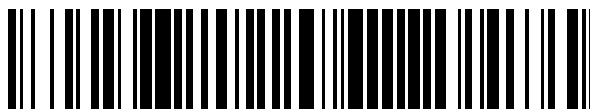


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 887**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01) C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/06	(2006.01)	
A61K 38/07	(2006.01)	
A61K 38/08	(2006.01)	
A61K 38/18	(2006.01)	
A61K 38/20	(2006.01)	
A61K 38/21	(2006.01)	
A61K 38/25	(2006.01)	
C07K 5/083	(2006.01)	
C07K 5/103	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012** **PCT/CU2012/000003**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013** **WO13004203**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 12743356 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2733149**

54 Título: **Compuestos y combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades cerebrales isquémicas y neurodegenerativas**

30 Prioridad:

01.07.2011 CU 20110146

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2017

73 Titular/es:

CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (100.0%)
Avenida 31 entre 158 y 19, Cubanacán, Playa La Habana 11600, CU

72 Inventor/es:

PENTON ROL, GISELLE;
LLOPIZ ARZUAGA, ALEXEY;
MARÍN PRIDA, JAVIER;
PENTÓN ARIAS, EDUARDO;
RODRÍGUEZ JIMÉNEZ, EFRAÍN;
MUSACCHIO LASA, ALEXIS;
BESADA PÉREZ, VLADIMIR, ARMANDO;
PARDO ANDREU, GILBERTO, LÁZARO;
GONZÁLEZ LÓPEZ, LUIS, JAVIER;
PAVÓN FUENTES, NANCY;
GUILLÉN NIETO, GERARDO, ENRIQUE y
LÓPEZ SAURA, PEDRO, ANTONIO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 601 887 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

Compuestos y combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades cerebrales isquémicas y neurodegenerativas

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con las Ciencias Biológicas, la Farmacología, la Neurobiología, la Biotecnología y las Ciencias Médicas, en especial con la Neurología y la Medicina Interna. En general, se relaciona con la generación de terapias para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) que cursan o son el resultado del daño isquémico, inflamatorio y/o neurodegenerativo.

La invención se basa en el empleo de derivados de la C-Ficocianina (C-Fico) o parte de ella, que presentan en su estructura anillos pirrólicos, para el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares, caracterizadas por hipoxia tisular y enfermedades con componente inflamatorio y neurodegenerativo. También comprende las combinaciones farmacéuticas de dichos compuestos con otras biomoléculas, las que son administradas tanto de forma profiláctica como terapéutica.

Estado de la técnica anterior

El tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares, desmielinizantes y neurodegenerativas representa una nueva frontera en el campo de las Neurociencias. Los accidentes vasculares encefálicos (AVE) afectan alrededor de un 5 % de la población mundial mayor de 65 años y pueden ocasionar serias discapacidades físicas en los individuos afectados (World Health Organization: Statistical Information System. World Health Organization, 2004). Más del 90 % de los fallecimientos ocurren en personas con más de 50 años y aproximadamente del 15 % al 30 % de los pacientes que sobreviven presentan algún tipo de secuela (Buerge-Zuaznabar M A, y otros, Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos: 2-22; Miranda Q J A. Cerebrovascular Diseases, 2004; 1: 17-21; Rosamond W, y otros Circulation. 2007:169-171).

Alrededor de un 80 % de los AVE, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), son de tipo isquémico y tienen su origen en la oclusión aguda por un trombo o un émbolo de una de las principales arterias cerebrales (World Health Organization: Statistical Information System. World Health Organization, 2004), lo que origina un descenso en la perfusión de la región irrigada por dicha arteria.

La neuroprotección es una estrategia de tratamiento profiláctico y terapéutico, cuyo objetivo fundamental es prevenir la pérdida neuronal patológica que ocurre en enfermedades del SNC, por ejemplo en la isquemia. La neurorregeneración tiene como objetivo fundamental revertir el daño ocurrido en las enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas como la Esclerosis Múltiple (EM).

Los principales objetivos en el tratamiento de la isquemia cerebral son: (1) reducir el tamaño de la zona isquémica, y limitar la posible extensión de esta zona a la adyacente; (2) limitar el avance progresivo de muerte celular a la zona recuperable de penumbra dentro de una ventana terapéutica adecuada (Muhammad S H A S. Eur Neurol. 2008; 59:4-14).

Los candidatos a nuevos agentes neuroprotectores y/o neurorregeneradores, deben bloquear y/o atenuar los procesos bioquímicos metabólicos celulares que conducen al daño cerebral progresivo durante y después del evento isquémico. Además, deben abarcar un amplio espectro de posibles blancos farmacológicos dentro del mecanismo patogénico del daño cerebral (Ovbiagele B, y otros Curr Treat Options Cardiovasc Med. 2003; 5:441-449).

