, compresión, contusión, transección u otras lesiones físicas, lesiones farmacológicas vasculares u otros daños, incluyendo los daños hemorrágicos o isquémicos. La lesión neuronal crónica puede ser el resultado de un estrés continuado, inflamación/estrés oxidativo dentro de un tejido neural causado por enfermedades, enfermedades neurodegenerativas u otras enfermedades neurológicas. La invención puede ser beneficiosa en todas las enfermedades en las que la matriz CSPG es inhibidora para la regeneración o el mantenimiento de axones, como TBI, SCI, esclerosis múltiple (enfermedad EM) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Una "lesión cerebral traumática, TBI", tal como se utiliza en el presente documento, incluye la condición en la que un golpe traumático en la cabeza causa un daño al cerebro o a su propia conexión con la médula espinal, con o sin penetración del cráneo. Se relaciona más específicamente con los daños mecánicos reales que se producen según el tipo de traumatismo causado, tales como cortes, desgarros y estiramiento de axones, neuronas y vasos sanguíneos. Por lo general, los traumatismos iniciales pueden dar lugar a una expansión de los hematomas, hemorragias subaracnoideas, edemas cerebrales, una presión intracraneal elevada e hipoxia cerebral, que a su vez puede conducir a eventos secundarios graves debido al bajo flujo sanguíneo cerebral.

"Una lesión de la médula espinal, SCI", tal como se utiliza en este documento, es un daño a cualquier parte de la médula espinal o los nervios al final del canal espinal. A menudo causa cambios permanentes con respecto a la fortaleza, la sensibilidad y otras funciones del cuerpo tras el sitio de la lesión. La lesión de la médula espinal puede ser una separación completa de la médula espinal, una separación parcial de la médula espinal o una lesión por aplastamiento o compresión de la médula espinal. La lesión de la médula espinal SCI procede durante minutos, horas, días e incluso meses después del daño traumático inicial y puede conducir a una expansión significativa del daño original. Estos eventos secundarios son una consecuencia de cambios bioquímicos, metabólicos y celulares retardados, que son iniciados por la lesión primaria, y que incluyen inflamación, muerte celular inducida por radicales libres y excitotoxicidad de glutamato.

La brotación axonal, a partir de las neuronas supervivientes, se asocia con la recuperación motora y sensorial espontánea después de TBI y SCI. Aunque el SNC tiene una capacidad limitada para regenerarse, la brotación espontánea de axones pericontusionales tiene lugar aproximadamente 1-2 semanas después del traumatismo. Sin embargo, este proceso normalmente falla debido a un entorno axonal inhibitorio promovido por proteoglicanos de

sulfato de condroitina (CSPGs). Los astrocitos, en el lugar de la lesión, producen CSPGs, más allá de los cuales los axones no pueden regenerarse (Silver and Miller, 2004). La inhibición de la actividad de CSPG representa un enfoque potencial para la neuro-regeneración, después de TBI o SCI. Pruebas que apoyan esta teoría se han proporcionado a través del uso de condroitinasa ABC (ChABC, una enzima que degrada los CSPG) en el lugar del traumatismo en los modelos de roedores de TBI y SCI. El tratamiento con ChABC dio como resultado una respuesta de brotación mejorada y prolongada con un aumento de la función sensorial, motora y autonómica (Harris et al., 2010, Starkey et al., 2012).

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica mediada por el sistema inmunitario que se caracteriza por procesos desmielinizadores y degenerativos dentro del sistema nervioso central. La EM requiere potencialmente terapias sintomáticas y modificadoras de la enfermedad. Numerosos síntomas como fatiga, espasticidad, depresión, disfunción intestinal y vesical, dolor y movilidad deteriorada se asocian con el daño neurológico que resulta de la EM. Varias terapias, por ejemplo, modafinilo, dalfampridina, baclofeno, diazepam, gabapentina, opioides se utilizan para el tratamiento sintomático de la discapacidad y los síntomas, pero estos no mejoran el resultado de la enfermedad. Los corticoesteroides intravenosos se utilizan en el tratamiento de las exacerbaciones de la EM, pero no parecen afectar el grado de mejora de las exacerbaciones agudas. Una terapia más definitiva para la EM debe reducir la tasa de recaídas, prolongar la remisión, limitar la aparición de nuevas lesiones de EM y posponer el desarrollo de la discapacidad a largo plazo. Actualmente existen terapias modificadoras de la enfermedad de la EM disponibles, pero hasta ahora no se ha establecido ningún agente beneficioso en la EM primaria-progresiva.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de las neuronas motoras y la enfermedad de Lou Gehrig, es la forma más común de las enfermedades de las neuronas motoras. El trastorno se caracteriza por una debilidad rápidamente progresiva, atrofia muscular, espasmos y espasticidad, dificultad para hablar y tragar y una disminución en la capacidad respiratoria. La característica definitoria de la ELA es la muerte de las neuronas motoras superior e inferior en la corteza motora del cerebro, el tallo cerebral y la médula espinal. La enfermedad tiene su aparición generalmente en la mediana edad y conduce a la muerte en los siguientes 3-5 años desde el diagnóstico, generalmente debido a una insuficiencia respiratoria. Una vez diagnosticados, solo el 10% de los pacientes sobreviven durante más de 10 años. En los Estados Unidos, hay aproximadamente 30.000 enfermos de ELA y 5.000 nuevos casos cada año. Aunque actualmente hay varios ensayos clínicos en curso para encontrar nuevos tratamientos para la ELA, no existe aún ninguna terapia curativa para la ELA y los cuidados paliativos siguen siendo el medio de tratamiento más importante.

