



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 331 342**

② Número de solicitud: 200601314

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **22.05.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2009**

Fecha de la concesión: **21.09.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **13.10.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**13.10.2010**

⑰ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad de Alcalá de Henares y  
Universidad Autónoma de Barcelona**

⑱ Inventor/es: **Rosa Cano, Enrique J. de la;  
Pablo Dávila, María Flora de;  
Boya Tremoleda, Patricia;  
Corrochano Sánchez, Silvia;  
Villa Polo, Pedro de la;  
Barhoum Tannous, Rima y  
Bosch Tubert, Fátima**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de la proinsulina para la elaboración de una composición farmacéutica neuroprotectora, composición terapéutica que la contiene y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Uso de la proinsulina para la elaboración de una composición farmacéutica neuroprotectora, composición terapéutica que la contiene y sus aplicaciones.

La presente invención se refiere al uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina, preferentemente la proinsulina humana, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de condiciones, desórdenes o enfermedades neurodegenerativas en las que se produzca muerte celular programada, preferentemente patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central y periférico, y más preferentemente del grupo de enfermedades heredo-degenerativas conocidas como retinosis pigmentaria. El compuesto activador puede estar constituido por una molécula química, un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos.

ES 2 331 342 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Uso de la proinsulina para la elaboración de una composición farmacéutica neuroprotectora, composición terapéutica que la contiene y sus aplicaciones.

5

**Campo de la invención**

La presente invención está dentro del campo de la Biomedicina y más concretamente en el desarrollo de compuestos terapéuticos. En particular, la invención se refiere al uso específico de la molécula proinsulina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina como la retinosis pigmentaria, así como de otras afecciones neurodegenerativas.

10

**Estado de la técnica**

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden una variedad de desórdenes progresivos del sistema nervioso central de origen genético-hereditario, traumático, esporádico o senil. La gran mayoría de las enfermedades neurodegenerativas presentan muerte celular programada de neuronas y/o células de glía en su origen o su progresión. Dicho proceso de muerte, que constituye una etapa irreversible del daño al tejido nervioso, aparece independientemente de la causa primaria del desorden, sea genética, traumática, esporádica o senil.

15

Numerosos factores de crecimiento juegan un papel fundamental en la regulación del balance entre la vida y la muerte de diversos tipos celulares, incluidos neuronas y células de glía. Entre ellos, los miembros de la familia de la insulina que incluyen la insulina, su precursor proinsulina, y los IGF-I e IGF-II (Varela-Nieto, I., de la Rosa, E.J., Valenciano, A.I., and Leon, Y. (2003) Cell death in the nervous system: lessons from insulin and insulin-like growth factors. *Mol Neurobiol* **28**: 23-50). La retina forma parte del sistema nervioso central y es un modelo bien establecido para el estudio tanto de procesos fisiológicos como patológicos del sistema nervioso, por esta razón es un modelo celular empleado en la presente invención. Uno de los procesos patológicos más importantes estudiados en la retina es el denominado Retinosis Pigmentaria ya que esta patología comprende un amplio grupo de desórdenes hereditarios de la retina y representa una de las mayores causas de ceguera en el mundo, con una incidencia aproximada de una persona entre 4.000. Aunque se han caracterizado más de 120 loci implicados y hay distintas etiologías, en todos los casos se produce una pérdida crónica y progresiva por muerte celular programada de las neuronas de la retina, en concreto de los fotorreceptores, llevando a los individuos a la ceguera. Actualmente no hay tratamiento para la Retinosis Pigmentaria y por el momento se están abordando estrategias de neuroprotección, terapia génica, neuroreparación y bioingeniería solamente en modelos animales con degeneración, como los ratones rd, las ratas RCS y otros modelos en perros, gatos, cerdos e, incluso, *Drosophila*. El ratón rd (rod degeneration) fue uno de los primeros modelos para el estudio de mecanismos celulares y moleculares que determinan la degeneración celular, habiéndose llegado a determinar la naturaleza apoptótica de la muerte de los fotorreceptores (Chang, G.Q., Hao, Y., and Wong, F. (1993) Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* **11**: 595-605). Los diferentes ratones rd proporcionarían un modelo ideal para el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas al tratamiento de las distrofias hereditarias de la retina, ya que permiten estudiar el proceso degenerativo de los fotorreceptores desde un punto de vista molecular, celular y genético.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Las intervenciones de terapia génica tienden a reintroducir una copia funcional del gen mutado causante de la neurodegeneración. Se han realizado progresos con adenovirus recombinantes o vectores virales asociados a adenovirus. En concreto, la reposición de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa de cGMP específica de bastones (13PDE) en el ratón rd neonatal, logrando un rescate histológico del fenotipo rd de, al menos, 6 semanas (Bennett, J., Tanabe, T., Sun, D., Zeng, Y., Kjeldbye, H., Gouras, P., and Maguire, A.M. (1996) Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by *in vivo* gene therapy. *Nat Med* **2**: 649-654). Sin embargo, esta terapia requiere la identificación inequívoca del gen mutado en cada paciente, lo que en la actualidad sólo es posible en el 40% de los casos (Wang, D.Y., Chan, W.M., Tam, P.O., Baum, L., Lam, D.S., Chong, K.K., Fan, B.J., and Pang, C.P. (2005) Gene mutations in retinosis pigmentaria and their clinical implications. *Clin Chim Acta* **351**: 5-16).

El trasplante de células madre neuronales o precursores con el fin de desarrollar nuevos fotorreceptores constituye la finalidad de las terapias de neuroreparación. Los nuevos fotorreceptores tienen que restablecer las conexiones apropiadas con las neuronas de la retina interna.

La neuroprotección inducida mediante tratamiento con factores de crecimiento persigue evitar la muerte celular asociada al proceso neurodegenerativo. Se han probado diferentes formas de administración en varios modelos animales con degeneración de retina. Los primeros intentos consistieron en inyecciones intravítreas de varias proteínas recombinantes en ratas o ratones con degeneración de retina (Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., and LaVail, M.M. (1990) Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* **347**: 83-86; LaVail, M.M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M.T., Yancopoulos, G.D., and Steinberg, R.H. (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11249-11253). Estos experimentos demostraron que el FGF2 enlentecía la degeneración de fotorreceptores en ratas RCS (Royal Collage of Surgeon). Varios factores de supervivencia, incluyendo el FGF2, FGF1, BDNF y CNTF, disminuyen la muerte de fotorreceptores inducida por daño luminoso (LaVail, M.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C.H., and Steinberg, R.H. (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol*

*Vis Sci* **39**: 592-602). Inyecciones intravítreas de análogos de CNTF en modelos de ratón con degeneraciones hereditarias de la retina (modelo Q433ter, rd y nr; terminología usada para designar ciertos modelos de ratones con retinosis pigmentaria) resultaron en una evidente mejora de algunas degeneraciones. El efecto neuroprotector por análogos de CNTF también se ha comprobado en estudios en gatos con distrofia de conos-bastones autosómica dominante, en los que inyecciones intravítreas de CNTF tenían efectos beneficiosos (Chong, N.H., Alexander, R.A., Waters, L., Barnett, K.C., Bird, A.C., and Luthert, P.J. (1999) Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 1298-1305).

Otra aproximación ha sido utilizar vectores de terapia génica para expresar factores de supervivencia en retinas de ratones o ratas con degeneración de retina. En dos modelos de ratones, el rd y el Prph2Rd (mutación recesiva en periférica) (Travis, G.H., Brennan, M.B., Danielson, P.E., Kozak, C.A., and Sutcliffe, J.G. (1989) Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature* **338**: 70-73; Connell, G., Bascom, R., Molday, L., Reid, D., McInnes, R.R., and Molday, R.S. (1991) Photoreceptor peripheral is the normal product of the gene responsible for retinal degeneration in the rds mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 723-726.), las inyecciones subretinianas de vectores adenovirales que codificaban para una forma secretable de CNTF retrasaron la muerte de fotorreceptores (Cayouette, M., and Gravel, C. (1997) Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther* **8**: 423-430; Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., and Gravel, C. (1998) Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci* **18**: 9282-9293). Por su parte, la expresión transgénica de BDNF en la retina, que no resulta apenas activo por inyecciones intravítreas, retrasa la neurodegeneración en ratones *Q344ter* (Okoye, G., Zimmer, J., Sung, J., Gehlbach, P., Deering, T., Nambu, H., Hackett, S., Melia, M., Esumi, N., Zack, D.J., and Campochiaro, P.A. (2003) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci* **23**: 4164-4172; Sung, C.H., Makino, C., Baylor, D., and Nathans, J. (1994) A rhodopsin gene mutation responsible for autosomal dominant retinosis pigmentaria results in a protein that is defective in localization to the photoreceptor outer segment. *J Neurosci* **14**: 5818-5833). Estos resultados, asimismo, evidencian que, además de los problemas técnicos, una inyección intravítrea puntual puede ser insuficiente para tener efecto neuroprotector. Por su parte el CNTF, que por un lado sí tiene efecto neuroprotector con una sola inyección, ha resultado ser contraproducente cuando se induce su expresión prolongada mediante vectores AAV codificando para la forma secretable de CNTF, en ratones Prph2Rd y dos ratas transgénicas con degeneración de retina (Liang, F.Q., Aleman, T.S., Dejneka, N.S., Dudus, L., Fisher, K.J., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., and Bennett, J. (2001) Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinosis pigmentaria. *Mol Ther* **4**: 461-472) ya que la función de los fotorreceptores empeoraba según un análisis por ERG.

