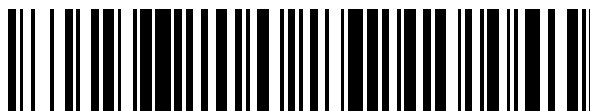


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 856 063**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012** **PCT/US2012/066373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013** **WO13078395**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012** **E 12851576 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021** **EP 2782566**

54 Título: **L-serina para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

21.11.2011 US 201161562194 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.09.2021

73 Titular/es:

THE INSTITUTE FOR ETHNOMEDICINE (25.0%)
3214 North University Avenue No. 316
Provo UT 84604, US;
RODGERS, KENNETH (25.0%);
DUNLOP, RACHAEL (25.0%) y
COX, PAUL, A. (25.0%)

72 Inventor/es:

RODGERS, KENNETH;
DUNLOP, RACHAEL y
COX, PAUL, A.

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 856 063 T3

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

DESCRIPCIÓN

L-serina para su uso en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos

5 Introducción

La traducción de proteínas es un proceso altamente eficiente y preciso para ensamblar los 20 aminoácidos estándar en proteínas. Las tasas de error en la traducción son relativamente poco frecuentes (1 en 10^3 a 10^4) y dependen de la capacidad del sistema para discriminar entre los 20 aminoácidos proteicos (o canónicos) (Zaher, y otros, Cell 136, 746-762 (2009)). Sin embargo, tales errores poco frecuentes que resultan en la carga incorrecta de la ARNt sintetasa del aminoácido incorrecto pueden resultar en proteínas mal plegadas o truncas, y daño celular subsecuente, tal como en la mutación sti (pegajosa) en ratones donde la alanina es sustituida por ácido glutámico, resultando en neurodegeneración (Lee, y otros, Nature 443, 50-55 (2006)). Aquí informamos que un aminoácido no proteico producido por las cianobacterias, β -metilamino-L-alanina (BMAA), puede incorporarse por error en proteínas humanas. También informamos que esta incorporación por error puede ser inhibida por L-serina.

La traducción de proteínas es el proceso mediante el cual el código genético se interpreta a partir de la información contenida en la secuencia de ácido nucleico en el ARNm en la secuencia primaria de una cadena polipeptídica. La fidelidad de la síntesis de proteínas, a nivel traduccional, se basa en la especificidad del reconocimiento de aminoácidos y ARNt afines por las ARNt sintetetas. En ciertos casos, cuando dos aminoácidos proteicos tienen una estructura similar, una etapa de revisión verifica el "ajuste" de un aminoácido al sitio catalítico de la ARNt sintetasa y el enlace se hidroliza si está unido el aminoácido incorrecto (Zaher, y otros, Cell 136, 746-762 (2009)). Existen cientos de aminoácidos no proteicos; muchos presentes naturalmente en plantas, algunos se producen *in vivo* a partir de la oxidación de aminoácidos, otros se producen sintéticamente (Rubenstein, y otros, Medicine (Baltimore) 79, 80-89 (2000); Rodgers, y otros, Free Radic Biol Med 32, 766-775 (2002); Rodgers, y otros, Int J Biochem Cell Biol 40, 1452-1466 (2008); Bell, J Agric Food Chem 51, 2854-2865 (2003)). Los aminoácidos no proteicos que son análogos estructurales cercanos de cualquiera de los 20 aminoácidos proteicos pueden unirse a un aminoácido-ARNt sintetasa y convertirse de manera errónea en un péptido unido en una cadena polipeptídica (Rodgers, y otros, Int J Biochem Cell Biol 40, 1452-1466 (2008)). Para poder incorporarse a las proteínas, los aminoácidos no proteicos deben estar presentes en la célula a niveles suficientes para competir con éxito con el aminoácido proteico para cargarse en el ARNt. Los ejemplos de aminoácidos no proteicos que están mal incorporados en proteínas que causan efectos patológicos incluyen cavananina y L-DOPA (Rubenstein, y otros, Medicine (Baltimore) 79, 80-89 (2000); Rodgers, y otros, Int J Biochem Cell Biol 40, 1452-1466 (2008); Allende, y otros, J Biol Chem 239, 1102-1106 (1964); Rosenthal, y otros, Science 196, 658-660 (1977); Rosenthal Quarterly Review of Biology, 52, 155-178 (1977)).

Se ha encontrado que BMAA está asociado con proteínas en cianobacterias y otros organismos (Banack, y otros, Mar Drugs 5, 180-196 (2007); Cox, y otros, Proc Natl Acad Sci EE. UU 102, 5074-5078 (2005); Murch y otros, Proc Natl Acad Sci EE. UU 101, 12228-12231 (2004)). La posibilidad de que la toxina cianobacteriana BMAA esté mal incorporada en proteínas se vio reforzada por un estudio en el que se realizó un análisis autorradiográfico en ratones después de una única inyección de ^3H -BMAA que informó de un patrón de distribución similar al de un aminoácido formador de proteínas (Karlsson, y otros, Pigment Cell Melanoma Res 22, 120-130 (2009)). La captación de ^3H -BMAA se demostró en tejidos con altos niveles de síntesis de proteínas y la radiactividad se mantuvo en el tejido después de la extracción con ácido (Karlsson, y otros, Pigment Cell Melanoma Res 22, 120-130 (2009)). Estos datos son consistentes con la incorporación de BMAA mediante síntesis de proteínas.

Como se describe en la presente descripción, un aminoácido no proteico producido por cianobacterias, β -metilamino-L-alanina (BMAA), puede incorporarse por error en proteínas humanas. La L-serina puede inhibir la incorporación errónea de BMAA.

50 Resumen

La presente invención se define por las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para prevenir, inhibir o reducir a) la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG) o β -amino-N-metil-alanina (BAMA), en una o más proteínas de una célula de mamífero, que comprende poner en contacto la célula con L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG) o β -amino-N-metil-alanina (BAMA), en la proteína; o el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en una célula de mamífero, que comprende poner en contacto la célula con L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de la proteína, en donde el plegamiento incorrecto o la agregación se debe a la incorporación de BMAA, ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG) o β -amino-N-metil-alanina (BAMA), en una o más proteínas. La presente invención también se refiere a L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso en: a) reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, debe

administrarse al sujeto en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; b) estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, debe administrarse al sujeto en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; o c) tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, sal de L-serina o éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas, en donde en (a), (b) y (c) la enfermedad o trastorno neurológico es Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), o Esclerosis Lateral Amiotrófica/Complejo de Demencia de Parkinsonismo (ALS/PDC). La presente invención se refiere además a L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso en: a) reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; b) estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; o c) tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, sal de L-serina o éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas, en donde en (a), (b) y (c) la enfermedad o trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer.

Como se describe en la presente descripción, la L-Serina puede bloquear la inserción de BMAA en cultivos de células humanas, evitando el plegamiento incorrecto de proteínas. De manera significativa, las células humanas que están en riesgo de sufrir una muerte celular programada por apoptosis pueden rescatarse con la adición de L-Serina.

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta la cognición y la memoria. Se desconoce la causa de esta forma más común de demencia. Existen formas familiares y esporádicas de Alzheimer y factores de riesgo conocidos que afectan la enfermedad.

Uno de los sellos distintivos de la patología de Alzheimer es el péptido beta amiloide agregado (A β), junto con otros materiales proteicos ubiquitinados y citoesqueléticos. A β (predominantemente de 40 o 42 aminoácidos de longitud) se deriva de la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide de longitud completa (APP). APP es una proteína de membrana que contiene sitios de unión a iones metálicos Cu(II) y Zn(II) en la parte de la cola que contiene la región A β . Aunque las placas que contienen A β son parte de la patología de la enfermedad, se sabe muy poco sobre la función tanto de este péptido más pequeño como de la APP de longitud completa. La proteína A β de 42 aminoácidos de longitud que induce la placa se produce a partir de la escisión normal de APP en las diversas subformas. Hay dos rutas para la APP que se muestran en la figura a la derecha, que indica la ruta amiloidogénica (izquierda) a A β , sAPP β y C99 o la ruta no amiloidogénica (derecha) a p3, sAPP β y C83.

En consecuencia, la L-serina, así como también los precursores de L-serina, los derivados de L-serina y los conjugados de L-serina, es un fármaco candidato para el tratamiento, mejora y/o prevención de la agregación/ovillos/placas de proteínas y enfermedades asociadas con la agregación/ovillos/placas de proteínas tal como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson, la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), la enfermedad de Huntington (HD) y también un tratamiento que puede enlentecer o detener la progresión de la enfermedad o la neurodegeneración continua.

En la presente descripción se proporcionan métodos y usos para L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina en: prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una o más proteínas de una célula de mamífero; y prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de una o más proteínas en una célula de mamífero. Un método o uso puede incluir poner en contacto una célula con L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en la proteína. Un método o uso puede incluir poner en contacto la célula con L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de la proteína.

También se proporcionan en la presente descripción métodos y usos para L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina en: reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto; estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto

o agregación de una o más proteínas en un sujeto; y tratar una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto. Un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas. Un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas. Además, un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas.

Las células incluyen células de mamíferos, tal como células de primates (por ejemplo, humanas). Los ejemplos particulares no limitantes de células incluyen una neurona o una célula glial. Los ejemplos particulares no limitantes de proteínas incluyen una proteína de unión a ADN TAR 43 (TDP-43) y alfa-sinucleína.

Los precursores, derivados y conjugados de L-serina incluyen un polímero de L-serina (poliserina), una sal de L-serina, una L-serina alquilada o un lípido de L-serina. Los precursores, derivados y conjugados de L-serina también incluyen sales, tales como una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de calcio, una sal de magnesio, una sal de zinc o una sal de amonio de L-serina. Los precursores, derivados y conjugados de L-serina incluyen además una L-serina alquilada, tal como L-serina con un grupo alquilo, por ejemplo, un alquilo que comprende 1-20 átomos de carbono. Los precursores, derivados y conjugados de L-serina incluyen además un éster de L-serina, un di-éster de L-serina, un éster de fosfato de L-serina, un éster de sulfato o sulfonato de L-serina, una L-serina pegilada, una L-serina lipídada o una L-serina con uno o más restos de polietilenglicol (PEG). Un ejemplo no limitante de un precursor de L-serina es L-fosfoserina.

Los precursores, derivados y conjugados de L-serina se pueden formular en una composición o formulación, tal como una composición o formulación farmacéutica. Los precursores, derivados y conjugados de L-serina también pueden incluirse en liposomas o micelas. Tales composiciones y formulaciones, que incluyen composiciones, formulaciones, liposomas y micelas farmacéuticos, incluyen aquellas adecuadas para la administración o suministro por cualquier vía, tal como por vía oral, por inyección, por infusión, por intubación, por catéter, intraespinal o intracraneal.

Los derivados e isómeros de BMAA incluyen, pero no se limitan a, ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG) o β -amino-N-metil-alanina (BAMA).

Las enfermedades y trastornos neurológicos incluyen enfermedades y trastornos caracterizados por el plegamiento incorrecto de proteínas o agregados de proteínas, por ejemplo, histológicamente. Las enfermedades y trastornos neurológicos incluyen enfermedades y trastornos que también incluyen aquellos caracterizados por deficiencia motora o cognitiva. Las formas clínicas específicas de enfermedades y trastornos neurológicos tratables de acuerdo con los métodos y usos de la presente descripción incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), Parálisis Supranuclear Progresiva (PSP), Demencia con Cuerpos de Lewy (LBD), Esclerosis Lateral Amiotrófica/Complejo de Demencia de Parkinsonismo (ALS/PDC), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Pick y Demencia Frontotemporal (FTD).

Los ejemplos no limitantes de un síntoma de una enfermedad o trastorno neurológico incluyen, por ejemplo, deficiencia motora o cognitiva; fatiga; temblores; ataxia; habla arrastrada, espesa o irregular; calambres musculares, espasmos, atrofia o debilidad; falta de aire; dificultad para comer, respirar o tragar; pérdida de memoria a corto o largo plazo; dificultad para concentrarse o completar tareas familiares o de rutina; confusión de espacio y tiempo; pérdida de visión, color o reconocimiento de signos; pérdida de percepción de profundidad, dificultad para hablar o escribir; pérdida de juicio; pérdida de vocabulario; mal humor; irritabilidad; agresión; paranoia; alucinaciones; retiro del compromiso social; dureza o rigidez; pérdida del control motor fino o grueso; enlentecimiento del movimiento; equilibrio deteriorado; inestabilidad corporal; anomalía en la postura o en la marcha; caminar arrastrando los pies; coordinación reducida; inestabilidad física; marcha inestable; disfunción motora; movimiento corporal espasmódico; movimiento ocular sacádico más lento; rigidez corporal; agarrotamiento; dificultad para masticar, comer, tragar o hablar; deterioro de las capacidades cognitivas/mentales; demencia; anomalías del sueño, del comportamiento o psiquiátricas; dificultad para hablar o pensar; cambios de comportamiento; regulación deficiente de la conducta social; pasividad; letargo; retiro social; inercia; hiperactividad; ritmo errante; pérdida del equilibrio; lanzarse hacia adelante al movilizarse; caminar rápido; desequilibrio (por ejemplo, chocar con objetos o personas); caídas; cambios de personalidad; enlentecimiento del movimiento; pérdida de inhibición o capacidad para organizar información; habla arrastrada; dificultad para tragar; oftalmoparesia o movimiento ocular alterado; función de los párpados deteriorada; contractura de los músculos faciales; Distonía del cuello o inclinación de la cabeza hacia atrás con rigidez de los músculos del cuello; interrupción del sueño; incontinencia urinaria/intestinal; o parkinsonismo.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción incluyen aquellos que proporcionan una mejora subjetiva u objetiva en cualquier síntoma de una enfermedad o trastorno neurológico, como se establece en la presente descripción, o que sea conocido por un experto en la técnica. En particular, un método o uso puede prevenir, reducir o inhibir el inicio, la gravedad, la frecuencia o la duración de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno

neurológico.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción incluyen administración, suministro o contacto de un sujeto, o cualquier órgano tisular o célula de un sujeto, con cualquier medio compatible para el suministro o contacto de L-serina, precursor, derivado o conjugado de L-serina. En particular, la L-serina, precursor, derivado o conjugado de L-serina, se puede administrar por vía oral, por inyección, por infusión, por intubación, por catéter o intracranalmente a un sujeto en un método o uso. En aspectos más particulares, la L-serina, precursor, derivado o conjugado de L-serina, se administra al menos una vez al día durante al menos una semana a un sujeto; al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas a un sujeto o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, 8, 9, 10, 11 o 12 meses a un sujeto.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción incluyen dosis de L-serina, precursor, derivado o conjugado de L-serina, opcionalmente destinadas a lograr un efecto deseado. En particular, L-serina, precursor, derivado o conjugado de L-serina, se puede administrar a una dosis de aproximadamente 1-10 mg/día, 10-25 mg/día, 25-50 mg/día, 50-100 mg/día, 100-250 mg/día, 250-500 mg/día, 500-750 mg/día, 750-1000 mg/día, 1000-2000 mg/día, 2000-3000 mg/día, 3000-4000 mg/día, 4000-5000 mg/día, 5000-7500 mg/día, 7500-10 000 mg/día, 10-15 g/día, 15-20 g/día, 20-25 g/día, 25-30 g/día, 30-40 g/día, 40-50 g/día 50-75 g/día o 75-100 g/día a un sujeto; se puede administrar a una dosis de aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 10-25 mg/kg de peso corporal, 25-50 mg/kg de peso corporal, 50-100 mg/kg de peso corporal, 100-250 mg/kg de peso corporal, 250-500 mg/kg de peso corporal, 500-750 mg/kg de peso corporal, o 750-1000 mg/kg de peso corporal a un sujeto; o se puede administrar a una dosis de aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal por día, 10-25 mg/kg de peso corporal por día, 25-50 mg/kg de peso corporal por día, 50-100 mg/kg de peso corporal por día, 100-250 mg/kg de peso corporal por día, 250-500 mg/kg de peso corporal por día, 500-750 mg/kg de peso corporal por día, o 750-1000 mg/kg de peso corporal por día a un sujeto.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un agente que reduce, inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína. Un método puede incluir poner en contacto una serina racemasa con un compuesto de prueba en presencia de L-serina en condiciones donde la L-serina se convertiría en D-serina por la serina racemasa; y determinar si el compuesto de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa. Si el compuesto de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa, el compuesto de prueba se identifica como un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína.

También se proporcionan en la presente descripción métodos para identificar un agente candidato para reducir o inhibir o prevenir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína. Un método puede incluir poner en contacto una serina racemasa con L-serina en condiciones en donde la L-serina se convertiría en D-serina por la serina racemasa en presencia de un agente de prueba; y determinar si el agente de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa. Una inhibición o reducción identifica al agente de prueba como un agente candidato para reducir o inhibir o prevenir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína.

Además, en la presente descripción se proporcionan métodos de cribado de un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína. Un método puede incluir poner en contacto una serina racemasa con L-serina en condiciones donde la L-serina se convertiría en D-serina por la serina racemasa en presencia de un agente de prueba; y determinar si el agente de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa, cribando de esta manera un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, en una proteína.

Descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1B muestran la captación e incorporación de ^3H -BMAA en proteínas por las células MRC-5. Las células MRC-5 se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) en HBSS que contiene FCS al 10 %. Después de 2, 4 y 16 horas, las células se lisaron y se determinó la concentración de proteína y el nivel de radiactividad en el lisado y las proteínas celulares. 1A: La captación de radiomarcaje por las células se expresó como desintegraciones por minuto (DPM) por μg de proteína celular. 1B: El radiomarcaje en la fracción de proteína celular se expresó como DPM por μg de proteína celular total.

