

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 332 632**

21 Número de solicitud: 200801055

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **14.04.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2010**

Fecha de la concesión: **23.06.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **08.07.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.07.2010

73 Titular/es: **Universidad de Cádiz**
OTRI-Universidad de Cádiz - c/ Ancha, 16
11001 Cádiz, ES

72 Inventor/es: **Moreno López, Bernardo**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Uso de inhibidores de eNOS en regeneración nerviosa.**

57 Resumen:

Uso de inhibidores de eNOS en regeneración nerviosa.
La presente invención se refiere al empleo de inhibidores de la actividad y/o expresión de la isoforma endotelial de la enzima NO sintasa (eNOS) en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Asimismo, contempla el empleo de vectores que dirigen la expresión de los inhibidores de eNOS en la fabricación de dichos medicamentos, lo que permite acelerar la recuperación de la comunicación neuromuscular tras la lesión mediante una sola aplicación por inyección intraneural.

ES 2 332 632 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de eNOS en regeneración nerviosa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente aquel relacionado con lesiones nerviosas. En concreto está dirigida al empleo de inhibidores de la actividad y/o expresión de la isoforma endotelial de la enzima NO sintasa (eNOS) para acelerar la regeneración de nervios periféricos lesionados.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema nervioso se divide tradicionalmente en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por el encéfalo, encerrado en el cráneo y su continuación inferior, la médula espinal, ubicada en el conducto raquídeo. La sustancia gris está formada fundamentalmente por los somas neuronales y células gliales, mientras que la sustancia blanca recibe su nombre por las fibras nerviosas mielínicas que la conforman. Los cuerpos neuronales, dentro de la sustancia blanca, están agrupados en núcleos y sus prolongaciones, organizadas histológicamente en fibras nerviosas, transcurren entre regiones del SNC formando fascículos o cordones nerviosos.

El SNP comprende todo el tejido nervioso existente fuera del encéfalo y médula espinal y está constituido por cuerpos neuronales organizados en ganglios, entrecruzamientos de fibras nerviosas o plexos y haces de fibras nerviosas de recorrido paralelo organizado en nervios. Los nervios periféricos son las vías de comunicación entre los centros cerebrales y medulares y el resto del cuerpo. Pueden ser sensitivos (aférentes), motores (eferentes) o mixtos.

Ante una lesión, las fibras nerviosas del sistema periférico nervioso mantienen la capacidad de regeneración, incluso de largas distancias, en mamíferos adultos. Esta es una de las características más reseñables que diferencian al sistema periférico nervioso del central.

Para que se lleve a cabo el re-crecimiento de las fibras nerviosas proximales hacia el extremo distal y la subsiguiente regeneración, debe producirse la degeneración Walleriana del extremo distal del nervio. Durante ese periodo tiene lugar la fragmentación y disolución de la mielina, la desdiferenciación de células de Schwann en células reactivadas con capacidad de formar cadenas celulares que expresan neurotrofinas, neurotrofinas y moléculas de adhesión, y la activación de las neuronas dañadas (*Ide C. (1996). Peripheral nerve regeneration. Neurosci Res 25(2):101-121*). La composición molecular del microambiente local modificado en respuesta a la lesión determina la movilidad del cono de crecimiento y la orientación y el crecimiento axonal. La lesión del nervio también activa las células fagocíticas, como los macrófagos y las células de Schwann, que eliminan los restos de axones y mielina y producen citoquinas, las cuales potencian el crecimiento axonal y desencadenan la proliferación de células endoteliales, aumentando la angiogénesis (*Ide C (1996); González-Hernández T. et al. (1999). Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. J Neurosci Res 55(2):198-207*).

Seddon (1943) clasifica las lesiones en nervios periféricos en tres grandes grupos: neuroapraxia, axonotmesis y neurotmesis.

Neuroapraxia: se define por un bloqueo de conducción local, con parálisis, en ausencia de degeneración Walleriana distal presentando una recuperación funcional completa (días o semanas). Macroscópicamente el nervio no presenta lesiones, histológicamente aparecen segmentos desmielinizados. Al no existir lesión axonal no existe regeneración y con ello tampoco existe signo de Tinel a nivel de la lesión.

Axonotmesis: se define por una discontinuidad axonal y una degeneración Walleriana distal y una regeneración axonal proximal. Tanto el peri como el endoneuro permanecen intactos. La recuperación nerviosa es de 1,5 mm por día.

Neurotmesis: es la lesión nerviosa más severa, equivalente a una disrupción fisiológica del nervio completa, pudiendo o no existir una sección nerviosa en el momento.

Tras la lesión, la función nerviosa degenera de forma secuencial: motora, sensibilidad propioceptiva, tacto, temperatura, dolor y componente simpático. La recuperación nerviosa se refleja en sentido inverso.

Sunderland (1951) amplió la clasificación sobre la base de que la axonotmesis presenta un pronóstico muy variado. Subdividió la axonotmesis de Seddon en tres grados, dependiendo del grado de lesión del componente conectivo del nervio.

Tipo I: equivalente a la neuroapraxia. La recuperación funcional es completa al cabo de semanas o meses.

Tipo II: el endoneuro y el perineuro se hallan intactos, pero los axones están fisiológicamente interrumpidos. Dado que el endoneuro está íntegro, la regeneración axonal está dirigida a lo largo de su recorrido original y por ello se puede esperar una recuperación funcional completa. El tiempo de recuperación depende del nivel de la lesión (generalmente meses), dado que los axones deben regenerarse distalmente hasta el órgano diana.

Tipo III: el endoneuro está interrumpido, quedando íntegro el perineuro. La recuperación funcional es incompleta por una serie de razones: la primera es una lesión retrógrada de los cuerpos celulares de mayor grado, que puede llegar a destruir la neurona o retrasar su recuperación. En segundo lugar aparece fibrosis interfascicular por presentar una lesión del endoneuro, lo que interfiere en la regeneración axonal. La tercera es el resultado de un mayor lapso de tiempo para inervar al órgano diana que ha podido sufrir cambios secundarios a la denervación que impidan una recuperación completa.

Tipo IV: la integridad del nervio se debe a un tejido cicatricial que contiene los fascículos nerviosos interrumpidos. La degeneración retrógrada y la fibrosis interfascicular son más acusadas, por lo que la recuperación es mínima. Presenta un signo de Tinel a nivel de la lesión que no progresa hacia distal, se espera un lapso de tres meses previa cirugía. Éste grado precisa la resección del segmento lesionado y la reparación quirúrgica o la reconstrucción nerviosa.

Tipo V: equivalente a la neurotmesis. Dado que se da en lesiones abiertas siempre está indicada una exploración quirúrgica. La recuperación funcional espontánea no existe.

La clasificación de Sunderland presenta una descripción anatómica de la lesión nerviosa, estando su utilidad clínica en debate. La mayoría de las lesiones no se pueden clasificar en un sólo grado dado que las lesiones mixtas son frecuentes a nivel de los nervios periféricos. Por ello Mackinnon describió un VI grado de lesión nerviosa que representa distintos grados de Sunderland en un mismo segmento nervioso lesionado. La subclasificación de la axonotmesis es improbable preoperatoriamente, siendo sólo realizable mediante un estudio histológico del nervio lesionado.

Se han sugerido en el estado de la técnica diferentes tipos de tratamientos para acelerar la regeneración de nervios periféricos, la mayoría de ellos invasivos y de aplicación crónica. Así, se han descrito tratamientos condicionantes y manipulaciones extrínsecas para acelerar la recuperación, como la administración de factores de crecimiento (Boyd JG, Gordon T. *A dose dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor.* (2002) *Eur J Neurosci* 15 (4):613-626), estimulación eléctrica (Al-Majed et al. *Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration* (2000) *J Neurosci* 20(7):2602-2608; Brushart et al. *Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron.* (2002) *J Neurosci* 22(15):6631-6638), campos electromagnéticos (Sisken et al. *Stimulation of rat sciatic nerve regeneration with pulsed electromagnetic fields* (1989) *Brain Res* 485(2):309-316; Greenebaum et al. *Effects of pulsed magnetic fields on neurite outgrowth from chick embryo dorsal root ganglia* (1996) *Bioelectromagnetics* 17(4):293-302; Longo et al. *Electromagnetic fields influence NGF activity and levels following sciatic nerve transection* (1999) *J Neurosci Res* 55(2):230-237) y el tratamiento con oxígeno hiperbárico (Bajrovic et al. *The effect of hyperbaric oxygen treatment on early regeneration of sensory axons after nerve crush in the rat* (2002) *J. Peripher Nerv Syst* 7 (3):141-148; Haapaniemi et al. *Functional evaluation after rat sciatic nerve injury followed by hyperbaric oxygen treatment* (2002) *J Peripher Nerv Syst* 7(3):149-154). Sin embargo, ninguna de estas técnicas se emplea actualmente en la práctica clínica.

Debido a que el éxito de la regeneración depende de la interrelación de todos los procesos degenerativos y regenerativos, la identificación de sustratos moleculares que regulen estos procesos es un paso básico hacia el desarrollo de nuevas estrategias para acelerar la recuperación funcional y morfológica del nervio lesionado.

El óxido nítrico (NO) podría estar implicado en la regulación de estos procesos degenerativos y regenerativos tras la lesión de nervios periféricos, dado que se ha demostrado que colapsa los conos de crecimiento neuronal (Yamada RX. et al. (2006). *Nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate-mediated growth cone collapse of dentate granule cells.* *Neuroreport* 17(6):661-665; Hess DT. et al. (1993). *Neuronal growth cone collapse and inhibition of protein fatty acylation by nitric oxide.* *Nature* 366:562-565) y que inhibe el restablecimiento de la cobertura sináptica a nivel central tras la lesión del nervio (Sunico CR. et al. (2005). *Nitric-oxide-directed synaptic remodeling in the adult mammal CNS.* *J Neurosci* 25(6):1448-1458). El NO, un gas altamente reactivo de vida corta, se produce durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina por acción de la NO sintasa (NOS). Se han identificado tres isoformas de NOS: la isoforma neuronal (nNOS, NOS-I), expresada constitutivamente en poblaciones neuronales discretas; la isoforma inducible (iNOS, NOS-II), expresada en varios tipos celulares incluyendo macrófagos activados, y la isoforma endotelial (eNOS, NOS-III), presente en células endoteliales de vasos sanguíneos.

El NO producido a bajas concentraciones por las isoformas nNOS y eNOS, actúa como una molécula mensajera en diferentes mecanismos de transducción de señales, mientras que el NO producido a altas concentraciones por la isoforma iNOS presenta efectos citotóxicos (Moreno-López B. et al. (2006). *Nitric oxide and synaptic dynamics in the adult brain: physiopathological aspects.* *Rev Neurosci* 17(3):309-357). Tras la ligadura del nervio, la nNOS se sobre-expresa en el ganglio de la raíz dorsal (González-Hernández T. et al (1999)) y en neuronas motoras (Sunico CR. et al. (2005)). Esta proteína es transportada centrífugamente y se acumula en los axones en crecimiento. Al mismo tiempo, la iNOS es inducida en los macrófagos reclutados y en las células de Schwann fagocíticas y la eNOS se sobre-expresa en los vasos sanguíneos (*vasa nervorum*) del muñón distal del nervio y alrededor de la ligadura (González-Hernández T. et al. (1999); Zochodne DW. et al. (2005). *Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system.* *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(3):255-267).

Los niveles de expresión de la isoforma eNOS aumentan por la acción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (Bouloumié A. et al. *"Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells"*. *Cardiovascular Research* 41 (1999) 773-780). Por otra parte, la fosforilación de eNOS, mediada por

los receptores del VEGF (VEGF1/Flt-1 y/o VEGFR2/Flk-1/KDR) con actividad tirosina-quinasa, aumenta su actividad (Ben-Quan Shen, et al. "Vascular Endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway". *Journal of biological chemistry*. Vol 274(46) (1999) 33507-33063). Asimismo, el transportador de aminoácidos catiónicos (CAT-1) actúa como transportador específico de L-Arginina para la eNOS, potenciando su actividad (Chunying Li et al. "Interaction of the endothelial nitric oxide synthase with the CAT-1 arginine transporter enhances NO release by a mechanism not involving arginine transport". *Biochem. J.* (2005), 386, 567-574).

En estudios realizados en ratones knockout de nNOS e iNOS, se ha comprobado que, tras la lesión del nervio, la ausencia de estas isoformas produce un retraso en la degeneración Walleriana y en la recuperación periférica (Zochodne DW. et al. (2005); Keilhoff G. et al. (2002). *Differences in peripheral nerve degeneration/regeneration between wild-type and neuronal nitric oxide synthase knockout mice*. *J Neurosci Res* 68(4):432-441). En estudios realizados con inhibidores específicos de nNOS y/o iNOS, se ha visto que su empleo no es efectivo a corto plazo en la recuperación de la función muscular o en la tasa de crecimiento axonal, aunque se utilizaron a unas dosis que fueron efectivas para otro tipo de procesos fisiopatológicos (Moreno-López B. et al. (2004). *Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb*. *J Neurosci* 24(1):85-95; Sunico CR. et al. (2005); Jiang W. et al. (2004). *Effects of nitric oxide on dentate gyrus cell proliferation after seizures induced by pentylentetrazol in the adult rat brain*. *Neurosci Lett* 367(3):344-348). En relación con la eNOS, la síntesis de NO por esta isoforma favorece la hiperemia en el extremo proximal del nervio (Zochodne D. W. et al. "Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves". *Neuroscience* Vol 91, nº 4, pp. 1515-1527, 1999). La hiperemia es un proceso por el cual aumenta el aporte sanguíneo al sitio de la lesión, lo cual, podría tener efectos beneficiosos en los procesos regenerativos. Según estas afirmaciones, la inhibición de eNOS sería contraproducente en la regeneración de nervios periféricos. Así, en ensayos realizados con ratones knockout de eNOS, la ausencia de esta isoforma retarda la revascularización nerviosa, lo cual, sin embargo, no se ha visto que afecte a la capacidad regenerativa del nervio (Hari Shanker Sharma et al. "Neuroprotective effects of nitric oxide synthase inhibitors in spinal cord injury-induced pathophysiology and motor functions. An Experimental Study in the rat" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2005) 1053: 422-434). No hay por tanto datos disponibles que demuestren la acción regulatoria del NO endógeno procedente de diferentes fuentes en la reparación total del nervio.