Teniendo en cuenta todas las estrategias anteriormente expuestas la presente invención proporciona una solución práctica a los sistemas empleados hasta el momento. Con anterioridad se han puesto de manifiesto funciones de supervivencia de la insulina distintas a su función metabólica en el embrión de pollo, ya que la insulina, en forma de su precursor proinsulina, se expresa durante el desarrollo antes de que exista un esbozo pancreático. Durante el desarrollo del sistema nervioso, la proinsulina regula múltiples procesos celulares. En el embrión temprano es un factor de supervivencia, como se comprobó en un estudio inhibiendo la expresión del gen de la proinsulina o de su receptor mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (Morales, A.V., Serna, J., Alarcon, C., de la Rosa, E.J., and de Pablo, F. (1997) Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology* **138**: 3967-3975). Su bloqueo mediante anticuerpos también aumenta el número de células apoptóticas en la retina de embrión de pollo (Díaz, B., Serna, J., De Pablo, F., and de la Rosa, E.J. (2000) *In vivo* regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development* **127**: 1641-1649), mientras que su adición exógena al embrión reduce el número de células apoptóticas (Hernandez-Sanchez, C., Mansilla, A., de la Rosa, E.J., Pollerberg, G.E., Martinez-Salas, E., and de Pablo, F. (2003) Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *Embo J* **22**: 5582-5592). La molécula aislable de los embriones de pollo es proinsulina, el producto primario de traducción del gen, cuya actividad metabólica es pequeña, alrededor del 5-10% de la actividad de la insulina.

En las enfermedades neurodegenerativas crónicas las neuronas y/o las células de glía van muriendo de forma progresiva. Normalmente la sintomatología de la enfermedad se manifiesta cuando se han muerto bastantes células. De ahí, la importancia de determinar moléculas eficaces que favorezcan la supervivencia celular para mantener una función visual relativamente normal. Aunque hay muchos tipos de enfermedades neurodegenerativas, cada una con una etiología diferente, todas cursan con una muerte final de las células afectadas. Esta muerte es del tipo programada, habiendo a su vez distintos tipos de muerte, ya sea apoptótica o no. A diferencia de los daños agudos, donde las células están en buen estado inicialmente antes del daño, en las enfermedades crónicas, las células conllevan un daño intrínseco que va a hacer que vayan muriendo en un momento determinado cuando ya no puedan soportar el daño y/o no puedan llevar a cabo la función que deben desempeñar.

## Descripción de la invención

### Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina, en adelante uso de un compuesto inductor de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de condiciones, desórdenes o enfermedades neurodegenerativas

## ES 2 331 342 B1

en las que se produzca muerte celular programada, preferentemente patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central y periférico, y más preferentemente del grupo de enfermedades hereditarias conocidas como retinosis pigmentaria.

5 Un objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una secuencia de nucleótidos, en adelante uso de la secuencia de nucleótidos proinsulina de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido neuroprotector, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 10 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- 15 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

20 Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina donde la secuencia de nucleótidos está constituida por la SEQ ID NO1 que codifica para la proinsulina humana.

25 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina donde la secuencia de nucleótidos de d) es un vector de expresión, en adelante uso del vector de expresión proinsulina de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción genética codificante de una proteína proinsulina capaz de inducir neuroprotección.

30 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una célula eucariota, preferentemente humana, en adelante uso de células proinsulina de la invención, modificada genéticamente y que comprende la secuencia de nucleótidos, la construcción o el vector de expresión proinsulina de la invención y que puede expresar y liberar de forma adecuada la proteína proinsulina al medio extracelular.

35 Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una proteína o péptido, en adelante uso de la proteína proinsulina de la presente invención, que presenta actividad neuroprotectora, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 40 a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO2),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),
- 45 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

50 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la invención en el que el compuesto inductor es la proteína proinsulina humana (SEQ ID NO2).

55 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones neurodegenerativas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 65 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a), y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

## ES 2 331 342 B1

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos está constituida por la SEQ ID NO1, que codifica para la proinsulina humana.

5 Otra realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos es un vector de expresión de la proinsulina humana.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una proteína o un péptido codificado por la secuencia, construcción genética o vector proinsulina de la invención.

10 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido inductor de la actividad de la proinsulina pertenece al siguiente grupo:

15 a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO2),

b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),

20 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a), y b), y

d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos está constituida por la proinsulina humana (SEQ ID NO2).

25 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una célula, preferentemente humana, y más preferentemente una célula del sistema nervioso central, transformada por la secuencia, construcción o vector de expresión de proinsulina de la invención.

30 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología neurodegenerativa del sistema nervioso central o periférico que afecta a seres humanos, en la que se produzca muerte celular programada, consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita atenuar dicha neurodegeneración.

### 40 Descripción detallada

Teniendo en cuenta que la mayoría de las afecciones neurodegenerativas, en particular en la Retinosis Pigmentaria, no tienen un tratamiento eficaz y/o efectivo, la presente invención proporciona una solución alternativa.

45 La presente invención se basa en que los inventores han demostrado que la proinsulina - factor de crecimiento de la familia de la insulina, normalmente conocida por ser la forma precursora de la insulina - es, además, un factor de supervivencia celular en procesos de neurodegeneración crónica, en particular en los procesos de neurodegeneración retiniana que tienen lugar en la retinosis pigmentaria.

50 Como modelo de degeneración de retina se ha elegido los ratones rd10 (*Pdeb*<sup>rd10<sup>-/-</sup></sup>), que portan una mutación homocigota recesiva en el exón 13 de la enzima fosfodiesterasa de GMP cíclico específica de bastones, lo que provoca una alteración en la función de esa enzima, lo que lleva a la muerte celular progresiva de los fotorreceptores, y la consiguiente degeneración secundaria del resto de tipos celulares de la retina, principalmente los conos.

55 Se han generado dos líneas de ratones transgénicos que expresan la proteína proinsulina humana y homocigotos recesivos para la mutación rd10, los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> (Ejemplo 1.1). Estos ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> con degeneración de la retina, producen proinsulina humana de forma constitutiva en el músculo estriado - que no se procesa a insulina - que se detecta en suero y no está sujeta a la regulación normal del páncreas por niveles de glucosa. Esto provoca que el animal tenga niveles circulantes mantenidos de proinsulina humana, sin depender de dosis, del estado del producto antes de la administración- ya que al ser de producción endógena no se degrada como puede ser un producto comercial-, y del modo y momento de la inyección. Esto ha permitido no hacer estudios de farmacocinética para ver como administrarlo.

60 La presencia de proinsulina humana en músculo y suero en los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> de ambas líneas se comprobó con un kit de detección ELISA contra la proinsulina humana. Además, se midió la glucemia, y se comprobó que la proinsulina no tiene efectos metabólicos indeseados. Por otro lado, se ha comprobado mediante inyección subcutánea de proinsulina humana que dicha proinsulina es capaz de llegar a la retina neural (identificación de la proinsulina mediante el kit de ELISA en extractos de retina), lo que implica que es capaz de pasar la barrera hematorretiniana.

## ES 2 331 342 B1

Los efectos de la hiperproinsulinemia de los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> en la neurodegeneración retiniana se identificaron de diversas maneras. En primer lugar, se observó histológicamente el estado de la retina (Ejemplo 1). En los ratones transgénicos para proinsulina humana y homocigotos para rd10 la degeneración se retrasa y se ha comprobado que a P32 en la retina se mantienen mayor número de bastones, conos y conexiones sinópticas, y que el estado de la retina es mejor (Ejemplo 1).

El hecho de que en los ratones además se mantenga el estado de la retina mejor por más tiempo, es beneficioso. Si además de enlentecer el proceso de muerte celular en las células propiamente dañadas (los bastones de la retina) se mantiene en mejor estado el resto de la retina, como por ejemplo evitando la muerte de los conos que no tienen un daño intrínseco, sino que degeneran secundariamente, se están mejorando varios aspectos de la enfermedad. En este caso en concreto, si se mantiene los conos por más tiempo, aunque los bastones acaben por degenerar, se mantiene la visión diurna, aunque la nocturna se vaya perdiendo, y eso significa calidad de vida en un paciente con retinosis pigmentaria.

Posteriormente, se analizó la función visual con los cinco tipos estandarizados de electroretinogramas a lo largo del proceso degenerativo, comparando los ratones transgénicos con controles rd10, y se ha comprobado que en los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> todavía a P55 siguen teniendo algo de función visual, cosa que en los ratones rd10 desaparece a P35, con lo que se puede concluir que la respuesta visual es mejor y se prolonga más en el tiempo en los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> (Ejemplo 2). Además, los ratones transgénicos Proins/rd10<sup>-/-</sup> llegan a tener ERG comparables a ratones sanos, al menos en visión fotópica (diurna) a P30 (Ejemplo 2, Figura 4).

Por otro lado, en la presente invención se observa que la utilización de proinsulina en una forma de administración que permite niveles fisiológicos mantenidos en el tiempo permite que la proinsulina ejerza su función neuroprotectora (ver Ejemplo 1.4), al contrario de lo que se observa con administraciones puntuales. Con respecto a esto último se han probado administraciones puntuales de proinsulina subcutáneas e intravítreas, pero no fueron exitosas en la mejora de la neurodegeneración retiniana probablemente al no obtenerse niveles estables y mantenidos en el tiempo.