La Figura 2 muestra la inhibición de la incorporación de radiomarcaje en la proteína celular por cicloheximida (CHX). Se incubaron células MRC-5, HUVEC y SH-SY5Y con ^3H -BMAA (31,25 nM) con o sin CHX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 16 horas. Las proteínas celulares se aislaron y la cantidad de radiomarcaje presente en las proteínas celulares se expresó como DPM por proteína celular. La cantidad de radiomarcaje presente en las proteínas celulares en los cultivos tratados con CHX se expresó en relación con la de los cultivos de control (sin CHX) que se estableció en 100 %. Se incubaron cultivos paralelos de células MRC-5 con ^3H -leucina (41 nM) con o sin CHX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [MRC-5 (Leu)] y los efectos de CHX se determinaron de manera similar (barras blancas). *** indica $P < 0,001$ mediante el uso de la prueba t de Student de dos colas.

La Figura 3 muestra la eliminación de radiomarcaje de las proteínas celulares después de la incubación de las células con ^3H -BMAA. Las células SH-SY5Y se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 24 horas. Las proteínas celulares se aislaron mediante precipitación con TCA (5 %). La cantidad de radiomarcaje liberado de las proteínas (es decir, no precipitables con TCA) después de la incubación a 37 °C con DTT (1 mM) y SDS (2 %) con DTT (DTT/SDS) se muestra en relación con la de las muestras de control incubadas con tampón solo. Las proteínas celulares también se incubaron con pronasa (2 mg/ml) durante 48 horas a 37 °C o HCl (12 M) durante 12 horas y se cuantificó la liberación de radiomarcaje en relación con la del tampón solo (para pronasa) o agua (para HCl). Todas las muestras de proteínas se procesaron por triplicado.

Las Figuras 4A-4C muestran la inhibición de la incorporación del radiomarcaje en proteínas celulares por L-serina. 4A: se incubaron células MRC-5 con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en presencia de L-serina (0, 50, 100 y 250 μM). Las proteínas celulares se aislaron mediante precipitación con TCA y el radiomarcaje en proteínas celulares se expresó como desintegraciones por minuto (DPM) por μg de proteína celular. La inhibición de la incorporación de radiomarcaje a cada concentración de L-serina se muestra en relación con las células cultivadas en un medio que no contiene L-serina. 4B: las células MRC-5 se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en presencia de 250 μM de L-serina (L-SER) o 250 μM de D-serina (D-SER) y la incorporación de radiomarcaje se comparó con cultivos de células sin L-serina (CTR, establecido en 100 %). 4C: las células MRC-5 se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en presencia de los 20 aminoácidos proteicos a 400 μM (NINGUNO), o solución salina tamponada de Hank que no contenía aminoácidos (TODOS) o en presencia de los 19 aminoácidos proteicos con L-serina omitida (L-SERINA) y el radiomarcaje en proteínas celulares se expresó como desintegraciones por segundo (DPM).

La Figura 5 muestra BMAA unida a proteína en células MRC5 incubadas con BMAA libre en el medio de cultivo. Pico normalizado por concentraciones de lisina.

Las Figuras 6A-6D muestran que la incubación con BMAA resulta en la formación de cuerpos autofluorescentes y cambios apoptóticos en las células. Se observó autofluorescencia en células MRC-5 incubadas con BMAA (300 μM) durante 96 horas (6A) y esto se previno mediante la coincubación con L-serina (300 μM) (6B). La microscopía fluorescente de células MRC-5 teñidas dobles con naranja de acridina para detectar apoptosis y bromuro de etidio para detectar necrosis reveló cambios morfológicos en las células tratadas con BMAA y la aparición de células "pálidas" indicativas de células que experimentan apoptosis (6D), las cuales estuvieron ausentes en células que no fueron expuestas a BMAA (6C). Hubo un aumento significativo en la tinción con Anexina V en las células SH-SY5Y incubadas con BMAA 500 μM solo, como se mostró medido mediante el uso de citometría de flujo. La coincubación con CHX (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o L-serina (50 μM) redujo significativamente la unión de Anexina V a las células, lo que indica una reducción de la apoptosis (6E).

La Figura 7 muestra que la L-serina reduce la incorporación de BMAA a las proteínas.

La Figura 8 muestra que la L-serina promueve la supervivencia de *Drosophila* y bloquea la mortalidad inducida por BMAA.

La Figura 9 muestra que BMAA afecta el rendimiento de nado del pez cebra.

Las Figuras 10A-10C muestran que la inyección de BMAA provoca anomalías en el desarrollo neuronal. 10A: el crecimiento y la ramificación de las neuronas motoras se observó claramente después de 30 horas. 10B y 10C: en huevos inyectados con L-BMAA, se observaron neuronas truncas (indicadas por las flechas blancas).

Descripción detallada

Como se describe en la presente descripción, BMAA puede incorporarse a proteínas lo que conduce a un plegamiento incorrecto de proteínas, agregación de proteínas y enfermedades y trastornos neuronales consiguientes no deseados caracterizados por agregación/ovillos/placas de proteínas. La L-serina puede inhibir o prevenir la incorporación de BMAA a proteínas, disminuyendo o previniendo de esa manera la agregación no deseada de proteínas y los consiguientes enfermedades y trastornos neuronales caracterizados por agregación/ovillos/placas de proteínas. En consecuencia, la L-serina, así como también los precursores de L-serina, los derivados de L-serina y los conjugados de L-serina, se pueden usar como tratamiento para enfermedades y trastornos neuronales caracterizados por agregación/ovillos/placas de proteínas.

En la presente descripción se proporcionan métodos y usos para prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una o más proteínas (por ejemplo, presentes en una célula), y métodos y usos para prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de una o más proteínas de una célula (por ejemplo, célula de mamífero). Un método o uso puede incluir poner en contacto una célula con L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA el cual carga erróneamente la serina aminoacil-ARNt sintetasa, a una proteína de la célula (por ejemplo, célula de mamífero). Los isómeros de BMAA incluyen ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB),

N-(2-aminoetil)glicina (AEG) y β -amino-N-metil-alanina (BAMA) (Banack y otros, Toxicon 56, 868-879 (2010); Banack y otros, Toxicon 57, 730-738 (2011); Jiang y otros, Anal Bioanal Chem 403, 1719-1730 (2012)). Un método o uso puede incluir poner en contacto la célula con L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de la proteína de la célula (por ejemplo, célula de mamífero).

También se proporcionan en la presente descripción métodos y usos para reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto. Un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas.

También se proporcionan en la presente descripción métodos y usos para estabilizar, prevenir o reducir o inhibir la progresión de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto. Un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas.

Además, se proporcionan en la presente descripción métodos y usos para tratar una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto. Un método o uso puede incluir administrar al sujeto L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas.

Los enfermedades y trastornos neurológicos se caracterizan por un número, función o actividad anormal o deficiente de células nerviosas o neuronales. Tales células nerviosas y neuronales pueden estar presentes en el sistema nervioso central (CNS, por ejemplo, cerebro, médula espinal) o el sistema nervioso periférico (PNS, fuera del cerebro y médula espinal, sistema nervioso somático, autónomo y sensorial). Los tipos de neuronas afectadas por tales enfermedades y trastornos incluyen neuronas unipolares, bipolares y multipolares (por ejemplo, motoras).

La L-serina, así como también los precursores de L-serina, los derivados de L-serina y los conjugados de L-serina, pueden proporcionar una mejora o beneficio terapéutico detectable o medible a un sujeto. Una mejora o beneficio terapéutico es cualquier beneficio medible o detectable, objetivo o subjetivo, transitorio, temporal o de más largo plazo para el sujeto o mejora en el trastorno o enfermedad, un síntoma adverso, consecuencia o causa subyacente, de cualquier grado, en un tejido, órgano, célula o población celular del sujeto. Las mejoras y beneficios terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, la reducción o disminución de la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de uno o más síntomas o complicaciones asociados con un trastorno o enfermedad, o una causa subyacente o efecto consecuente del trastorno o enfermedad. La L-serina, así como también los precursores de L-serina, derivados de L-serina y conjugados de L-serina, los métodos y usos por lo tanto incluyen proporcionar una mejora o beneficio terapéutico a un sujeto.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción incluyen métodos de tratamiento y usos que convenientemente resultan en una mejora en un síntoma o causa subyacente de la enfermedad o trastorno del sujeto, que es un cambio considerado beneficioso para el sujeto. Por tanto, el tratamiento puede dar como resultado una mejora, tal como inhibir, reducir o prevenir una progresión o empeoramiento de la enfermedad o trastorno o síntomas, o un mayor deterioro o aparición de uno o más síntomas adicionales de la enfermedad o trastorno. Por tanto, un resultado de tratamiento satisfactorio conduce a un "efecto terapéutico" o inhibir, reducir o prevenir la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas o causas subyacentes de una enfermedad o trastorno en el sujeto.

El término "aliviar" significa una mejora objetiva o subjetiva detectable o medible en la afección de un sujeto. Una mejora detectable o medible incluye una reducción subjetiva u objetiva en la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas causados por o asociados con el trastorno o enfermedad, o una mejora en las causas subyacentes del trastorno o enfermedad, o una reversión del trastorno o enfermedad.

La estabilización de una enfermedad o trastorno también es un resultado exitoso del tratamiento. Un tratamiento exitoso puede reducir o prevenir la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno, inhibir la progresión o empeoramiento de la enfermedad o trastorno y, en algunos casos, revertir la enfermedad o trastorno. En consecuencia, en el caso de una enfermedad o trastorno neurológico, por ejemplo, el tratamiento puede conducir a una mejora de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno neurológico, estabilizar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno neurológico, o una reversión de la enfermedad o trastorno neurológico. Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos incluyen, pero no se limitan a: deficiencia motora (por ejemplo, coordinación) o cognitiva; fatiga; temblores; ataxia; habla arrastrada, espesa o irregular; calambres musculares, espasmos, atrofia o debilidad (por ejemplo, manos, brazos, piernas, tragar, respirar, músculos del habla); falta de aire; dificultad para comer, respirar o tragar. Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos también incluyen, pero no se limitan a: pérdida de memoria a corto o largo plazo; dificultad para concentrarse o completar

tareas familiares o de rutina; confusión de espacio y tiempo; pérdida de visión, color o reconocimiento de signos; pérdida de percepción de profundidad, dificultad para hablar o escribir; pérdida de juicio; pérdida de vocabulario; mal humor; irritabilidad; agresión; paranoia; alucinaciones; y retiro del compromiso social. Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos incluyen, además, pero no se limitan a: temblor; dureza o rigidez; pérdida del control motor fino o grueso; enlentecimiento del movimiento; equilibrio deteriorado; inestabilidad corporal; anomalía en la postura o en la marcha; y caminar arrastrando los pies. Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos incluyen adicionalmente, pero no se limitan a: coordinación reducida; inestabilidad física; marcha inestable; disfunción motora; movimiento corporal espasmódico (corea); movimiento ocular sacádico más lento; rigidez corporal; agarrotamiento; dificultad para masticar, comer, tragar o hablar; deterioro de las capacidades cognitivas/mentales, incluida la demencia; pérdida de memoria a corto y/o largo plazo; anomalías del sueño, del comportamiento y psiquiátricas (por ejemplo, ansiedad, depresión, pérdida del afecto emocional, agresión, comportamiento compulsivo). Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos incluyen, además, pero no se limitan a: dificultad para hablar y pensar; cambios de comportamiento; regulación deficiente de la conducta social (por ejemplo, infracciones de la etiqueta, falta de tacto, desinhibición, comportamiento delictivo); pasividad; letargo; retiro social; inercia; hiperactividad; ritmo errante. Los síntomas no limitantes de enfermedades y trastornos neurológicos incluyen además, pero no se limitan a: pérdida del equilibrio; lanzarse hacia adelante al movilizarse; caminar rápido; desequilibrio, por ejemplo, chocar con objetos o personas; caídas; cambios de personalidad; enlentecimiento del movimiento; demencia (incluida la pérdida de inhibición y capacidad para organizar información); habla arrastrada; dificultad para tragar; oftalmoparesia o movimiento ocular alterado (particularmente en la dirección vertical que explica algunas de las caídas experimentadas por los pacientes); función de los párpados deteriorada; contractura de los músculos faciales; Distonía del cuello o inclinación de la cabeza hacia atrás con rigidez de los músculos del cuello; interrupción del sueño; incontinencia urinaria/intestinal; y parkinsonismo. Los métodos y usos, tales como el tratamiento de acuerdo con la descripción, incluyen el tratamiento que mejora o alivia cualquiera de los síntomas anteriores, en cualquier grado o duración de tiempo.

Los métodos y usos, tales como el tratamiento de acuerdo con la descripción, también incluyen afectar las causas subyacentes de la enfermedad o trastorno de la misma. Por tanto, en el caso de una enfermedad o trastorno neurológico, por ejemplo, estabilizar o disminuir el empeoramiento de la afección, por ejemplo, mediante medidas objetivas y subjetivas de la gravedad clínica del trastorno neurológico se considera un resultado de tratamiento satisfactorio. Por ejemplo, la Escala de Calificación Funcional de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALSFRS) es un control funcional de 10 elementos diseñado para su uso en ensayos terapéuticos de Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS). Funciones tales como la alimentación, el aseo, la deambulación (motilidad y habilidades motoras), la comunicación y otras son parte de la escala. En consecuencia, una mejora en la causa subyacente de ALS puede reflejarse en una mejora en uno o más de los controles funcionales, por ejemplo.

En un método o uso descrito en la presente descripción en el que un beneficio o mejora terapéutica es un resultado deseado, se puede administrar L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente o efectiva a un sujeto que lo necesite. Una "cantidad suficiente" o "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que se calcula o es probable que proporcione, en dosis únicas o múltiples, sola o en combinación con otra u otras composiciones (agentes terapéuticos tales como un fármaco quimioterapéutico o estimulante del sistema inmunitario), tratamientos o protocolos terapéuticos, regímenes o agentes, una respuesta detectable de cualquier duración de tiempo (a largo o corto plazo), un resultado deseado o un beneficio a un sujeto de cualquier grado medible o detectable o durante cualquier duración de tiempo (por ejemplo, durante horas, días, meses, años, o la curación). La dosis o "cantidad suficiente" o "cantidad efectiva" para el tratamiento (por ejemplo, para proporcionar un beneficio o mejora terapéutica) típicamente es efectiva para aliviar un trastorno o enfermedad, o uno, múltiples o todos los síntomas, consecuencias o complicaciones adversos del trastorno o enfermedad, hasta un grado medible, aunque reducir o inhibir una progresión o empeoramiento (por ejemplo, estabilizar) del trastorno o enfermedad o un síntoma, se considera un resultado satisfactorio.

Por lo tanto, el tratamiento puede resultar en la inhibición, reducción o prevención de un trastorno o enfermedad, o un síntoma o consecuencia asociado, o una causa subyacente; inhibir, reducir o prevenir una progresión o empeoramiento de un trastorno o enfermedad, síntoma o consecuencia, o causa subyacente; o deterioro adicional o aparición de uno o más síntomas adicionales del trastorno o enfermedad, o síntoma. Por lo tanto, un resultado de tratamiento satisfactorio conduce a un "efecto terapéutico" o "beneficio" o inhibe, reduce o previene la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración de uno o más síntomas o causas subyacentes o consecuencias de un trastorno o enfermedad, en el sujeto. Por lo tanto, los métodos de tratamiento y los usos que afectan a una o más causas subyacentes de la enfermedad o trastorno o un síntoma se consideran beneficiosos. Estabilizar, inhibir o reducir la progresión o el empeoramiento de un trastorno o enfermedad también es un resultado exitoso del tratamiento.

Por lo tanto, no es necesario que un beneficio o mejora terapéutica sea la eliminación completa de cualquiera, la mayoría o todos los síntomas, complicaciones, consecuencias o causas subyacentes asociadas con la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, se logra un criterio de valoración satisfactorio incluso cuando solo se logra una mejora incremental en la afección de un sujeto, tal como una reducción parcial en la aparición, frecuencia, gravedad, progresión o duración, o inhibición o reversión de uno o más síntomas o complicaciones o consecuencias o causas subyacentes adversos asociados, empeoramiento o progresión (por ejemplo, estabilizar uno o más síntomas o

complicaciones de la enfermedad o trastorno), de una o más de las manifestaciones o características fisiológicas, bioquímicas o celulares del trastorno o enfermedad, durante un duración corta o larga (minutos, horas, días, semanas, meses, etc.).