Ante la falta de datos concluyentes, los autores de la presente invención han desarrollado una importante labor de investigación acerca del papel del NO sintetizado por los diferentes subtipos de NOS en la recuperación total de la función neuromuscular y la tasa de regeneración axonal tras la lesión de un nervio motor.

Por primera vez, y en contra de los prejuicios establecidos en el estado de la técnica, han identificado la isoforma eNOS como la mayor fuente de NO con efectos negativos en la recuperación del potencial muscular tras la lesión de nervios periféricos, demostrando su utilidad como diana terapéutica en el tratamiento de estas lesiones.

Así, han demostrado la utilidad de la inhibición de la actividad y/o expresión de la óxido nítrico sintasa de origen endotelial (eNOS), por medio de herramientas farmacológicas y/o moleculares, en la recuperación de la función neuromuscular y en la regeneración axonal.

Particularmente, han demostrado que la inhibición de eNOS mediada por un vector viral que dirige la expresión de una proteína inhibidora de la expresión y/o actividad de eNOS acelera la recuperación de la comunicación neuromuscular tras la lesión mediante una sola aplicación por inyección intraneural, actuando como una estrategia viable en terapia génica aplicada a lesiones nerviosas.

Descripción de las figuras

Figura 1. *Modelo experimental de lesión del nervio del XII par craneal por aplastamiento (crush) en la rata adulta*. (A) Con el fin de evaluar el curso temporal de la recuperación de la comunicación neuromuscular, se registró el potencial de acción muscular compuesto (PAMC), evocado por estimulación eléctrica (St) del nervio XII usando electrodos implantados en el músculo geniogloso. Los registros se realizaron en animales control y a diferentes puntos temporales tras el aplastamiento del nervio (Cr: crush). NH: núcleo hipogloso. (B) El índice de crecimiento axonal se analizó cuantificando el número de neuronas motoras marcadas de forma retrógrada con FluoroGold (FG) tras el aplastamiento del nervio (Cr: crush) a 10 mm en posición proximal a la bifurcación. T+FG: Transección (T) del nervio XII y aplicación de FG. Tras la aplicación de FG se dejó que los animales sobrevivieran durante 7 días para permitir el transporte retrógrado del marcador. Inserto: Microfotografía de alta amplificación de neuronas motoras del hipogloso marcadas con FG. Barra de calibración: 50 μ m.

Figura 2. *Curso temporal de la recuperación de la función neuromuscular tras la lesión por aplastamiento del nervio del XII par craneal*. PAMC evocados en el músculo geniogloso mediante un único estímulo eléctrico (las puntas de flecha señalan los artefactos de los estímulos) del nervio XII en animales controles (A) y a los 7 (B), 15 (C), 22 (D), 30 (E) y 45 (F) días tras la lesión. Por comparación, se ilustran los PAMC evocados por estimulación del nervio XII izquierdo (I, lado intacto) y derecho (D, lado lesionado). Cada trazo representa una media de diez trazados individuales. Los trazados de color gris en C representan las respuestas obtenidas en el mismo animal tras la inyección del bloqueante de la transmisión neuromuscular trietioduro de galamina (GT) en el músculo geniogloso. Obsérvese la completa ausencia al 7º día de PAMC y los primeros signos de re-inervación muscular 15 días después de la lesión.

Figura 3. Estudio del efecto de la inhibición crónica de la NOS en el curso temporal de la recuperación de la función neuromuscular tras la lesión por aplastamiento del nervio del XII par craneal. (A) Ejemplos de respuestas evocadas en el músculo geniogloso mediante estimulación eléctrica del nervio XII derecho (D)/lesionado en los tiempos indicados en animales tratados con solución salina (salino) o el inhibidor de amplio espectro de la NOS, L-NAME. (B,C) Curso temporal de los cambios en el ratio de áreas (B) y diferencias en la latencia de los PAMC (C) evocados mediante estimulación eléctrica del nervio XII derecho (lesionado) frente al izquierdo (intacto) en animales tratados crónicamente con solución salina o L-NAME. El valor medio en los animales control se tomó como el 100%. *, # $p < 0,05$; prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, en relación con el control o los grupos control y tratados con solución salina, respectivamente.

Figura 4. Estudio del efecto de L-NAME en la actividad de disparo basal de las neuronas motoras del hipogloso tras la lesión por aplastamiento del nervio del XII par craneal. (A) Ejemplos representativos que muestran la actividad de descarga de neuronas motoras del hipogloso registradas a una concentración de CO₂ al final de la espiración basal en el ET_{CO2} BASAL (4,8-5,2%) en los controles y 7 días después del aplastamiento del nervio XII homolateral en animales no tratados y tratados con L-NAME. Los trazos son las señales originales de la actividad de potenciales de acción registradas extracelularmente (parte superior) y el histograma de la tasa de disparo instantáneo (parte inferior; FR; en potencial/es de acción). La línea discontinua horizontal ilustra la FR media (mFR) de un brote. (B, C) Curso temporal de las alteraciones en el número de potenciales de acción (SB) (B) y el mFR (C) por brote tras la lesión del nervio XII. * $p < 0,05$; ANOVA de una vía; método *post hoc* de Dunnett, en relación con la condición control.

Figura 5. Efecto de los inhibidores de la NOS específicos de isoforma sobre el inicio de la recuperación de la función neuromuscular. (A) Respuestas PAMC típicas evocadas en el músculo geniogloso mediante estimulación eléctrica del nervio XII dañado 7 días después de la lesión en animales tratados y no tratados. (B) La proporción entre las áreas de los PAMC medidos en los lados derecho (lesionado) e izquierdo (intacto) en animales tratados con L-NAME y L-NIO (C). Diferencias en la latencia de los PAMC evocados mediante estimulación del nervio derecho (lesionado) y el izquierdo (intacto). # $p < 0,05$; prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney.

Figura 6. Estudio del efecto de la inhibición crónica de la NOS en el índice de crecimiento axonal. (A-F) Microfotografías de secciones coronales del NH derecho que muestran neuronas motoras que contienen el marcador retrógrado FG. El muñón del nervio XII proximal se sumergió en una solución con FG en animales control (A), justo después del aplastamiento del nervio (B), dos días después de la lesión por aplastamiento del nervio en animales tratados diariamente con solución salina (C) o L-NAME (D) y una semana después de la lesión por aplastamiento en animales que reciben estos mismos tratamientos (E,F). Todos los animales fueron perfundidos 7 días después de la aplicación de FG. Barra de calibración: 100 μ m. (G) Número de neuronas motoras (MN) marcadas con FG en animales control (c) y a diferentes puntos de tiempo tras la lesión por aplastamiento del nervio XII tratados con solución salina o L-NAME. (H) Número de neuronas motoras marcadas (MN) cuando la aplicación de FG se realizó dos días después de la lesión por aplastamiento en animales que estaban recibiendo los tratamientos indicados. La barra gris horizontal representa la media \pm S.E.M en ratas control. *, # $p < 0,05$; prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, en relación con el control o los grupos control y tratado con solución salina/D-NAME, respectivamente.

Figura 7. Estudio del efecto de la inhibición intraneural crónica de la eNOS usando un vector adenoviral en la recuperación de la función neuromuscular y el índice de crecimiento axonal. (A-C) PAMC evocados en el músculo geniogloso mediante estimulación eléctrica (las puntas de flecha señalan los artefactos del estímulo) del nervio XII a 7 (A), 22 (B) o 62 (C) días después de la inyección intraneural de Ad-eGFP o Ad-TeNOS. Para propósitos comparativos, se ilustran los registros obtenidos mediante estimulación del nervio XII izquierdo (intacto) y derecho (lesionado). Cada trazo representa el promedio de diez respuestas individuales. (D) La razón entre el área del PAMC evocado mediante estimulación eléctrica del nervio derecho frente al izquierdo a diferentes puntos de tiempo. La barra gris horizontal representa la media \pm E.S. en ratas control. (E) Diferencias en la latencia de los PAMC evocados mediante estimulación de los nervios derecho e izquierdo. (F,G) Microfotografías de secciones coronales del NH derecho que muestran neuronas motoras marcadas con FG en animales a los que se ha inyectado Ad-eGFP (F) o Ad-TeNOS (G) el día de la lesión. FG se aplicó dos días tras la lesión y los animales fueron perfundidos 7 días después de la aplicación del FG. Barra de calibración: 100 μ m. (H) Número de neuronas motoras (MN) marcadas con FG identificadas en animales tratados con Ad-eGFP o Ad-TeNOS. §, #, *, $p < 0,05$; prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney en relación con el control o los grupos control y tratado con Ad-eGFP o los grupos tratados con Ad-eGFP, respectivamente.

Objeto de la invención

La presente invención tiene como principal objetivo el empleo de un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Además, contempla un vector de expresión que codifica un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS, en la preparación de dicho medicamento.

Finalmente, es objeto de la presente invención un método para identificar agentes aceleradores de la regeneración en nervios periféricos.

Descripción de la invención

Debido a la ausencia en el estado de la técnica de un tratamiento efectivo para acelerar la regeneración de nervios periféricos, los autores de la presente invención han llevado a cabo un importante trabajo de investigación centrado en el estudio de la participación de las diferentes isoformas de NOS en los procesos de regeneración de nervios periféricos lesionados. Así, han demostrado la utilidad de la inhibición de la actividad y/o expresión de la óxido nítrico sintasa de origen endotelial (eNOS), por medio de herramientas farmacológicas y/o moleculares, en la recuperación de la función neuromuscular y en la regeneración axonal.

En un aspecto principal de la invención se contempla el uso de un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos (sensitivos, motores o mixtos) lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

En la presente invención, se entiende por lesión de un nervio periférico aquella ocasionada por agentes térmicos (altas o bajas temperaturas), irradiación (altas dosis de radiaciones ionizantes), o cualquier tipo de lesión traumática que de lugar a una lesión con interrupción de la función nerviosa. Según el grado de lesión se denomina neurapraxia (interrupción de la conducción nerviosa con conservación morfológica de los componentes de la fibra, incluyendo el axón), axonotmesis (rotura del axón y de su vaina de mielina, con preservación de los tubos endoneurales, que pueden estar distorsionados, pero no interrumpidos; por ejemplo el *crush* o aplastamiento) y neurotmesis (destrucción de todos los elementos del nervio; transección). Las lesiones de nervios periféricos también pueden ser generadas por enfermedades autoinmunes que atacan generalmente a la cubierta de mielina (ej. enfermedad de Guillain-Barré). También lesiones de tipo irritativo, que se manifiestan por movimientos o sensaciones anormales como fasciculaciones y espasmos musculares, parestesias, dolor espontáneo y trastornos vasomotores y de la sudoración.

Por inhibidor de eNOS se entiende cualquier herramienta farmacológica y/o molecular (oligonucleótidos, péptidos, anticuerpos, antagonistas, etc) capaz de inhibir la actividad y/o expresión de esta enzima.

La actividad y/o expresión de eNOS puede inhibirse de forma directa o indirecta a tres niveles: 1) actuando directamente sobre la expresión y/o actividad de eNOS, disminuyendo su capacidad funcional, 2) actuando sobre el VEGF o sus receptores (VEGF1/Flt-1 y/o VGFR2/Flk-1/KDR), con el fin de reducir la expresión de eNOS y/o su activación por fosforilación, y 3) actuando sobre el transportador del sustrato de la eNOS, CAT-1, con el fin de reducir la disponibilidad del sustrato de la eNOS, disminuyendo así la producción de NO de origen endotelial.

Así, en una realización preferida el inhibidor de eNOS actúa directamente sobre la expresión y/o actividad de eNOS o, indirectamente, inhibiendo la expresión y/o actividad de VEGF, VEGF1/Flt-1, VGFR2/Flk-1 y/o CAT-1.

Estas posibilidades de inhibición de la actividad y/o expresión de eNOS pueden utilizarse de forma independiente o combinada.

En una realización particular, el inhibidor se selecciona de entre L-N(5)-(1-iminoetil)ornitina (L-NIO) (inhibidor específico de eNOS), SU-5416 (bloqueante de los receptores de VEGF), L-lisina (inhibidor de CAT-1) y combinaciones de los mismos.

En otra realización particular, el inhibidor es una molécula de ARN interferente dirigida contra el ARNm que codifica para una proteína seleccionada entre eNOS, VEGF, VEGF1/Flt-1, VGFR2/Flk-1/KDR y/o CAT-1. De forma preferida, la molécula de ARN interferente empleada está dirigida contra la secuencia de ARNm, concretamente contra el sintetizado a partir de la secuencia de ADN del gen, ilustrada en SEQ ID NO 1, que codifica para la isoforma eNOS. En este caso, el ARN interferente puede ser cualquier secuencia de 21-23 nucleótidos complementaria a cualquier región del ARNm sintetizado a partir de la secuencia de ADNc que codifica para el ARNm que da lugar a la proteína eNOS (SEQ ID NO 2). De forma particular, se emplea un ARN interferente de secuencia SEQ ID NO 3.

En otra realización particular, el inhibidor comprende una molécula de ADN, que codifica para una forma truncada mutante dominante negativo de una proteína seleccionada de entre eNOS, VEGF, VEGF1/Flt-1, VGFR2/Flk-1/KDR y/o CAT-1, inserta en un sistema de expresión heterólogo. Una forma truncada mutante dominante negativo de una proteína se define como cualquier fragmento de la proteína nativa que se une a la misma inhibiendo su función, siempre y cuando sean capaces de formar dímeros. De forma preferida, el inhibidor es una forma truncada mutante dominante negativo de la proteína eNOS. Más preferiblemente, la secuencia de ADN que codifica dicha proteína mutada tiene una secuencia seleccionada de entre SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5.