Otra ventaja adicional es que la proinsulina no tiene los efectos metabólicos de la insulina y, por lo tanto, se puede administrar a pacientes que no tienen alterado el metabolismo de la glucosa. Aunque en estudios *in vitro* la insulina también presenta actividad antiapoptótica, su actividad metabólica normal hace inviable su utilización para un tratamiento como el aquí descrito. El hecho de que se sea la proinsulina circulante sérica la que logre este rescate, indica que es un buen tratamiento, ya que hace que sea de fácil administración. La aplicación de la proinsulina sería un tratamiento tanto preventivo como sofocante de enfermedad neurodegenerativa, ya que evita la muerte de las neuronas dañadas.

En resumen, niveles séricos crónicos de proinsulinemia (1-15 pM), obtenidos mediante expresión transgénica de proinsulina humana controlada por el promotor de la cadena ligera de la miosina, que también podrían ser obtenidos mediante otras formas de administración, por ejemplo, inyección subcutánea de proinsulina humana vehiculizada en soportes de liberación lenta o vectores de expresión aprobados para terapia génica, son capaces de alcanzar la retina y atenuar la neurodegeneración de los fotorreceptores en el modelo genético de ratones rd10.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina, en adelante uso de un compuesto inductor de la presente invención, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de condiciones, desórdenes o enfermedades neurodegenerativas en las que se produzca muerte celular programada, preferentemente patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central y periférico, y más preferentemente del grupo de enfermedades heredodegenerativas conocidas como retinosis pigmentaria.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “compuesto inductor de la actividad de la proinsulina” se refiere a una molécula que mimetiza, incrementa la intensidad o prolonga la duración de la actividad neuroprotectora de la proteína proinsulina humana. Un compuesto activador puede estar constituido por una molécula química, un péptido, una proteína o una secuencia de nucleótidos, así como aquellas moléculas que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína con actividad neuroprotectora.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “actividad neuroprotectora” se refiere a la atenuación del proceso de muerte celular programada de las células primariamente afectadas en la enfermedad neurodegenerativa, y/o de las células secundariamente afectadas por la neurodegeneración, y/o a la potenciación de la actividad neurofuncional de las células remanentes.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “enfermedad neurodegenerativa” se refiere una enfermedad, desorden o patología perteneciente, entre otras a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, retinosis pigmentaria, demencia de cuerpos de Lewy, Esclerosis lateral amiotrófica, atrofias espinocerebelosas, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, demencia vascular, enfermedad de Huntington, enfermedad de Baten, lesión en médula espinal, degeneración macular y glaucoma.

Así, un objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una secuencia de nucleótidos, en adelante uso de la secuencia de

## ES 2 331 342 B1

nucleótidos proinsulina de la presente invención, que permite la expresión de una proteína o péptido neuroprotector, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 5 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- 10 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que permita la codificación de un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana (SEQ ID NO2).

20 A partir de la información descrita en la presente invención y en el estado de la técnica, un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de nucleótidos análoga a las descritas en la presente invención para su posterior utilización.

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%. La forma preferente de la secuencia de nucleótidos a utilizar es la secuencia de nucleótidos de proinsulina de origen humano (SEQ ID NO1) y sus derivados.

30 Tal como se utiliza en la presente invención el término “secuencia de nucleótidos” se refiere a una secuencia de DNA, cDNA o mRNA.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina donde la secuencia de nucleótidos está constituida por la SEQ ID NO1 que codifica para la proinsulina humana.

La secuencia de nucleótidos definida en el apartado d) se corresponde con una construcción génica y con vector de expresión génica que permite la expresión de una proteína proinsulina. En el caso de la construcción génica, construcción génica proinsulina de la invención, también puede comprender, en caso necesario y para permitir un mejor aislamiento, detección o secreción al exterior de la célula del péptido expresado, a una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido susceptible de ser utilizado con fines de aislamiento, detección o secreción de dicho péptido. Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye una construcción génica que comprende, además de la secuencia de nucleótidos proinsulina de la invención, cualquier otra secuencia de nucleótidos codificante de un péptido o secuencia peptídica que permita el aislamiento, la detección o la secreción al exterior de la célula del péptido expresado, por ejemplo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, una secuencia de polihistidina (6xHis), una secuencia peptídica reconocible por un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, para su identificación), o cualquier otra que sirva para purificar la proteína de fusión resultante por cromatografía de inmunoafinidad: péptidos etiqueta tales como c-myc, HA, E-tag) (Using antibodies: a laboratory manual. Ed. Harlow and David Lane (1999). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Capítulo: Tagging proteins. Pp. 347-377).

50 La secuencia de nucleótidos y la construcción génica descritas previamente pueden ser aisladas y obtenidas por un experto mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica (Sambrook *et al.* “Molecular cloning, a Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 vol 1-3). Dichas secuencias de nucleótidos pueden estar integradas en un vector de expresión génica que permite la regulación de la expresión de la misma en condiciones adecuadas en el interior de las células.

Por tanto, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina donde la secuencia de nucleótidos de d) es un vector de expresión, en adelante uso del vector de expresión proinsulina de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica codificante de una proteína proinsulina capaz de inducir neuroprotección. Un ejemplo de una realización particular lo constituye el uso de un vector de expresión elaborado en la presente invención en el que la expresión se regula mediante un promotor específico de músculo y la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO1 (ver Ejemplo 1).

En general, un vector de expresión comprende, además de la secuencia de nucleótidos o de la construcción genética descritas en la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *ABAD*, *ret*, etc.), preferentemente tisular, al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*t1t2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a

## ES 2 331 342 B1

ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), represores, etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (DNA o RNA), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con el gen o genes de interés. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por tanto, según un modo de realización particular de la presente invención dicho vector es un plásmido o un vector viral. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia al igual que para la transformación de microorganismos y células eucariotas se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidos - transformación química, electroporación, microinyección, etc. - descritos en diversos manuales [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.]. Una estrategia podría ser la de utilizar lentivirus para infectar las células diana, tal y como ya esta siendo intentado en otro tipo de terapias (Ralph GS, Binley K, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND (2006) *Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors*. *Clin Sci (Lond)* 110: 37-46).

Los sistemas de expresión génica pueden permitir o no la integración del nuevo material genético en el genoma de la célula huésped. De esta forma, tanto la secuencia de nucleótidos, la construcción génica o el vector de expresión proinsulina pueden utilizarse como un medicamento para proteger células humanas, preferentemente neuronas y/o células gliales humanas afectadas de una alteración neurodegenerativa, en un procedimiento de tratamiento y profilaxis de terapia génica de un ser humano afectado por una enfermedad que cursa con alteraciones neuronales y/o gliales. Estos sistemas de expresión génica una vez administrados a un ser humano afectado por una enfermedad neurodegenerativa pueden introducirse de forma general o específica en células tisulares donde, una vez integradas en el genoma celular, permiten la expresión de una proteína proinsulina, la cual una vez secretada al medio extracelular alcanza el sistema nervioso central donde llevaría a cabo su acción neuroprotectora (ver ejemplos).

Por otro lado, estos sistemas de expresión génica pueden ser utilizados para transformar también células humanas fuera del cuerpo humano, autólogas o heterólogas con respecto al potencial receptor, convirtiéndose estas células en compuestos inductores de la proinsulina una vez que se administren a un ser humano enfermo de una enfermedad neurodegenerativa ya que expresan y liberan proteína proinsulina con actividad neuroprotectora de neuronas y/o células gliales humanas.

Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una célula eucariota, preferentemente humana, en adelante uso de células proinsulina de la invención, modificada genéticamente y que comprende la secuencia de nucleótidos, la construcción o el vector de expresión proinsulina de la invención y que puede expresar y liberar de forma adecuada la proteína proinsulina al medio extracelular.

Estas células pueden ser transformadas, infectadas o transfectadas mediante dichas secuencias de nucleótidos por técnicas de ingeniería genética conocidas por un experto en la materia. [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory]. Las herramientas biofarmacéuticas y los procedimientos de terapia génica son suficientemente conocidas por un experto del sector de la técnica de tal forma que con la información descrita en la presente invención pueden desarrollarse sin excesivo esfuerzo.

Otra realización particular sería el uso de una célula humana transformada mediante la secuencia de nucleótidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO1), proveniente de distintas estipes celulares, preferentemente del sistema nervioso central y más preferentemente una neurona que puede utilizarse como células regeneradoras de tejidos humanos.

Además, otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina en el que el compuesto inductor es una proteína o péptido, en adelante uso de la proteína proinsulina de la presente invención, que presenta actividad neuroprotectora, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO2),
- b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a)
- c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que mimetice la actividad neuroprotectora de la proinsulina humana.

## ES 2 331 342 B1

A partir de la información descrita en la presente invención, un técnico experto en el sector de la técnica puede aislar o construir una secuencia de aminoácidos análoga a las descritas en la presente invención.

5 En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 30%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

10 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto inductor de la invención en el que el compuesto inductor es la proteína proinsulina humana (SEQ ID NO2).

15 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones neurodegenerativas, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina de la invención, en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

20 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

25 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar neuroprotección, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

30 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por inhalación nasal, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

35 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto o agente neuroprotector pertenece al siguiente grupo: secuencia, construcción genética o vector de expresión proinsulina que permiten la expresión de una proteína o péptido con actividad proinsulina.

40 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

- 45 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO1),
- b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a),
- 50 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y
- d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

55 Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos está constituida por la SEQ ID NO1, que codifica para la proinsulina humana.

Otra realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de nucleótidos es un vector de expresión de la proinsulina humana.

60 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una proteína o un péptido codificado por la secuencia, construcción genética o vector proinsulina de la invención.