"Los proteoglicanos de sulfato de condroitina, CSPGs", tal como se utilizan en el presente documento, representan una clase variada de macromoléculas de la matriz extracelular complejas. Comparten una estructura molecular general que comprende una proteína central del núcleo con cadenas laterales de azúcar muy sulfatadas, generalmente glicosaminoglicanos (GAG), unidas a través de enlaces covalentes. Las cadenas laterales GAG son de diferentes longitudes, que definen parcialmente los diferentes CSPG, por ejemplo, agregano (CSPG1), versicano (CSPG2), neurocano (CSPG3), brevicano (CSPG7) y fosfacano. Algunos de estos agreganos comparten dominios N-terminal y C-terminal similares.

Los CSPG desempeñan un papel activo en el desarrollo neuronal de los bebés posnatales, actuando como señales de orientación para el desarrollo de los conos de crecimiento. Se encuentran axones de crecimiento que evitan áreas densas CSPG. Del mismo modo, los CSPG encontrados cerca y alrededor de las placas de techo embrionarias inhiben el alargamiento de axones a través de la médula espinal y dirigen los axones en una dirección alternativa. Se encontró que los CSPG ausentes en las placas del techo atraían el alargamiento axonal (Snow et al., 1990).

Según la presente descripción, la protamina promueve el crecimiento de neuritas en sustratos recubiertos de CSPG. Los sustratos recubiertos con CSPG son un modelo experimental de una matriz CSPG. Se pueden preparar, por ejemplo, recubriendo un CSPG, como el agregano, en pocillos de cultivos de tejidos. Se encontraron efectos anti-CSPG in vivo usando condroitinasa ABC originalmente utilizando ensayos in vitro (Kwok JC et al 2011). Como se utiliza en este documento, la matriz CSPG significa el tipo de matriz extracelular que expresa los proteoglicanos del sulfato de condroitina. La matriz extracelular (ECM) proporciona una serie de funciones críticas en el SNC, contribuyendo tanto a la organización estructural general del SNC como al control de las células individuales. A nivel celular, la ECM afecta a sus funciones mediante una amplia gama de mecanismos, incluyendo la proporción de apoyo estructural a las células, la regulación de la actividad de los sistemas de segundo mensajero, y el control de la distribución y la concentración local del crecimiento y de la diferenciación. La matriz extracelular cerebral tiene efectos tróficos en las células neuronales y afectan al crecimiento de las neuritas.

Sólo recientemente se ha identificado un receptor, la proteína tirosina fosfatasa sigma (RPTP σ) para los CSPGs (Shen et al., 2009). Anteriormente se demostró que el bloqueo del gen RPTP σ mejoraba la regeneración en los nervios ciáticos, pero el mecanismo por el cual se logró no estaba claro. Se demostró una interacción entre el neurocano y el agregano con RPTP σ , que dependía de las cadenas laterales de sulfato de condroitina. RPTP σ tiene una región conservada, cargada positivamente, en el primer dominio de inmunoglobulina que se sabe que interactúa con el sulfato de heparina (Aricescu et al., 2002). La mutación de un grupo de cuatro residuos de lisina en esta área a alaninas redujo la unión de CSPG a RPTP σ a los niveles iniciales.

Un efecto funcional de la interacción de RPTP σ y CSPG se ha demostrado mediante el uso de neuronas de ganglio surgente de raíz dorsal (DRG) que expresan, constitutivamente, altos niveles de RPTP σ . Se cultivaron neuronas DRG naturales en paralelo con las de ratones con una alteración genética específica de RPTP σ en presencia de una mezcla CSPG. El control del crecimiento de las neuronas DRG se redujo en aproximadamente un 50% en presencia de la mezcla CSPG, pero tuvo mucho menos efecto en esas neuronas de ratones RPTP $\sigma^{-/-}$. Cuando las neuronas DRG fueron expuestas a neurocano purificado, se observaron resultados similares.

También se ha demostrado el papel de RPTP σ en la inhibición de la regeneración de axones y dendritas, a través de la interacción de CSPG, después de lesiones utilizando modelos in vivo apropiados. En ratones PTP $\sigma^{-/-}$, después de una lesión por aplastamiento de la columna dorsal, la extensión axonal en la penumbra de la lesión mejoró significativamente en comparación con los controles (Shen et al., 2009). También se ha evaluado la capacidad de los axones del tracto corticoespinal (CST) para regenerarse después de la hemisección espinal y la lesión por contusión en ratones PTP $\sigma^{-/-}$. Se encontró que las fibras CST dañadas, en ratones PTP $\sigma^{-/-}$, se regeneraban y se extendían durante largas distancias después de una lesión en la médula espinal torácica. Por el contrario, no se vio una regeneración de axones a larga distancia de las fibras CST después de lesiones similares en ratones naturales (Fry et al., 2010).