- 5 Puede observarse o medirse un beneficio terapéutico o eficacia del tratamiento mediante la mejora en cualquiera o más de los síntomas que caracterizan o están asociados con la enfermedad o trastorno neurológico que se expone en la presente descripción. Los ejemplos particulares no limitantes de beneficio o mejora terapéutica para una enfermedad o trastorno neurológico incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes síntomas (por ejemplo, una reducción o disminución de un síntoma adverso o la progresión de un síntoma adverso): deficiencia motora (por ejemplo, coordinación) o cognitiva; fatiga; temblores; ataxia; habla arrastrada, espesa o irregular; calambres, espasmos musculares, atrofia o debilidad (por ejemplo, manos, brazos, piernas, tragar, respirar, músculos del habla); falta de aire; dificultad para comer, respirar o tragar; pérdida de memoria a corto o largo plazo; dificultad para concentrarse o completar tareas familiares o de rutina; confusión de espacio y tiempo; pérdida de visión, color o reconocimiento de signos; pérdida de percepción de profundidad, dificultad para hablar o escribir; pérdida de juicio; pérdida de vocabulario; mal humor; irritabilidad; agresión; paranoia; alucinaciones; retiro del compromiso social; temblor; dureza o rigidez; pérdida del control motor fino o grueso; enlentecimiento del movimiento; equilibrio deteriorado; inestabilidad corporal; anomalía en la postura o en la marcha; caminar arrastrando los pies; coordinación reducida; inestabilidad física; marcha inestable; disfunción motora; movimiento corporal espasmódico (corea); movimiento ocular sacádico más lento; rigidez corporal; agarrotamiento; dificultad para masticar, comer, tragar o hablar; deterioro de las capacidades cognitivas/mentales, incluida la demencia; pérdida de memoria a corto y/o largo plazo; anomalías del sueño, del comportamiento y psiquiátricas (por ejemplo, ansiedad, depresión, pérdida del afecto emocional, agresión, comportamiento compulsivo); dificultad para hablar y pensar; cambios de comportamiento; regulación deficiente de la conducta social (por ejemplo, infracciones de la etiqueta, falta de tacto, desinhibición, comportamiento delictivo); pasividad; letargo; retiro social; inercia; hiperactividad; ritmo errante; pérdida del equilibrio; lanzarse hacia adelante al movilizarse; caminar rápido; desequilibrio, por ejemplo, chocar con objetos o personas; caídas; cambios de personalidad; enlentecimiento del movimiento; demencia (incluida la pérdida de inhibición y capacidad para organizar información); habla arrastrada; dificultad para tragar; oftalmoparesia o movimiento ocular alterado (particularmente en la dirección vertical que explica algunas de las caídas experimentadas por los pacientes); función de los párpados deteriorada; contractura de los músculos faciales; distonía del cuello o inclinación de la cabeza hacia atrás con rigidez de los músculos del cuello; interrupción del sueño; incontinencia urinaria/intestinal; y parkinsonismo. Los métodos y usos, tales como el tratamiento de acuerdo con la descripción, incluyen el tratamiento que mejora o alivia cualquiera de los síntomas anteriores, en cualquier grado o período de tiempo.
- 35 Los ejemplos adicionales incluyen la medición de varias funciones en comparación con los criterios establecidos. Por ejemplo, una evaluación del funcionamiento intelectual (cognitivo), tales como las pruebas de memoria o el funcionamiento físico, puede caracterizar aún más el estado de una enfermedad. Un beneficio terapéutico o la eficacia del tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico (o la gravedad de una enfermedad o trastorno neurológico) también se puede determinar o medir por medios mecánicos o instrumentación. En particular, la tomografía electrónica de positrones (PET) del cerebro de una persona con una enfermedad o trastorno neurológico puede mostrar el grado de pérdida de función. Las imágenes como la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética (MRI), o con la tomografía computarizada por emisión de positrones única (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) también se pueden usar para identificar patología cerebral o subtipos de demencia con el fin de determinar el beneficio terapéutico o eficacia del tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico, o gravedad de una enfermedad o trastorno neurológico.

50 Para la enfermedad de Alzheimer (AD), una medida de deterioro cognitivo que se usa habitualmente son los Criterios de diagnóstico de Alzheimer establecidos por el NINCDS-ADRDA. Ocho dominios cognitivos están más comúnmente afectados en la AD, a saber, memoria, lenguaje, percepción (color visual, profundidad, reconocimiento de símbolos), habilidades constructivas/funcionales de atención, orientación y habilidades para resolver problemas. Por tanto, estos dominios pueden ser útiles para determinar el diagnóstico y, como tal, cualquier mejora de la AD. Una exploración por PET del cerebro de una persona con enfermedad de Alzheimer muestra clásicamente un hipometabolismo biparietal en el lóbulo temporal.

55 Para la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS, también conocida como enfermedad de Lou Gehrig), el diagnóstico se basa principalmente en los síntomas y signos, y en pruebas para descartar otras enfermedades. Se usa un examen neurológico para evaluar si los síntomas como debilidad muscular, atrofia de los músculos, hiperreflexia y espasticidad están presentes y, con el tiempo, empeoran progresivamente. Una de estas pruebas que distingue la ALS de otras enfermedades o trastornos que tienen síntomas similares es la electromiografía (EMG), una técnica de registro que detecta la actividad eléctrica en los músculos. Ciertos hallazgos de la EMG pueden respaldar el diagnóstico de ALS. Otra prueba común mide la *velocidad de conducción nerviosa* (NCV). Las anomalías específicas en la NCV pueden sugerir, por ejemplo, que el paciente tiene una forma de neuropatía periférica (daño a los nervios periféricos) o miopatía (enfermedad muscular) en lugar de ALS. Las exploraciones por resonancia magnética suelen ser normales en pacientes con ALS, pero pueden revelar evidencia de otros problemas que pueden estar causando los síntomas, como un tumor de la médula espinal, un disco herniado en el cuello, siringomielia o espondilosis cervical.

Para la Enfermedad de Parkinson, el diagnóstico de aparición se puede realizar tras la aparición de síntomas físicos y/o psicológicos específicos de la enfermedad, como se establece en la presente descripción, por ejemplo. Los rasgos característicos incluyen temblor; rigidez o dureza corporal; pérdida del control motor fino o grueso; enlentecimiento del movimiento; equilibrio deteriorado; inestabilidad corporal; anomalía en la postura o en la marcha; y caminar arrastrando los pies, coordinación reducida; inestabilidad física; marcha inestable; disfunción motora; movimiento corporal espasmódico (corea); movimiento ocular sacádico más lento; agarrotamiento; dificultad para masticar, comer, tragar o hablar; deterioro de las capacidades cognitivas/mentales, incluida la demencia; pérdida de memoria a corto y/o largo plazo; sueño y anomalías psiquiátricas y de comportamiento (por ejemplo, ansiedad, depresión, pérdida del afecto emocional, agresión, comportamiento compulsivo).

Para la enfermedad de Huntington (HD), el diagnóstico de aparición se puede realizar tras la aparición de síntomas físicos y/o psicológicos específicos de la enfermedad, como se establece en la presente descripción, por ejemplo. Los movimientos involuntarios excesivos de cualquier parte del cuerpo, que son abruptos y tienen un momento y una distribución aleatorios, sugieren un diagnóstico de HD. Los síntomas cognitivos o psiquiátricos rara vez son los primeros diagnosticados; por lo general, solo se reconocen en retrospectiva o cuando se desarrollan más. La progresión de la enfermedad se puede medir mediante el uso de la escala de calificación de la enfermedad de Huntington unificada que proporciona una calificación general basada en evaluaciones motoras, conductuales, cognitivas y funcionales. Las imágenes médicas, tales como la CT y la MRI, pueden mostrar atrofia de los núcleos caudados al comienzo de la enfermedad, pero estos cambios por sí solos no son diagnósticos de HD. La atrofia cerebral se puede observar en las etapas avanzadas de la enfermedad. Las pruebas genéticas se pueden usar para confirmar un diagnóstico físico si no hay antecedentes familiares de HD. Incluso antes de la aparición de los síntomas, una prueba genética puede confirmar si un individuo es portador de una copia expandida de las repeticiones del trinucleótido CAG en el gen *HTT* que causa la enfermedad. Debido a que la HD sigue un patrón de herencia autosómico dominante, los individuos que están en riesgo pueden identificarse fácilmente. Se puede obtener un resultado positivo muchos años antes de que comiencen los síntomas. Una prueba negativa significa que el individuo no es portador de la copia expandida del gen y no desarrollará la HD.

Para la Enfermedad de Pick (PD), el criterio más conocido es el del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido y el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Accidentes Cerebrovasculares de EE.UU. Los criterios del Banco de Cerebros de la Sociedad de la PD requieren lentitud de movimiento (bradicinesia) más rigidez, temblor en reposo o inestabilidad en la postura, mientras que descartan otras posibles causas de estos síntomas. Además, se requieren tres o más de las siguientes características durante el inicio o la evolución: inicio unilateral, temblor en reposo, progresión en el tiempo, asimetría de los síntomas motores, respuesta a la levodopa durante al menos cinco años, curso clínico de al menos diez años y aparición de disquisias inducidas por la ingesta excesiva de levodopa.

Para la Demencia Frontotemporal (FTD), el diagnóstico es principalmente clínico e incluye cambios de comportamiento, cambios en el lenguaje, combinados con pruebas neuropsicológicas e imágenes. Las exploraciones por MRI estructural a menudo revelan atrofia del lóbulo frontal y/o del lóbulo temporal anterior, pero en los primeros casos la imagen puede parecer normal. La atrofia suele ser asimétrica. La comparación de imágenes tomadas en diferentes momentos (por ejemplo, con un año de diferencia) puede mostrar evidencia de atrofia en dos imágenes transversales que pueden reportarse como normales. Las exploraciones por FDG-PET muestran clásicamente un hipometabolismo temporal anterior y/o frontal, que también ayuda a diferenciar la FTD de la enfermedad de Alzheimer.

Se puede proporcionar una cantidad suficiente o una cantidad efectiva en una única administración, pero no es necesario, administrarla sola o en combinación con otra composición, tratamiento, protocolo o régimen terapéutico. Por ejemplo, la cantidad puede aumentarse proporcionalmente según lo indique la necesidad del sujeto, el estado del trastorno o enfermedad tratado o los efectos secundarios del tratamiento. Además, una cantidad suficiente o una cantidad efectiva no necesita ser suficiente o efectiva si se administra en dosis únicas o múltiples sin una segunda composición, tratamiento, protocolo o régimen terapéutico, ya que dosis, cantidades o duración adicionales por encima y más allá de tales dosis, o dosis adicionales pueden incluirse composiciones, tratamientos, protocolos o regímenes terapéuticos para que se consideren efectivos o suficientes en un sujeto determinado.

Las cantidades consideradas suficientes también incluyen cantidades que dan como resultado una reducción del uso de otro tratamiento, régimen terapéutico o protocolo. Por ejemplo, se considera que una cantidad suficiente o efectiva de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, tiene un efecto terapéutico si la administración da como resultado una menor cantidad o frecuencia de un fármaco, u otra terapia o protocolo, siendo necesario para tratar una enfermedad o trastorno neurológico.

No es necesario que una cantidad suficiente o una cantidad efectiva sea efectiva en todos y cada uno de los sujetos tratados, profiláctica o terapéuticamente, en un sujeto particular, o en la mayoría de los sujetos tratados en un grupo o población determinados. Como es típico para el tratamiento o los métodos terapéuticos, algunos sujetos mostrarán una respuesta mayor o menor a un tratamiento, régimen terapéutico o protocolo dado. Una cantidad suficiente o una cantidad efectiva se refiere a la suficiencia o efectividad en un sujeto dado, no a un grupo o la población en general. Tales cantidades dependerán en parte de la enfermedad o trastorno tratado, como el tipo o estadio (temprano o avanzado) del trastorno o enfermedad, el efecto terapéutico deseado, así como también el sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.).

Una cantidad suficiente para los métodos, usos y composiciones descritos en la presente descripción incluye aproximadamente 1-10 miligramos (mg), 10-25 mg, 25-50 mg, 50-100 mg, 100-250 mg, 250-500 mg, 500-750 mg, 750-1000 mg, 1000-2000 mg, 2000-3000 mg, 3000-4000 mg, 4000-5000 mg, 5000-7500 mg, 7500-10 000 mg, 10-15 gramos (g), 15-20 g, 20-25 g, 25-30 g, 30-40 g, 40-50 g, 50-75 g o 75-100 g. También se pueden usar cantidades suficientes de acuerdo con la masa de un sujeto (por ejemplo, en kilogramos, kg). Por ejemplo, para un sujeto humano, las cantidades de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, incluyen aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 10-25 mg/kg de peso corporal, 25-50 mg/kg de peso corporal, 50-100 mg/kg de peso corporal, 100-250 mg/kg de peso corporal, 250-500 mg/kg de peso corporal, 500-750 mg/kg de peso corporal, 750-1000 mg/kg de peso corporal, 1-5 g/kg de peso corporal, o 5-10 g/kg de peso corporal de un sujeto. Tales cantidades para los métodos, usos y composiciones descritos en la presente descripción pueden ser menores, por ejemplo, de aproximadamente 50-500, 500-5000, 5000-25 000 o 25 000-50 000 ng/kg.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción se pueden practicar antes (es decir, profilaxis) o después de que comiencen los síntomas, antes o después de que se desarrollen los síntomas o la enfermedad o trastorno. La administración de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, antes o inmediatamente después del desarrollo de un síntoma puede disminuir la gravedad o frecuencia de los síntomas, o la causa subyacente del trastorno neurológico, en el sujeto. Además, la administración de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, antes o inmediatamente después del desarrollo de uno o más síntomas puede estabilizar o enlentecer la progresión o empeoramiento de un síntoma o la causa subyacente del trastorno neurológico o enfermedad.

Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción se pueden usar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Las composiciones pueden administrarse o suministrarse como una forma de dosificación única o múltiple, en días consecutivos o alternos o de manera intermitente, a un sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar o suministrar formas de dosificación únicas o múltiples en días alternos o de manera intermitente, durante aproximadamente 1 a 7, o 7 a 45, o 45 a 90 días o durante aproximadamente 1-4, 4-8, 8-12, 12-18, 18-24, 24-48, o más semanas, a un sujeto.

El término "poner en contacto" significa unión o interacción directa o indirecta entre dos o más entidades (por ejemplo, entre L-serina, un precursor, derivado o conjugado de L-serina, o molécula diana, dentro de una célula, por ejemplo). Poner en contacto, como se usa en la presente descripción, incluye en solución, en fase sólida, *in vitro*, *ex vivo*, en una célula e *in vivo*. El contacto *in vivo* puede referirse como administrar, o administración, o suministro *in vivo*.

El término "sujeto" se refiere a animales, típicamente animales mamíferos, tales como un primate no humano (vervet, gorilas, chimpancés, orangutanes, macacos, gibones), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos), animales de experimentación (ratón, rata, conejo, conejillo de indias) y humanos. Los sujetos humanos incluyen adultos y niños. Los sujetos humanos incluyen aquellos que tienen o están en riesgo de tener un trastorno neurológico. Los sujetos en riesgo pueden ser identificados mediante cribado genético para la predisposición a un trastorno neurológico o antecedentes familiares de un trastorno neurológico, por ejemplo, por acumulación de BMAA en tejidos queratináceos o plasma sanguíneo (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 7,256,002 y 7,670,783). Los sujetos incluyen además animales modelos de enfermedad (por ejemplo, ratones y primates no humanos) para probar la eficacia *in vivo* de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina.

También se proporcionan en la presente descripción composiciones, que incluyen L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad que es capaz de producir una o más de las actividades asociadas con L-serina. Una composición puede incluir L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, en una cantidad suficiente para tratar un trastorno neurológico. Una composición puede incluir una cantidad de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, suficiente para inhibir, revertir, aliviar o reducir uno o más síntomas de un trastorno neurológico. Además, una composición puede incluir una cantidad de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, suficiente para revertir las causas subyacentes de un trastorno neurológico.

Las cantidades de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina para los métodos, usos y composiciones descritos en la presente descripción incluye aproximadamente 1-10 miligramos (mg), 10-25 mg, 25-50 mg, 50-100 mg, 100-250 mg, 250-500 mg, 500-750 mg, 750-1000 mg, 1000-2000 mg, 2000-3000 mg, 3000-4000 mg, 4000-5000 mg, 5000-7500 mg, 7500-10 000 mg, 10-15 gramos (g), 15-20 g, 20-25 g, 25-30 g, 30-40 g, 40-50 g, 50-75 g o 75-100 g. También se pueden producir y/o proporcionar cantidades de acuerdo con la masa de un sujeto (por ejemplo, en kilogramos, kg). Por ejemplo, para un sujeto humano, las cantidades de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina pueden ajustarse de acuerdo con la masa del humano. Tales cantidades de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, incluyen aproximadamente 1-10 mg/kg de peso corporal, 10-25 mg/kg de peso corporal, 25-50 mg/kg de peso corporal, 50-100 mg/kg de peso corporal, 100-250 mg/kg de peso corporal, 250-500 mg/kg de peso corporal, 500-750 mg/kg de peso corporal, 750-1000 mg/kg de peso corporal, 1-5 g/kg de peso corporal, o 5-10 g/kg de peso corporal de un sujeto. Tales cantidades pueden ser menores, por ejemplo, de aproximadamente 50-500, 500-5000, 5000-25 000 o 25 000-50 000 ng/kg.

Los métodos y usos descritos en la presente descripción se pueden practicar mediante el uso de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, opcionalmente en las cantidades establecidas en la presente

descripción. Un derivado o conjugado de L-serina puede ser una modificación (por ejemplo, un grupo protector) en cualquiera de uno, dos o tres grupos funcionales, a saber, el resto amino (NH_2), el resto ácido ($-\text{COOH}$) y/o el resto hidroxilo (grupos $-\text{OH}$) de L-serina. Los grupos modificados se pueden escindir *in vivo* para producir L-serina libre y un grupo protector hidrolizado. Los grupos adecuados son farmacéuticamente aceptables y típicamente sustancialmente no tóxicos. Un derivado o conjugado de L-serina puede tener una estabilidad y/o solubilidad potenciadas en comparación con la L-serina libre lo que ayuda en el almacenamiento y dosificación, y la captación del compuesto activo de L-serina. Estos y otros derivados y conjugados de L-serina conocidos por un experto en la técnica se incluyen en los métodos, usos y composiciones descritos (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas).

Los ejemplos no limitantes de conjugados y derivados de L-serina en los que se deriva un resto hidroxilo para formar un hidroxilo protegido incluyen éster, carbonato, fosfato y éster sulfonato. El grupo hidroxilo de L-serina puede esterificarse selectivamente con un electrófilo de carbonilo, fosfonilo o sulfonilo adecuado después de la protección previa de los restos amino y ácido de la L-serina. Típicamente, uno o ambos grupos protectores de amino y ácido pueden eliminarse después de la esterificación selectiva del resto hidroxilo; la biocompatibilidad de los grupos protectores de ácido y amino no es un problema cuando se eliminan ambos grupos protectores. Los ejemplos no limitantes de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, terc-butoxicarbonilo (Boc) y carbobenciloxi (CBz), que se pueden eliminar en condiciones ácidas y de hidrogenólisis, respectivamente. Los grupos protectores de ácido adecuados incluyen ésteres de terc-butilo (tBu) y bencilo (Bn), que se pueden eliminar en condiciones ácidas y de hidrogenólisis, respectivamente. Los grupos protectores de hidroxilo adecuados son ésteres de ácidos carboxílicos, ácido fosfórico, ácidos fosfónicos, ácidos sulfúrico y sulfónico y otros grupos protectores de hidroxilo conocidos por el experto en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que la L-serina con hidroxilo protegido puede existir como una especie zwitteriónica como en el aminoácido libre o puede convertirse fácilmente en una sal de adición de ácido prótico.