65 Una realización particular de la invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que la proteína o péptido inductor de la actividad de la proinsulina pertenece al siguiente grupo:

- a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO2),

## ES 2 331 342 B1

b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a),

c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), y

5 d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a: a), b), y/o c).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que la secuencia de aminoácidos está constituida por la proinsulina humana (SEQ ID NO2).

10 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es una célula, preferentemente humana, y más preferentemente una célula del sistema nervioso central, transformada por la secuencia, construcción o vector de expresión de proinsulina de la invención.

15 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención, en adelante uso de la composición farmacéutica de la invención, en un método de tratamiento o profilaxis de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por una enfermedad, desorden o patología neurodegenerativa del sistema nervioso central o periférico que afecta a seres humanos, en la que se produzca muerte celular programada, consistente en la administración de dicha composición terapéutica en dosis adecuada que permita atenuar dicha neuroregeneración.

20 La composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos.

25 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, demencia de cuerpos de Lewy, Esclerosis lateral amiotrófica, atrofas espinocerebelosas, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, demencia vascular, enfermedad de Huntington, enfermedad de Baten y lesión en médula espinal.

30 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa perteneciente al siguiente grupo: retinosis pigmentaria, degeneración macular y glaucoma.

### 35 **Breve descripción del contenido de las figuras**

La Figura 1 muestra una representación esquemática del inserto de cDNA del gen de la preproinsulina humana y del plásmido pMLC-hIns. (A) Se muestra una representación esquemática de la secuencia de DNA que está insertada en el plásmido. Corresponde al cDNA del gen de la proinsulina humana. En el esquema se muestra el mRNA del gen de 462 pares de bases (pb), que está formado por tres exones (exon1= E1, exón2= E2, exón 3= E3). La secuencia de DNA insertada es la que se traduce, la ORF (del inglés "open reading frame") de 347 pb. Las zonas flanqueantes no traducidas, (5'UTR y 3'UTR) no están insertadas en la construcción. La proteína que se traduce es la preproinsulina de 110 aminoácidos (aa). Esta proteína consta de un péptido señal (pep.señal), la cadena B, el péptido C y la cadena A. El péptido señal se elimina, quedando la molécula proinsulina. (B) El plásmido contiene el inserto descrito en el apartado anterior 1.A, que codifica para la proteína preproinsulina de 110 aminoácidos (zona gruesa en negro), bajo el control transcripcional del promotor constitutivo muscular MLC1 (Miosin Light Chain) de las fibras de cadena ligera de la miosina del músculo estriado. Este plásmido es el utilizado para producir las dos líneas de ratones transgénicos productores de proinsulina humana que se cruzaron para alcanzar homocigosis para rd10.

50 La Figura 2 muestra secciones de criostato de 12  $\mu\text{m}$  de ojos de ratones a P32 donde se aprecia el estado de bastones y conos que evidencian con distintos marcadores el avance de la degeneración. Ratón control silvestre (A y D), ratón transgénico productor de proinsulina y rd10 homocigoto, Proins/rd10<sup>-/-</sup>, (B y E) y ratón rd10 homocigoto control (C y F). La capa nuclear externa (CNE) donde se sitúan los núcleos de los bastones y conos. La capa nuclear interna (CNI) es donde se encuentran los núcleos de células bipolares, amacrinas, horizontales y Müller. Para el marcaje de conos se utilizó una aglutinina marcada con el fluorocromo Alexa 488, cuya reacción muestra los segmentos externos (flecha de arriba) y los pies sinópticos de los conos (flecha de abajo). La barra representa 45  $\mu\text{m}$ .

60 La Figura 3 muestra secciones de criostato de 12  $\mu\text{m}$  de ojos de ratones a P32 donde se aprecia el estado de las conexiones sinópticas. Ratón control silvestre (A), ratón transgénico productor de proinsulina y rd10 homocigoto, Proins/rd10<sup>-/-</sup> (P), y ratón rd10 homocigoto control (C). Se muestran las capas nucleares CNE, CNI y la capa de células ganglionares (CCG). Entre ellas se sitúan las capas plexiformes donde se producen las conexiones sinópticas, capa plexiforme externa (CPE) y capa plexiforme interna (CPI). La figura muestra el marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo SV2 que marca las conexiones sinópticas en general. La barra representa 45  $\mu\text{m}$ .

65 La Figura 4 representa los resultados de los registros electroretinográficos realizados a P30. Ratón silvestre (wt), ratón Rd10<sup>-/-</sup> control y ratón Proins/rd10<sup>-/-</sup>, tanto de la línea 1 (L1) como de la línea 2 (L2). Para cada animal se muestran ejemplos de las respuestas electroretinográficas registradas en condiciones escotópicas (nocturnas), originadas en los bastones (fila superior) y respuestas mixtas (fila intermedia). Se muestran asimismo las respuestas electroreti-

nográficas registradas en condiciones fotópicas (diurnas), originadas en conos (fila inferior). Nótese la mayor amplitud de las respuestas obtenidas en ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> de ambas líneas (L1 y L2) en comparación con las respuestas de los ratones rd10<sup>-/-</sup>.

- 5 La Figura 5 muestra los resultados de los registros electroretinográficos realizados a diferentes días. Ratón silvestre (wt), ratón Rd10<sup>-/-</sup> control y ratón Proins/rd10<sup>-/-</sup>, a diferentes días de desarrollo postnatal: P35, P45 y P55. En A se muestra para cada tipo de animal y a los distintos tiempos de desarrollo postnatal, ejemplos de las respuestas registradas en condiciones escotópicas, exclusiva de bastones (-2,55 log cd·s·m<sup>-2</sup>) y respuestas mixtas (1,48 log cd·s·m<sup>-2</sup>). En B se muestra también para cada tipo de animal y a los distintos tiempos de desarrollo postnatal, ejemplos de las respuestas registradas en condiciones fotópicas, generada en conos (1,48 log cd·s·m<sup>-2</sup>).

### Ejemplos de realización

- 15 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

#### Ejemplo 1

- 20 *La proinsulina humana es capaz de evitar la muerte de bastones de la retina y de mantener las conexiones sinópticas en el ratón transgénico Proins/rd10<sup>-/-</sup>*

1.1.- *Producción de dos líneas de transgénicos productores de proinsulina humana y homocigotos para la mutación rd10 (Proins/rd10<sup>-/-</sup>)*

- 25 Tras obtener varias líneas de ratones transgénicos productores de proinsulina humana, bajo el control del promotor constitutivo de la cadena ligera de la miosina (MLC1) del músculo estriado, cuyo bagaje genético era 50% C57B1/6 y 50% SJL, se cruzaron sucesivamente con ratones homocigotos rd10 (100% C57B1/6). Con esto se consiguió homogeneizar el bagaje genético hasta llegar a un porcentaje superior al 95% C57B1/6 y obtener ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup>. Esto se consiguió a partir del sexto retrocruce, obteniéndose dos líneas principales, L1 y L2 (en los ejemplos siguientes se ha utilizado animales L2, mientras que los resultados descritos en la Figura 4 ERG a P30, se han llevado a cabo también con animales de la L1; los análisis de proinsulinemia y glucemia se han realizado en ambos).

- 35 En la presente invención se entiende por ratón silvestre al ratón utilizado como control. No tiene ninguna alteración. Es comercial y su nombre es C57B1/6J, procedente de los laboratorios Jackson.

Se entiende por Ratón rd10 a los ratones comerciales que llevan la mutación en el gen de la fosfodiesterasa de GMP cíclico específica de bastones, cuyo nombre comercial es Pdeb<sup>rd10<sup>-/-</sup></sup>, procedente de los laboratorios Jackson.

- 40 Se entiende por Ratón Proins/rd10<sup>-/-</sup> a los ratones generados por cruce que son ratones rd10 y transgénicos productores de proinsulina humana bajo el promotor del músculo estriado MLC1. La construcción introducida en estos ratones lleva el cDNA de la proteína proinsulina humana controlada por el promotor muscular de la miosina de cadena ligera, cuya expresión es constitutiva (Figura 1B, SEQ ID NO1). Se observa una variabilidad en la expresión, que se puede deber a la distinta penetrancia del transgénico. Esto se correlaciona bastante con la producción de proinsulina humana que se encuentra en suero.

La construcción utilizada para generar el ratón transgénico consistió en un plásmido (pMLC-hIns) de un tamaño de 6,4 kb. La expresión va mediada por el promotor muscular constitutivo, de la cadena ligera de la miosina (MLC). El cDNA del gen de la proinsulina humana esta clonado entre los dos sitios EcoRI (Figura 1B).

- 50 Genotipaje. El DNA genómico se obtuvo de los tejidos según la técnica descrita por Miller y cols, 1988 (Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1215.). Las colas de ratones destetados se digirieron en 0,5 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM, pH 8,0, EDTA 20 mM, SDS 0,5% y NaCl 200 mM) con 0,3 mg de Proteinasa K (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Tras precipitar el DNA, se cortó con la enzima HindIII (Roche). Se utilizaron 10 pg de DNA genómico que se digirieron con la enzima HindIII en un volumen de 50 µl finales, durante toda la noche a 37°C. Se cargaron en cada pocillo individual de un gel de agarosa al 1% de 12 cm de largo para una buena separación de tamaño. Previo a la transferencia se preparó el gel con las siguientes soluciones: primero 15 minutos con solución de depuración (0,5 M HCl), después 30 minutos con solución de desnaturalización (0,5 N NaOH y 1,5 M NaCl), y finalmente 30 minutos con solución de neutralización (0,5 M Tris-HCl, pH 8). Con este tratamiento se consigue la fragmentación del DNA, lo que facilita su transferencia. Se utilizaron membranas de nylon (Schleicher & Schuell BioScience, USA) y el DNA se fijó a la membrana por radiación UV en el horno *Stratalinker* (Stratagene, La Jolla, CA, EEUU). La transferencia húmeda se realizó durante toda la noche a temperatura ambiente.