Para el uso directo de los inhibidores de la actividad y/o expresión de eNOS, la presente invención contempla su introducción en las células del nervio, donde se requiere el efecto inhibitorio. Para ello, se contempla el empleo de sistemas específicos empleados habitualmente en el estado de la técnica. De forma particular, se contempla el empleo de vectores de expresión.

Así, en otra realización principal, la invención se refiere al empleo de un vector de expresión que codifica un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS, en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento. De forma particular, el vector puede ser plasmídico y/o vírico (lentiviral, adenoviral, etc).

De forma particular, y tal y como se ha definido anteriormente, el inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS codificado por el vector puede ser una molécula de ARN interferente dirigida contra el ARNm que codifica para una proteína seleccionada entre eNOS, VEGF, VEGF1/Flt-1, VGFR2/Flk-1/KDR y CAT-1 y/o una forma truncada mutante dominante negativo de una proteína seleccionada de entre eNOS, VEGF, VEGF1/Flt-1, VGFR2/Flk-1/KDR y/o CAT-1.

El medicamento que comprende los inhibidores de la actividad y/o expresión de eNOS, se administra preferiblemente de forma local. Esta vía de administración presenta ventajas puesto que evita el efecto hipertensivo que pudiera producir un medicamento de administración sistémica.

De forma particular, cuando el medicamento comprende inhibidores específicos de eNOS, de VEGF, de sus receptores y/o de CAT-1, tales como L-NIO, SU-5416 ó L-lisina, la administración local es crónica y tópica (ej. pomadas), sistemas de perfusión local continuada o vehículos similares.

Cuando el medicamento comprende una secuencia nucleotídica, bien ARN o bien ADN, cuya expresión está mediada o no por un vector, la administración se realiza directamente en el nervio, mediante inyección intraneural, para que el tratamiento sea más efectivo, aunque no se descarta la aplicación tópica de tales agentes.

De forma particular, la presente invención contempla la administración, el mismo día de la lesión, de un vector adenoviral recombinante que comprende una molécula de ADN que codifica para una forma truncada de la proteína eNOS, mediante una única inyección intraneural, lo que adelanta el proceso de regeneración nerviosa en, al menos, una semana. La vida relativamente corta de la expresión genética proporcionada por este tipo de vectores es un factor beneficioso en la regeneración nerviosa, ya que la inhibición de eNOS durante largos periodos de tiempo podría presentar el efecto contrario. El efecto beneficioso de la aplicación intraneural de este tipo de vectores se refleja en la aceleración de la reinervación del músculo, y en el incremento de la tasa de regeneración axonal observándose, una semana después de la transducción, características similares a las que se observan tras el tratamiento sistémico crónico con inhibidores específicos de eNOS.

Los medicamentos contemplados en la presente invención pueden comprender además vehículos, excipientes y otros ingredientes conocidos y empleados habitualmente en el estado de la técnica, en función de la forma de administración (local o sistémica; inyección o tópica, etc.).

La dosis de medicamento empleada dependerá también de la forma de administración, del peso corporal del paciente y otros factores, y en cualquier caso será determinada por el médico responsable del tratamiento.

Finalmente, en otra realización principal, se contempla un método para identificar agentes aceleradores de la regeneración en nervios periféricos que comprende: a) poner en contacto el agente a ensayar con la isoforma eNOS y b) determinar si el agente a ensayar inhibe la actividad y/o expresión de eNOS.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar pero no limitar la presente invención.

Ejemplos

Material

En este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 250-400 g de peso obtenidas de un suministrador autorizado (Servicios de Experimentación y Producción Animal, Universidad de Cádiz, España). Los animales se estabularon de forma individual en jaulas con agua y pequeñas bolas de alimento *ad libitum* en condiciones de temperatura controlada a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/UE) y la legislación española (BOE 67/8509-12; BOE 1201/2005) sobre el uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité local de Ética y Atención a los Animales. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Como anestesia se usó hidrato de cloral (0,5 g/kg; i.p.). Se estudiaron al menos tres animales por grupo experimental. Todos los valores de los datos se presentan como la media \pm E.S.

Métodos

Lesión en el nervio XII

Bajo anestesia, se aisló del tejido adyacente, el XII par craneal derecho y se aplastó, de forma severa, con pinzas de microdissección aplicadas durante 30 s. La lesión se infligió en lugares diferentes según el diseño experimental (Fig. 1). En los experimentos en los que debía evaluarse la función neuromuscular, la lesión por aplastamiento se realizó justo en posición proximal a la bifurcación del nervio en las ramas lateral y medial (Fig. 1A). Cuando se debían estudiar los efectos de los fármacos sobre el índice de crecimiento axonal, el nervio se aplastó a aproximadamente 10 mm proximal a la bifurcación (Fig. 1B). La incisión se suturó y limpió con una solución antiséptica (povidona yodada). Todos los animales recibieron tras la intervención una inyección de penicilina (20.000 UI/kg; im) con el fin de evitar infecciones. Tras despertar se administró pirazolona (0,1 mg/kg; im) para conseguir analgesia posquirúrgica.

Registros electromiográficos

Para estudiar el efecto de la lesión nerviosa sobre el potencial de acción muscular compuesto (PAMC) se anestesió a los animales experimentales tal y como se ha indicado antes, se diseccionaron los dos nervios XII y se colocaron
 5 electrodos bipolares de plata aislados con teflón 3-4 mm proximal a las bifurcaciones nerviosas. Los electrodos se aislaron eléctricamente del tejido adyacente con vaselina y parafina. El PAMC se registró usando dos electrodos de gancho de acero inoxidable recubiertos con teflón insertados en el músculo geniogloso. Se estimuló el par craneal XII y se registró el potencial de campo ortodrómico provocado en el músculo (Fig. 1A), se amplificó y se pasó a través de
 10 filtros de paso bajo a 3 kHz. Los estímulos fueron pulsos cuadrados catódicos únicos de 50 μ s a 1 Hz y la intensidad de corriente aplicada fue tres veces la corriente umbral para la detección del PAMC. Las señales se visualizaron, transfirieron y guardaron en un ordenador. Para estudiar el curso de tiempo de la re-inervación muscular se analizaron los PAMC evocados por la estimulación del nervio XII a diferentes tiempos tras la lesión por aplastamiento. Se midió la latencia al pico y el área del PAMC en relación con el estímulo artefacto y la línea base, respectivamente. Se realizó la media de diez PAMC consecutivos y se expresaron en relación con el lado de control contralateral. En ninguno de
 15 los animales analizados a 1, 3 y 7 días se pudo determinar el umbral, en cuyo caso se analizaron las intensidades de estimulación cinco veces superiores al umbral medido en el lado control ($< 0,1$ mA).

Registros unitarios extracelulares de las neuronas motoras del hipogloso

Los animales se prepararon para los registros extracelulares como se ha descrito anteriormente (González-Forero D.
 20 *et al.* (2004). *Nerve injury reduces responses of hypoglossal motoneurons to baseline and chemoreceptor-modulated inspiratory drive in the adult rat. J Physiol* 557.3:991-1011; Sunico *et al.*, 2005). De manera resumida, se anestesió a las ratas (como se ha indicado antes) y se les inyectó i.m. atropina (0,2 mg/kg) y dexametasona fosfato sódico (0,8 mg/kg). Alrededor de los nervios XII derechos se fijaron electrodos bipolares de plata aislados con teflón. Se introdujo
 25 una cánula en la tráquea, la vejiga urinaria y la arteria y la vena femoral. Posteriormente se sometió a los animales a vagotomización, descerebración y parálisis con trietioduro de galamina (20 mg/kg, iv, inicialmente; 4 mg/kg iv, según fuera necesario) y se procedió a su ventilación mecánica. El CO₂ y el O₂ espirados se monitorizaron de forma continuada (Eliza duo; Gambro Engström, Bromma, Suecia). Durante el experimento la concentración de CO₂ al final de la espiración (ETCO₂) se mantuvo estable (4,8-5,2%) ajustando el volumen corriente y/o la frecuencia del
 30 respirador. La presión sanguínea arterial femoral (95 \pm 15 mmHg) y la temperatura rectal (37 \pm 1°C) se monitorizaron de forma continuada y se mantuvieron estables. Se utilizaron micropipetas de vidrio (1-3 M Ω) cargadas con NaCl 2M y se colocaron mediante guía visual y se desplazaron a través del tronco encefálico hacia el núcleo hipogloso (NH). La posición correcta de la micropipeta se confirmó mediante registro del patrón inspiratorio característico y la presencia del potencial de campo antidrómico provocado por la estimulación eléctrica del nervio XII homolateral. Las neuronas
 35 motoras del hipogloso (NMH) se identificaron mediante su activación antidrómica del nervio XII y mediante la prueba de colisión (González-Forero *et al.*, 2004; Sunico *et al.*, 2005). Las señales eléctricas se amplificaron y filtraron a un ancho de banda de 10 Hz-10 kHz para su visualización y digitalización. Las NMH se registraron en condiciones basales (ETCO₂= 4,8-5,2%). Los registros electromiográficos, actividad de descarga unitaria, porcentajes de CO₂ y O₂ espirado y la presión arterial se amplificaron, filtraron y guardaron en un ordenador usando la interfaz PowerLab/8SP
 40 A/D (ADInstruments, Castle Hill, Australia) para el análisis off-line.

Marcaje retrógrado de las NMH

El nervio XII derecho se expuso y transeccionó en la bifurcación en ratas control o con lesiones homolaterales
 45 anestesiada (como se ha indicado anteriormente, Fig. 1B). El muñón proximal del nervio se sumergió primero en agua destilada durante 10 min y después en 5 μ l de una solución con 4% del marcador retrógrado metanosulfonato de aminoetilbamidina (FluoroGold (FG); Molecular Probes, Eugene, OR) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 90 min. Por último, el muñón del nervio se lavó abundantemente con solución salina. La incisión se
 50 suturó y limpió como se ha indicado anteriormente. Una semana después de la cirugía, se anestesió a las ratas, se les inyectó heparina intraventricularmente y se perfundió por vía transcardiaca primero con PBS y después con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M (PB), a pH 7,4 y a 4°C. Se extrajeron los cerebros y se fijaron posteriormente durante 2 h en la misma solución de fijación y se crioprotegieron mediante inmersión durante
 55 toda la noche en sacarosa al 30% en PB a 4°C. Se obtuvieron tres series de secciones coronales (de 30 μ m de espesor) del tronco encefálico usando un criostato y se almacenaron a -20°C en una solución crioprotectora (glicerol:PBS, pH 7,4, 1:1 en volumen). Como último punto, las secciones se lavaron con PBS y se montaron en portas con una solución con galato de propilo (0,1 mM en PBS:glicerol 1:9). Las secciones de tejido se analizaron usando un microscopio BX60 (Olympus) y las imágenes se adquirieron usando una cámara digital (DP10, Olympus). Las tres series por
 60 animal se analizaron para obtener el número de neuronas positivas a FG por serie. Como valor representativo para cada animal se tomó el valor medio de las tres series.

Fármacos

Para estudiar el impacto del NO producido por diferentes fuentes enzimáticas sobre la recuperación del nervio se administró (i.p) diariamente a las ratas lesionadas el inhibidor de amplio espectro de la NOS, éster metílico de N^w-nitro-L-arginina (L-NAME, 90 mg/kg/d, Sigma), el estereoisómero inactivo D-NAME (90 mg/kg/d, Sigma), los inhibidores
 65 relativamente específicos de la nNOS, 7-nitroindazol (7-NI, 30 mg/kg/d, Sigma), para iNOS, aminoguanidina (AG, 100 mg/kg/d, Sigma), para eNOS, L-N (5)-(1-iminoetil)ornitina (L-NIO, 20 mg/kg/d, Tocris) o 7-NI+AG, comenzando el día en que tuvo lugar el aplastamiento del nervio. La dosis inyectada de L-NAME produjo un incremento transitorio

de la presión sanguínea arterial que retornó a los valores control 6 h después de la inyección. Los niveles de nNOS y eNOS cerebrales, medidos mediante western blotting, permanecieron como en los animales control tras el tratamiento crónico con L-NAME (Moreno-López *et al.*, 2004). Las perfusiones y sesiones de registros se llevaron a cabo al menos 18 h tras la última inyección de los fármacos.

5

Transferencia génica intraneural

Se aplicó un vector adenoviral recombinante que dirige la expresión de una forma mutante truncada de eNOS (TeNOS) (de SEQ ID NO 4) en el nervio XII para inhibir crónicamente la actividad de la eNOS endógena (Lee *CM. et al.* (1995). *Oligomerization of endothelial nitric oxide synthase. Evidence for a dominant negative effect of truncation mutants.* *J Biol Chem* 270(46):27403-27406; Kantor *DB. et al.* (1996). *A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue.* *Science* 274:1744-1748; Paton *JFR et al.* (2001). *Adenoviral vector demonstrates that angiotensin II-induced depression of the cardiac baroreflex is mediated by endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the rat.* *J Physiol (Lond)* 531:445-458; 2002; Waki *H. et al.* (2003). *Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarii enhances baroreceptor reflex in conscious rats.* *J Physiol (Lond)* 546.1:233-242; Waki *H. et al.* (2006). *Endothelial NO synthase activity in nucleus tractus solitarii contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats.* *Hypertension* 48(4):644-650). Ad-TeNOS (2,2 x 10¹⁰ ufp/ml) es un vector adenoviral que carece de capacidad de replicación, que expresa TeNOS bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (hCMV). TeNOS carece de actividad catalítica y actúa como inhibidor dominante negativo de la actividad eNOS normal mediante heterodimerización con la proteína nativa (Lee *et al.*, 1995). Como control de los efectos virales no específicos se utilizó el vector Ad-eGFP (4,56 x 10¹⁰ ufp/ml) que dirige la expresión de la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) bajo el control del hCMV.