Los ejemplos no limitantes de derivados y conjugados de L-serina en los que el resto amino se deriva incluyen la formación de una amida o urea, o L-serina que contiene carbamato. El resto amino de la L-serina puede derivarse selectivamente después de la protección previa de los restos hidroxilo y ácido de la L-serina. Tanto los restos hidroxilo como ácido en L-serina pueden protegerse con grupos susceptibles de ser eliminados después de la derivatización final del grupo amino. Típicamente, uno o ambos de los grupos protectores del resto hidroxilo y ácido se eliminan después de la derivatización selectiva del resto amino de L serina.

Los derivados y conjugados de L-serina incluyen la derivatización del resto ácido, que puede derivarse selectivamente después de proteger los restos hidroxilo y amino de la L-serina. Tanto los restos hidroxilo como amino en la L-serina pueden enmascarse con grupos protectores que son susceptibles de ser eliminados después de la protección final del resto ácido. Típicamente, uno o ambos de los grupos protectores del resto hidroxilo y amino se eliminan después de la derivatización selectiva del resto ácido de la L-serina.

En varios aspectos adicionales, un conjugado de L-serina incluye un polímero. Por ejemplo, la L-serina puede estar dentro de un péptido de residuo pequeño (por ejemplo, 2-10) que incluye otros aminoácidos. En este aspecto, enzimas tales como las peptidasas y la pepsina pueden escindir el péptido en aminoácidos individuales, liberando la L-serina. En tales aspectos, el péptido puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc., o más moléculas de L-serina Ser-[Ser] n donde n es de 1 a 1000. El péptido administrado produce serina o péptidos de serina más pequeños que a su vez se hidrolizan.

Los materiales de partida útiles para preparar derivados y conjugados de L-serina están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante métodos sintéticos bien conocidos (Harrison y otros, "Compendium of Synthetic Organic Methods", Volúmenes 1-8 (John Wiley y Sons, 1971-1996); "Beilstein Handbook of Organic Chemistry," Beilstein Institute of Organic Chemistry, Frankfurt, Alemania; Feiser y otros, "Reagents for Organic Synthesis," Volúmenes 1-17, Wiley Interscience; Trost y otros, "Comprehensive Organic Synthesis," Pergamon Press, 1991; "Theilheimer's Synthetic Methods of Organic Chemistry," Volúmenes 1-45, Karger, 1991; March, "Advanced Organic Chemistry," Wiley Interscience, 1991; Larock "Comprehensive Organic Transformations," VCH Publishers, 1989; Paquette, "Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis," John Wiley y Sons, 1995). Otros métodos para la síntesis de compuestos de serina con hidroxilo protegido y grupos de protección de aminoácidos serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

La L-serina y los precursores, derivados y conjugados de L-serina y composiciones de la misma (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas) pueden administrarse sistémica, regional o localmente por cualquier vía. Por ejemplo, la L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, puede administrarse por vía intravenosa, oral (por ejemplo, ingestión), intracraneal, intraespinal, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intracavitaria, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo, transmucosa y rectal. Los métodos, usos y -serina, y precursores, derivados y conjugados de L-serina, y composiciones de los mismos, descritos en la presente descripción, incluidas las formulaciones farmacéuticas, pueden administrarse mediante un sistema de suministro microencapsulado o empaquetarse en un implante para la administración sostenida, continua o intermitente.

Las composiciones incluyen además formulaciones farmacéuticas que contienen L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina. Tales formulaciones farmacéuticas se pueden formular en una cantidad que tenga una o más

de las actividades descritas en la presente descripción, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En varios aspectos, una formulación farmacéutica incluye L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina en una cantidad suficiente para lograr el efecto deseado.

Como se usa en la presente descripción, los términos "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" se refieren a portadores, excipientes, diluyentes y similares que se pueden administrar a un sujeto, preferentemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náuseas, dolor abdominal, dolores de cabeza, etc.). Tales preparaciones para la administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles.

Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar a partir de portadores, diluyentes, excipientes, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración a un sujeto. Tales formulaciones pueden estar contenidas en un comprimido (recubierto o no), cápsula (dura o blanda), microperla, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. También pueden estar presentes compuestos activos suplementarios y conservantes, entre otros aditivos, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Se puede formular una formulación farmacéutica para que sea compatible con su vía de administración prevista. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por vías que incluyen intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, ingestión o inhalación), intravenosa, intracavitaria, intracraneal, intraespinal, transdérmica (tópica), parenteral, por ejemplo, transmucosa y rectal.

Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir lo siguiente: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o plástico.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles (donde son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL. TM. (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula que se requiere en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. Pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las formulaciones inyectables se puede lograr incluyendo un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Para la administración oral, se puede incorporar L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, o una composición de la misma, con excipientes en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. En las formulaciones orales se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un glidani tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante.

Las formulaciones también pueden incluir portadores para proteger la L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de la L-serina contra la degradación o eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye materiales que se degradan lentamente dentro del cuerpo y, a su vez, liberan el(los) ingrediente(s) activo(s). Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solo o en combinación con una cera.

Las formulaciones adicionales incluyen partículas biodegradables o biocompatibles o sustancias poliméricas tales como poliésteres, ácidos poliamina, hidrogel, polivinilpirrolidona, polianhídridos, ácido poliglicólico, acetato de etileno-vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímeros de lactida/glicólido, copolímeros de polilactida/glicólido, o copolímeros de etilenvinilacetato para controlar el suministro de una composición administrada. Los métodos para la preparación de tales formulaciones se conocen por los expertos en la técnica. Los

materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc., por ejemplo.

La velocidad de liberación de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina puede controlarse mediante la alteración de la concentración o composición de tales macromoléculas. Por ejemplo, L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina se puede atrapar en microcápsulas preparadas mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, mediante el uso de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina o microcápsulas de poli (metilmetacrolato), respectivamente, o en un sistema de suministro de fármacos coloides. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, microperlas y sistemas basados en lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. núm. 4,522,811.

Se conocen en la técnica formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración y son aplicables en los métodos, usos y composiciones descritos en la presente descripción (véase, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18va ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.; The Merck Index (1996) 12da ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N.J.; y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

La L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina descrito en la presente descripción puede incluir combinaciones de otras composiciones y estar incluida en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción. Por ejemplo, un fármaco que se usa para tratar un trastorno neurológico se puede incluir con L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina.

La L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, incluidas sus formulaciones farmacéuticas, se pueden empaquetar en kits, que opcionalmente pueden contener instrucciones de uso, por ejemplo, practicar un método o uso descrito en la presente descripción. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente descripción kits. Un kit puede incluir L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina, y/o una formulación farmacéutica, empaquetada en un material de empaque adecuado. Además, un kit puede incluir una etiqueta o un prospecto para poner en práctica un método descrito en la presente descripción. Por tanto, un kit puede incluir instrucciones para tratar a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno neurológico, *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Además, un kit puede incluir una etiqueta o un prospecto que incluya instrucciones para tratar a un sujeto que tiene un trastorno neurológico *in vivo* o *ex vivo*.

Como se usa en la presente descripción, el término "material de envasado" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes de manera estéril, y puede estar hecho de un material comúnmente usado para tales fines (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, papel de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o el prospecto puede incluir instrucciones escritas apropiadas, por ejemplo, practicar un método o uso descrito en la presente descripción. Por lo tanto, los kits descritos en la presente descripción pueden incluir adicionalmente instrucciones para usar los componentes del kit en un método o uso descrito en la presente descripción.

Las instrucciones pueden incluir instrucciones para practicar cualquiera de los métodos o usos descritos en la presente descripción. Por tanto, L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina y composiciones farmacéuticas de la misma pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración a un sujeto. Las instrucciones pueden incluir además indicaciones, un criterio de valoración clínico satisfactorio, cualquier síntoma adverso que pueda ocurrir o información adicional requerida por la Administración de Alimentos y Medicamentos para su uso en sujetos humanos.

Las instrucciones pueden estar en "material impreso", por ejemplo, en papel o cartón dentro del kit, en una etiqueta adherida al kit o material de envasado, o adherida a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender cinta de voz o video que opcionalmente se puede incluir en un medio legible por computadora, tal como un disco (disco duro), CD óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medios de almacenamiento eléctrico tal como RAM y ROM e híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

Los kits descritos también pueden incluir uno o más fármacos que proporcionan un efecto sinérgico o aditivo o que reducen o alivian uno o más síntomas de un trastorno neurológico. Por ejemplo, se puede incluir un fármaco que reduce o disminuye un síntoma de un trastorno neurológico. Los kits descritos pueden incluir adicionalmente un agente tampón, un conservante o un agente estabilizante. El kit puede incluir además componentes de control para evaluar una actividad o efecto del tratamiento. Cada componente del kit puede incluirse en un recipiente individual separado. Por ejemplo, un kit puede incluir una única dosis unitaria de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina como se expone en la presente descripción. Alternativamente, un kit puede incluir múltiples dosis unitarias de L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina. Por ejemplo, cada una de las dosis unitarias múltiples contendría una cantidad de L-serina, o precursor, derivado o conjugado de L-serina, en un recipiente individual separado. Los componentes del kit pueden estar en una mezcla de uno o más recipientes y todos los diversos recipientes pueden estar dentro de uno o varios empaques.

También se proporcionan en la presente descripción métodos libres de células y basados en células de cribado, detección e identificación de agentes que modulan la actividad de la serina racemasa, y métodos de cribado, detección e identificación de agentes que modulan la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA a una proteína. Los métodos pueden realizarse en solución, en fase sólida, en sílice, *in vitro*, en una célula e *in vivo*.

Un método de cribado de un agente puede incluir poner en contacto la serina racemasa en condiciones que permitan que la L-serina se convierta en D-serina en presencia de un agente de prueba; y determinar si el agente de prueba inhibe o reduce la conversión de L-serina en D-serina. Un método de identificación de un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína puede incluir poner en contacto una serina racemasa con un compuesto de prueba en presencia de una L-serina en condiciones donde la L-serina se convierte en D-serina por la serina racemasa y determinar si el compuesto de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa. Una reducción o inhibición de la serina racemasa que convierte L-serina en D-serina en presencia del agente de prueba o compuesto de prueba identifica al agente de prueba o compuesto de prueba como un agente que disminuye, reduce o inhibe la conversión de L-serina en D-serina, o que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína.

Además, un método de identificación de un agente candidato para reducir o inhibir o prevenir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína, puede incluir poner en contacto una serina racemasa con L-serina en condiciones donde la L-serina se convertiría en D-serina por la serina racemasa en presencia de un agente de prueba; y determinar si el agente de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa. Una inhibición o reducción de D-serina identifica al agente de prueba como un agente candidato para reducir o inhibir o prevenir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína.

Además, un método de cribado de un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína, puede incluir poner en contacto una serina racemasa con L-serina en condiciones donde la L-serina se convertiría en D-serina por la serina racemasa en presencia de un agente de prueba; y determinar si el agente de prueba inhibe o reduce la conversión de la L-serina en D-serina por la serina racemasa. Por tanto, el método anterior criba un agente que reduce o inhibe o previene la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA, a una proteína.

Tales métodos pueden incluir etapas adicionales u otras del método. Por ejemplo, los métodos de identificación, detección y cribado pueden incluir también medir la actividad del agente para reducir o inhibir o prevenir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), o un derivado o isómero de BMAA a una proteína en una célula.

Los términos "determinar", "evaluar" y "medir" y las variaciones gramaticales de los mismos se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a determinaciones cualitativas o cuantitativas, o determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas. Cuando los términos se usan en referencia a la medición o detección, cualquier medio de evaluar la cantidad relativa, incluidos los diversos métodos establecidos en la presente descripción y conocidos en la técnica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un(a)", "y" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "L-serina, o un precursor, derivado o conjugado de L-serina" incluye una pluralidad de L-serina, o precursores, derivados o conjugados de L-serina, y así sucesivamente.

Como se usan en la presente descripción, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen los números enteros dentro de tales intervalos y las fracciones de los valores o los números enteros dentro de los intervalos, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 1-10, incluye 1, 2, 3, 4, 5, etc., así como también 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, etc., y así sucesivamente. Una referencia a un intervalo incluye una referencia a subintervalos dentro de ese intervalo. Así, por ejemplo, la referencia a 1-10 también incluye 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, etc. La referencia a una serie de intervalos, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 1-10 mg, 10-25 mg, 25-50 mg, 50-100 mg, 100-250 mg, 250-500 mg, 500-750 mg, 750-1,000 mg, 1,000-2,000 mg, 2,000-3,000 mg, 3,000-4,000 mg, 4,000-5,000 mg, 5,000-7,500 mg, 7,500-10,000 mg, 10-15 g, 15-20 g, 20-25 g, 25-30 g, 30-40 g, 40-50 g, 50-75 g y 75-100 g incluyen combinaciones de intervalos combinados, tal como 10-50, 50-500, 70-100 mg o g, etc. Una serie de intervalos incluye los extremos inferior y superior de esos intervalos combinados en intervalos. Así, por ejemplo, la referencia a una serie de intervalos tal como 50-100 100-200 y 200-300, incluye un intervalo de 50-200, 50-300, 100-300, etc.

Los ejemplos siguientes ilustran, pero no limitan el alcance de la invención que se describe en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Este ejemplo describe varios materiales y métodos.

Materiales y Métodos

10 Las células MRC-5 eran de American Tissue and Cell Culture (Virginia, EE.UU.). Las células SH-SY5Y eran de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Se obtuvo ^3H -BMAA (80 Ci/mmol, 0,5 mCi/ml) de American Radiolabeled Chemicals. La modificación de Dulbecco del medio esencial mínimo de Eagle (DMEM) y HAMS F12 fueron de JRH biosciences, (Lenexa, Kansas, EE.UU.). BMAA, ditiotreitol, L-serina, D-serina, naranja de acridina, bromuro de etidio, cicloheximida y SDS fueron de Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia). El reactivo de proteína BCA era de Pierce Biotechnology (Rockford, IL, EE.UU.). El kit de detección de apoptosis BD Pharmingen™ Anexina V-FITC era de BD Biosciences (Sidney Australia). El agua era de un sistema Milli Q de 4 etapas (Millipore-Waters, Lane Cove, NSW, Australia). Todo el equipo de HPLC fue suministrado por Shimadzu Corporation (Kioto, Japón) excepto la columna (Nova-Pak® C18 4 μM 3,9 x 300 mm) y el kit de derivatización AccQ•Tag que fueron suministrados por Waters Corporation (MA, EE.UU.). Otros productos químicos, solventes y materiales cromatográficos eran de calidad AR o HPLC.

Cultivo Celular

25 Las células MRC-5, una línea celular de fibroblastos de pulmón humano (número de pases 14-19) y las células SH-SY5Y, una línea celular de neuroblastoma humano (número de pases 30-32), se mantuvieron en DMEM o DMEM/Hams F12 respectivamente que contiene suero fetal bovino (FBS) al 10 %, L-glutamina 4 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 % de y aire al 95 %. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se recolectaron enzimáticamente con collagenasa de tipo II (Sigma-Aldrich) en condiciones estériles como las describe Minter (Minter, y otros, Thromb Haemost 67, 718-723 (1992)) y se establecieron como cultivos de células primarias en M199 (Trace Biosciences, Sydney, Australia) que contienen FBS al 20 %, L-glutamina 4 mM, promotor del crecimiento de células endoteliales al 0,5 %, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Todos los medios se prepararon con agua libre de endotoxinas (Baxter) y se filtraron con filtros Zetapore (Cuno Life Sciences Division). Las células se sembraron a 3×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron adherir durante la noche (16 horas) antes del tratamiento.

35 Estudios que examinan la incorporación de BMAA a proteínas y la inhibición de la incorporación por cicloheximida y aminoácidos

40 Las células MRC-5 se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) en HBSS que contiene FCS al 10 %. Después de 2, 4 y 16 horas, las células se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato y se lisaron por congelación-descongelación en Triton X-100. La concentración de proteína en el lisado se determinó mediante el uso del ensayo de ácido bicinónico (BCA) (Smith, y otros, Anal Biochem 150, 76-85 (1985)) (y el radiomarcage en el lisado celular cuantificado por recuento de centelleo líquido (LSC). A continuación, las proteínas celulares se aislaron mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (5 %), se lavaron tres veces en TCA (5 %) y se disolvieron en ácido fórmico.

45 Para determinar si la incorporación de marcate radiactivo en proteínas dependía de la síntesis de proteínas, se incubaron células MRC-5, SH-SY5Y y HUVEC con ^3H -BMAA (31,25 nM) con o sin CHX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 16 horas. La cantidad de radiomarcage presente en las proteínas celulares en los cultivos tratados con CHM se expresó en relación con la de los cultivos de control, que se estableció en 100 %. Se incubaron cultivos paralelos de células MRC-5 con ^3H -leucina (41 nM) con o sin CHX 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en condiciones de cultivo idénticas y se procesaron como antes.

50 Para examinar la capacidad de los aminoácidos individuales para reducir la incorporación o el radiomarcage en proteínas, se incubaron células MRC-5 con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en presencia de aminoácidos individuales (250 μM) y el radiomarcage presente en las proteínas celulares se evaluó como antes. Los 20 aminoácidos proteicos (isómeros L) se examinaron individualmente en cultivos celulares por triplicado. Para confirmar que la L-serina tenía un efecto inhibidor sobre la incorporación de radiomarcage en proteínas, se incubaron células MRC-5 con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en presencia de L-serina (0, 50, 100 y 250 μM) y en un experimento separado con 250 μM de L-serina y D-serina. La incorporación de radiomarcage se determinó en relación con las células incubadas en un medio que no contenía serina. A continuación, las células MRC-5 se incubaron con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 16 horas en HBSS solo, HBSS que contenía los 20 aminoácidos proteicos (400 μM) o 19 aminoácidos proteicos excepto L-serina y la cantidad de radiomarcage en la proteína celular se evaluó como antes.