RPTP σ también es conocido por unir proteoglicanos de sulfato de heparán (HSPG), que son similares a los CSPG, porque contienen un núcleo proteico con cadenas laterales de azúcar muy sulfatadas y cargadas negativamente. Aunque se ha demostrado que los CSPG, a través de RPTP σ , tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento neuronal, los HSPG, que también actúan a través de RPTP σ , promueven fuertemente el crecimiento neuronal (Coles et al., 2011). Tanto los CSPG como los HSPG se unen a un sitio común en RPTP σ y estos efectos diferenciales se racionalizaron en función del estado de oligomerización de RPTP σ . Se encontraron GAG de sulfato de heparano para inducir la oligomerización de fragmentos de RPTP σ , pero los GAG de sulfato de condroitina no admitían la agrupación en racimos. Los HSPG y los CSPG difieren en la composición de sus cadenas GAG; los grupos de sulfato se distribuyen de manera más uniforme en los CSPG, mientras que los HSPG contienen áreas de alta sulfatación. La oligomerización del receptor puede causar microdominios con altos niveles de fosfotirosina y apoyar la extensión neuronal, que los CSPG son capaces de interrumpir y, por lo tanto, inhibir el crecimiento de axones (Coles et al., 2011).

En la presente descripción, la protamina o un péptido o un fragmento de la misma se utiliza para el tratamiento de lesiones neuronales. El tratamiento se refiere a aumentar, mejorar y promover la regeneración de neuronas y/o crecimiento nervioso en presencia de una lesión neuronal. El tratamiento abarca tanto los regímenes de tratamientos terapéuticos como profilácticos.

De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, la protamina o el péptido o un fragmento de la misma puede formularse en una preparación farmacéutica, que puede ser administrado a un sujeto para prevenir o tratar lesiones neuronales. La preparación farmacéutica puede comprender además cualquier otro agente terapéuticamente eficaz y cualquier otro agente, como excipientes farmacéuticamente aceptables, portadores, tampones, adyuvantes, antisépticos, empastes, agentes estabilizadores y espesantes y o cualquier componente bien conocido en la técnica.

En una realización preferida, un sujeto es un ser humano y/o un animal.

La presente descripción también se refiere a un método para promover el crecimiento neuronal y/o la regeneración neuronal. Esto se logra mediante el contacto de las neuronas con una cantidad terapéuticamente eficaz de protamina o un fragmento de la misma o el péptido de la invención. El contacto puede ocurrir in vitro o in vivo con la célula neuronal. In vitro, la protamina se puede agregar a un cultivo celular que contiene la neurona. La protamina, in vivo, se puede administrar a un sujeto, de tal manera que una cantidad efectiva de ella entre en contacto con la neurona para inducir así el crecimiento neuronal. En una realización, la neurona es una neurona del sistema nervioso central.

El término "administrado" o "administración" a un sujeto incluye la dispensación, entrega o aplicación del agente al sujeto por cualquier vía adecuada para la entrega del agente a un sitio en el cuerpo donde se desea el crecimiento neuronal. La protamina se puede administrar directamente al sistema nervioso (particularmente en el lugar de la lesión), intracranalmente, intraespinal, intracerebroventricular, intravenosa, tópica o intratecal, por ejemplo, en una lesión crónica de una enfermedad neurodegenerativa o en el(los) sitio(s) de la lesión traumática.

El término "administrado" o "administración" a un sujeto incluye la dispensación, entrega o aplicación del agente al sujeto por cualquier vía adecuada para la entrega del agente a un sitio en el cuerpo donde se desea el crecimiento neuronal. La protamina puede ser entregada de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Estos incluyen, sin limitación, administración subcutánea, intramuscular, transdérmica, intravenosa, oral, sublingual, nasal, rectal y tópica. En una realización de la invención, la PEGilación de la protamina se utiliza para modificar la farmacocinética de un medicamento y su interacción con los tejidos vivos. La PEGilación del sulfato de protamina mejora su capacidad para promover el crecimiento de neurita en CSPG-sustrato en neuronas corticales.

Un método preferido de administración es introducir la protamina o un péptido o fragmento de la misma en el lugar de la lesión en una operación quirúrgica. Otro método preferido de administración es introducir la protamina en el

sitio de la lesión sin cirugía abierta, por ejemplo, por inyección. Preferiblemente, la protamina se administra a través de la inyección directa o la material de implantación del vehículo unido a la protamina (estructura) o vector viral que expresa la protamina bajo una señal de secreción escindible diseñada en la construcción. Las estructuras pueden incluir componentes naturales (agrecano, neurocano, ácido hialurónico) o materiales artificiales. La vía de administración y el régimen de dosificación serán determinados por médicos cualificados, en función de factores como la naturaleza exacta de la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, y la edad y condición física general del paciente.

En una realización, la administración debe ponerse en contacto con las neuronas lesionadas y/o no lesionadas proximales al sitio de la lesión. En una realización, la administración es tal que la entrega del agente a través de la barrera hematoencefálica. El agente de la presente invención puede formularse como parte de composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los agentes específicos.

La expresión "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un agente activo suficiente para inducir un resultado biológico deseado, por ejemplo, la promoción y/o restauración de la regeneración neuronal y/o el crecimiento de las neuritas. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, los síntomas o las causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico.