- 65 Para el genotipaje, se utilizó una sonda marcada radiactivamente con <sup>32</sup>P en la base dCTP contra la secuencia del cDNA de proinsulina humana insertada en la construcción. El molde para hacer la sonda se sacó del propio plásmido, digiriendo con EcoRI (Roche).

## ES 2 331 342 B1

El inserto liberado tras la digestión del constructo con EcoRI, se purificó por el *kit DNA extraction* (Millipore). El marcaje de la sonda se realizó utilizando el *Kit Random primer* (Stratagene), en presencia de [<sup>32</sup>P]dCTP. Posteriormente, la sonda se purificó en columnas Microspin G25 (Amersham Pharmacia Biotech).

5 La membrana se prehibridó a 65°C con una solución que contiene 50% formamida, Denhardt 1x (0,02% de Ficol, 0,02% de polivinilpirrolodona y 0,02% de BSA), 1% de SDS, SSC 5x (0,15 M de NaCl y 15 mM de citrato sódico a pH 7,2) y 0.1 mg/ml de DNA de esperma de salmón durante al menos 2 horas; posteriormente se hibridó a 65°C toda la noche con la solución de prehibridación, a la que se le añadieron 1.5 x10<sup>6</sup> cpm/ml de la sonda. Se realizaron dos lavados de 15 minutos con SSC 2x a temperatura ambiente, otro de 30 minutos con SSC2x 1% SDS y un último de 30 minutos con SSC 2x y 0,1% de SDS a 62,5°C.

15 Una vez lavados los filtros, sin dejar que se secaran, se envolvieron en un plástico tipo GLAD y se expusieron entre dos pantallas de amplificación (Genescreen plus, DuPont) a una película fotográfica de 18x24 cm, tipo Kodak Biomax MS (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.). Se requirió un tiempo de exposición de 3-4 días para obtener una señal nítida. La sonda producida contra el cDNA de la proinsulina humana detectó una banda de 1,5 Kb en el gel de DNA genómico.

20 Los ratones rd10 tienen una mutación puntual localizada en el exón 13 del gen de la enzima fosfodiesterasa 6 de GMP cíclico específica de bastones. En los ratones silvestres existe en esa localización un sitio de corte con la enzima Cfol. En el caso de los mutantes, desaparece el lugar de corte de la enzima. Esto permitió un control de la técnica de genotipaje intrínseco.

25 Se realizó la PCR sobre genómico con los siguientes cebadores: 3'-CTTTCTATTCTCTGTCAGCAAAGC-5' (Oligo A, SEQ ID NO3) y 3'-CATGAGTAGGGTAAACATGGTCTG-5' (Oligo B, SEQ ID NO4) que amplificaron un fragmento de 97 pb. Después el producto de PCR se sometió a digestión con la enzima CfoI (Roche) durante dos horas a 37°C. Después se fraccionó en un gel de agarosa Metaphor al 3%. Los ratones silvestres mostraron dos bandas, tras la digestión, de 54 y 43 pb. Los ratones homocigotos rd10 dieron una sola banda de 97 pb, ya que la enzima no corta el amplicón y los ratones heterocigotos rd10/+ mostraron tres bandas (de un alelo que se corta y el otro no). En este gen no se encontró ningún tipo de variabilidad entre individuos, lo cual se traduce en que la degeneración sigue un patrón estándar que se suele cumplir de la misma manera para todos los individuos que la poseen.

### 1.2.- Determinación de la glucemia y de los niveles de proinsulina en los ratones transgénicos

35 A todos los ratones se les midió la glucemia con tiras reactivas (Accu-Chek, Roche) tras 12 horas de ayuno. Los niveles normales de un ratón suelen estar entre 100 y 200 mg/dl. En los dobles mutantes Proins/rd10<sup>-/-</sup> se encontró una variación de entre 80 y 150 mg/dl, que no se correlacionaba directamente con los niveles de proinsulinemia.

40 Para la detección de los niveles de producción de proinsulina humana por los ratones transgénicos, se utilizó un ensayo comercial ELISA (Linco Research, MO, EEUU) que detecta específicamente la proinsulina humana.

45 Se analizaron músculo y suero, tanto de ratones transgénicos como controles. En el caso del suero, se siguieron todas las recomendaciones del fabricante, pero en el caso del músculo, se requirió una previa extracción proteica con un tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 7,0, 100 mM de NaCl y 0,1% de Tritón) y una cuantificación de la misma con el kit BCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU).

50 La proinsulina humana detectada en los extractos de músculo siempre fue muy elevada y se tuvo que corregir por la cantidad de proteína. La proinsulina humana detectada en suero osciló entre 1 y 15 pM. Esta concentración se midió en un volumen de 20 µl, de acuerdo con las instrucciones del kit. Las medidas se hicieron sistemáticamente a P30. Esto nos indicó que los ratones transgénicos Proins/rd10<sup>-/-</sup>, producen proinsulina humana en músculo y que esta se vierte a la circulación sanguínea desde donde es capaz de llegar a la retina neural.

### 1.3.- Inmunotinciones en secciones de criostato de la retina de los ratones transgénicos

55 En ratones P32 se analizó la histología de la retina (figura 2), comparando ratones silvestres que no sufren degeneración (A y D), ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup> (B y E) y ratones rd10<sup>-/-</sup> (C y F), que sí sufren degeneración. A P32, momento en que la degeneración está muy avanzada en las retinas de ratones rd10<sup>-/-</sup>, se analizó el número de células fotorreceptoras que hay por columna, el estado y abundancia de conos y el estado de las sinapsis (Figura 3). Se pretendía de esta manera comprobar el estado de la retina en general y del avance de la degeneración con distintos marcadores.

60 Todos los tejidos se embebieron en Tissue-tec (Sakura Finetek Europe B.U. Países Bajos), se congelaron en nieve carbónica y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Se realizaron secciones de criostato a 12 µm de grosor. Se recogieron en portas cubiertos con poli-L-lisina (Fisher Biotech, Pittsburgh, EEUU) y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

65 En todos los casos, fuera cual fuese la tinción a realizar, tras sacar los portas del congelador, se dejaron a temperatura ambiente durante media hora y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos, tras lo cual se lavaron con PBS.

## ES 2 331 342 B1

Se decidió marcar los conos que quedaban, porque como degeneran secundariamente, sin tener ninguna mutación, podían dar una idea del estado de la retina y su mantenimiento. Por su parte, para ver el progreso de la degeneración en los bastones, sólo había que contar el número de filas de células que quedaban en el grosor de la capa nuclear externa (CNE). Para el marcaje de conos, se utilizó una aglutinina marcada con el fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) durante 2 horas en una solución de PBS con BSA al 0.1%. Los lavados se hicieron con una solución que contenía  $MgCl_2$  1 mM y  $CaCl_2$  1 mM. Con ello se detectaron los segmentos externos de los conos y los terminales axónicos de los mismos.

Los ratones controles silvestres sin degeneración, tienen entre ocho y doce filas de núcleos en la CNE (figura 2D). El número de conos, que llevan los segmentos externos y también los botones sinópticos de estos mismos en la CPE, es bastante representativo por la tinción con aglutinina observada en la CPE (Figura 2A). En el ratón  $rd10^{-/-}$  control el número de filas de bastones en la CNE fue bastante pequeño, entre 1 y 2 filas, ya que la degeneración en este punto estaba bastante avanzada (Figura 2F). Lo más sorprendente es que los conos ya habían empezado a degenerar en este punto, aunque no están primariamente afectados por la mutación (Figura 2C). Se observó como apenas aparecieron segmentos externos de conos y los botones sinópticos de los mismos redujeron bastante su número. En los ratones Proins/ $rd10^{-/-}$  se observaron 5-6 filas de núcleos de bastones en este caso, que fue uno de los ratones en los que se detectó mayor proinsulinemia (Figura 2E). El estado de los conos fue muy bueno; de hecho se asemejaba a los ratones silvestres. Se pueden ver los segmentos externos de los mismos y los botones sinópticos en la CPE que denotan muy buena preservación de conos (Figura 2B). Se observó una variedad en la conservación de la CNE que se correlaciona con el nivel de proinsulina en sangre.

Además, se analizó el estado de las capas plexiformes (Figura 3), donde tienen lugar las conexiones sinópticas de las neuronas, porque lo que se desea con este tratamiento con proinsulina no solo es evitar o retrasar la muerte de la degeneración sino que las células que se mantengan vivas, ya tengan el daño intrínseco o se alteren secundariamente, y sean funcionales. Para la tinción con el anticuerpo SV2 (del inglés sinaptical vesicle 2), los cortes de criostato, tras la fijación con PFA al 4%, se permearon con tritón x-100 al 0,1% y se bloquearon con NGS (normal goat serum) al 10% en PBS durante 1 hora. El anticuerpo SV2, a una dilución 1:50, se une a una proteína de las vesículas sinópticas, marcando así las capas plexiformes de la retina (capa plexiforme externa, CPE, y la capa plexiforme interna, CPI). Se incubó a 4°C toda la noche en la solución de bloqueo. La incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (1/200) se realizó 1 hora a temperatura ambiente. Tras los correspondientes lavados con PBS, se montaron las secciones con medio de montaje con DAPI, para contrateñir los núcleos.