Para la inyección intraneural, las ratas fueron anestesiadas y se expuso quirúrgicamente el nervio XII derecho. Micropipetas de vidrio con extremos rotos de alrededor de 50 μ m se cargaron con una solución de 3 μ l con uno de los dos vectores. Las micropipetas se desplazaron a través del perineurio a lo largo del eje del nervio con un micro-manipulador a 2-4 mm en posición proximal al punto de ramificación. La microinyección intraneural de la solución se realizó lentamente durante un periodo de 5 min guiada por un sistema de tubos cargados de aceite conectados a una jeringa Hamilton. Durante la inyección se aplicó al nervio una suave contracción. A continuación, en la misma sesión quirúrgica el nervio fue aplastado en la bifurcación o a 10 mm en posición proximal a la misma. A diferentes puntos de tiempo tras la microinyección del adenovirus y el aplastamiento del nervio se utilizaron los animales para el registro de los PAMC o los protocolos de seguimiento con FG.

35 Ejemplo 1

Estudio de la evolución temporal de la recuperación de la función neuromuscular tras el aplastamiento del nervio

En primer lugar se caracterizó la eficacia del procedimiento de aplastamiento del nervio por medio de los registros electromiográficos de los PAMC evocados en el músculo geniogloso mediante estimulación eléctrica del nervio XII. El área y la latencia de la onda evocada se tomaron como índices de la eficacia de la transmisión neuromuscular. En los animales control, los PAMC evocados mediante estimulación de los nervios derecho o izquierdo, fueron bifásicos, con una gran onda negativa (latencia: 2,5 \pm 0,04 ms) seguida por una onda pequeña positiva (Fig. 2A). En todos los registros realizados una semana después de la lesión por aplastamiento del nervio no se pudieron evocar los PAMC, ni usando estimulación supramáxima (<0,1 mA) del nervio dañado (Fig. 2B). Al mismo tiempo, la respuesta ortodrómica evocada por estimulación del nervio XII izquierdo intacto no fue diferente a la de los animales control (Fig. 2B). Estos resultados indican que el método empleado de lesión del nervio desensambló de un modo eficaz la mayoría de las unidades motoras. El día 15, se pusieron de manifiesto signos sutiles del reestablecimiento de la conexión neuromuscular, registrándose PAMC de menor amplitud y mayor latencia (Δ latencia: 4,7 \pm 0,6 ms) mediante estimulación del nervio dañado en comparación con el evocado por estimulación del nervio intacto (Fig. 2C). Los potenciales registrados fueron postsinápticos y no estaban contaminados por la señal de descarga aferente, ya que pudieron eliminarse por completo mediante inyección intramuscular de un bloqueante de los receptores de acetilcolina (trietioduro de galamina; 3 mg/kg, im; trazos de color gris en la Fig. 2C). Además, los PMAC registrados a los 15 y 22 días de la lesión fueron polifásicos con un número variable de picos negativos (Fig. 2C, D), que podrían ser principalmente una consecuencia de la llegada asíncrona de potenciales de acción presinápticos a través de los axones con velocidades de conducción irregulares. A tiempos posteriores se observó una lenta y progresiva recuperación de los PAMC hacia los valores control (Fig. 2E, F). Un mes después de la lesión, la recuperación de los PAMC era casi completa aunque todavía era evidente una leve diferencia en la latencia de la respuesta (Fig. 2E), que también permaneció en el último punto de tiempo analizado (45 días después de la lesión. Fig. 2F). De estos experimentos se concluyó que en este modelo de lesión por aplastamiento del nervio XII existe un periodo de al menos una semana durante la cual se alcanza una interrupción completa de la conectividad neuromuscular. Durante la re-inervación, la mayoría de los parámetros de PAMC se recuperaron progresivamente en paralelo con el estrechamiento del intervalo de velocidades de conducción axonal. El tiempo relativamente corto requerido para la recuperación completa de la función neuromuscular tras el aplastamiento del nervio hace que este modelo sea particularmente adecuado para estudiar acontecimientos moleculares que subyacen a los procesos degenerativos y regenerativos tras la lesión del nervio periférico.

Ejemplo 2

Efecto de la inhibición crónica de la NOS sobre la recuperación de la función de la transmisión neuromuscular

5 Dado que varias fuentes enzimáticas de NO se sobre-expresan en el nervio una vez que este ha sido dañado (González-Hernández *et al.* 1999) se abordó la hipótesis de que el NO puede estar afectando a los procesos de restauración que se producen en los nervios de mamíferos adultos tras el daño de un nervio periférico. En este punto, estudiamos el curso temporal de la recuperación de los PAMC tras la administración diaria crónica del inhibidor de la NOS de amplio espectro L-NAME, comenzando el mismo día de la lesión por aplastamiento del nervio. En todos los experimentos realizados 1 y 3 días después de la lesión, los PAMC estaban completamente ausentes, incluso después de la estimulación supramáxima del nervio lesionado en ambos grupos, el tratado con solución salina y el tratado con L-NAME. No obstante, una semana después el tratamiento con el inhibidor de la NOS se evocaron potenciales polifásicos de larga latencia mediante estimulación del nervio (Fig. 3A). El área de PAMC representó el $26,1 \pm 0,89\%$ en relación con la de los animales control (intactos) ($100 \pm 17,5\%$, Fig. 3B). Asimismo, la primera onda negativa apareció a una latencia más prolongada en comparación con la evocada mediante estimulación del nervio contralateral intacto (Δ latencia D: $6,72 \pm 0,57$ ms; comparado con el Δ latencia: $0,03 \pm 0,08$ ms en animales intactos; Fig. 3C). No obstante, a pesar de la aceleración de la re-inervación muscular mediante L-NAME, no condujo a una mejora en la recuperación del área de los PMAC en los puntos de tiempo posteriores estudiados (Fig. 2A, B). El área y la latencia de los PMAC 15 días después de la lesión no presentaron una diferencia significativa entre los grupos tratados con solución salina (área: $19,2 \pm 1,3\%$; Δ latencia: $4,3 \pm 0,6$ ms) y tratados con L-NAME (área: $34,6 \pm 15,4\%$; Δ latencia: $3,2 \pm 0,6$ ms; Fig. 3B, C). El perfil bifásico característico del PMAC se recuperó por completo 30 y 45 días después del aplastamiento del nervio en ambos grupos (Fig. 3A), pero el área del potencial muscular ortodrómico ($22,7 \pm 9,1\%$ y $13,4 \pm 6,1\%$, respectivamente) permaneció significativamente reducido en el grupo tratado con L-NAME en comparación con el grupo tratado con solución salina ($54,5 \pm 8,9\%$ y $91,6 \pm 38,8\%$; Fig. 3B). En resumen, aunque la inhibición crónica de la síntesis de NO aceleró el comienzo de la re-inervación muscular tras la lesión del nervio, la inhibición prolongada de la NOS deterioró el reestablecimiento o la eficacia de las unidades motoras establecidas.

Ejemplo 3

Efecto de la inhibición crónica de la NOS sobre la actividad basal de las NMH

30 Como se ha descrito previamente, la acción crónica del NO incrementa la excitabilidad de las NMH (González-Forero *et al.*, 2007), mientras que se sabe que la estimulación eléctrica de los axones lesionados acelera el índice de crecimiento axonal Al-Majed *et al.*, 2000; Brushart *et al.*, 2002). Por tanto, se analizó si la inhibición crónica de la NOS podría acelerar la re-inervación muscular mediante un incremento en el índice de descarga de las neuronas motoras. Las características de disparo unitario de las NMH se registraron en condiciones basales ($ET_{CO_2}=4,8-5,2\%$) en animales descerebrados y vagotomizados bajo bloqueo neuromuscular. La mayoría de las NMH generan brotes de potenciales de acción que coinciden con la inspiración (Hwang JC. *et al.* (1983). *Characterization of respiratory-modulated activities of hypoglossal motoneurons. J Appl Physiol* 55:793-798), incluso tras la descerebración, la vagotomía y la administración de un bloqueante neuromuscular (González-Forero *et al.*, 2004; Fig. 4A). Se midieron el número de potenciales de acción (SB) y la frecuencia media de disparo (mFR) por borte y se obtuvo la media usando un mínimo de 30 brotes por neurona motora para caracterizar la actividad basal del NH a diferentes puntos de tiempo tras la lesión. En los controles, la mFR fue $35,2 \pm 2,9$ pa/s ($n=41$) y la media de SB fue de $14,7 \pm 1,4$ pa/brotes (Fig. 4B, C).

45 En el punto de tiempo más temprano estudiado, 3 días después de la lesión del nervio, los parámetros de descarga se redujeron de forma significativa; este efecto persistió también tras 7 y 15 días (Fig. 4). Este cambio en la actividad neuronal no se puede evitar mediante el tratamiento crónico con L-NAME (Fig. 4). En consecuencia, la actividad basal de las NMH tras el aplastamiento del nervio permaneció significativamente reducida en el grupo tratado con L-NAME en relación con la situación control a los 3 (SB: $59,2 \pm 4,1\%$; mFR: $74,1 \pm 5,4\%$; $n=32$), 7 (SB: $57,1 \pm 6,8\%$; mFR: $51,4 \pm 5,1\%$; $n=36$) y 15 (SB: $46,3 \pm 4,8\%$; mFR: $39,2 \pm 3,1\%$; $n=34$) días desde la lesión. Se produjeron cambios similares en animales lesionados sin tratar (Fig. 4). Se concluyó que el efecto del L-NAME sobre la re-inervación muscular es independiente de una mayor actividad de disparo, a largo plazo del conjunto de motoneuronas.

Ejemplo 4

Identificación de la fuente de NO que retrasa la re-inervación muscular

60 Como se ha demostrado antes, la administración crónica del inhibidor de amplio espectro de la NOS, L-NAME, aceleró el comienzo de la recuperación de la función neuromuscular y tuvo como resultado un PAMC evidente a los 7 días de la lesión. Sin embargo, tras la administración del estereoisómero inactivo D-NAME no se registró un PAMC en el músculo geniogloso 7 días después de la agresión al nervio (Fig. 5A). Se observó un resultado similar cuando se administraron diariamente inhibidores relativamente específicos de la nNOS (7-NI) o iNOS (AG; Fig. 5A), lo que indica que los efectos positivos de L-NAME no se debieron a la inhibición de la síntesis de NO por neuronas motoras (nNOS) o macrófagos (iNOS), al menos en cuanto a lo que se refiere al comienzo de la re-inervación muscular. Por el contrario, la administración crónica del inhibidor relativamente específico de la eNOS, L-NIO, tuvo como resultado una recuperación parcial en el área ($24,8 \pm 7,3\%$; Fig. 5B) y la latencia (Δ latencia: $2,2 \pm 0,02$ ms; Fig. 5C) del PAMC

evocado. Además, el PAMC registrado tras L-NIO mostró un perfil correspondiente a una onda bifásica (Fig. 5A). En conjunto, estos resultados indican que el NO sintetizado principalmente por la isoforma endotelial de la NOS retrasa la re-inervación muscular.

5

Ejemplo 5

Efecto de la inhibición de la NOS sobre el índice de crecimiento axonal

10 La acción negativa del NO endógeno sobre la re-inervación muscular funcional podría ser la consecuencia de un crecimiento axonal más lento, del deterioro en el reestablecimiento y/o en la maduración de nuevos contactos neuromusculares. Para analizar un posible control negativo mediado por el NO sobre el índice de regeneración axonal tras la lesión del nervio, se cuantificó el número de NMH que extendieron sus axones a una distancia de 10 mm dentro de un determinado intervalo temporal (Fig. 1B). Para ello se procedió a la transección (T) del nervio XII y su inmersión en una solución que contenía el marcador retrógrado de FG. En estas condiciones, sólo se identificaron como positivas para FG las neuronas motoras cuyos axones hubieran alcanzado la bifurcación (10 mm distal al punto de la lesión; Fig. 1B). En los animales control (no lesionados previamente), las neuronas motoras marcadas con FG aparecieron ampliamente distribuidas por todo el NH (Fig. 6A). El número de NMH identificadas fue de $1435,7 \pm 68,6$ (Fig. 6G). Cuando se realizó la aplicación del FG el mismo día de la lesión por aplastamiento no se detectaron neuronas positivas para FG, lo que ilustra la eficacia del aplastamiento del nervio (Fig. 6B, G). Un día después de la lesión sólo unos pocos axones cubrieron la distancia en los animales tratados con solución salina ($29,4 \pm 12,1$ NMH; Fig. 6G). El número de neuronas marcadas aumentó sustancialmente 2 días después (Fig. 6C, G) y no fue significativamente diferente en comparación con el control 3 días después de la lesión ($1179,9 \pm 58,6$ NMH; Fig. 6G). El número de NMH marcadas de forma retrógrada cuando se administró FG 7 días después del aplastamiento del nervio no fue diferente al observado en los controles ($1363,1 \pm 43,8$ NMH; Fig. 6E, G). Por tanto, este tipo de lesión no indujo una muerte significativa de neuronas motoras.

A continuación, se estudió el efecto del tratamiento crónico con L-NAME sobre la recuperación axonal. Aunque un día después de la lesión la cantidad de neuronas marcadas de forma retrógrada no se vio significativamente alterada por la administración del inhibidor de la NOS ($112,5 \pm 37,3$ NMH), al segundo día el número de unidades positivas para FG fue $\sim 2,3$ veces superior en las ratas tratadas con L-NAME ($1241,7 \pm 58,6$ NMH) en relación con el grupo tratado con solución salina ($545,2 \pm 87,3$ NMH; Fig. 6D, G). Las diferencias disminuyeron a los 3 días de la lesión, coincidiendo con la recuperación en el grupo tratado con solución salina y al 7º día los recuentos en ambos grupos fueron muy cercanos, lo que indica que la administración crónica de L-NAME no comprometía la viabilidad de las NMH. A continuación, se aplicaron inhibidores de la NOS específicos de isoforma y, según los resultados previos, se evaluaron los efectos dos días después de la lesión del nervio, cuando el efecto del L-NAME era más importante (Fig. 6G). El estereoisómero inactivo D-NAME no afectó al índice de regeneración axonal y el número de neuronas marcadas fue similar al observado en el grupo tratado con solución salina (Fig. 6H). De igual forma, la administración de los inhibidores de la nNOS (7-NI) o iNOS (AG) no tuvieron ningún efecto estadísticamente significativo comparado con lo observado en el grupo tratado con solución salina (Fig. 6H). A continuación, se analizó la combinación de 7-NI y AG, pero también se comprobó que era ineficaz (Fig. 6H). Por otro lado, la inhibición de la eNOS por L-NIO aumentó de forma significativa la cantidad de neuronas marcadas con FG ($1031,6 \pm 35,3$ NMH; Fig. 6H). En conjunto, estos resultados demostraron que el NO sintetizado de forma endógena de origen endotelial retrasa la regeneración axonal después de la lesión del nervio.