El crecimiento neuronal inducido por los métodos descritos en el presente documento puede determinarse mediante una variedad de métodos, como por ejemplo mediante la determinación de la formación de axones (por ejemplo, la detección de la formación de ramificaciones neuronales microscópicamente o mostrando el transporte del citoplasma de tintes). El crecimiento neuronal también se puede detectar mediante la determinación de la formación de la conectividad neuronal.

El crecimiento también se puede determinar por un aumento o una restauración de la función de la neurona. La función neuronal se puede medir mediante ensayos estándar como la detección del potencial de acción o la condición del impulso nervioso mediante ensayos estándar.

Ejemplos

Reactivos y productos químicos

La protamina (salmón) y el sulfato de protamina (arenque) eran de Sigma, el sulfato de protamina (salmón) era de Leo Pharma. El agregano bovino era de Sigma. La secuencia de ADN (el clon de cADN de plantilla MGC:63375 IMAGE:6834684) del dominio de unión de CSPG del RPTP σ de ratón se utilizó para la producción de proteínas RPTP σ marcadas por Fc. Los péptidos derivados de la secuencia de protamina fueron sintetizados a medida por CASLO ApS (Dinamarca).

Ensayo de crecimiento de neuritas

Las neuronas corticales o hipocámpales de embriones de rata E17 se pusieron en placas a 50.000 células/cm² en placas de cultivo de células plásticas. Las placas estaban precubiertas con agregano o IgG (10 μ g/ml). La protamina, o los péptidos derivados, fueron pre-recubiertos junto con agregano o añadidos al medio de cultivo al poner en placas las neuronas. Las células se cultivaron durante 1,5-3,5 días y, después de eso, se tomaron imágenes de cultivos celulares utilizando un microscopio de contraste de fase con objetivo x20. La longitud de las neuritas se cuantificó utilizando el software ImagePro. Las neuronas de ratón fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-tubulina β III e imágenes con microscopio fluorescente.

Ensayo de unión de RPTP σ

El dominio extracelular marcado con Fc de RPTP σ fue inmovilizado en placas recubiertas de proteína G. La unión del agregano biotilado a RPTP σ se cuantificó mediante un ensayo colorimétrico utilizando peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina. Los experimentos se realizaron utilizando placas de 96 pocillos recubiertas con proteína G (Pierce, prod. N°. 15133). Los pocillos se lavaron primero brevemente con PBS, 0,05% Tween-20 solución. Las proteínas de fusión FC mutadas y RPTP σ natural se diluyeron en 2 μ g/ml de solución en tampón que contenía PBS, 1% de BSA, 0,05% de Tween-20. Se añadieron 150 μ l de solución proteica en los pocillos y se dejaron placas para agitar a +RT durante 1 hora. Los pocillos fueron lavados 3 veces 5 minutos con 200 μ l de PBS, 0,05% Tween-20. Durante los pasos de recubrimiento y lavado, el agregano biotilado se diluyó a 5 μ g/ml con diferentes cantidades de protamina (0-5 μ g/ml) en solución que contenía PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20. El agregano y la protamina se quedaron juntos con agitación durante 30 minutos antes de aplicar 150 μ l de esta solución en los pocillos recubiertos de RPTP σ lavados. Los pocillos fueron dejados en agitación a +RT durante 1 hora. Los pocillos fueron lavados 3 veces 5 minutos con 200 μ l de PBS, 0,05% Tween-20. El polímero estreptavidina-peroxidasa (SIGMA, S2438) se diluyó 1/10 000 en PBS, 1%BSA, solución 0,05% Tween-20 y se aplicó 150 μ l en los pocillos lavados que se dejaron agitando +RT durante 30 minutos. Los pocillos fueron lavados 3 veces 5 minutos con 250 μ l de PBS, 0,05% Tween-20. La detección del polímero de estreptavidina-peroxidasa unida se realizó añadiendo 200 μ l de OPD (dihidrocloreto de O-fenilendiamina, SIGMA P9187) en los pocillos y se midió leyendo la absorbancia a 450 nm (A450).

Ejemplo 1 - La protamina promueve el crecimiento de neuritas en el sustrato de agregano in vitro

El sulfato de condroitina proteoglicano agregano previene la unión y el crecimiento de neuritas en neuronas corticales de ratas embrionarias en el cultivo. La protamina superó esta acción inhibitoria del agregano, promoviendo la unión neuronal y el crecimiento de neuritas en el sustrato recubierto con agregano in vitro. La protamina estaba activa tanto como proteína libre como como en sal de sulfato (Figura 2).

Ejemplo 2 - Un péptido derivado de la secuencia de protamina promueve el crecimiento de neuritas en el sustrato de agregano in vitro

Debido a la actividad demostrada por la protamina, una serie de péptidos (Tabla 1), basados en la secuencia de protamina, fueron sintetizados y probados en el ensayo de crecimiento de neuritas. Los péptidos 2 (SEQ ID NO:3) y el péptido 12 (SEQ ID No. 10) mostraron la actividad (Figura 3).