Se observó expresión en las dos capas plexiformes de la retina, la externa (CPE) y la interna (CPI) (Figura 3). La capa plexiforme interna, donde suceden las conexiones de las interneuronas bipolares con las neuronas que proyectan al cerebro, las células ganglionares, mostró bastante tinción y buen estado en los tres casos. La diferencia se encontró en la capa plexiforme externa, donde están las conexiones de las células fotorreceptoras con las interneuronas bipolares, principalmente. La CPE estaba bastante definida e intensa en el ratón silvestre control (Figura 3A) y en el ratón transgénico Proins/ $rd10^{-/-}$  (Figura 3B). El ratón control  $rd10$  mantuvo la tinción en la CPI, pero la CPE conservó poca tinción y bastante desorganizada (Figura 3C). En este ratón control  $rd10^{-/-}$  incluso se encontraron intentos de proyecciones de sinapsis entre las capas nucleares, debido a la desorganización y a que las neuronas que quedan pierden su sinapsis con los fotorreceptores. Esto indicó que el estado funcional de la retina en los ratones Proins/ $rd10^{-/-}$  es mejor que en los ratones con degeneración  $rd10^{-/-}$  sin tratamiento.

Esto demuestra que en el ratón transgénico Proins/ $rd10^{-/-}$  la proinsulina humana es capaz de mantener las conexiones sinópticas por más tiempo que en la situación de degeneración sin tratamiento. Esto implicaría que, además de retardar la muerte de las células en degeneración, las mantiene en buen estado y son capaces de ejercer su función biológica.

Las mejoras observadas histológicamente en los ratones Proins/ $rd10^{-/-}$  con respecto a los  $rd10^{-/-}$  son más patentes con los registros electroretinográficos posteriores (Figuras 4 y 5).

Por otro lado, para analizar el valor de los niveles de proinsulina en el efecto neuroprotector se llevaron a cabo ensayos con modelos diferentes al daño crónico y progresivo que se encuentra en los modelos genéticos de las enfermedades neurodegenerativas de la retina y de otras partes del sistema nervioso, así como en los asociados a senilidad. Así, se realizaron estudios preliminares donde se provocaba la muerte de células ganglionares de la retina en ratas adultas mediante un daño agudo - corte del nervio óptico- y se les administró proinsulina humana por vía subcutánea. Este tratamiento produjo un leve retraso de la muerte de las células ganglionares, hasta el momento inevitable en este paradigma de daño agudo (datos no mostrados). Igualmente, se administró mediante inyección subcutánea e intravítrea proinsulina humana como tratamiento en estos ratones  $rd10$ , pero la degeneración no se detuvo (datos no mostrados). Estos resultados indican que la proinsulina sérica es capaz de alcanzar zonas dañadas del sistema nervioso central y ejercer acciones neuroprotectoras únicamente cuando se alcanzan niveles mantenidos y prolongados.

## Ejemplo 2

*La proinsulina humana mejora la función visual valorada por ERG en el ratón transgénico Proins/rd10<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones control y enfermo*

5 Aunque los ratones se mantienen siempre en ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, para el estudio electrorretinográfico, los ratones fueron adaptados a la oscuridad durante toda la noche. A título informativo los conos están encargados de la visión fotópica (diurna) y los bastones de la escotópica (nocturna). Los ratones se anestesiaron bajo una luz tenue roja con una inyección intraperitoneal de una solución que contenía ketamina (a razón de 95 mg/kg) y xylazina (a razón de 5 mg/kg). Las pupilas fueron dilatadas con una gota de una solución que contenía 1% de tropicamida (Colircusí Tropicamida, Alcon Cusí, SA, El Masnou, Barcelona, España). El electrodo de registro es una lente que se colocó sobre el ojo del ratón. El electrodo de referencia se colocó en la boca, y el electrodo de tierra se dispuso en la cola. Los animales anestesiados se situaron en una caja de Faraday y se procedió a realizar todos los experimentos de naturaleza escotópica en absoluta oscuridad. Se registraron así las respuestas electrorretinográficas inducidas por flashes de luz de baja intensidad producidos por un estimulador Ganzfeld, permitiendo registrar las respuestas originadas sólo en bastones (respuesta de bastones) o conos y bastones (respuesta mixta) en adaptación a la oscuridad. La intensidad de los estímulos luminosos utilizados se ajustaron a valores comprendidos entre los -4 y los 1,52 log cd·s·m<sup>-2</sup>. La intensidad de luz se determinó mediante un fotómetro (Mayo Monitor USB) a nivel del ojo. Para cada intensidad de estímulo, se promediaron un máximo de 64 respuestas. El intervalo entre estímulos luminosos varía dependiendo de la intensidad, así, para estímulos de baja intensidad (-4 log cd·s·m<sup>-2</sup>) el tiempo entre estímulos se ajustó a 10 segundos y para estímulos de elevada intensidad (1,52 log cd·s·m<sup>-2</sup>) fue de 60 segundos. Con el fin de registrar las respuestas aisladas de cono, se adaptó el animal a condiciones fotópicas. Bajo estas condiciones, el intervalo entre los flashes de luz se fijó en 1 segundo.

25 Las señales eléctricas procedentes de la retina se amplificaron y filtraron entre 0,3 y 1000 Hz con un amplificador Grass (CP511 AC amplifier, Grass Instruments, Quincy, MA). Las señales se digitalizaron (PC-card ADI instruments, CA). Los registros se almacenaron en el ordenador para su posterior análisis.

30 Las respuestas mediadas por bastones se registraron en condiciones de adaptación a la oscuridad, ante la aplicación de flashes de luz de intensidades comprendidas entre -4 y los -1,52 log cd·s·m<sup>-2</sup>. Las respuestas mixtas generadas por conos y bastones se registraron ante la aplicación de flashes de luz de intensidades comprendidas entre -1,52 y 0,48 log cd·s·m<sup>-2</sup>. También se aislaron los potenciales oscilatorios, mediante la aplicación de filtros eléctricos comprendidos entre 100 y 1000 Hz. La respuesta mediada por los conos se registró en condiciones de adaptación a la luz (luz de fondo de el registro de 30 Cd·m<sup>-2</sup>), ante la aplicación de flashes de luz de intensidades comprendidas -0,52 y 2 log cd·s·m<sup>-2</sup>. Las respuestas Flicker (30 Hz) se registraron en adaptación a la luz, ante estímulos de 1,48 log cd·s·m<sup>-2</sup>.

40 En la Figura 4 se muestran las respuestas electrorretinográficas registradas tanto en adaptación a la oscuridad (c.escotópicas) como en adaptación a la luz (c.fotópicas) de ratones silvestres (WT), rd10<sup>-/-</sup> controles y Proins/rd10<sup>-/-</sup> obtenidas a P30, tanto de la línea 1 como de la línea 2.

45 Por otro lado, en la Figura 5, se muestran los registros electrorretinográficos correspondientes a ratones silvestres (wt), rd10 controles y Proins/rd10<sup>-/-</sup> de la línea 2 obtenidos a distintos tiempos de desarrollo postnatal (P35, P45 Y P55). Se muestran de forma separada los registros obtenidos en condiciones escotópicas (adaptación a la oscuridad) y fotópicas (adaptación a la luz). Se observó como los ratones silvestres generaron respuestas electrorretinográficas escotópicas (bastones) y fotópicas (conos) de gran amplitud a P35. En los ratones rd10<sup>-/-</sup> controles las respuestas fueron nulas a P35, tanto las respuestas generadas en bastones, como en conos. Los ratones Proins/rd10<sup>-/-</sup>, mantuvieron respuestas electrorretinográficas fotópicas y escotópicas muy significativas a P35 y consiguieron mantener cierto grado de respuesta hasta P55. Así, se observó que la respuesta visual era mejor en los ratones transgénicos Proins/rd10<sup>-/-</sup> y se prolonga más en el tiempo.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina **caracterizado** porque dicho compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es:

i) una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína o péptido neuroprotector, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

10 a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO:1);

b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a) que codifica un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana;

15 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b) que codifica un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana; y

d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a a), b) y/o c),

20 o

ii) una proteína o péptido que presenta actividad neuroprotectora y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

25 a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO:2);

b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a) capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana;

30 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b), capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana; y

d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a a), b), y/o c);

35 o

40 iii) una célula eucariota humana modificada genéticamente que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de i) o un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción genética que contiene la secuencia descrita en i) d) y que puede expresar y liberar de forma adecuada la proinsulina humana o un análogo o fragmento de la misma al medio extracelular,

45 para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica para la prevención y el tratamiento de condiciones, desórdenes o enfermedades neurodegenerativas en las que se produzca muerte celular programada, preferentemente patologías neurodegenerativas del sistema nervioso central y periférico.

50 2. Uso de un compuesto inductor según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enfermedad neurodegenerativa pertenece al siguiente grupo: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, retinosis pigmentaria, demencia de cuerpos de Lewy, Esclerosis lateral amiotrófica, atrofas espinocerebelosas, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, demencia vascular, enfermedad de Huntington, enfermedad de Baten, lesión en médula espinal, degeneración macular o glaucoma.

55 3. Uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de i) d) está constituida por una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana (SEQ ID NO:1).

60 4. Uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de i) d) está constituida por un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción genética codificante de una proteína proinsulina capaz de inducir neuroprotección.