45

Ejemplo 6

Efecto de la inyección intraneural de Ad-TeNOS sobre los procesos regeneradores tras la lesión por aplastamiento del nervio

Dado que la administración sistémica de fármacos podría inducir efectos secundarios generalizados e indeseados que complicarían la interpretación de los resultados y limitarían su uso como herramientas terapéuticas, a continuación se utilizó un vector adenoviral para inhibir la actividad local de la eNOS dentro del nervio dañado. El día de la lesión se aplicó una única inyección intraneural de $3 \mu\text{l}$ de una suspensión (vira) de Ad-eGFP o Ad-TeNOS. Tras varios intervalos de tiempo ninguna NMH expresó eGFP en su soma, lo que indica que el adenovirus permanecía en el nervio y no se había transportado retrógradamente. Esto excluyó la posibilidad de una acción central de la proteína expresada en el vector.

60 La inhibición de la eNOS por Ad-TeNOS aceleró el comienzo de la re-inervación neuromuscular. Siete días después de la lesión por aplastamiento y la transducción viral, las propiedades del PAMC registrado fueron similares a las obtenidas tras la administración de L-NIO, es decir estaban representadas por un potencial bifásico de latencia prolongada (Fig. 7, D, E; compárese con la Fig. 5A). A los 15 días de la lesión, también se observó cierto grado de recuperación de PAMC tras la administración de Ad-eGFP (área: $3,9 \pm 0,6\%$; Δ latencia: $7,1 \pm 1,1$ ms). No obstante, el área de PAMC y la latencia tras el tratamiento con Ad-TeNOS mejoró significativamente, lo que indica una aceleración de la reconexión neuromuscular (área: $28,8 \pm 1,9\%$; Δ latencia: $2,6 \pm 0,9$ ms; Fig. 7C, D). Es importante el hecho de que 22 días después del aplastamiento del nervio, el área del PAMC alcanzó valores similares a los observados en los animales control (Fig. 7B, D). Por lo tanto, se alcanzó la recuperación funcional una semana antes que en los

65

ES 2 332 632 B2

animales dañados tratados con solución salina (Fig. 3B), aunque la latencia de la onda fue mayor (Δ latencia: 1.9 ± 0.4 ms) que en el grupo control. La estabilidad de la recuperación se confirmó con los resultados obtenidos de animales estudiados 62 días después de la lesión del nervio y la administración de Ad-TeNOS (área: $95.2 \pm 17.3\%$; Δ latencia: 0.3 ± 0.2 ms). Estos resultados demostraron que una única inyección intraneural de Ad-TeNOS acelera de forma eficaz la recuperación funcional de la unión neuromuscular tras una lesión nerviosa.

Además, el índice de regeneración axonal también aumentó con la administración de Ad-TeNOS en comparación con el grupo tratado con Ad-eGFP (Fig. 7 F-H). Esto se puso de manifiesto por el hecho de que el número de neuronas motoras marcadas de forma retrógrada tras el marcaje con FG dos días después del aplastamiento del nervio y la inyección intraneural de Ad-eGFP (797.3 ± 20.6 NMH) fue significativamente menor que el observado después del tratamiento con Ad-TeNOS (1120.0 ± 69.9 NMH). El número de NMH marcadas de forma retrógrada 7 días después de la lesión en ratas a las que se inyectó Ad-TeNOS fue similar al observado en los controles (1584.0 ± 31.6), lo que ilustra que la administración adenoviral no afectó a la viabilidad de las neuronas motoras. En consecuencia, se concluyó que la inhibición de la eNOS local con Ad-TeNOS acelera la recuperación de la función neuromuscular, que se acompaña por la aceleración de la regeneración axonal.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 332 632 B2

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS seleccionado entre i) una molécula de ARN interferente dirigida contra el ARNm que codifica para la proteína eNOS y ii) una molécula de ADN, que codifica para una forma truncada mutante dominante negativo de la proteína eNOS, inserta en un sistema de expresión heterólogo, en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.
- 10 2. Uso de un inhibidor, según la reivindicación 1, donde la molécula de ARN interferente (i) tiene la secuencia SEQ ID NO 3.
3. Uso de un inhibidor, según la reivindicación 1, donde la molécula de ADN (ii) se selecciona entre SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5.
- 15 4. Uso de un inhibidor, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el medicamento se administra mediante inyección intraneural.
- 20 5. Uso de un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor de la actividad y/o expresión de eNOS, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la preparación de un medicamento para aumentar la velocidad de regeneración de nervios periféricos lesionados en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.
- 25 6. Uso de un vector, según la reivindicación 5, donde el vector es plasmídico y/o vírico.
7. Uso de un vector, según la reivindicación 6, donde el vector es lentiviral o adenoviral.
- 30 8. Uso de un vector, según la reivindicación 7, donde dicho vector es un vector recombinante adenoviral que comprende una molécula de ADN que codifica para una forma truncada mutante dominante negativa de la proteína eNOS.
- 35 9. Uso de un vector, según la reivindicación 8, donde el medicamento se administra mediante una única inyección intraneural.
- 40 10. Método para identificar agentes aceleradores de la regeneración en nervios periféricos que comprende: a) poner en contacto el agente a ensayar con eNOS y b) determinar si el agente a ensayar inhibe la actividad y/o expresión de eNOS.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