Tabla 1. Péptidos derivados de la secuencia de protamina

Péptido	Secuencia
Protamina (salmón), SEQ ID NO: 1	MPRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGRRRR
Péptido 1, SEQ ID: 2	ARRRRS
Péptido 2 SEQ ID: 3	SRPVRRRRRPRVSRRRRRRGRRRR
Péptido 3 SEQ ID: 4	SRPVRRRRRPRVS
Péptido 4 SEQ ID: 5	SRRRRRRG
Péptido 5 SEQ ID: 6	RRRRRR
Péptido 6 SEQ ID: 7	RRRR
Péptido 7	RR
Péptido 10 SEQ ID: 8	AKKKKS
Péptido 11 SEQ ID: 9	KKKKKK
Péptido 11 SEQ ID: 10	VSRRRRRRGRRRR

Ejemplo 3 — La protamina aumenta el enlace de agregano a RPTPσ

La unión de agregano a RPTPσ se evaluó a través de ELISA utilizando RPTPσ marcado con Fc y agregano biotinilado. La unión se cuantificó utilizando peroxidasa de rábano picante ligada a la estreptavidina. El RPTPσ mutante, con un sitio de enlace CSPG defectuoso, se utilizó como control negativo. Se encontró que la protamina aumentaba la unión de agregano a RPTPσ natural, en dos veces, de una manera dependiente de la concentración. Por el contrario, el enlace de agregano al RPTPσ mutante no se vio afectado por la protamina (Figura 4).

Ejemplo 4 - El sulfato de protamina pegilado tiene mayor actividad para promover el crecimiento de neuritas que el sulfato de protamina

La PEGilación de compuestos farmacéuticos se utiliza a menudo para modificar la farmacocinética de un medicamento y su interacción con los tejidos vivos. En este documento se demuestra que la protamina se mantiene activa tras la PEGilación para que la protamina PEGilada induzca el crecimiento de neuritas en un sustrato recubierto de CSPG (Figura 3). La pegilación se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: La protamina se tamponó con 1XPBS a una concentración de 9 mg/ml; se añadió un exceso molar 10 veces de mPEG-NHS (Nanocs Inc.) en la solución de protamina; el reticulado de mPEG-NHS a protamina se llevó a cabo 2 horas a temperatura ambiente con agitación; el exceso de mPEG-NHS se inactivó al añadir 100 mM de Tris-HCl a pH 7,5 durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y la protamina PEGilada se purificó con cromatografía de heparina-sepharose mediante el uso de un gradiente de sal para la elución.

Ejemplo 5. El péptido de protamina 12 promueve la recuperación funcional después de SCI

Las vías nerviosas de un lado de la médula espinal se cortaron (hemisección) en el nivel C4, lo que provocó una reducción de las funciones locomotoras como se ve por la escalada vertical y el uso de la extremidad en el lado afectado (representado en la prueba del cilindro). Cuando el péptido de protamina 12 se administraba mediante inyección intracerebroventricular, el tiempo utilizado en la prueba de la escalada vertical se acortaba en comparación

con la inyección del vehículo solamente, lo que indicaba una mejor locomoción básica en el grupo de ratones tratados con péptido 12 (Fig. 5A). Además, el péptido de protamina 12 mejoraba el uso de las extremidades en el lado afectado en comparación con el vehículo (Fig. 5B), lo que también indicaba una mejor curación debido al péptido de protamina 12.

5 Lesión de la médula espinal y atención post-operación.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla intraperitoneal de Ketaminol (2 mg/20g de peso corporal, Intervet) y Rompun (0,25 mg/20g de peso corporal, Bayer). Después de la laminectomía a nivel vertebral C5, la dura fue cuidadosamente removida. La hemicorda espinal cervical derecha se transeccionó con una aguja de jeringa de 25G desde el vaso dorsal de línea media hasta el lado lateral. El sangrado se controló con esponja de gelatina hemostática. Músculo y piel fueron suturados con 6-0 monocriilo. 30 minutos antes de la cirugía y durante los 3 días siguientes, los ratones fueron tratados con el antibiótico Borgal (30 mg/kg, Intervet). El peso corporal y la expresión en la vejiga se comprobaron durante 7 días, y los animales recibieron Rimadil (5 mg/kg, Pfizer) y Rapidexon (0,2 mg/kg, Evrovet) para controlar el dolor y la hinchazón inflamatoria hasta que dejaron de perder peso corporal.

Evaluación conductual de la recuperación funcional

15 Rejilla vertical (VS). El ratón se colocó en el mismo filo de una rejilla de alambres horizontal (25 x 22 cm, diámetro de los alambres de 2 mm espaciados a 1 cm) frente al borde. Inmediatamente después de eso, la rejilla se giró verticalmente para colocar al ratón en una posición del revés en el borde inferior. El tiempo que el animal se tomaba para subir al borde superior se medía en intervalos de 1 min. Esta prueba se repitió cada dos semanas a partir de la 1ª semana después de la cirugía.