65 5. Uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el vector de expresión contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 y un promotor específico de tejido, preferentemente de músculo.

## ES 2 331 342 B1

6. Uso de un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la célula eucariota es una célula humana transformada mediante la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana (SEQ ID NO:1).

5 7. Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades, desórdenes o patologías que cursan con alteraciones neurodegenerativas **caracterizado** porque comprende un compuesto inductor de la actividad de la proinsulina **caracterizado** porque dicho compuesto inductor de la actividad de la proinsulina es

10 i) una secuencia de nucleótidos que permite la expresión de una proteína o péptido neuroprotector, y que está constituida por una o varias secuencias de nucleótidos pertenecientes al siguiente grupo:

a) una secuencia de nucleótidos constituida por la secuencia de nucleótidos codificante de la proinsulina humana (SEQ ID NO:1);

15 b) una secuencia de nucleótidos análoga a la secuencia de a) que codifica un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana;

20 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b) que codifica un péptido o proteína capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana; y

d) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a a), b) y/o c);

o

25 ii) una proteína o péptido que presenta actividad neuroprotectora, y que comprende una o varias secuencias de aminoácidos pertenecientes al siguiente grupo:

a) una secuencia de aminoácidos constituida por la secuencia de aminoácidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO:2);

30 b) una secuencia de aminoácidos análoga a la secuencia de a) capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana;

35 c) un fragmento de una cualquiera de las secuencias de a) y b) capaz de mimetizar la actividad de la proinsulina humana; y

d) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente a a), b), y/o c),

o

40 iii) una célula eucariota humana modificada genéticamente que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de i) o un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción genética que contenga la secuencia descrita en i) d) y que puede expresar y liberar de forma adecuada la proinsulina humana o un análogo o fragmento de la misma al medio extracelular,

45 en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos de d) está constituida por una construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proinsulina humana (SEQ ID NO:1).

55 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la secuencia de nucleótidos de d) es un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos o una construcción génica codificante de una proteína proinsulina capaz de inducir neuroprotección.

60 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, **caracterizada** porque el vector de expresión contiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1 y un promotor específico de tejido, preferentemente de músculo.

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, **caracterizada** porque la célula eucariota es una célula humana transformada mediante la secuencia de nucleótidos de la proinsulina humana (SEQ ID NO:1).

65 12. Uso de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 7-11 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis, de una enfermedad, desorden o patología neurodegenerativa en la que se produce muerte celular programada.

## ES 2 331 342 B1

13. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la enfermedad neurodegenerativa pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, demencia de cuerpos de Lewy, Esclerosis lateral amiotrófica, atrofas espinocerebelosas, demencia frontotemporal, enfermedad de Pick, demencia vascular, enfermedad de Huntington, enfermedad de Baten y lesión en médula espinal.

5

14. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 13, **caracterizado** porque la enfermedad neurodegenerativa pertenece al siguiente grupo: retinosis pigmentaria, degeneración macular y glaucoma.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1.A

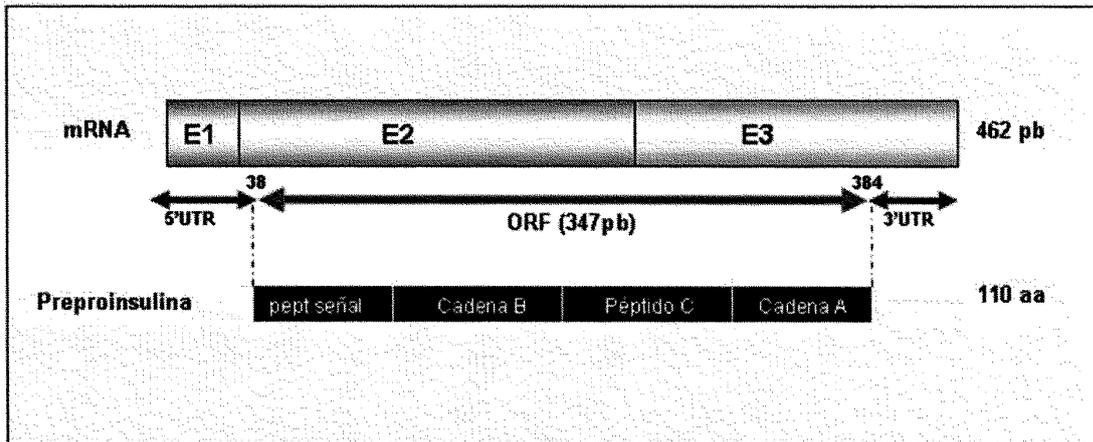


Figura 1.B

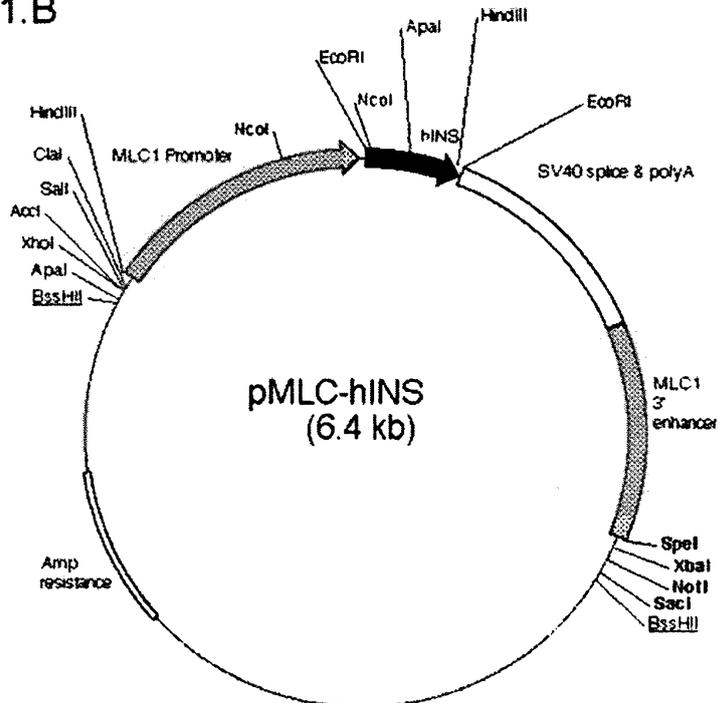


Figura 2

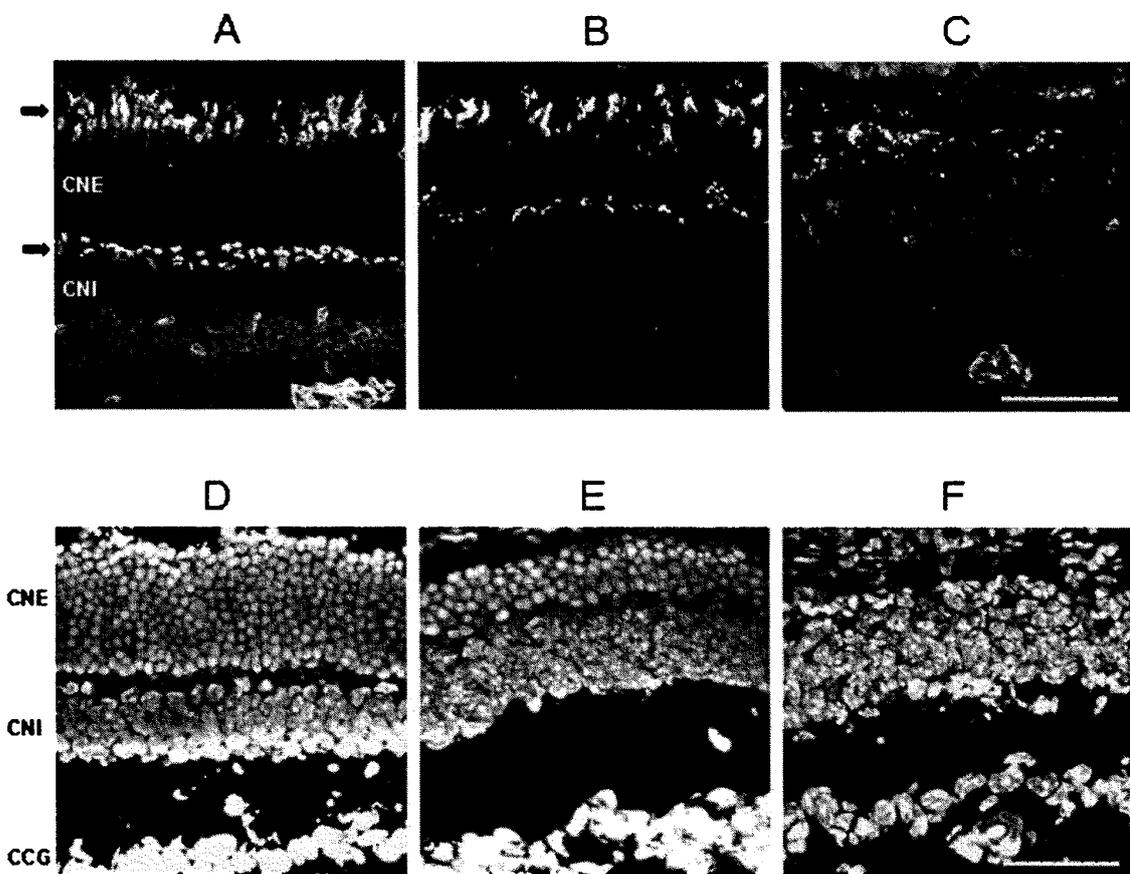
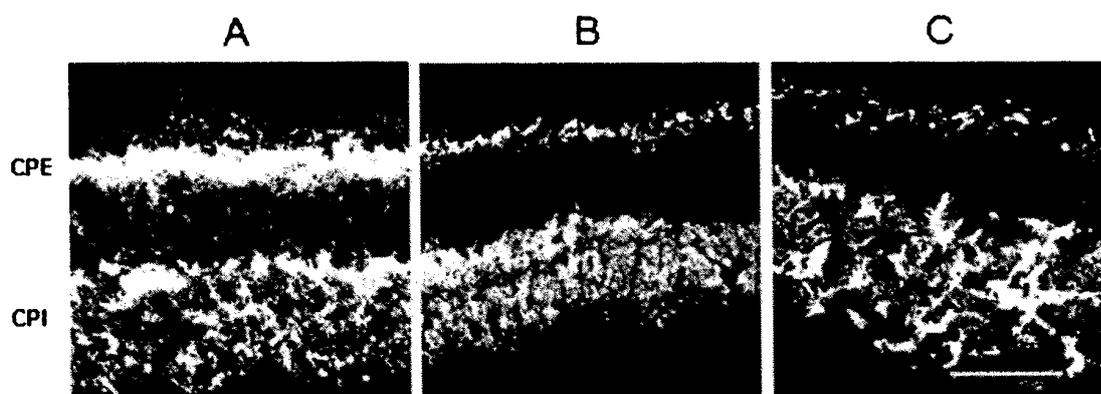