Eliminación de radiomarcage de proteínas celulares generado incubando células MRC-5 con ^3H -BMAA

65 Se incubaron células SH-SY5Y con ^3H -BMAA (31,25 nM) durante 24 horas y se aislaron las proteínas celulares mediante precipitación con TCA (5 %). Las proteínas se lavaron tres veces en TCA (5 %), se lavaron con acetona

enfriada con hielo y se redisolviéron en PBS. La cantidad de radiomarcaje liberado de las proteínas (es decir, no precipitable con TCA) después de la incubación a 37 °C con DTT (1 mM) y SDS (2 %) con DTT (DTT/SDS) se determinó mediante Recuento de Centelleo Líquido (LSC). Las proteínas celulares también se incubaron con pronasa (2 mg/ml) durante 48 horas en tampón Tris HCl 100 µM pH 8 que contenía CaCl₂ 20 mM a 37 °C o en HCl (12 M) durante 12 horas y se cuantificó la liberación de radiomarcaje en relación con la del tampón solo (para pronasa) o agua (para HCl). Todas las muestras de proteínas se procesaron por triplicado.

Recuperación de BMAA incorporado de proteínas después de la hidrólisis

Después de la incubación con ³H-BMAA o BMAA frío, las células se lavaron tres veces con PBS, se lisaron por congelación-descongelación en Triton-X-100 (0,1 %) y las proteínas celulares se precipitaron en TCA (5 %). Los sedimentos de proteínas se lavaron tres veces con TCA (5 %) y se hidrolizaron en HCl 6 M hirviendo a 110 °C durante 16 horas como se describió anteriormente (Mondo, y otros, Mar Drugs 10, 509-520 (2012)). Los sedimentos de proteínas se liofilizaron y reconstituyeron en HCl 20 mM. Las partículas se eliminaron mediante centrifugación a través de membranas de 0,22 µm y el hidrolizado se derivatizó en AccQ•Tag (Waters Corporation, Australia). Los aminoácidos se separaron en una columna Waters C-18 mediante el uso de un método y un gradiente como se describió anteriormente (Mondo, y otros, Mar Drugs 10, 509-520 (2012)). Para recuperar el radiomarcaje en las muestras hidrolizadas, se recogieron fracciones manualmente cada minuto durante 40 minutos, se diluyeron en 5 ml de centelleante (centelleante Ultima Gold™, Perkin Elmer) y se determinaron las desintegraciones por minuto (DPM) mediante LSC.

Imágenes de autofluorescencia de células

Las células MRC-5 se incubaron en DMEM suplementado con BMAA 300 µM en presencia o ausencia de L-serina 300 µM durante 96 horas con cambios diarios de medio. La autofluorescencia celular se visualizó mediante el uso de un microscopio fluorescente invertido (Olympus IX71) como se describió previamente (Dunlop, y otros, Biochem J 410, 131-140 (2008)).

Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH)

La liberación de lactato deshidrogenasa de las células se determinó como se describió anteriormente (Tang, y otros, Phytother Res 25, 417-423 (2010)).

Doble tinción de células con naranja de acridina (AO)/bromuro de etidio (EtBr)

Las células MRC-5 se incubaron en presencia y ausencia de BMAA 500 µM durante 23 horas. Después de retirar el medio, las células se enjuagaron una vez con PBS caliente y se incubaron en una solución de AO/EB y luego se visualizaron mediante el uso de microscopía fluorescente como se describió anteriormente (Tang, y otros, Phytother Res 25, 417-423 (2010)).

Unión de Anexina V a la fosfatidilserina (PS) expuesta en la membrana plasmática

La apoptosis o necrosis en etapa tardía se midió mediante tinción simultánea con yoduro de propidio y anexina V mediante el uso del kit de detección de apoptosis BD Pharmingen™ Anexina V-FITC y se realizó citometría de flujo como se describió anteriormente (Dunlop, y otros, Biochem J 435, 207-216 (2010)).

Métodos de extracción para el análisis de BMAA en la mosca de la fruta

Treinta moscas de cada tratamiento se pesaron y se sometieron a sonicación (desmembrador sónico Fisher Scientific modelo 100; 2 vatios durante 30 segundos) en ácido tricloroacético al 10 % (TCA 72 µg/µl). La extracción con TCA se completó en dos etapas de 20 h a 4 °C mediante el uso de la mitad del volumen de TCA seguido de centrifugación (13 rpm durante 3 min, Labnet spectrafuge 16M) y eliminación del sobrenadante. Esto fue seguido por una segunda sonicación y extracción, 5 horas a temperatura ambiente mediante el uso de un volumen igual de TCA, seguido de centrifugación y eliminación del sobrenadante. Los sobrenadantes se agruparon (con la excepción de 50 µl retirados de la última extracción) y se filtraron por centrifugación (0,22 µm Ultrafree-MC, Millipore). El sedimento de proteína restante se transfirió a un vial de vidrio y se hidrolizó en HCl 6 M durante 16 horas a 110 °C (58 µg/µl). Una porción del extracto de TCA agrupado también se hidrolizó en un volumen igual de HCl 12 M durante 16 horas a 110 °C. Los extractos se diluyeron y derivatizaron con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidilo (AQC) y se analizaron por LC-MS/MS.

Métodos analíticos para BMAA de la mosca de la fruta

Los derivados de carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC Waters reactivo AccQTag, PN WAT052880) se analizaron mediante el uso de un instrumento de triple cuadrupolo (Thermo Scientific Finnigan TSQ Quantum UltraAM, San Jose, CA) después de la separación mediante un sistema Waters Acquity-UHPLC con un sistema binario Solvent Manager, Sample Manager y una columna Waters AccQTag Ultra (núm. de pieza 186003837,

2,1 x 100 mm) a 55 °C. La separación se logró mediante el uso de un gradiente de elución a 0,65 ml/min en ácido fórmico acuoso al 0,1 % (v/v) (Eluyente A) y ácido fórmico al 0,1 % (v/v) en acetonitrilo (Eluyente B): 0,0 min = 99,1 % A; 0,5 min = 99,1 % A curva 6; 2 min = 95 % A curva 6; 3 min = 95 % A curva 6; 5,5 min = 90 % A curva 8; 6 min = 15 % A curva 6; 6,5 min = 15 % A curva 6; 6,6 min = 99,1 % A curva 6; 8 min = 99,1 % A curva 6. Este gradiente proporcionó la separación de BMAA (Irvine Chemistry, CA) de los isómeros ácidos 2,4-diaminobutírico (Sigma # 32830 St. Louis, MO) y N-2(amino)etilglicina (TCI America (Portland, OR). Se suministró gas nitrógeno a la sonda de ionización por electropulverización calentada (H-ESI) con una presión de nebulización de 40 psi y una temperatura del vaporizador de 400 °C.

El espectrómetro de masas se hizo funcionar en las siguientes condiciones: la temperatura capilar se fijó en 270 °C, la compensación capilar de 35, la compensación de la lente del tubo de 110, la presión de gas auxiliar de 35, el voltaje de pulverización 3500, la energía de colisión de la fuente de 0 y el voltaje del multiplicador de - 1585. El segundo cuadrupolo se presurizó a 1,0 mTorr con argón al 100 %. El análisis de iones de producto de BMAA derivatizado con AQC usó m/z 459 (ionizado con una sola carga) y m/z 230 (ionizado con una carga doble) como iones precursores para la disociación inducida por colisión (CID).

Se realizó un filtrado de masas en dos etapas durante la monitorización de reacción selectiva (SRM) de BMAA después de CID en el segundo cuadrupolo, monitorizando las siguientes transiciones: m/z 459 a 119, CE 21 eV; m/z 459 a 289 CE 17 eV; m/z 459 a 171 CE 38 eV; m/z 459 a 258 CE 21 eV; m/z 230 a 171 CE 21 eV. Se detectaron iones de producto dentro del tercer cuadrupolo y se cuantificaron sus abundancias relativas.

La identificación de BMAA se confirmó mediante comparación con un estándar autenticado (Irvine Chemistry, CA) basado en cuatro parámetros (a) la presencia de los iones parentales m/z 459 y m/z 230; (b) tiempo de retención; (c) presencia de iones producto de la disociación inducida por colisión (transición m/z 459 al ion cuantificador 171; transiciones m/z 459 a iones calificadores 289, 258 y 119; y transición m/z 230 al ion calificador 171); (d) relaciones de iones calificadores en relación con el ion cuantificador del ion original m/z 459. La idoneidad de la reacción AQC se monitoreó mediante el examen de L-lisina (Sigma # L5501) comparando áreas de picos de lisina derivatizada simple (m/z 317) con las de lisina derivatizada doble (m/z 487).

Ejemplo 2

Este ejemplo describe datos que indican que BMAA se incorpora en proteínas, lo que puede conducir a un plegamiento incorrecto/agregación de proteínas, y cuya incorporación y plegamiento incorrecto/agregación es inhibida por la L-serina.

La incubación de fibroblastos humanos MRC-5 con ^3H -BMAA en medio de cultivo empobrecido en aminoácidos resultó en un aumento dependiente del tiempo en el radiomarcaje en los lisados celulares (Figura 1A), una proporción del cual se asoció con proteínas celulares (Figura 1B). La coincubación de células MRC-5 con ^3H -BMAA junto con el inhibidor de la síntesis de proteínas CHX redujo significativamente la cantidad de radiomarcaje en la fracción de proteína (Figura 2). CHX inhibió la incorporación del aminoácido proteico ^3H -leucina a proteínas en la misma medida que ^3H -BMAA (Figura 2), lo que sugiere que el ^3H -BMAA se incorporó a las proteínas mediante un mecanismo dependiente de la síntesis de proteínas. También se encontró que ^3H -BMAA estaba asociado a proteínas después de la incubación con células endoteliales primarias humanas (HUEC) y células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), este proceso nuevamente se encontró que es dependiente de la síntesis de proteínas ya que fue inhibido por CHX (Figura 2).

Para examinar más a fondo la asociación entre BMAA y las proteínas celulares, se analizó la disponibilidad de una variedad de tratamientos para liberar el radiomarcaje de las proteínas celulares. Las proteínas celulares radiomarcadas se generaron mediante incubación de las células SH-SY5Y con ^3H -BMAA durante 24 horas. El radiomarcaje no pudo eliminarse de las proteínas celulares aisladas mediante incubación con un exceso molar de 100 veces del agente reductor ditioneitol (DTT) o al calentar con el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) así como también DTT (Figura 3). La liberación del radiomarcaje requirió la escisión de los enlaces peptídicos mediante hidrólisis ácida o digestión proteolítica con pronasa (Figura 3).

Para determinar qué aminoácido estaba siendo reemplazado por BMAA, se analizó la competencia entre los 20 aminoácidos proteicos y ^3H -BMAA para su incorporación a proteínas celulares. La incorporación de ^3H -BMAA a proteínas celulares se inhibió en presencia de L-serina de una manera dependiente de la concentración (Figura 4A). La D-serina, que no se carga por las sintetasas de ARNt de mamíferos, no evitó la incorporación de ^3H -BMAA a la proteína (Figura 4B). La incubación de células con ^3H -BMAA en medio de cultivo que contenía los 20 aminoácidos proteicos (400 μM) redujo en gran medida la cantidad de radiomarcaje en la fracción proteica en relación con las condiciones de cultivo empobrecidas en aminoácidos (Figura 4C); cuando se omitió la L-serina de la mezcla de aminoácidos, la incorporación de BMAA a proteínas aumentó significativamente (Figura 4C).

Para confirmar aún más que BMAA estaba presente en las proteínas celulares y que la L-serina inhibía la incorporación, las células MRC-5 se incubaron con un intervalo de concentraciones de BMAA (250-1000 μM) o BMAA con L-serina (250-1000 μM) y las proteínas celulares hidrolizadas se analizaron mediante espectroscopía de masas en serie en una LC/MS/MS de triple cuadrupolo. Los tiempos de retención, los iones producto únicos y las relaciones de

las transiciones m/z durante la disociación inducida por colisión coincidían con los de un estándar BMAA autenticado (Figura 5A). La incubación de células con concentraciones crecientes de BMAA dio como resultado una recuperación creciente de BMAA de las proteínas hidrolizadas (Figura 5B). De acuerdo con los estudios que utilizaron ^3H -BMAA, la incorporación de BMAA no marcado se inhibió tanto por L-serina como por CHX (Figura 5C). En las células incubadas durante 96 horas con BMAA (300 μM), los cuerpos autofluorescentes fueron evidentes en el núcleo, el citosol y en el espacio perinuclear (Figura 6A). Esto es consistente con la acumulación de proteínas agregadas, ya que se ha demostrado que el pigmento fluorescente se acumula en las células como resultado del envejecimiento (lipofusina) o de una variedad de patologías asociadas con la proteólisis alterada (ceroide).

La coincubación con L-serina previno la formación de cuerpos autofluorescentes (Figura 6B). Las células MRC-5 y SH-SY5Y no mostraron signos de necrosis como lo demuestra la ausencia de cambios significativos en la liberación de LDH (λ datos no mostrados? - no) sin embargo, la apoptosis estaba presente como lo indica el aumento de tinción para Anexina V (Figura 6E) y el mayor número de apariencia "pálida" de las células tratadas con naranja de acridina y bromuro de etidio (Figuras 6C y D). La apoptosis podría anularse mediante la coincubación con L-serina, así como con CHX, lo que proporciona más pruebas de que este proceso depende de la incorporación de BMAA a la cadena de proteínas (Figura 6E). Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la incorporación de BMAA a las proteínas celulares es un proceso dependiente de la síntesis de proteínas, que es inhibido por la L-serina.

En base a los datos anteriores, la capacidad de BMAA de incorporarse por error a proteínas en lugar de L-serina aumentaría el plegamiento incorrecto de proteínas propensas a agregarse. Las células posmitóticas, tal como las neuronas, serían las más afectadas ya que, entre otros factores (Polymenidou, y otros, J Exp Med 209, 889-893 (2012)), no pueden distribuir agregados de proteínas entre las células hijas. Al promover el plegamiento incorrecto de una serie de proteínas específicas de enfermedad, BMAA podría ser un desencadenante único para los complejos trastornos neurológicos informados en Guam en los que la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Parkinson y síntomas similares a la demencia eran evidentes en individuos expuestos a BMAA (Bradley, y otros, Amyotroph Lateral Scler 10 Supl 2, 7-20 (2009)).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe datos que indican que la L-Serina rescata a *Drosophila melanogaster* (moscas de la fruta) de la mortalidad inducida por BMAA y modelos útiles adicionales.

La APP se conserva evolutivamente desde invertebrados hasta vertebrados. Esto permite realizar investigaciones sobre APP en moscas de la fruta *Drosophila*, para estudiar enfermedades humanas como la enfermedad de Alzheimer. El modelo de *Drosophila* se usó para caracterizar cómo influye BMAA en la producción de los fragmentos derivados de APP, especialmente los fragmentos amiloidogénicos. El modelo de insecto *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) es un sistema de invertebrado conveniente para medir características importantes de una enfermedad humana, incluida la formación de placa, la pérdida de memoria, las interacciones sociales y la estructura neuronal general de un organismo modelo. Las moscas de la fruta también modificadas genéticamente para producir A β humano extra serán alimentadas con BMAA y se medirá el aumento o disminución resultante en el A β inductor de placa. Las moscas son un modelo excelente porque sus características genéticas han sido bien estudiadas y se examinan una gran cantidad de enfermedades humanas en las moscas de la fruta.

Los estudios preliminares muestran la capacidad de la L-Serina para prevenir la incorporación errónea de BMAA a proteínas. En una serie de experimentos de alimentación, las moscas de la fruta *Drosophila* se alimentaron con cuatro tipos diferentes de medios: 1) medio estándar para mosca de la fruta con BMAA 0 mM (control), 2) medio enriquecido con L-serina 25 mM, 3) medio con BMAA añadido 25 mM, y 4) medio con BMAA 25 mM y L-serina 25 mM añadidos durante tres días de alimentación. Luego se analizó la incorporación errónea de BMAA a proteínas mediante el uso de LC/MS/MS de triple cuadrupolo y LC/MS/MS de trampa orbital. La adición de L-Serina a los medios redujo a la mitad la cantidad de la incorporación errónea de BMAA (Figura 7).

Igualmente, interesante es el análisis del valor protector de la L-Serina en *Drosophila* dosificada con BMAA. Las moscas de la fruta alimentadas con medio enriquecido con BMAA (tercer conjunto de bloques) padecieron una mortalidad del 40 % después de tres días, mientras que las moscas alimentadas con Serina más BMAA (cuarto conjunto de bloques) no tuvieron mortalidad (Figura 8). Estas moscas fueron rescatadas por la L-Serina.

Hay dos modelos adicionales que se usarán para estudiar los efectos de BMAA de la siguiente manera:

1. Líneas de células neuronales humanas (células NT2). Estas neuronas humanas se cultivan en placas de Petri y son lo suficientemente robustas para estudiarlas durante largos períodos de tiempo. Estas células son el modelo más cercano a lo que puede ocurrir a nivel neuronal en el cerebro humano. Las células *ex-vivo* tienen todas las características importantes para la comunicación neurona a neurona, la función del neurotransmisor glutamato y un sistema conveniente para medir la viabilidad celular y los fragmentos de APP mediante el uso de técnicas de proteínas (transferencia Western).
2. Las células de alta proliferación, denominadas células CHO/APP. Estas células, derivadas de hámsteres, tienen cantidades adicionales de APP que permitirán la medición de fragmentos de A β más pequeños. A menudo, las técnicas de proteínas, si bien son buenas para detectar fragmentos pequeños, se potencian aún más mediante

el uso de líneas celulares que han sido modificadas genéticamente para producir más de una proteína en particular, en este caso, APP.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe datos en un modelo de vertebrado que ilustra la neurotoxicidad de BMAA y que BMAA causa anomalías en el desarrollo neuronal.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un modelo clínicamente relevante para trastornos neurológicos humanos y enfermedades tales como atrofia muscular espinal, ataxia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, demencia y enfermedad de Alzheimer (ver, por ejemplo, Kabashi y otros, Trends Genet. 26:373 (2010); y Kabashi y otros, Biophys. Acta 1812:335 (2011)). El pez cebra se usó para determinar la toxicidad de BMAA y para evaluar los cambios funcionales en el rendimiento del nado en peces después de una exposición única a BMAA.