20 Evaluación del uso de las extremidades anteriores. Basándose en la prueba de la postura anormal de animales suspendidos aplicada en el modelo de accidente cerebrovascular animal de Hoffer (J Cereb Blood Flow Metab, 2013) y Bederson (Stroke, 1986) se desarrolló un sistema de puntuación para evaluar la gravedad de las disfunciones de la extremidad anterior después de la hemisección cervical. El ratón se sostuvo suavemente por la cola suspendida debajo de la rejilla y luego se tiró lentamente hacia abajo para permitir que se agarrara a la rejilla por las patas delanteras. La flexión de las extremidades delanteras en posición suspendida y la eficacia y precisión del agarre se utilizaron para la prueba de puntuación de acuerdo con los criterios presentados en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios para la prueba por puntuación

Puntuación	Criterios
0	el ratón, por un lado, prolonga las extremidades delanteras rectas en posición suspendida y, por otro, se agarra firmemente a la rejilla
1	el ratón mantiene el ipsilateral al sitio del trauma de la extremidad delantera ligeramente flexionado, pero el agarre de la rejilla es seguro y preciso
2	el ratón mantiene el ipsilateral al sitio del trauma de la extremidad delantera flexionada, el agarre de la rejilla es débil y el ratón puede hacer múltiples desplazamientos con las patas antes de agarrarse
3	el ratón mantiene el ipsilateral al sitio del trauma de la extremidad delantera flexionada y no lo utiliza en el agarre

30 Prueba del cilindro de la asimetría de uso de las extremidades. El ratón se colocó en el cilindro de vidrio de 10 cm de diámetro y 14 cm de alto. El espejo estaba colocado en el ángulo detrás del cilindro para una mejor observación. El ratón fue grabado en video durante los primeros 20 pasos verticales exploratorios o durante 5 min. Se midió el número de pasos en los que el ratón utilizaba la extremidad derecha (deteriorada), la izquierda o ambas para el soporte contra la pared. La preferencia de la pata se calculó como la relación entre el número total de usos de la extremidad izquierda (izquierda + ambas) y el número total del uso de las extremidades derecha (deteriorada + ambas).

35 Estadística. Los datos obtenidos de la prueba de la rejilla vertical fueron analizados por ANOVA unidireccional seguido de la prueba post-hoc Newman-Keuls para la detección de diferencias de grupo. La prueba no paramétrica Mann-Whitney se utilizó para analizar la evaluación de la puntuación del uso de las extremidades anteriores y la prueba del cilindro.

40 **Referencias**

Xiong Y. et al., Neurorestorative treatments for traumatic brain injury. *Discovery Medicine* (2010) 10 434-442.
 Silver and Miller, Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience* (2004) 5 146-156.

- Harris N. et al., Chondroitinase ABC enhance pericontusion axonal sprouting but does not confer robust improvements in behavioural recovery. *Journal Neurotrauma* (2010) 27 1971-1982.
- 5 Starkey M. L. et al., Chondroitinase ABC promotes compensatory sprouting of the intact corticospinal tract and recovery of forelimb function following unilateral pyramidotomy in adult mice. *European Journal Neuroscience* (2012) 36 3665-3678.
- Snow D. M. et al., Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Developmental Biology* (1990) 138 359-376.
- Jones, L. L. et al., The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Experimental neurology* (2003) 182 399-411.
- 10 Shen Y. et al., PTPo is a receptor for chondroitin sulphate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration. *Science* (2009) 326 592-596.
- Aricescu AR et al., Heparan sulphate proteoglycans are ligands for receptor protein tyrosine phosphatase sigma. *Molecular Cellular Biology* (2002) 22 1881-1892.
- 15 Fry E. J. et al., Corticospinal tract regeneration after spinal cord injury in receptor protein tyrosine phosphatase sigma deficient mice. *Glia* (2010) 58 423-433.
- Coles C. H., Proteoglycan-specific molecular switch for RPTPo clustering and neuronal extension. *Science* (2011) 332 484-488.
- Rauvala, H., An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO Journal* (1989) 8 2933-2941.
- 20 Rauvala H. et al., Heparin-binding proteins HB-GAM (pleiotrophin) and amphoterin in the regulation of cell motility. *Matrix Biology* (2000) 19 377-387.
- Raulo et al., The two thrombospondin type 1 repeat domains of the heparin-binding growth-associated molecule bind to heparin/heparin sulphate and regulate neurite extension and plasticity in hippocampal neurons. *Journal of Biological Chemistry* (2005) 280 41576-41583.
- 25 Milev P. et al., High affinity binding and overlapping localisation of neurocan and phosphacan/protein tyrosine phosphatase-§/§ with Tenascin-R, amphoterin and HB-GAM. *Journal of Biological Chemistry* (1998) 273 6998-7005.
- Sambrook J and DW Russell. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, US.
- 30 Coen, D.M. (2001) The polymerase chain reaction. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., More, D.D., Seidman, J.G., Smith, K. and Struhl, K. (eds.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA.
- Gellissen, G. (ed.) (2005) *Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, Germany.
- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol.* (2011) Nov;71(11):1073-89.
- 35 Pearson and Lipman. Improved Tools for Biological Sequence Analysis, *PNAS* 85:2444-2448 (, 1988).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Helsingin yliopisto
- <120> Protamina en el tratamiento de las lesiones neuronales
- 5 <130> 2131033PC
- <160> 10
- <170> Patent In versión 3.5
- 10 <210> 1
<211> 33
<212> PRT
<213> salmón
- 15 <400> 1
Met Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15
- Arg Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg
20 25 30
- Arg
- 20 <210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> péptido sintético
- <400> 2
Ala Arg Arg Arg Arg Ser
1 5
- 30 <210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
<223> péptido
- <400> 3
Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg
1 5 10 15
- Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
20 25
- 40 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> péptido
- <400> 4
Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg Val Ser
50 1 5 10