Figura 3



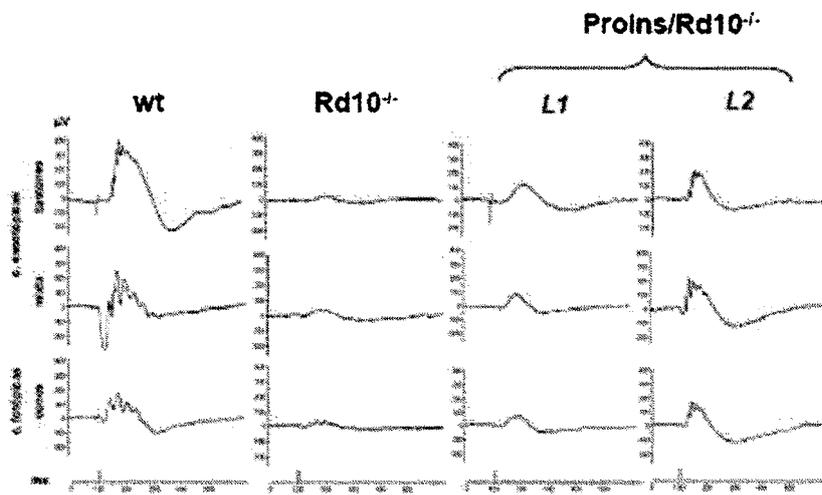
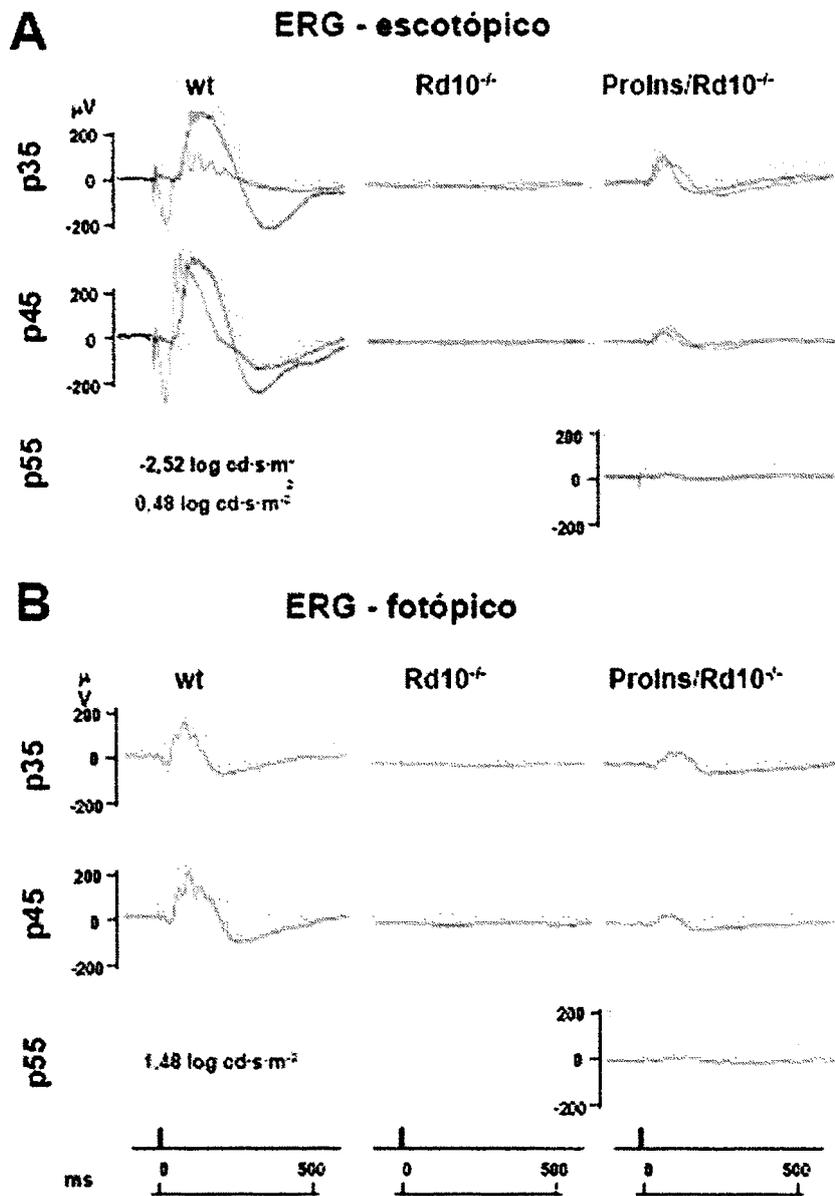


Figura 4



**Figura 5**

# ES 2 331 342 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

<120> USO DE LA PROINSULINA PARA LA ELABORACIÓN DE UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA NEUROPROTECTORA, COMPOSICIÓN TERAPÉUTICA QUE LA CONTIENE Y SUS APLICACIONES

<130> ProIns

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1125

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (64)..(393)

<400> 1

```

actttctttt tgaggttctt ctggaggaga tccttctttt gttccaagct atcgaattct      60

gcc atg gcc ctg tgg atg cgc ctc ctg ccc ctg ctg gcg ctg ctg gcc      108
  Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala
    1             5             10             15

ctc tgg gga cct gac cca gcc gca gcc ttt gtg aac caa cac ctg tgc      156
Leu Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys
                20             25             30

ggc tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc      204
Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly
                35             40             45

ttc ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg      252
Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val
                50             55             60

ggg cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc      300
Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro
    65             70             75

ttg gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc      348
Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys
    80             85             90             95

tgt acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac      393
Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
                100             105             110

tagacgcagc tgcaagctta tcgataccgt ccggaattcc tgcagcccgg gggatctttg      453

tgaaggaacc ttacttctgt ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagatttaaa      513

```

## ES 2 331 342 B1

```

gctctaaggt aatatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg 573
tttgtgtatt ttagattcca acctatggga actgatgaat gggagcagtg gtggaatggc 633
5 tttaatgagg aaaacctggt ttgctcagaa gaaatgccat ctagtgatga tgaaggctac 693
tgctgactct caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aacggtagaa ggaccgctcg 753
10 actttccttc agaattgcta aggtttttga gtcatgctgt gattagtaat agaactgctt 813
gccttgcatt tgctatttac acccaciaaag gaaaaagcct gcactgctat acaagaaaaa 873
15 ttattggaaa aattattcct gtaaccttta tagtaggcat aacagttat taatcataac 933
atacctgggt gttttgcttt acttccacac caggcataga ggggatctgc ttatttatgt 993
actattgctg aaatgtgtgt accgttagct tttttatatt tgtaagcgt cataaagaaa 1053
20 atattcgagg ttaatggctt ggcttaagat tcttattcgc cattccaatt tgaagggtta 1113
ctggcgttgg ac 1125

```

<210> 2

<211> 110

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

35 Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15
40 Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30
45 Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45
50 Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60
55 Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80
60 Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95
65 Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

```

## ES 2 331 342 B1

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> Oligo A

10

<400> 3

ctttctatc tctgtcagca aagc

24

15

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

<223> Oligo B

25

<400> 4

catgagtagg gtaaacaatgg tctg

24

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 331 342

② Nº de solicitud: 200601314

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.05.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/28** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DÍAZ, B. et al. "Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin". EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE. Mayo 1999. Vol. 11, Nº. 5, páginas 1624-1632; todo el documento.	1-14
X	DÍAZ, B. et al. "In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis". DEVELOPMENT. 15.04.2000. Vol. 127, Nº. 8, páginas 1641-1649; todo el documento.	1-14
X	CORROCHANO SÁNCHEZ, S. et al. "Insulina y muerte celular programada: expresión y efectos durante la neurogénesis en la retina de ratón". XI Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Cádiz, 3-6 Noviembre 2005. Página 90, comunicación.	1-14
X	GB 2104380 A (ELI LILLY AND COMPANY) 09.03.1983, todo el documento.	7-11

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

14.12.2009

**Examinador**

M. Novoa Sanjurjo

**Página**

1/1