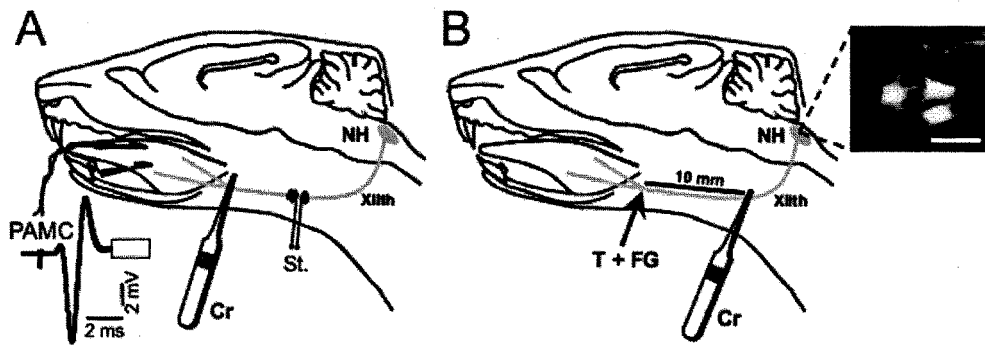


FIG. 1

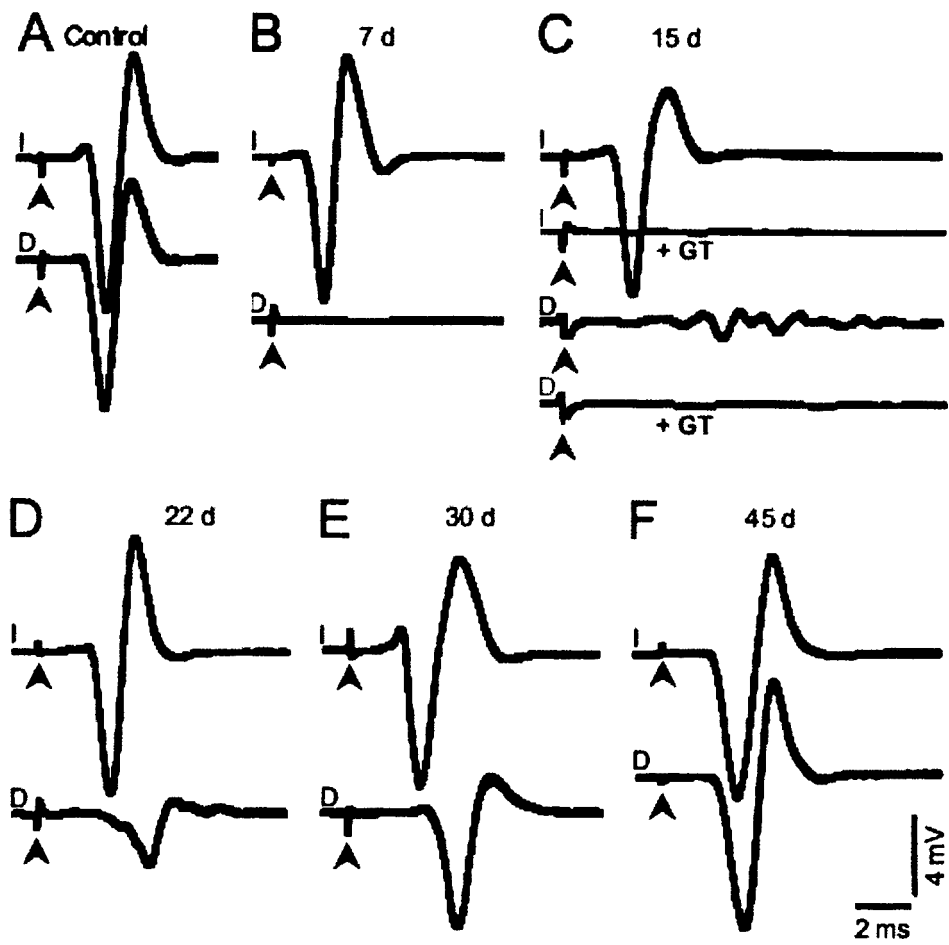


FIG. 2

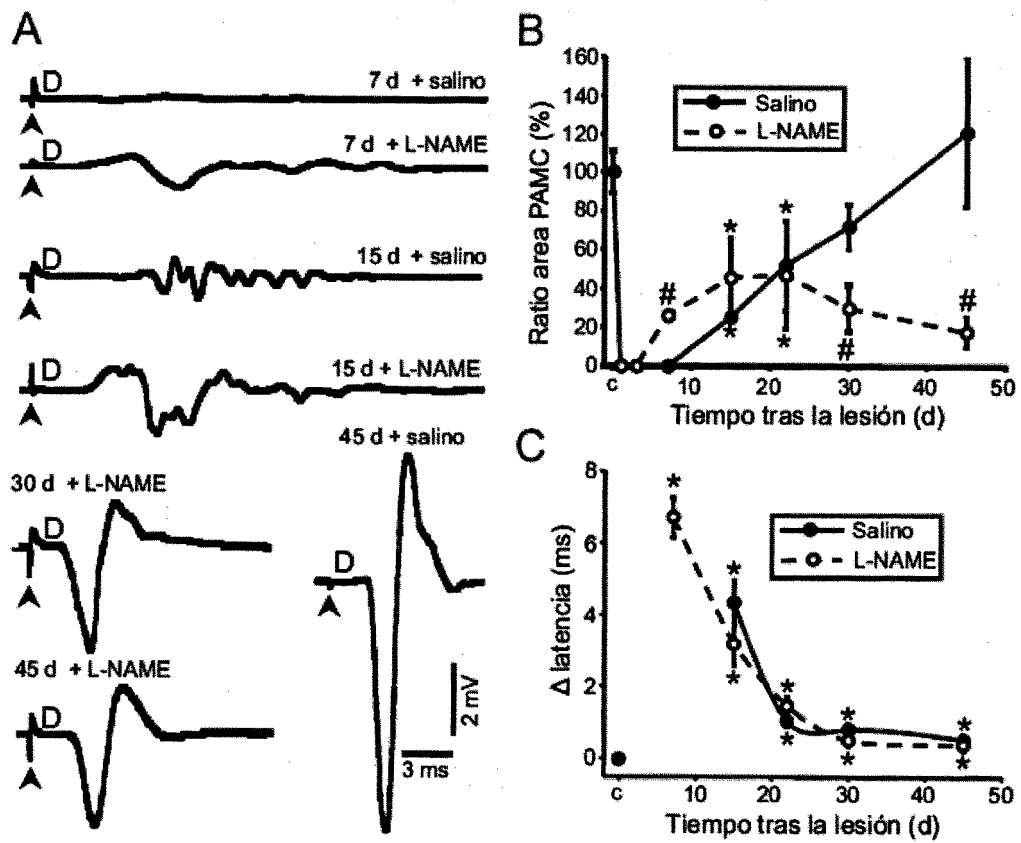


FIG. 3

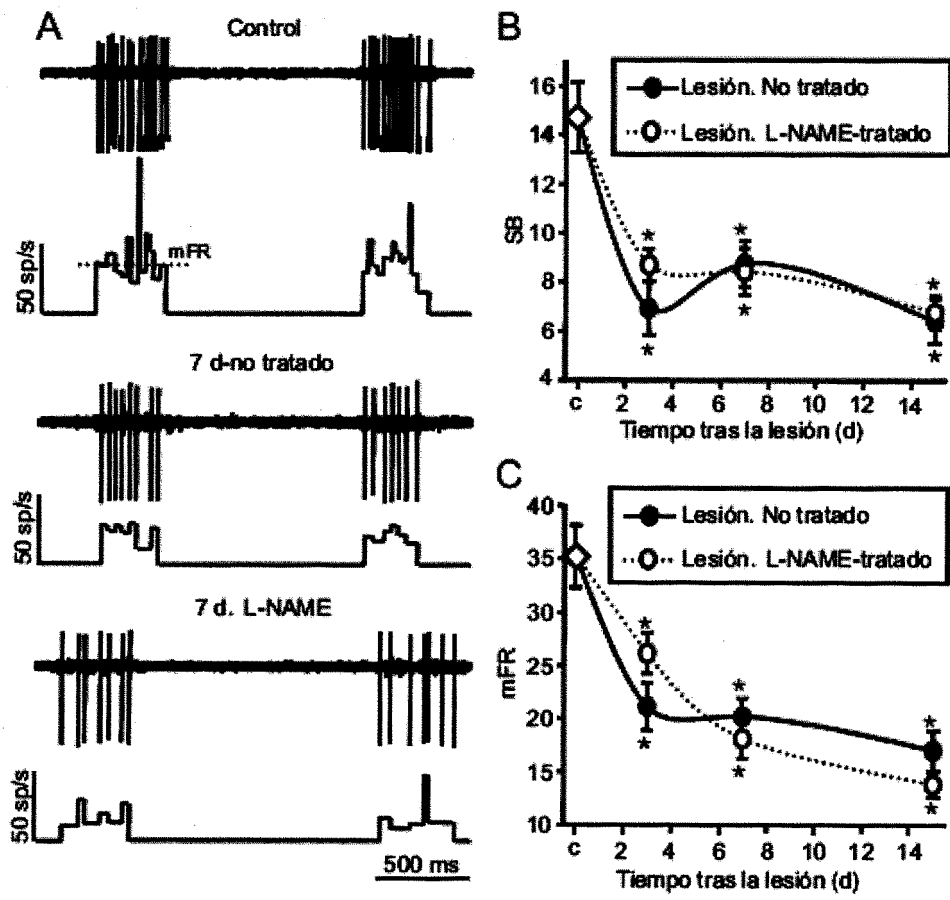


FIG. 4

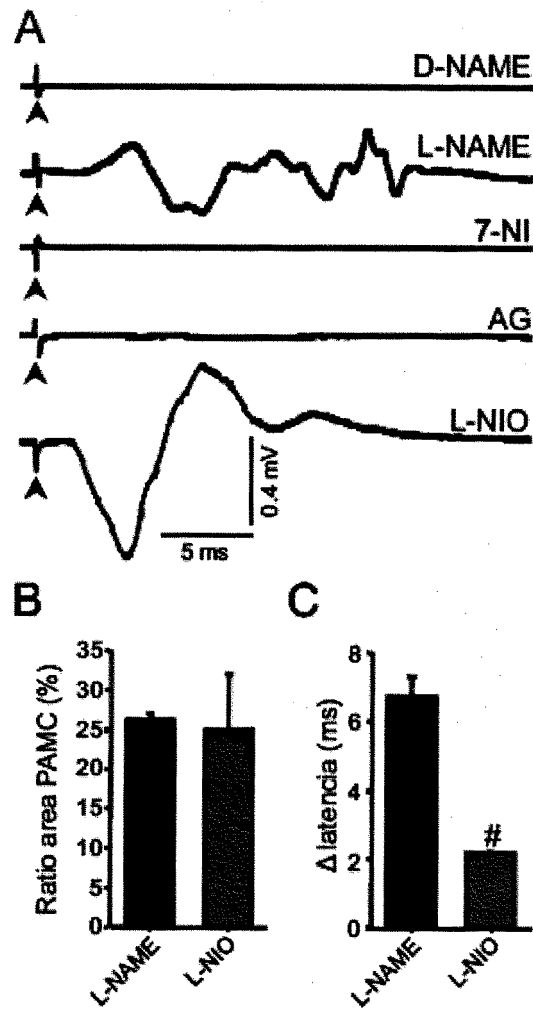


FIG. 5

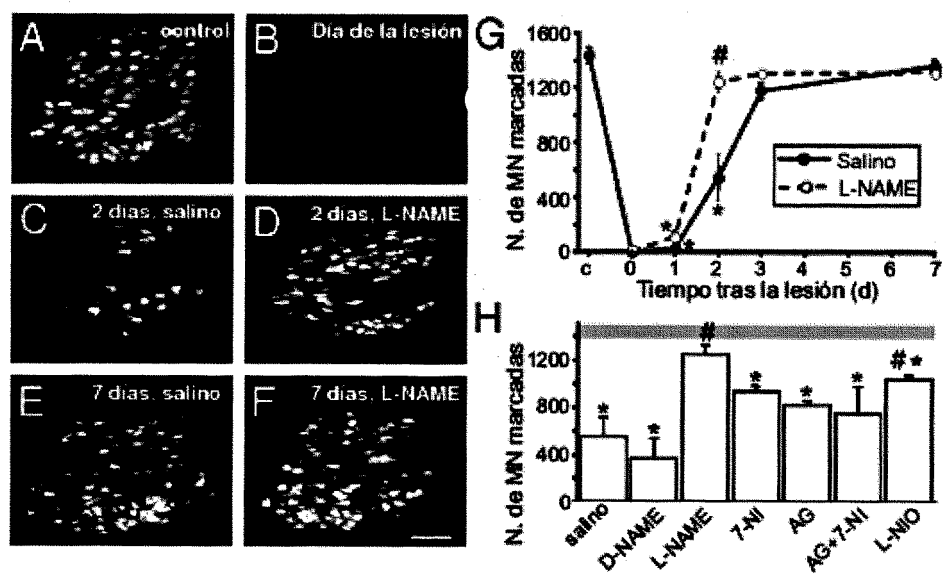


FIG. 6

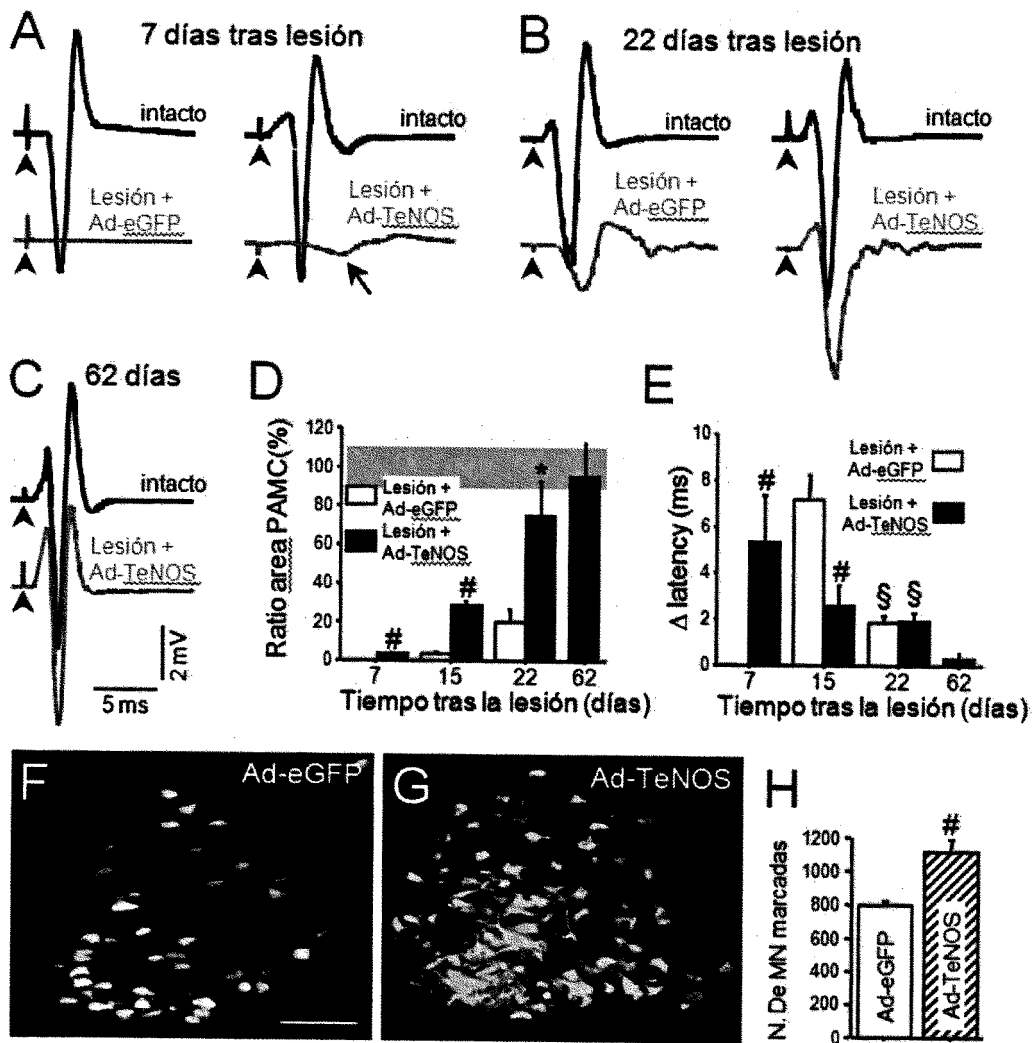


Fig. 7

ES 2 332 632 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Cádiz

5 <120> USO DE INHIBIDORES DE eNOS EN REGENERACIÓN NERVIOSA

<130> 029/08

10 <160> 5

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 4341

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la isoforma eNOS

25 <400> 1

	gaaactaggg	gcaaggagac	gaagagaaca	tgaaggttaa	actttaagat	gaagaacaaa	60
	gctgaacata	ctgatgcatt	ggatctttgg	agaggatctc	agaactcatt	gtacttaatt	120
30	tacaggctaa	aaccttagaa	gaggaattta	ttatatccta	cacaagactc	cagggagca	180
	catggccttg	gactgaaggc	tggcatctgg	aagctgtcag	ccaccagcac	cttctgcagc	240
	aggaaaaggc	cagggctctg	ctggagcagg	cagcagagtg	gacgcacagt	aacatgggca	300
	acttgaagag	cgtggcccag	gagcctgggc	caccctgcgg	cctggggctg	gggctgggcc	360
35	ttgggctgtg	cggcaagcag	ggcccagcca	ccccggcccc	tgagcccagc	cgggccccag	420
	catccctact	cccaccagcg	ccagaacaca	gccccccgag	ctccccgcta	accagcccc	480
	cagagggggc	caagttccct	cgtgtgaaga	actgggaggt	ggggagcatt	acctatgaca	540
	ccctcagcgc	ccaggcgcag	caggatgggc	cctgcacccc	aagacgctgc	ctgggctccc	600
	tggatattcc	acggaaacta	cagggccggc	cctccccggg	ccccccggcc	cctgagcagc	660
40	tgctgagtca	ggccccggac	ttcatcaacc	agtactacag	ctccattaag	aggagcggct	720
	cccaggccca	cgaacagcgg	cttcaagagg	tggaagccga	ggtggcagcc	acaggcacct	780
	accagcttag	ggagagcgag	ctggtgttcg	gggctaagca	ggcctggcgc	aacgctcccc	840
	gctgcgtggg	ccggatccag	tgggggaagc	tgcaggtgtt	cgatgcccgg	gactgcaggt	900
45	ctgcacagga	aatgttcacc	tacatctgca	accacatcaa	gtatgccacc	aaccggggca	960
	accttcgctc	ggccatcaca	gtgttcccgc	agcgtgccc	tggccgagga	gacttccgaa	1020
	tctggaacag	ccagctgggt	cgctacgcgg	gctaccggca	gcaggatggc	tctgtgcggg	1080
	gggaccagc	caacgtggag	atcaccgagc	tctgcattca	gcacggctgg	accccaggaa	1140
	acggtcgctt	cgacgtgctg	cccctgctgc	tgcaggcccc	agatgatccc	ccagaactct	1200
50	tccttctgcc	ccccgagctg	gtccttgagg	tgcccctgga	gcaccccacg	ctggagtggg	1260
	ttgcagccct	gggctgcgc	tggtagcccc	tcccggcagt	gtccaacatg	ctgctggaaa	1320
	ttgggggect	ggagttcccc	gcagccccct	tcagtggctg	gtacatgagc	actgagatcg	1380
	gcacgaggaa	cctgtgtgac	cctcaccgct	acaacatcct	ggaggatgtg	gctgtctgca	1440
55	tggacctgga	taccgggacc	acctcgtccc	tgtggaaaga	caaggcagca	gtggaaatca	1500
	acgtggccgt	gctgcacagt	taccagctag	ccaaagtcac	catcgtggac	caccacgccg	1560
	ccacggcctc	tttcatgaag	cacctggaga	atgagcagaa	ggccaggggg	ggctgccctg	1620
	cagactgggc	ctggatcgtg	cccccatct	cgggcagcct	cactcctgtt	ttccatcagg	1680
	agatggtcaa	ctatttctctg	tccccggcct	tccgctacca	gccagacccc	tggaagggga	1740
60	gtgccgcaa	gggcaccggc	atcaccagga	agaagacctt	taaagaagtg	gccaacgccg	1800
	tgaagatctc	cgctcgtctc	atgggcacgg	tgatggcgaa	gcgagtgaag	gcgacaatcc	1860
	tgtatggctc	cgagaccggc	cgggcccaga	gctacgcaca	gcagctgggg	agactcttcc	1920
	ggaaggcttt	tgatccccgg	gtcctgtgta	tggatgagta	tgacgtgggtg	tcctcgaac	1980