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido

 10 <400> 5
 Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly
 1 5

 <210> 6
 <211> 6
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido
 20
 <400> 6
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

 <210> 7
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> péptido

 <400> 7
 Arg Arg Arg Arg
 1

 35 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> péptido

 <400> 8
 Ala Lys Lys Lys Lys Ser
 1 5
 45
 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> péptido

 <400> 9
 Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 55 1 5

 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

 <220>

ES 2 771 448 T3

<223> péptido

<400> 10

Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
1 5 10

5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de protamina que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10 para su uso en el tratamiento de lesiones neuronales en un sujeto mediante la promoción del crecimiento de las neuronas y/o de la regeneración neuronal.
- 5 2. El péptido de protamina para su uso según la reivindicación 1, en el que la lesión neuronal se selecciona de un grupo formado por enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple (EM), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), Enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, lesión del nervio periférico, lesión ocular y quemaduras en la piel.
- 10 3. El péptido de protamina para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que un sujeto es un humano o un animal.
4. El péptido de protamina para su uso de acuerdo con cualquiera de las afirmaciones anteriores, en el que el tratamiento de las lesiones neuronales comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del péptido de protamina.
- 15 5. El péptido de protamina para su uso según la reivindicación 4, en el que dicha administración es intracraneal, intracerebroespinal, intravenosa o tópica.
6. El péptido de protamina para su uso según la reivindicación 4, en el que dicha administración es subcutánea, intramuscular, transdérmica, intravenosa, oral, sublingual, nasal, rectal o tópica del péptido de protamina.
- 20 7. El péptido de protamina para su uso según la reivindicación 4, en el que el péptido de protamina se administra mediante la inyección directa o el péptido de protamina que contiene la implantación del material portador o vector viral que expresa el péptido de protamina.
8. Un péptido de protamina que consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3 y capaz de promover el crecimiento de una neurona y/o la regeneración neuronal.
- 25 9. Un método in vitro para promover el crecimiento de una neurona y/o la regeneración neuronal que comprende el contacto de la neurona con una protamina pegilada o un péptido de protamina establecido en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 10.
10. Una protamina pegilada para su uso en la promoción del crecimiento de una neurona y/o regeneración neuronal que comprende el contacto de la neurona con una protamina pegilada.
- 30 11. Un péptido de protamina que consiste en la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 3 para su uso como un medicamento.

Figura 1



Figura 2

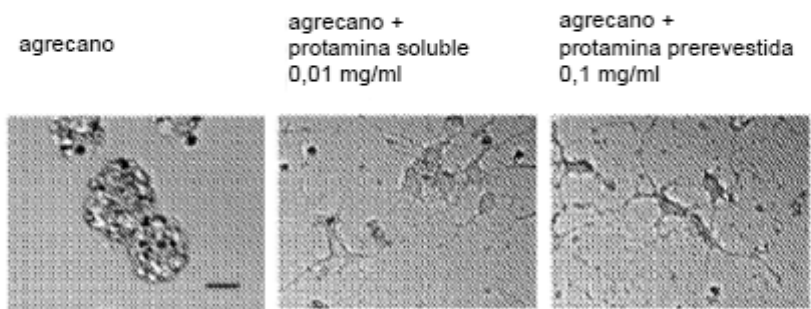
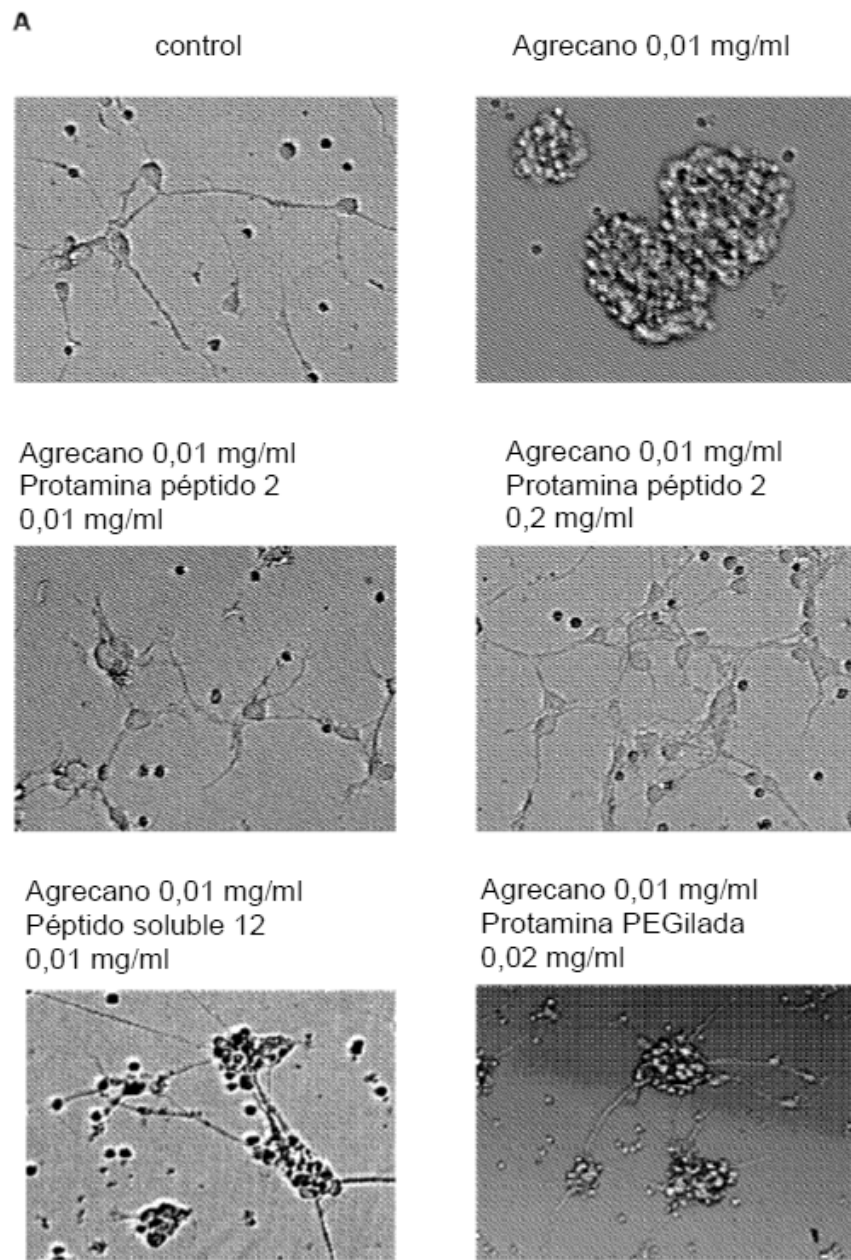
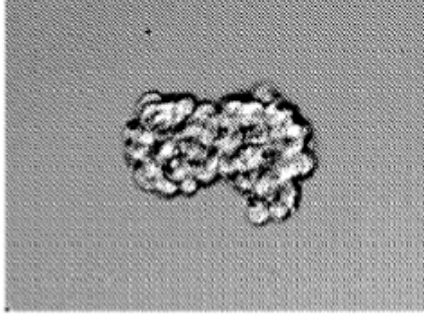