El BMAA se inyectó directamente a través del corion en la yema, lo que le permitió competir directamente con la L-serina para su incorporación a las proteínas recién sintetizadas en los peces en desarrollo. Se suministró BMAA (100 mg/ml en agua) o agua mediante una bomba Picospritzer automatizada para suministrar 5 nl por inyección en la yema (~ 110 µl) del pez cebra inmediatamente después de ser fertilizado. Los peces se dejaron desarrollar durante 30 horas en condiciones estándar. Supervivencia: En el grupo de control, el 91 % de los peces sobrevivieron. En el grupo tratado con BMAA, la viabilidad del pez cebra se redujo al 74 %.

Los peces supervivientes se criaron en un acuario equipado con filtración biológica y control de temperatura a 28 °C durante 3 meses. Los peces tratados con BMAA y de control de los mismos padres se criaron en los mismos tanques, luego se separaron en base a una etiqueta fluorescente antes de la evaluación del nado. Después de 3 meses, se examinaron todos los peces adultos sanos sin deformaciones o anomalías. Se determinó la velocidad crítica de nado, definida como la velocidad máxima de nado que se puede mantener durante un período determinado en un túnel de agua. Se bombeó agua desde un depósito (EcoTech Marine MP10 Vortech Propeller Pump con EcoSMART Driver) a través de un tubo de 50 mm de diámetro. Una malla ubicada en el extremo corriente abajo evitaba que los peces abandonaran la sección de prueba. Los peces nadaron durante 6 minutos en la posición 4 de la bomba, luego la velocidad se incrementó gradualmente hasta la posición 6 y se mantuvo hasta que el pez falló.

Rendimiento de nado: los peces tratados con BMAA mostraron un deterioro significativo en el rendimiento de nado en comparación con los peces de control (Ctrl) en base al tiempo para fallar (segundos) (Figura 9). Hubo una diferencia significativa entre los dos grupos ($p < 0,001$)

Desarrollo neuronal: las neuronas se observaron bajo un microscopio fluorescente. En los peces de control inyectados (Figura 10A), se pudo observar claramente el crecimiento y la ramificación de las neuronas motoras después de 30 horas. En los huevos inyectados con L-BMAA, se observaron neuronas trunca (Figura 10B, indicada por flechas blancas). La diferencia en la longitud total de la neurona motora se cuantificó midiendo las primeras diez proyecciones de neurona motora marcadas antes del final de la extensión de la yema (Paquet D y otros, J. Clin. Invest. 119:1382 (2009)). Las mediciones se realizaron en tres peces diferentes por tratamiento mediante el uso de la herramienta de línea a mano alzada en ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/> Versión 1.46r). Los datos se recopilaron en GraphPad Prism (versión 6 para OSX) y se calculó la significación estadística mediante una prueba T de Student. Las líneas horizontales representan la media de la longitud de las neuronas dentro y entre muestras (Figura 10C). $P < 0,0001$.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe el análisis de la prevención de la L-serina de la incorporación errónea de BMAA a neuroproteínas de roedores.

Se realizó una serie de estudios que demostraron que BMAA radiomarcado, tanto BMAA marcados con tritio como con ¹⁴C, atraviesan rápidamente la barrera hematoencefálica en ratas y se insertan en neuroproteínas. Se llevan a cabo estudios para probar si la L-Serina bloquea la incorporación errónea de BMAA radiomarcado al cerebro de los roedores.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe un modelo Vervet para evaluar el efecto protector de la L-serina contra la enfermedad neurodegenerativa progresiva.

Los primates no humanos son modelos excepcionales para comprender las enfermedades humanas, ya que estos animales comparten una gran parte del genoma humano y tienen homologías significativas con el sistema nervioso humano. Se sabe que los monos verdes africanos, conocidos como vervets, portan el gen APOe y desarrollan placas cerebrales de beta-amiloide (Aβ), lo que convierte a los vervets en un modelo prometedor para la enfermedad de Alzheimer (AD). Un estudio en vervet y un estudio encontraron que las vacunas Aβ redujeron el Aβ en el cerebro. Un ensayo posterior de fase I en humanos mostró que las vacunas Aβ eran seguras para las personas y esta vía se está

investigando actualmente en gran parte debido a los ensayos positivos en vervets, lo que indica que los vervets son un modelo aceptado para el Alzheimer humano.

Se estudió una colonia de vervets para detectar el plegamiento incorrecto de proteínas y los agregados de proteínas producidos por la administración oral de BMAA y la capacidad de dosis equivalentes de L-serina para prevenir la incorporación errónea de BMAA a las proteínas, así como también la L-serina para prevenir el plegado incorrecto de las proteínas y los agregados de proteínas. Los vervet (16 animales) se dividieron en cuatro grupos diferentes. Cuatro de los vervet recibieron diariamente 651 mg de BMAA. Un segundo grupo de cuatro vervets recibió 651 mg de BMAA más 651 mg de L-Serina cada día. El tercer grupo recibió una dosis diaria de 651 mg de L-Serina, y el cuarto grupo de control recibió placebos, en este caso 651 mg de harina de arroz. Estas dosis, que se normalizan a 210 mg/kg/día, son comparables a las dosis usadas para los macacos que indujeron neurotoxicidad aguda en algunos animales con movimientos profundos y déficits cognitivos en los animales dosificados.

Las neuroproteínas derivadas de los tejidos de vervets, así como las muestras de plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo, se están analizando con espectrometría de masas de trampa orbital y espectrometría de masas de triple cuadrupolo en busca de evidencia de incorporación errónea de BMAA. Además, las neuroproteínas se estudian en busca de evidencia de plegamiento incorrecto y agregación mediante el uso de tinciones y microscopía fluorescente como se detalló anteriormente, así como estudios neuropatológicos generales de tejidos cerebrales en busca de lesiones u otras anomalías neuroanatómicas.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe estudios para evaluar los cerebros con Alzheimer en busca de proteínas que tengan BMAA incorporado erróneamente a la proteína.

Se examinarán las diferencias en la abundancia de las enzimas, particularmente 3-PGDH, PSAT y PSPH que producen L-serina endógena dentro de los astrocitos de primates en el cuerpo del sistema neuronal, para comprender si las deficiencias en la L-serina neuronal hacen que las neuroproteínas sean más vulnerables al plegado incorrecto por BMAA. La composición específica de estas proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer se puede usar para demostrar que BMAA se está incorporando de manera errónea en lugar de L-Serina en los sistemas nerviosos de los primates vivos. Al final de estos estudios *in vivo*, se determina si la L-Serina previene la incorporación errónea de BMAA a neuroproteínas, y si la L-Serina es capaz de prevenir el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas subsecuentes.

Se realizarán extractos de cerebros con Alzheimer para purificar y analizar proteínas a las que se les haya incorporado de manera errónea BMAA a la secuencia de proteínas. Se obtienen muestras de cerebros de pacientes que padecían la enfermedad de Alzheimer y se extraen proteínas de los cerebros. Los extractos se separarán por electroforesis en gel y las proteínas se transferirán a las membranas. Estas membranas que contienen todas las proteínas de los extractos se sondarán con anticuerpos contra BMAA para determinar qué proteínas muestran reactividad con los anticuerpos y, por tanto, qué proteínas contienen BMAA. El sondeo de la membrana permitirá calcular el tamaño o el peso molecular de estas proteínas. Un aislamiento de las proteínas que tienen el mismo peso molecular que las proteínas que fueron positivas cuando se evaluaron con membranas. Estas proteínas luego se cortarán del gel, se digieren y se analizan mediante el uso de un espectrómetro de masas. Las secuencias obtenidas para estas proteínas digeridas se evaluarán mediante el uso del software de análisis de proteínas para identificar las proteínas en base a sus secuencias y también para determinar los sitios donde se produce la incorporación errónea de BMAA.

Alternativamente, los anticuerpos contra BMAA se usarán para purificar proteínas a partir de soluciones preparando columnas de afinidad de anticuerpos. Los extractos de proteínas del cerebro con Alzheimer estarán sujetos a purificación por afinidad. Después de pasar la solución de proteína a través de la columna de anticuerpos, es más probable que las proteínas que contienen BMAA se unan a los anticuerpos en la columna y las proteínas que no contienen BMAA fluirán a través de la columna. La columna se lavará y las proteínas que contienen BMAA se eluirán de la columna como una solución semipura. El uso de tales columnas nos permite purificar rápidamente las soluciones de proteínas de tal manera que hay una mayor probabilidad de obtener proteínas que contienen BMAA. Una vez aisladas, las proteínas serán digeridas mediante el uso de enzimas antes del análisis de los fragmentos mediante el uso de espectrometría de masas y software de análisis de proteínas.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe los ensayos clínicos propuestos en humanos de L-Serina como tratamiento para la enfermedad neurodegenerativa progresiva.

En base a las consideraciones anteriores, se espera que la L-serina y sus derivados estructurales funcionen como un profiláctico que puede prevenir la enfermedad degenerativa progresiva humana, así como también un tratamiento que enlentecerá la progresión de los síntomas en pacientes que han sido diagnosticados con una enfermedad neurodegenerativa progresiva.

Se realizarán ensayos clínicos en humanos para determinar si la L-Serina puede retardar la progresión de la ALS y la enfermedad de Alzheimer, o posiblemente incluso prevenir su aparición. Para aprobar cualquier compuesto como un fármaco, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) requiere tres fases diferentes de ensayos clínicos en humanos. Los ensayos de fase I típicamente involucran a un pequeño número de pacientes (10-12) con la enfermedad y están diseñados para ver si el fármaco es seguro y bien tolerado por los pacientes. Los ensayos de fase II involucran a más pacientes (30 a 60) y están diseñados para ver si el fármaco es efectivo en el tratamiento de la enfermedad. Los ensayos de fase III están diseñados para reconfirmar tanto la seguridad como la eficacia, y para determinar los posibles efectos secundarios. Estos ensayos generalmente involucran de 300 a 500 pacientes.

En base a los datos *in vitro* e *in vivo* detallados anteriormente, no sería ético presentar a los pacientes con ALS un placebo en un ensayo clínico aleatorizado doble ciego. En consecuencia, se usarán datos históricos sobre pacientes de control con ALS de ensayos clínicos previos realizados por Phoenix Neurological Associates y otros.

En el diseño actual, un ensayo de etiqueta abierta de fase I de 20 pacientes con ALS recibirán L-Serina por vía oral en dosis que van desde 500 mg/día a 30 g/día durante seis meses. Criterios de inclusión de ALS: edad 18-85; Masculino o Femenino; diagnosticado clínicamente con ALS probable o definitiva en base a los criterios de El Escorial; Puntuación de ALS-FRS > 25; y capaz de dar su consentimiento informado y cumplir con todos los procedimientos médicos. Criterios de exclusión de ALS: pacientes con FVC por debajo del 60 %; evidencia de cualquier MND durante más de 3 años; cualquier otra afección comórbida que pudiera hacer que la finalización del ensayo sea poco probable; historial de intolerancia a la L-serina; tomar cualquier otro medicamento de prueba; y si es femenino, embarazada o en período de lactancia, o si está en edad fértil, cualquier falta de voluntad para prevenir el embarazo hasta que se completen los ensayos;

Aunque el ensayo de fase I está diseñado para demostrar la seguridad de la dosificación de L-serina para pacientes con ALS, dentro de estos intervalos de dosis podría haber un posible enlentecimiento de la reducción de los síntomas mediante el uso de ALSFRS-R, una clasificación de Esclerosis Lateral Amiotrófica progresiva en base a los síntomas clínicos. Además, se extraerán y analizarán muestras de plasma sanguíneo y líquido cefalorraquídeo mediante el uso de LC/MS/MS de triple cuadrupolo y LC/MS/MS de trampa orbital para determinar el grado de incorporación errónea de BMAA a las neuroproteínas, los niveles plasmáticos de L-serina. Se usarán estudios de microscopía de tinción y fluorescente similares a los detallados en la presente descripción para detectar agregados de proteínas y el grado de plegamiento incorrecto de proteínas clave asociadas con la neurodegeneración progresiva. Además, las neuroproteínas que son particularmente vulnerables a la incorporación errónea de BMAA se identificarán mediante espectrometría de masas con trampa orbital.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para prevenir, inhibir o reducir

a) la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG), o β -amino-N-metilalanina (BAMA), a una o más proteínas de una célula de mamífero, que comprende poner en contacto la célula con L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la incorporación de β -N-metilamino-L-alanina (BMAA), ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG) o β -amino-N-metil-alanina (BAMA), a la proteína; o

b) el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en una célula de mamífero, que comprende poner en contacto la célula con L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir el plegamiento incorrecto o la agregación de la proteína, en donde el plegamiento incorrecto o la agregación es causado por la incorporación de BMAA, ácido 2,4-diaminobutírico (2,4-DAB), ácido 2,3-diaminobutírico (2,3-DAB), N-(2-aminoetil)glicina (AEG), o β -amino-N-metil-alanina (BAMA), a una o más proteínas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula es humana.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la célula es una neurona o una célula glial.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína es la proteína de unión a ADN TAR 43 (TDP-43) o alfa-sinucleína.

5. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso en:

a) reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas;

b) estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; o

c) tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, sal de L-serina o éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas,

en donde en (a), (b) y (c) la enfermedad o trastorno neurológico es Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), o Esclerosis Lateral Amiotrófica/Complejo de Demencia de Parkinsonismo (ALS/PDC).

6. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso en:

a) reducir o disminuir el riesgo de una enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para reducir o disminuir el riesgo de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas;

b) estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para estabilizar, o reducir o inhibir la progresión de la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas; o

c) tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas en un sujeto, en donde la L-serina, sal de L-serina o éster de L-serina, se debe administrar al sujeto en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad o trastorno neurológico causado o caracterizado por el plegamiento incorrecto o agregación de una o más proteínas,

en donde en (a), (b) y (c) la enfermedad o trastorno neurológico es la enfermedad de Alzheimer.

7. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el sujeto es un humano.

8. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 7 o la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la proteína es la proteína de unión a ADN TAR 43 (TDP-43) o alfa-sinucleína.
- 5 9. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5, 7 y 8 o la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde un síntoma de la enfermedad o trastorno neurológico es una deficiencia motora o cognitiva; fatiga; temblores; ataxia; habla arrastrada, pastosa o irregular; calambres musculares, espasmos, atrofia o debilidad; falta de aire; dificultad para respirar; pérdida de memoria a corto o largo plazo; dificultad para concentrarse o completar tareas familiares o de rutina; confusión de espacio y tiempo; pérdida de visión, color o reconocimiento de signos; pérdida de percepción de profundidad, dificultad para escribir; pérdida de juicio; pérdida de vocabulario; mal humor; irritabilidad; agresión; paranoia; alucinaciones; retiro del compromiso social; dureza o rigidez; pérdida del control motor fino o grueso; enlentecimiento del movimiento; equilibrio deteriorado; inestabilidad corporal; anormalidad en la postura o en la marcha; caminar arrastrando los pies; coordinación reducida; inestabilidad física; marcha inestable; disfunción motora; movimiento corporal espasmódico; movimiento ocular sacádico más lento; rigidez corporal; agarrotamiento; dificultad para masticar, comer, tragar o hablar; deterioro de las capacidades cognitivas/mentales; demencia; anomalías del sueño, del comportamiento o psiquiátricas; dificultad para pensar; cambios de comportamiento; regulación deficiente de la conducta social; pasividad; letargo; retiro social; inercia; hiperactividad; deambulación, ritmo errante; pérdida del equilibrio; lanzarse hacia adelante al moverse; caminar rápido; desequilibrio, por ejemplo, chocar con objetos o personas; caídas; cambios de personalidad; pérdida de inhibición o capacidad para organizar información; habla arrastrada; oftalmoparesia o movimiento ocular alterado; función de los párpados deteriorada; contractura de los músculos faciales; Distonía del cuello o inclinación de la cabeza hacia atrás con rigidez de los músculos del cuello; interrupción del sueño; 10 15 20 25 30 10. La L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7 a 9 o la L-serina, una sal de L-serina o un éster de L-serina como único principio activo para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde la L-serina, la sal de L-serina o el éster de L-serina está comprendida en liposomas o micelas o una composición o formulación farmacéutica.