65

ES 2 332 632 B2

	acgagacgct	ggtgctggtg	gtaaccagca	catttgggaa	tggggatccc	ccggagaatg	2040
	gagagagctt	tgcagctgcc	ctgatggaga	tgtccggccc	ctacaacagc	tcccctcggc	2100
	cggaacagca	caagagttat	aagatccgct	tcaacagcat	ctcctgctca	gacccactgg	2160
5	tgtcctcttg	gcggcggaag	aggaaggagt	ccagtaacac	agacagtgca	ggggccctgg	2220
	gcaccctcag	gttctgtgtg	ttcgggctcg	gctcccgggc	atacccccac	ttctgcgcct	2280
	ttgctcgtgc	cgtggacaca	cggctggagg	aactgggcyg	ggagcggctg	ctgcagctgg	2340
	gccagggcga	cgagctgtgc	ggccaggagg	aggccttccg	aggctgggcc	caggctgcct	2400
10	tccagggcgc	ctgtgagacc	ttctgtgtgg	gagaggatgc	caaggccgcc	gcccagagaca	2460
	tcttcagccc	caaacggagc	tggaagcgcc	agaggtaccg	gctgagcgcc	caggccgagg	2520
	gcctgcagtt	gctgccaggt	ctgatccacg	tgcacaggcg	gaagatgttc	caggctacaa	2580
	tccgctcagt	ggaaaacctg	caaagcagca	agtccacgag	ggccaccatc	ctggtgcgcc	2640
	tggacaccgg	aggccaggag	gggctgcagt	accagccggg	ggaccacata	ggtgtctgcc	2700
15	gcgccaaccg	gcccggcctt	gtggaggcgc	tgctgagccg	cgtaggagac	ccgcccggcg	2760
	ccactgagcc	cgtggcagta	gagcagctgg	agaaggccag	ccctggtggc	ccctcccccg	2820
	gctgggtgcg	ggaccccccg	ctgcccccg	gcacgctgcy	ccaggtcttc	accttcttcc	2880
	tggacatcac	ctccccaccc	agccctcagc	tcttgcggt	gctcagcacc	ttggcagaag	2940
20	agcccagggg	acagcaggag	ctggaggccc	tcagccagga	tccccgacgc	tacgaggagt	3000
	ggaagtgggt	ccgctgcccc	acgctgctgg	aggtgctgga	gcagttcccg	tcggtggcgc	3060
	tgcctgcccc	actgctcctc	accagctgcy	ctctgctcca	gccccggtac	tactcagtca	3120
	gctcggcacc	cagcaccac	ccaggagaga	tccacctcac	tgtagctgtg	ctggcataca	3180
	ggactcagga	tgggctgggc	cccctgcact	atggagtctg	ctccacgtgg	ctaagccagc	3240
25	tcaagcccgg	agaccctgtg	ccctgcttca	tccggggggc	tccctccttc	cggctgccac	3300
	ccgatcccag	cttgccctgc	atcctggtgg	gtccaggcac	tggcattgcc	cccttccggg	3360
	gattctggca	ggagcggctg	catgacattg	agagcaaagg	gctgcagccc	actcccatga	3420
	ctttgggtgt	cggctgccga	tgetcccaac	ttgaccatct	ctaccgcgac	gaggtgcaga	3480
30	acgcccagca	gcgcggggtg	tttggccgag	tctcaccgc	cttctcccgg	gaacctgaca	3540
	acccaagac	ctacgtgcag	gacatcctga	ggacggagct	ggctgcccgg	gtgcaccgcg	3600
	tgctgtgcct	cgagcggggc	cacatgtttg	tctgcccga	tgttaccatg	gcaaccaacg	3660
	tctgcagac	cgtgcagcgc	atcctggcga	cggaggcgca	catggagctg	gacgagcccg	3720
35	gcgacgtcat	cggcgtgctg	cgggatcagc	aacgctacca	cgaagacatt	ttcgggctca	3780
	cgctgcgcac	ccaggaggtg	acaagccgca	tacgcacca	gagcttttcc	ttgcaggagc	3840
	gtcagttgcy	gggcygagtg	ccctgggcyt	tcgaccctcc	cggctcagac	accaacagcc	3900
	cctgagagcc	gcctggcctt	cccttccagt	tccgggagag	cggctgcccg	actcaggctc	3960
	gcccagaccg	gatcagcccc	gctcctcccc	tcttgagggtg	gtgccttctc	acatctgtcc	4020
40	agaggctgca	aggattcagc	attattcctc	caggaaggag	caaaacgcct	cttttccctc	4080
	tctaggcctg	ttgcctcggg	cctgggtccg	ccttaatctg	gaaggcccct	cccagcagcg	4140
	gtaccccagg	gcctactgcc	acccgcttcc	tgtttcttag	tcgaatgta	gattcctctt	4200
	gcctctctca	ggagtatctt	acctgtaaag	tctaactctc	aatcaagta	tttattattg	4260
45	aagatttacc	ataagggact	gtgccagatg	ttaggagaac	tactaaagtg	cctaccccag	4320
	ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	a				4341

<210> 2

<211> 3612

50 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <223> Secuencia del cDNA que codifica para el mRNA que da lugar a la proteína eNOS

<400> 2

60	atgggcaact	tgaagagcgt	ggcccaggag	cctggggccac	cctgcggcct	ggggctgggg	60
	ctgggccttg	ggctgtgcgg	caagcagggc	ccagccacc	cggcccctga	gccagccgg	120
	gccccagcat	ccctactccc	accagcgcca	gaacacagcc	ccccgagctc	cccgctaacc	180
	cagccccag	aggggcccga	gttccctcgt	gtgaagaact	gggaggtggg	gagcatcacc	240
	tatgacacc	tcagcgccca	ggcgcagcag	gatgggccc	gcaccccag	acgctgcctg	300
65	ggctccctgg	tatttccacg	gaaactacag	ggccggccc	cccccgccc	cccggcccct	360
	gagcagctgc	tgagtcaggc	ccgggacttc	atcaaccagt	actacagctc	cattaagagg	420

ES 2 332 632 B2

	agcggctccc	aggcccacga	acagcggctt	caagaggtgg	aagccgaggt	ggcagccaca	480
	ggcacctacc	agcttaggga	gagcgagctg	gtgttcgggg	ctaagcaggc	ctggcgcaac	540
	gctccccgct	gcgtgggccg	gatccagtgg	gggaagctgc	aggtgttcga	tgccccggac	600
5	tgcaggtctg	cacaggaaat	gttcacctac	atctgcaacc	acatcaagta	tgccaccaac	660
	cggggcaacc	ttcgctcggc	catcacagtg	ttcccgcagc	gctgccctgg	ccgaggagac	720
	ttccgaatct	ggaacagcca	gctggtgcgc	tacgcgggct	accggcagca	ggacggctct	780
	gtgcgggggg	accagccaa	cgtggagatc	accgagctct	gcattcagca	cggctggacc	840
10	ccaggaaacg	gtcgcttcga	cgtgctgccc	ctgctgctgc	aggccccaga	tgagccccc	900
	gaactcttcc	ttctgcccc	cgagctggtc	cttgagggtgc	ccctggagca	ccccacgctg	960
	gagtggtttg	cagccctggg	cctgcgctgg	tacgccctcc	cggcagtgtc	caacatgctg	1020
	ctggaaattg	ggggcctgga	gttccccgca	gcccccttca	gtggctggta	catgagcact	1080
	gagatcggca	cgaggaacct	gtgtgacctc	caccgctaca	acatcctgga	ggatgtggct	1140
15	gtctgcattg	acctggatac	cggaccacc	tcgtccctgt	ggaaagacaa	ggcagcagtg	1200
	gaaatcaacg	tggcctgctg	gcacagttac	cagctagcca	aagtcaccat	cgtggaccac	1260
	cacgcgcgca	cggcctcttt	catgaagcac	ctggagaatg	agcagaaggc	cagggggggc	1320
	tgccctgcag	actgggcctg	gatcgtgccc	cccattctcg	gcagcctcac	tctgttttc	1380
20	catcaggaga	tggtcaacta	tttcctgtcc	ccggccttcc	gctaccagcc	agacccttgg	1440
	aaggggagtg	ccgccaaggg	caccggcatc	accaggaaga	agaccttaa	agaagtggcc	1500
	aacgcctgga	agatctccgc	ctcgtcatg	ggcacggtga	tggcgaagcg	agtgaaggcg	1560
	acaatcctgt	atggctccga	gaccggccgg	gccagagct	acgcacagca	gctggggaga	1620
	ctcttccgga	aggcttttga	tccccgggtc	ctgtgtatgg	atgagtatga	cgtggtgtcc	1680
25	ctcgaacacg	agacgctggt	gctggtggta	accagcacat	ttgggaatgg	ggatcccccg	1740
	gagaatggag	agagctttgc	agctgccctg	atggagatgt	ccggccccta	caacagctcc	1800
	cctcggcccg	aacagcacia	gagttataag	atccgcttca	acagcatctc	ctgctcagac	1860
	ccactggtgt	cctcttggcg	gcggaagagg	aaggagtcca	gtaacacaga	cagtgcaggg	1920
30	gccctgggca	ccctcaggtt	ctgtgtgttc	gggctcggct	cccgggcata	ccccacttc	1980
	tgcgcctttg	ctcgtgccgt	ggacacacgg	ctggaggaac	tgggcgggga	gcggctgctg	2040
	cagctgggcc	agggcgacga	gctgtgcggc	caggaggagg	ccttccgagg	ctgggcccag	2100
	gctgccttcc	aggcgcctg	tgagaccttc	tgtgtgggag	aggatgccaa	ggccgcgcgc	2160
	cgagactctc	tcagcccaa	acggagctgg	aagcgcaga	ggtaccggct	gagcgcacc	2220
35	gccgagggcc	tgcagttgct	gccaggtctg	atccacgtgc	acaggcggaa	gatgtccag	2280
	gctacaatcc	gctcagtgga	aaacctgcaa	agcagcaagt	ccaccgagggc	caccatcctg	2340
	gtgcgcctgg	acaccggagg	ccaggagggg	ctgcagtacc	agccggggga	ccacataggt	2400
	gtctgcccgc	ccaaccggcc	cggccttgtg	gaggcgctgc	tgagccgcgt	ggaggaccctg	2460
40	ccggcgccca	ctgagcccg	ggcagtagag	cagctggaga	agggcagccc	tggtggccct	2520
	ccccccgct	gggtgcggga	cccccgctg	cccccggtca	cgctgcgcca	ggctctcacc	2580
	ttcttctctg	acatcacctc	cccaccagc	cctcagctct	tgccgctgct	cagcaccttg	2640
	gcagaagagc	ccagggaaca	gcaggagctg	gaggccctca	gccaggatcc	ccgacgctac	2700
	gaggagtggg	agtggttccg	ctgccccacg	ctgctggagg	tgctggagca	gttcccgtcg	2760
45	gtggcgctgc	ctgccccact	gctcctcacc	cagctgcctc	tgctccagcc	ccggtactac	2820
	tcagtcagct	cggcaccag	caccaccca	ggagagatcc	acctcactgt	agctgtgctg	2880
	gcatacagga	ctcaggatgg	gctgggcccc	ctgcaactatg	gagtctgctc	cacgtggcta	2940
	agccagctca	agcccggaga	ccctgtgccc	tgcttcatcc	ggggggctcc	ctccttccgg	3000
50	ctgccaccog	atcccagctt	gccctgcatac	ctgggtgggtc	caggcactgg	cattgcccc	3060
	ttccggggat	tctggcagga	gcggtgcat	gacattgaga	gcaaagggct	gcagcccact	3120
	cccatgactt	tggtgttcgg	ctgcccgatgc	tcccaacttg	acatctcta	ccgcgacgag	3180
	gtgcagaacg	cccagcagcg	cggggtggtt	ggccgagtc	tcaccgcctt	ctcccgggaa	3240
	cctgacaacc	ccaagacct	cgtgcaggac	atcctgagga	cggagctggc	tgccggaggtg	3300
55	caccgcgtgc	tgtgcctcga	gccccggccac	atgtttgtct	gcggcgatgt	taccatggca	3360
	accaacgtcc	tgacagccgt	gcagcgcatac	ctggcgacgg	agggcgacat	ggagctggac	3420
	gaggccggcg	acgtcatcgg	cgtgctgcgg	gatcagcaac	gctaccacga	agacattttc	3480
	gggctcacgc	tgccaccca	ggaggtgaca	agccgcatac	gcacccagag	cttttctctg	3540
60	caggagcgtc	agttgcgggg	cgcagtgccc	tgggcgttcg	accctcccgg	ctcagacacc	3600
	aacagcccct	ga					3612

<210> 3

<211> 19

65

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 332 632 B2

	<220>		
	<223> siRNA de eNOS		
5	<400> 3		
	gcucccagaa ugccagagg		19
	<210> 4		
10	<211> 2202		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
15	<220>		
	<223> Secuencia de DNA que expresa para una proteína truncada con función dominante negativa de la eNOS		
	<400> 4		
20	atgggcaact tgaagagcgt ggcccaggag cctggggccac cctgcggcct ggggctgggg	60	
	ctgggccttg ggctgtgcgg caagcagggc ccagccaccc cggcccctga gccccagccgg	120	
	gccccagcat ccctactccc accagcgcga gaacacagcc ccccagactc cccgctaacc	180	
	cagccccag aggggcccga gttccctcgt gtgaagaact gggaggtggg gagcatcacc	240	
25	tatgacaccc tcagcgccca ggcgagcag gatgggcccct gcaccccag acgctgcctg	300	
	ggctccctgg tatttcacag gaaactacag ggccggccct cccccggccc cccggcccct	360	
	gagcagctgc tgagtcaggc ccgggacttc atcaaccagt actacagctc cattaagagg	420	
	agcggctccc aggccacga acagcggctt caagaggtgg aagccgaggt ggcagccaca	480	
30	ggcacctacc agcttaggga gagcagactg gtgttcgggg ctaagcaggc ctggcgcaac	540	
	gtccccgct gcgtgggccc gatccagtgg gggaaactgc aggtgttcga tgcccgggac	600	
	tgaggctcg cacaggaat gttcacctac atctgcaacc acatcaagta tgcccacaac	660	
	cggggcaacc ttcgctcggc catcacagtg ttcccgcagc gctgccctgg ccgaggagac	720	
	ttccgaatct ggaacagcca gctgggtgcg tacgcgggct accggcagca ggacggctct	780	
35	gtgcgggggg acccagccaa cgtggagatc accgagctct gcattcagca cggctggacc	840	
	ccaggaaacg gtcgcttcga cgtgctgccc ctgctgctgc agccccaga tgagccccca	900	
	gaactcttcc ttctgcccc cgagctggtc cttgaggtgc ccctggagca ccccacgctg	960	
	gagtggtttg cagccctggg cctgcgctgg tacgccctcc cggcagtgtc caacatgctg	1020	
40	ctggaaattg ggggcctgga gttccccgca gcccccttca gtggctggta catgagcact	1080	
	gagatcggca cgaggaacct gtgtgaccct caccgctaca acatcctgga ggatgtggct	1140	
	gtctgcatgg acctggatac ccggaccacc tcgtccctgt ggaaagaca ggcagcagtg	1200	
	gaaatcaacg tggcctgct gcacagttac cagctagcca aagtcacat cgtggaccac	1260	
	cacgcccga cggcctcttt catgaagcac ctggagaatg agcagaaggc cagggggggc	1320	
45	tgccctgcag actgggcctg gatcgtgccc cccatctcgg gcagcctcac tctgttttc	1380	
	catcaggaga tggtaacta tttcctgtcc ccggccttcc gctaccagcc agaccctgg	1440	
	aaggggagtg ccgccaaagg caccggcctc accaggaaga agaccttaa agaagtggcc	1500	
	aacgcccgtg agatctccgc ctgcctcatg ggcacggtga tggcgaagcg agtgaaggcg	1560	
50	acaatcctgt atggctccga gaccggccc gcccagact acgcacagca gctggggaga	1620	
	ctcttccgga aggcctttga tccccgggtc ctgtgtatgg atgagtatga cgtggtgtcc	1680	
	ctcgaacacg agacgctggt gctggtggta accagcacat ttgggaatgg ggateccccg	1740	
	gagaatggag agagctttgc agctgccctg atggagatgt cggccccta caacagctcc	1800	
	cctcggcccg aacagcaca gagttataag atccgcttca acagcatctc ctgctcagac	1860	
55	ccactggtgt cctcttggcg gcggaagagg aaggagtcca gtaacacaga cagtgcaggg	1920	
	gcctgggca ccctcaggtt ctgtgtgttc gggctcggct cccgggcata cccccacttc	1980	
	tgcgctttg ctgctgccc ggacacacgg ctggaggaac tgggcccggga gcggtgctg	2040	
	cagctgggccc agggcgacga gctgtgcggc caggaggagg ccttccgagg ctgggcccag	2100	
60	gctgccttcc aggcgcccgt tgagacctc tgtgtgggag aggatgccaa ggcccggccc	2160	
	cgagacatct tcagccccc aaacggagctgg aagcggccaga gg	2202	
	<210> 5		
65	<211> 2076		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		