Figura 3



B

Agrecano 2 $\mu\text{g/ml}$



Agrecano 2 $\mu\text{g/ml}$
Protamina péptido 3
0,2 mg/ml

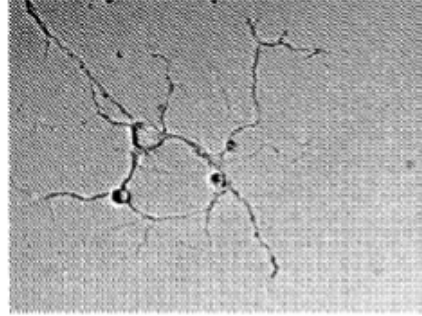


Figura 4

Pocillos recubiertos con 2 µg/ml de PTRP natural o mutante
 Cantidad de agrecano constante 5 µg/ml

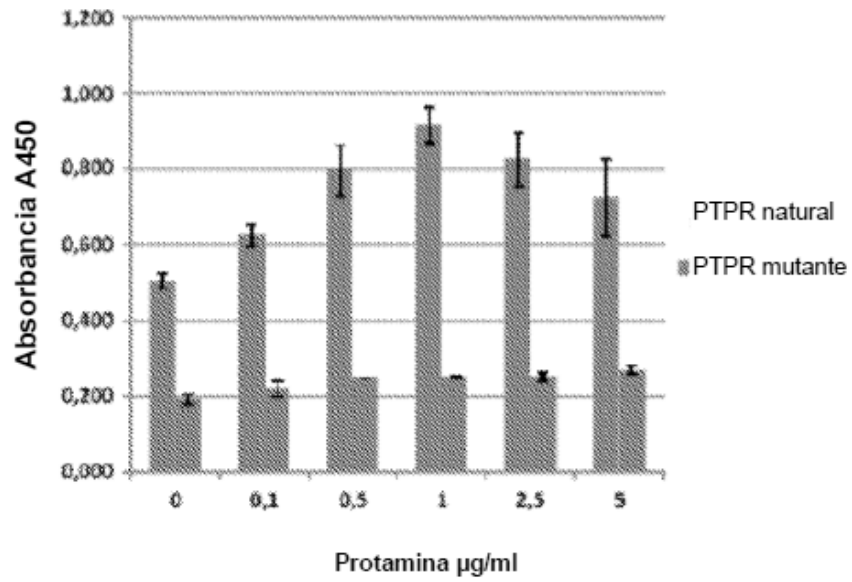
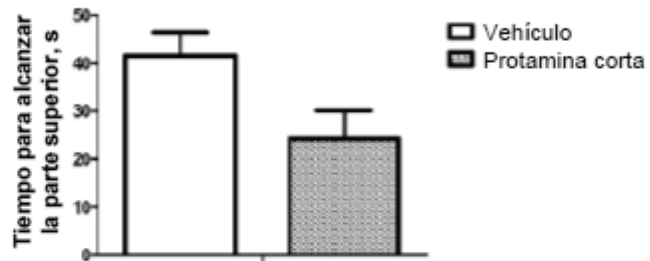


Figura 5

A



B