Figura 1A

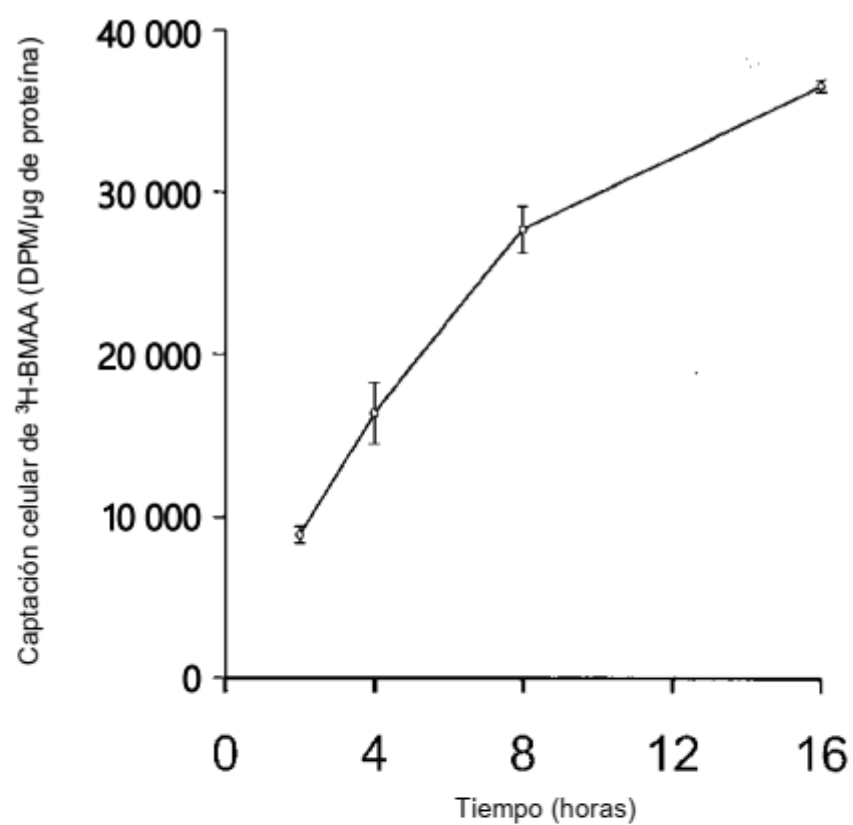


Figura 1B

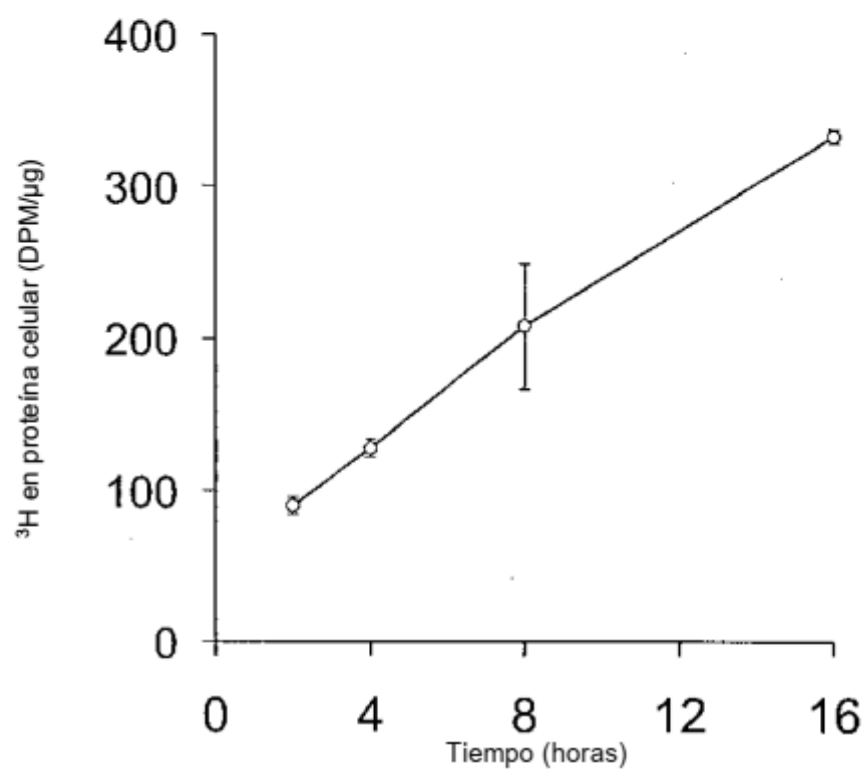


Figura 2

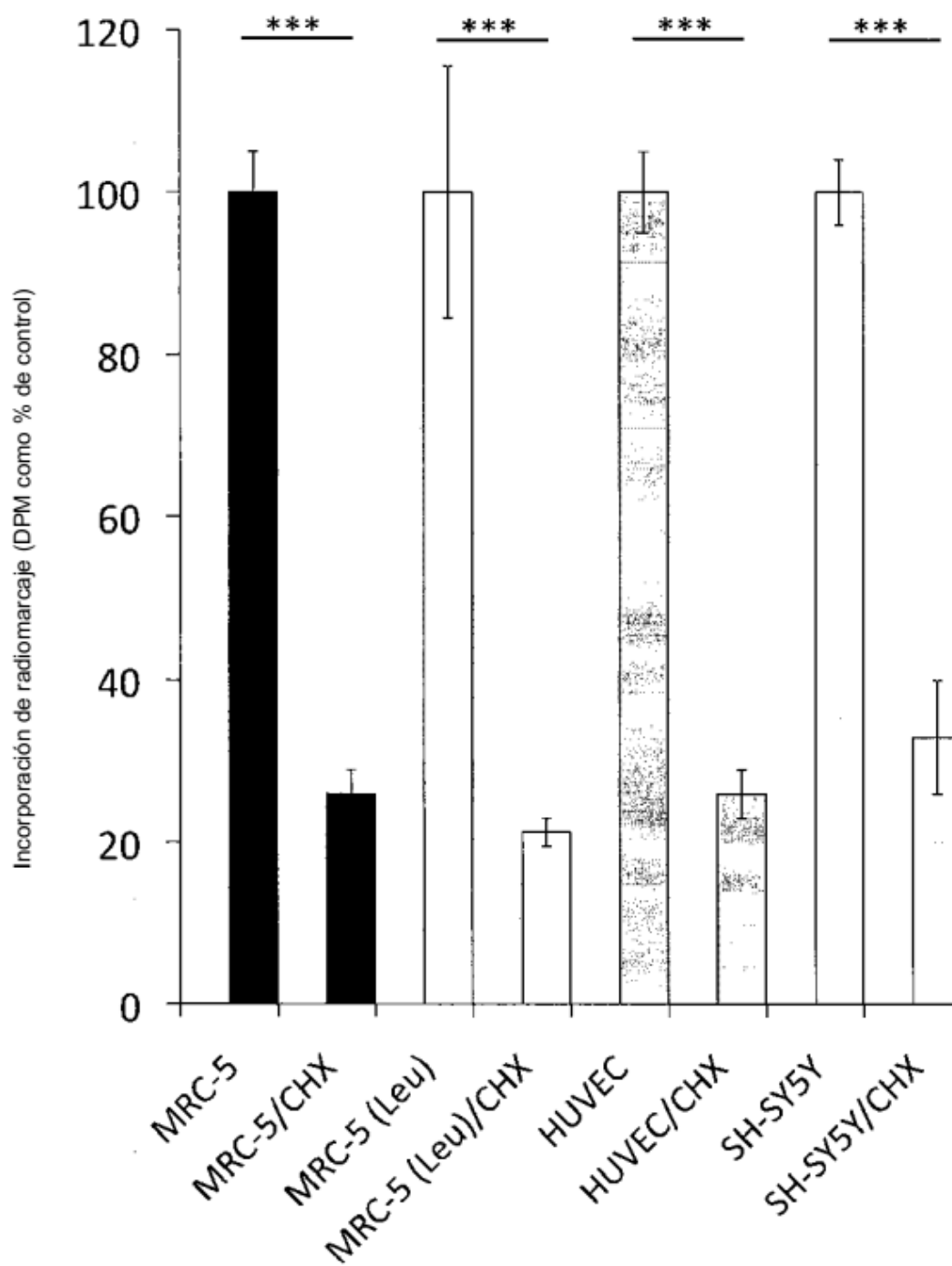


Figura 3

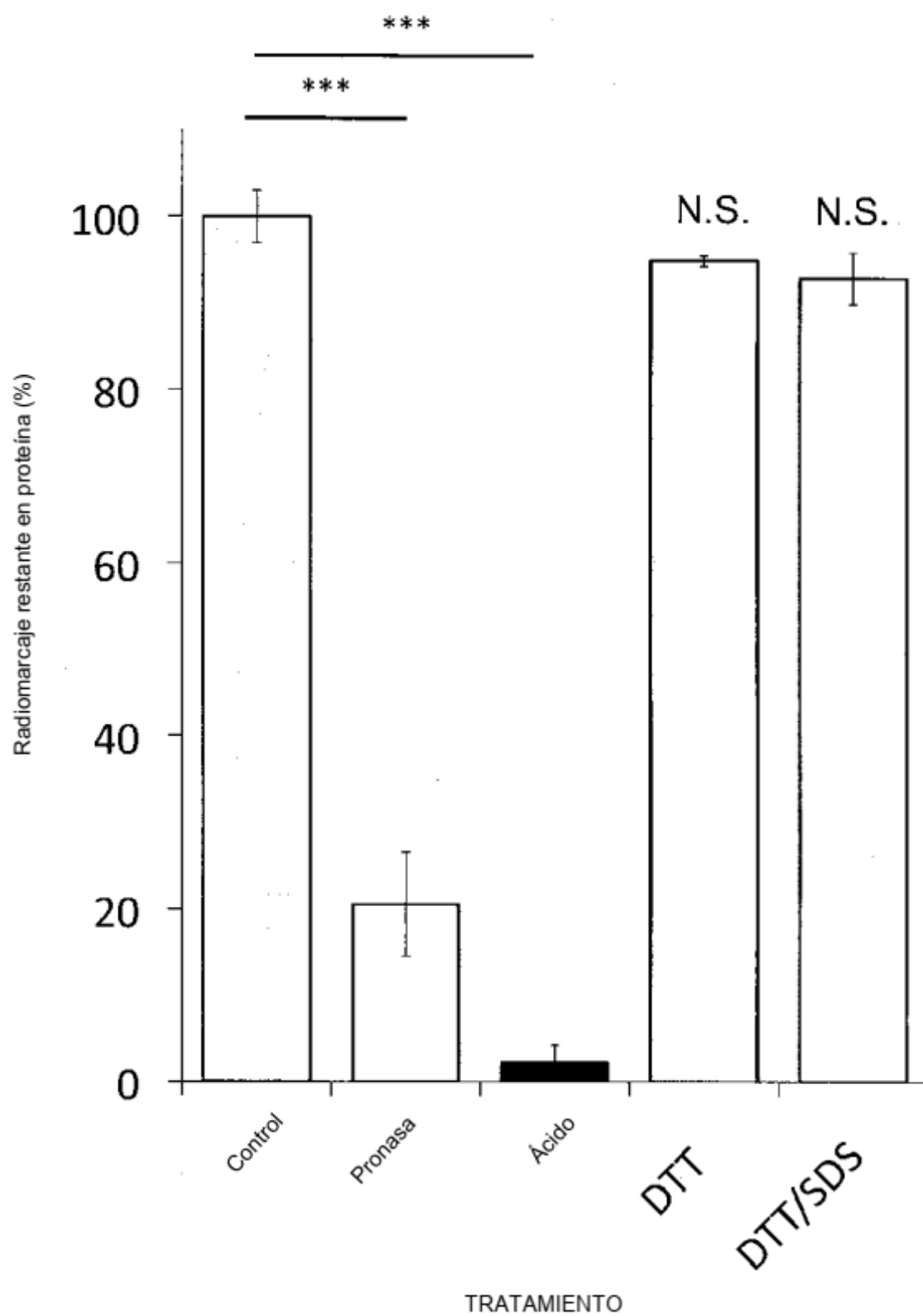


Figura 4A

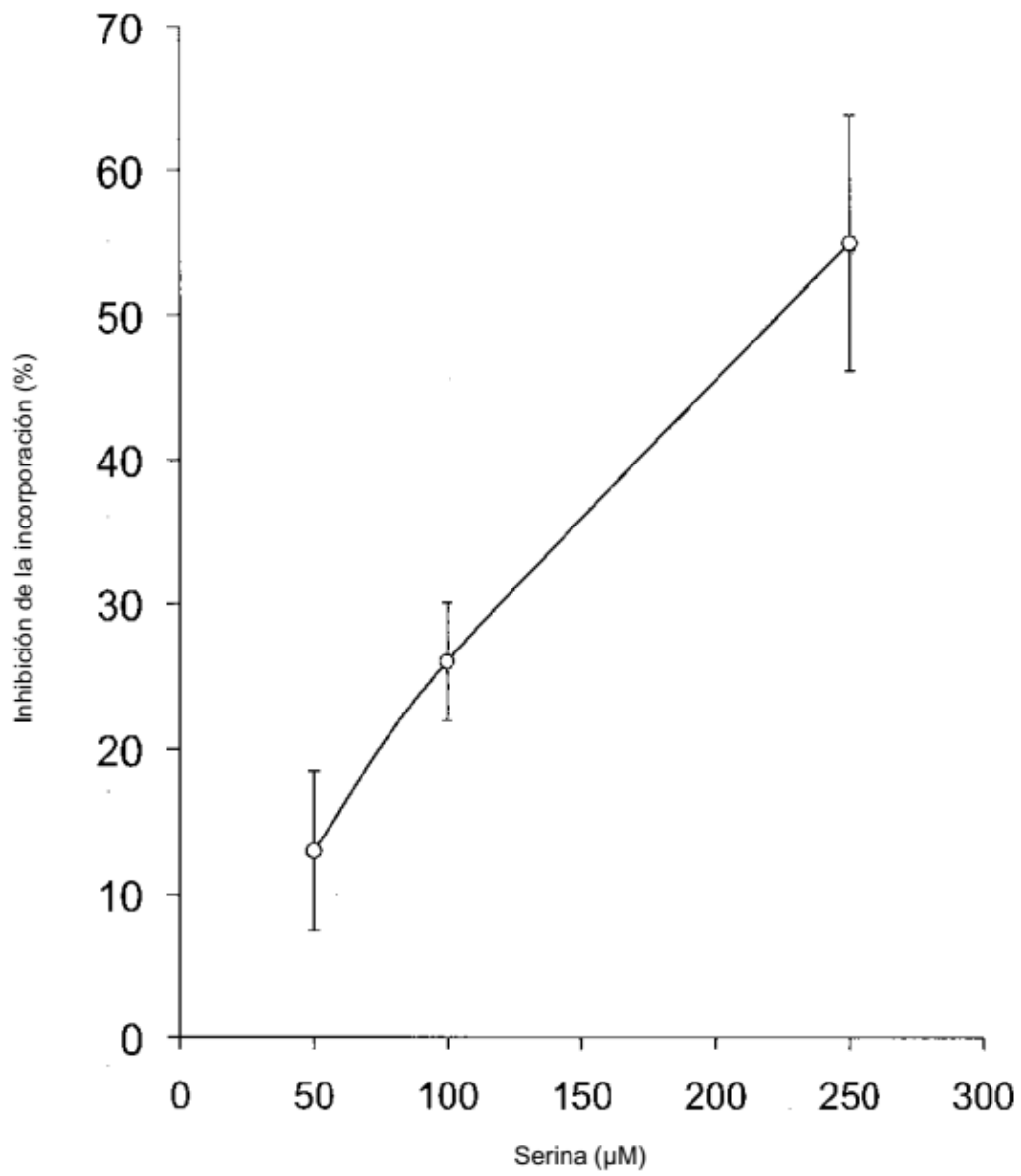


Figura 4B

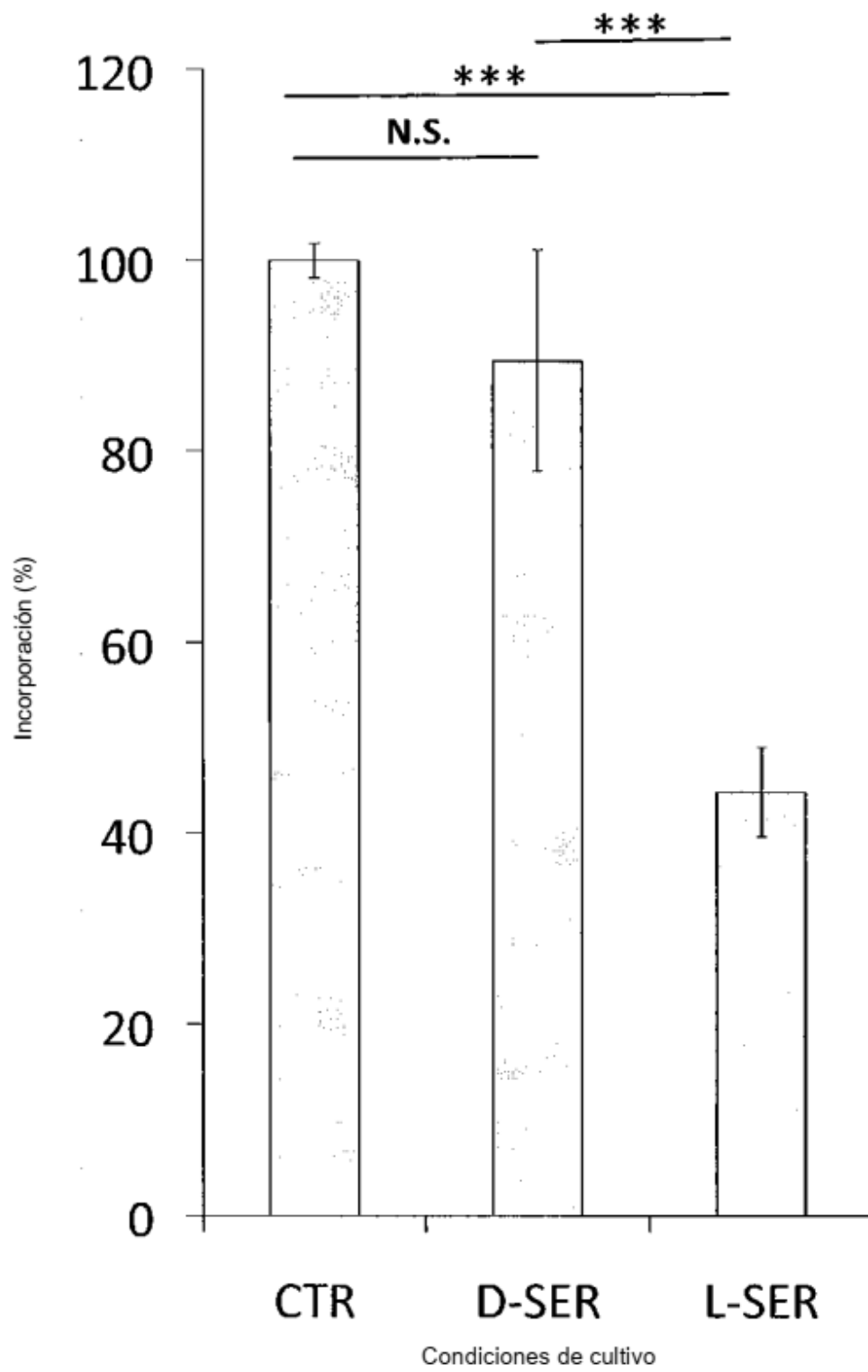
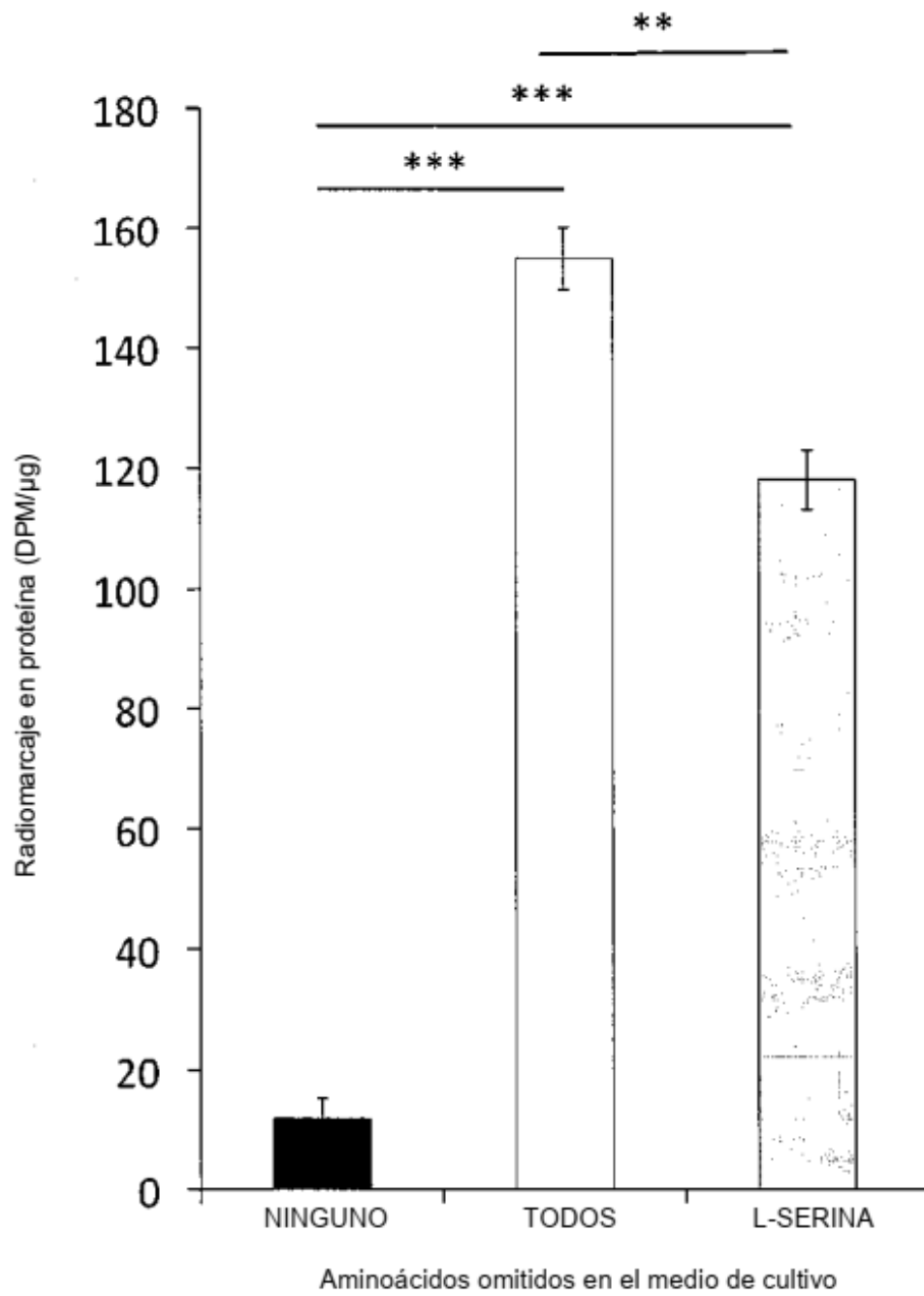