ES 2 332 632 B2

<220>

<223> Secuencia de DNA que expresa para una proteína truncada con función dominante negativa de la eNOS

5 <400> 5

	gtgatggcga	agcgagtgaa	ggcgacaatc	ctgtatggct	ccgagaccgg	ccgggcccag	60
	agctacgcac	agcagctggg	gagactcttc	cggaaggctt	ttgatccccg	ggtcctgtgt	120
	atggatgagt	atgacgtggg	gtccctcgaa	cacgagacgc	tgggtgctgg	ggtaaccagc	180
10	acatttgagg	atggggatcc	cccggagaat	ggagagagct	ttgcagctgc	cctgatggag	240
	atgtccggcc	cctacaacag	ctccccctcg	ccggaacagc	acaagagtta	taagatccgc	300
	ttcaacagca	tctcctgctc	agacccactg	gtgtcctctt	ggcggcggaa	gaggaaggag	360
	tccagtaaca	cagacagtgc	aggggcccctg	ggcaccctca	ggttctgtgt	gttcgggctc	420
15	ggctcccggg	cataccccc	cttctgcgcc	tttgcctcgtg	ccgtggacac	acggctggag	480
	gaactgggcg	gggagcggct	gctgcagctg	ggccaggggcg	acgagctgtg	cggccaggag	540
	gaggccttcc	gaggctgggc	ccaggctgcc	ttccaggccg	cctgtgagac	cttctgtgtg	600
	ggagaggatg	ccaaggccgc	cgcccagagc	atcttcagcc	ccaaacggag	ctggaagcgc	660
	cagaggtacc	ggctgagcgc	ccaggccgag	ggcctgcagt	tgtctccagg	tctgatccac	720
20	gtgcacaggc	ggaagatggt	ccaggctaca	atccgctcag	tggaaaacct	gcaaagcagc	780
	aagtccacga	gggccaccat	cctgggtgcgc	ctggacaccg	gaggccagga	ggggtgcag	840
	taccagccgg	gggaccacat	aggtgtctgc	ccgcccaacc	ggcccggcct	tgtggaggcg	900
	ctgctgagcc	gctggaggga	ccgcggcg	cccactgagc	ccgtggcagt	agagcagctg	960
25	gagaagggca	gcccgggtgg	cccctcccc	ggctgggtgc	gggacccccg	gctgcccccg	1020
	tgcacgctgc	gccaggtctc	cacctctctc	ctggacatca	cctccccacc	cagccctcag	1080
	ctctcgcggc	tgtcagcac	cttggcagaa	gagcccaggg	aacagcagga	gctggaggcc	1140
	ctcagccagg	atccccgacg	ctacgaggag	tggaaagtgg	tccgctgcc	cacgctgctg	1200
	gagggtgctgg	agcagttccc	gtcgggtggc	ctgcctgccc	cactgctcct	caccagctg	1260
30	cctctgctcc	agccccggta	ctactcagtc	agctcggcac	ccagcaccca	cccaggagag	1320
	atccacctca	ctgtagctgt	gctggcatac	aggactcagg	atgggctggg	ccccctgcac	1380
	tatggagtct	gctccacgtg	gctaagccag	ctcaagcccg	gagaccctgt	gccctgcttc	1440
	atccgggggg	ctccctcctc	ccggctgcca	cccgatccca	gcttgcctcg	catcctggtg	1500
35	ggtccaggca	ctggcattgc	ccccttccgg	ggattctggc	aggagcggct	gcatgacatt	1560
	gagagcaaag	ggctgcagcc	cactcccattg	actttgggtg	tccgctgccg	atgctcccaa	1620
	cttgaccatc	tctaccgcga	cgagggtgag	aacgcccagc	agcgcggggg	gtttggccga	1680
	gtcctcaccg	ccttctcccc	ggaacctgac	aacccccaga	cctacgtgca	ggacatcctg	1740
40	aggacggagc	tggctgcgga	ggtgcaccgc	gtgctgtgcc	tccagcgggg	ccacatgttt	1800
	gtctgcggcg	atgttaccat	ggcaaccaac	gtcctgcaga	ccgtgcagcg	catcctggcg	1860
	acggagggcg	acatggagct	ggacgaggcc	ggcgacgtca	tccgctgtct	gcgggatcag	1920
	caacgctacc	acgaagacat	tttcgggctc	acgctgcgca	cccaggaggt	gacaagccgc	1980
	atacgcaccc	agagcttttc	cttgcaggag	cgtcagttgc	ggggcgcagt	gccctgggcg	2040
45	ttcgaccctc	ccggctcaga	caccaacagc	ccctga			2076

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 632

② Nº de solicitud: 200801055

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KRUSE, M., et al. Increased brain endothelial nitric oxide synthase expression in thiamine deficiency: relationship to selective vulnerability. <i>Neurochemistry International</i> . 2004. Vol. 45, páginas 49-56. ISSN: 0197/0186. Ver resumen y discusión.	1,10
A	BEAUCHESNE, E., et al. Contribution of cerebral vascular endothelium to the pathophysiology of Werniche's encephalopathy. <i>Free Radical Biology and Medicine - Neuroscience</i> . 2007 (en línea 30.10.2007) Vol. 43, Suppl. 1, página S183.	1,10
A	BEAUCHESNE, E., et al. Contribution of cerebral vascular endothelium to the pathophysiology of Werniche's encephalopathy. <i>J. Neurochem.</i> Agosto 2007. Vol. 102, Suppl. 1, páginas 209-210. ISSN: 0022-3042.	1,10
A	WO 0220768 A2 (YALE UNIVERSITY) 14.03.2002, página 2, línea 25 - página 4, línea 28; página 11, líneas 9-22; ejemplos 3-7; reivindicaciones 1,21,25-30,35-37.	1,10
A	KANTOR, D.B., et al. A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue. <i>Science</i> . 06.12.1996. Vol. 274, nº 5293, páginas 1744-1748. ISSN 0036-80 Ver todo el documento.	1,3-10 5.
A	LI, C., et al. Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. <i>Vascular pharmacology</i> . 09.08.2007. Vol. 47, nº 5-6, páginas 257-264. ISSN 1537-1891. Ver resumen, materiales y métodos, apartados 2.4, 2.5 y 2.8, y discusión.	1,2,4-7,10

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 26.01.2010	Examinador B. Pérez Esteban	Página 1/6
---	---------------------------------------	----------------------



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 332 632

② Nº de solicitud: 200801055

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FARIAS, M., et al. Nitric oxide reduces transcriptional promoter activity of SLC29A1 for human equilibrative nucleoside transporter 1 in umbilical vein endothelium from gestational diabetes. <i>Vascular Pharmacology</i> . 01.09.2006. Vol. 45, nº 3, página e46. ISSN 1537-1891.	1,2,4-7,10
A	ZHANG, Q., et al. Functional relevance of Golgi- and plasma membrane-localized endothelial NO synthase in reconstituted endothelial cells. <i>Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.</i> 02.03.2006. Vol. 26, nº 5, páginas 1015-1021. ISSN 1524-4636. Ver resumen páginas 1016, 1017, 1020 y 1021.	1,2,4-6,10

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

26.01.2010

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/02 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (EMBL AII, naGeneSeq), REGISTRY.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	KRUSE, M., et al.	2004
D02	BEAUCHESNE, E., et al.	30.10.2007
D03	BEAUCHESNE, E., et al.	Agos-2007
D04	WO 02/20768 A2	14.03.2002
D05	KANTOR, D.B., et al.	06.12.1996
D06	LI, C., et al.	09.08.2007
D07	FARIAS, M., et al.	01.09.2006
D08	ZHANG, Q., et al.	02.03.2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente describe y reivindica el uso de inhibidores de la actividad de isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) para la preparación de un medicamento que aumente la velocidad de regeneración de nervios periféricos. Entre los inhibidores se incluyen ARNs interferentes (ARNi) y proteínas truncadas mutantes de eNOS. También se reivindican los vectores de expresión de dichos inhibidores y un método para identificar agentes aceleradores de la regeneración en nervios periféricos.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue la invención tal y como está reivindicada en la solicitud, por lo que ésta se considera nueva y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Hay numerosos documentos de este campo técnico que estarían relacionados con la presente solicitud, pues en ellos se divulga el uso de inhibidores y formas mutantes de eNOS con fines terapéuticos y neuroprotectores, incluyendo los ARNs interferentes frente al ARN mensajero de eNOS y proteínas truncadas de la enzima que son mutantes dominantes negativos, y que se introducen y expresan en las células neurales mediante vectores virales que controlan su expresión. A pesar de estas coincidencias con el contenido de la solicitud, ninguno de estos documentos afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la invención, pues ninguno de ellos divulga mejoras en la regeneración de nervios periféricos, y los ARNs y proteínas mutantes no coinciden con los empleados en la solicitud. A continuación se resumen algunos de estos documentos.

Respecto a la capacidad neuroprotectora de eNOS, se han seleccionado los documentos D01 a D04.

Así, el documento D01 consiste en un estudio en ratones del aumento en la expresión de eNOS como consecuencia del daño cerebral ocasionado por deficiencia de tiamina. Se observa un incremento específico en el ARNm y la proteína eNOS, pero no hay cambios en la expresión de las otras dos isoformas de la proteína (iNOS y nNOS). Atendiendo a sus resultados a los de otros trabajos citados en el artículo, los autores deducen que, puesto que el óxido nítrico (NO) está implicado en la patología asociada a la deficiencia de tiamina, la inactivación de la enzima eNOS supondrá una disminución de la neurodegeneración y el estrés oxidativo causados por la deficiencia de tiamina.

En los documentos D02 y D03 se analiza igualmente el aumento en la expresión de eNOS en ratones con deficiencia de tiamina, y se sugiere el papel que la inhibición de la enzima puede ejercer en terapias dirigidas a contrarrestar el daño cerebral debido a esta enfermedad.

En la patente D04 también se describe el potencial terapéutico de la inhibición de eNOS, y se reivindica (reivindicaciones nº 21 y 25 a 30) un método para modular negativamente la actividad de eNOS, y la utilización del método para tratar distintas afecciones, como inflamación, o angiogénesis y proliferación celular.

Hoja adicional

En cuanto a la utilización de formas mutantes de la enzima, se ha elegido el documento D05, en el que se utiliza, entre otras construcciones, una forma mutante de eNOS truncada en su extremo C-terminal, que se introduce en un vector adenoviral para controlar su expresión tras transfectar líneas celulares CHO. Este estudio coincide con la solicitud en que en ambos casos se emplean formas mutantes truncadas de la proteína, y se utilizan vectores recombinantes adenovirales. pero, a diferencia de la solicitud de patente, en este trabajo se analiza la localización de eNOS en membrana, y no se ensaya su capacidad regeneradora de nervios periféricos,

Los tres últimos documentos citados (D06, D07 y D08) son ejemplos de inhibición de la expresión de eNOS empleando ARNs interferentes diseñados a partir de las secuencias del ARN mensajero de la enzima. En el documento D06 se generan vectores adenovirales y retrovirales que contienen el ARNi, y se infectan con ellos líneas celulares de endotelio para analizar el efecto de la fosforilación en la actividad enzimática. En D07 se introduce un ARNi para eNOS en un adenovirus, y se transfectan células HUVEC para estudiar si el óxido nítrico modula la actividad promotora del transportador humano ENT1, y su relación con la diabetes gestacional. Finalmente, en el documento D08 se generan múltiples ARNs interferentes dirigidos frente a eNOS, y se emplean sistemas de expresión retrovirales para transfectar células endoteliales y estudiar el significado funcional de la localización de eNOS en membrana plasmática o en Golgi. En los tres ejemplos la finalidad de los ARNs interferentes es diferente a la del ARNi de la solicitud, y en ningún caso se menciona la posibilidad de utilizarlos en la preparación de un medicamento capaz de acelerar la regeneración neuronal; estos documentos únicamente ponen de manifiesto la capacidad inhibitoria del ARNi, y sus múltiples usos.