Figura 4C



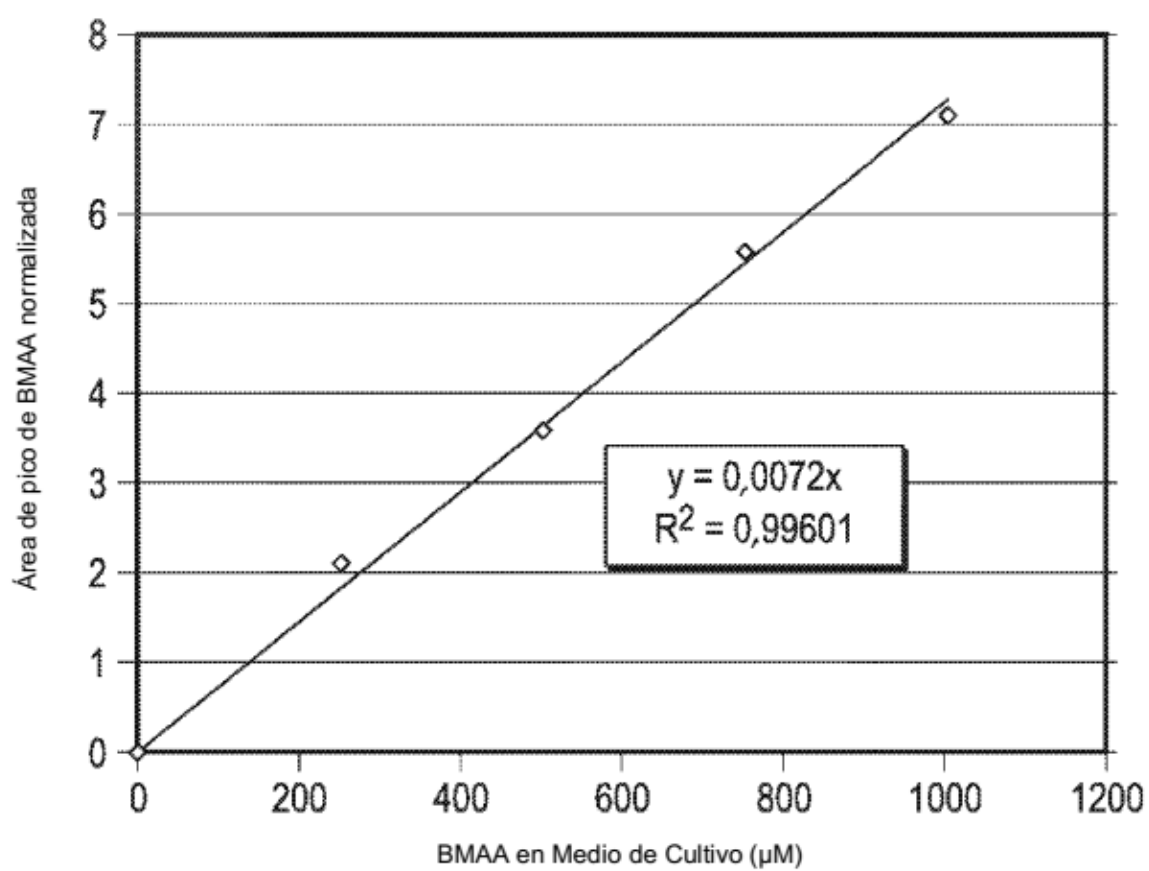


Figura 5

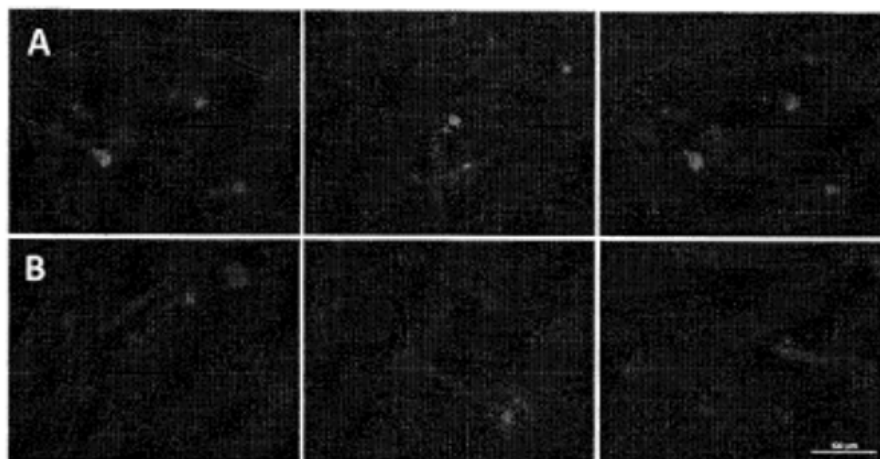


Figura 6A

Figura 6B

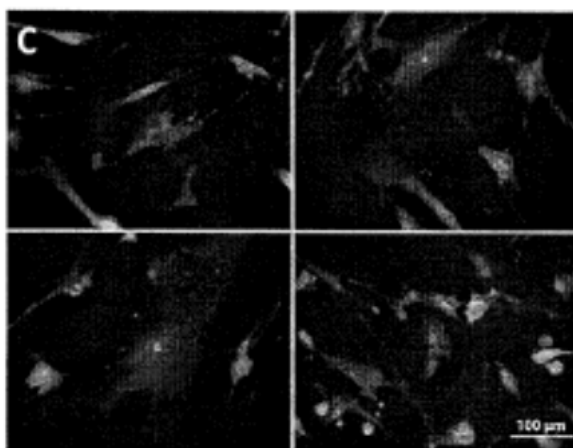


Figura 6C

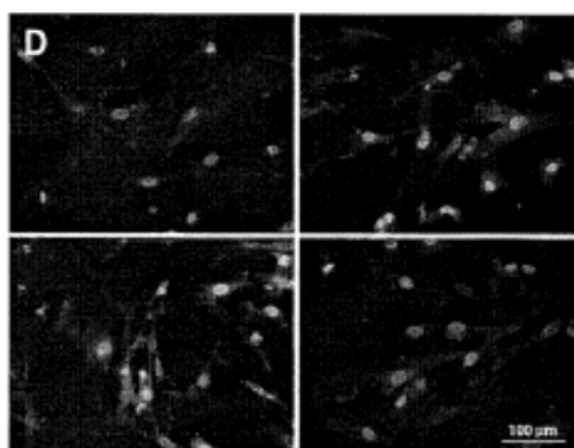


Figura 6D

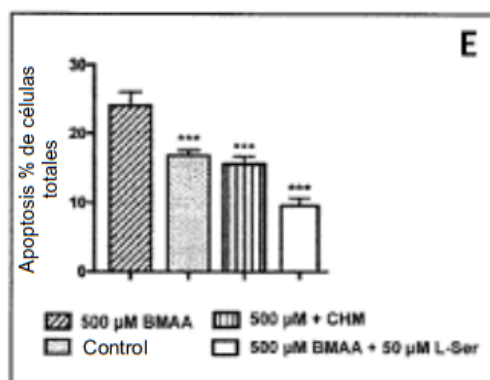


Figura 6E

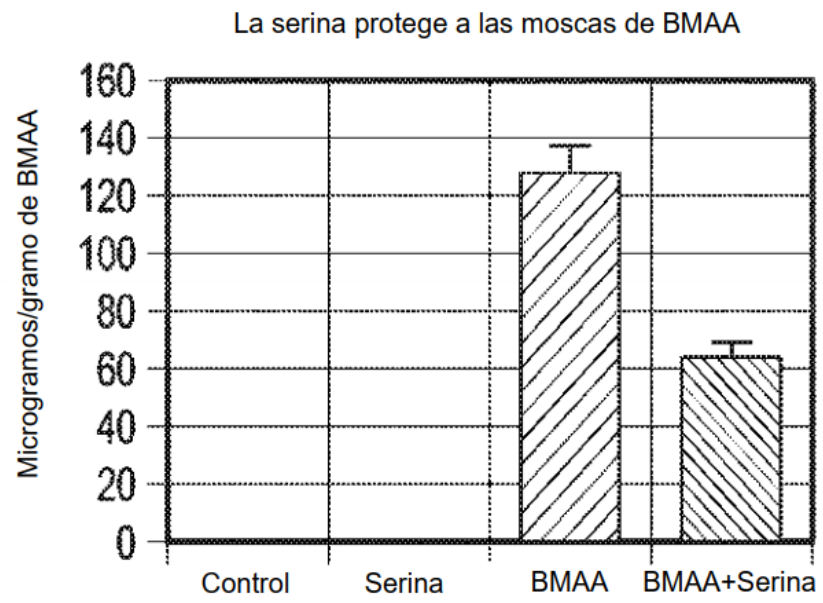


Figura 7

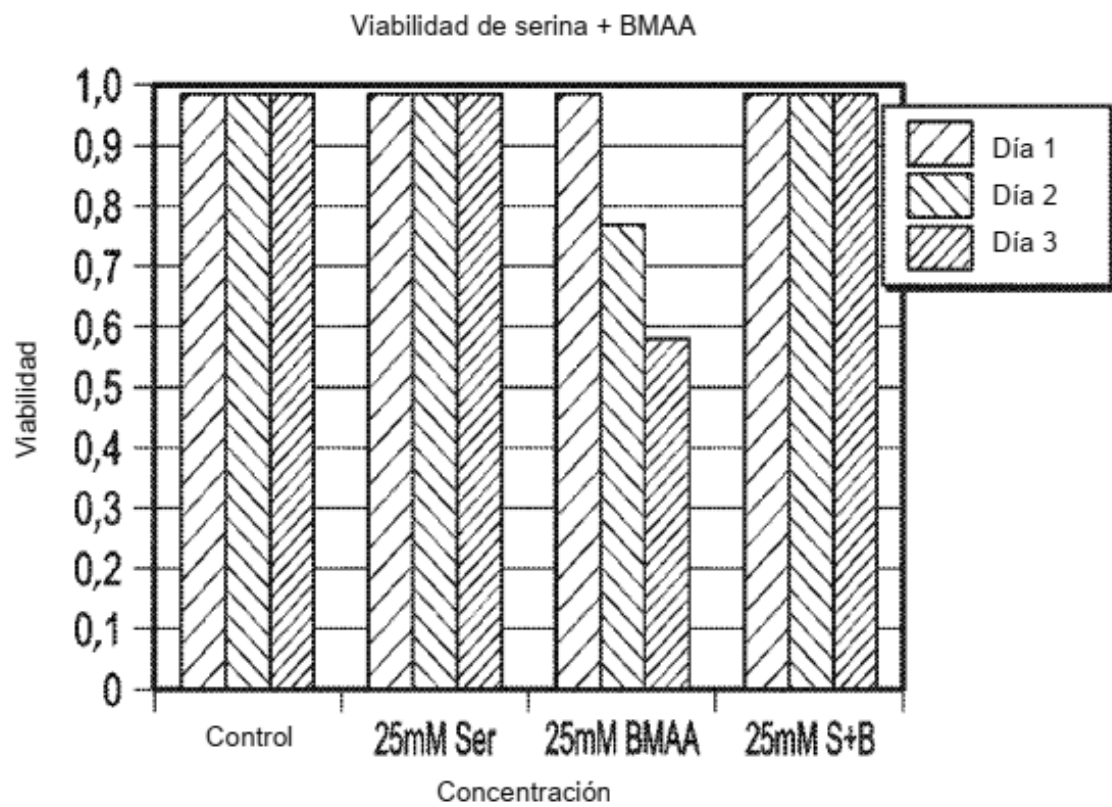
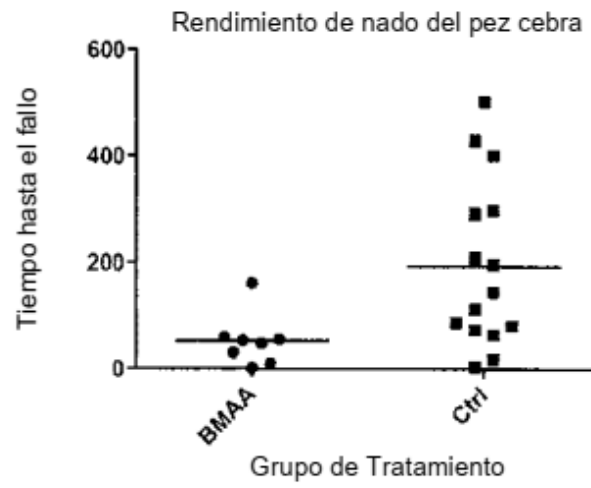


Figura 8

Figura 9



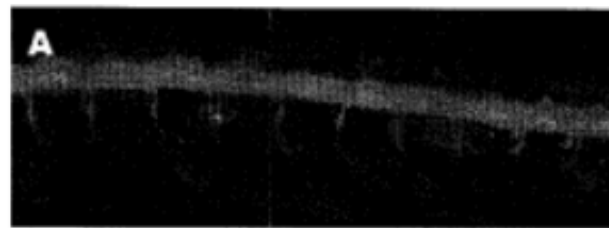


Figura 10A

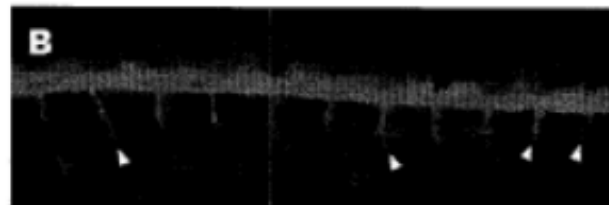


Figura 10B

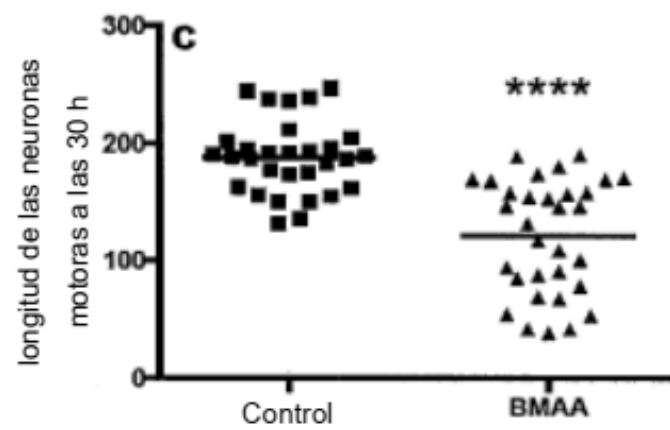


Figura 10C