Existen evidencias de compuestos extraídos de fuentes naturales con efectos neuroprotectores y/o neurorregeneradores tanto en trastornos de tipo isquémico como en enfermedades neurodegenerativas. Varios estudios indican que los cannabinoides naturales y sintéticos ejercen efectos neuroprotectores en la isquemia cerebral (Mauler F, y otros J Pharmacol Exp Ther. 2002; 302(1): 359-68; Iadecola C. Curr Opin Neurol. 2001; 14: 89-94; Sinor A D, y otros Neurosci Lett. 2000; 278(3): 157-60), esclerosis múltiple (Baker D, Pryce G, Croxford J L, Brown P, Pertwee RG, y otros Nature. 2000; 404(6773): 84-87), enfermedad de Huntington (Lastres-Becker I, y otros Brain Res. 2002; 929(2): 236-42) y en la enfermedad de Parkinson (Lange J M, y otros DDT. 2005; 10(10): 693-702) por medio de diferentes mecanismos antioxidantes y la inhibición de la excitotoxicidad a través de la disminución y bloqueo de la liberación de aminoácidos y mediadores de la inflamación.

A pesar de lo anteriormente expresado, existen importantes efectos adversos asociados a los cannabinoides que dependen, en gran medida, de la dosis-dependencia, de la concentración de compuestos cannabinoides en cada dosis, de la experiencia del consumidor y del tiempo de consumo.

Se han reportado efectos agudos que se deben en gran medida, a los efectos anticolinérgicos de los cannabinoides e incluyen: sequedad de boca, enrojecimiento ocular y visión borrosa, disminución de la tensión arterial, aumento de la

frecuencia cardíaca, disminución de la capacidad de reacción, incremento de las sensaciones percibidas, pérdida de coordinación y enlentecimiento psicomotor. También han sido reportados efectos crónicos, como son: alteración del sistema inmunológico con un posible incremento de la aparición de cáncer que supera, en el caso del cáncer de pulmón, a la probabilidad de aparición de esta enfermedad en fumadores de tabaco. Aumento del riesgo de infarto agudo de miocardio, infertilidad, fibrosis hepática en sujetos con hepatitis y continúa en debate el posible incremento del riesgo de epilepsia en consumidores de cannabinoides; y algunos efectos psíquicos, dado porque el consumo de cannabis puede desencadenar alteraciones de la percepción entre las que destacan alucinaciones, distorsión de la percepción témporo-espacial, o fenómenos de despersonalización y/o desrealización. También se han descrito crisis de ansiedad, crisis agudas de carácter psicótico, euforia, excesiva locuacidad, así como alteraciones de las funciones cognitivas como disminución de la memoria a corto plazo o el enlentecimiento en el pensamiento, alteraciones cognitivas no reversibles, empeoramiento de trastornos psiquiátricos previos, aumento de riesgo de aparición de esquizofrenia. También han sido descritos trastornos de humor (depresivos y/o maníacos), marginación social, así como dependencia del consumo de cannabis, que en algunos casos supone el inicio del consumo de otras drogas. Cabe destacar que el consumo de cannabis durante el embarazo puede derivar en alteraciones cognitivas y psicopatológicas de los hijos durante la adolescencia.

La C-Fico es una biliproteína, que se encuentra en algunas algas verde-azules como *Spirulina platensis*, la cual es frecuentemente utilizada como un suplemento dietético en muchos países y de la cual propiedades nutricionales y citoprotectoras han sido muy bien argumentadas (Bockow B I. United States Patent. No. 05709855 (1998); Kay, R.A. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1991; 30: 555-573; González De R C, y otros Life Sci. 1993; 53: 57-61).

Una gran parte de los estudios con C-Fico se han realizado con el propósito de demostrar sus propiedades antioxidantes. La acción secuestradora de radicales libres de C-Fico fue demostrada mediante un ensayo de: (1) quimioluminiscencia, y (2) de inhibición del daño a 2-desoxirribosa (Romay C, y otros Inflamm. Res. 1998; 47:36-41; Bhat V B, y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 275:20-25).

Se ha comprobado que la C-Fico inhibe significativamente el incremento de peróxidos lipídicos de microsomas del hígado de ratas después del tratamiento con ácido ascórbico + Fe^{2+} (Romay C, y otros Inflamm. Res. 1998; 47:36-41) o con hidrocloreuro 2,2' azobis 2-amidinopropano (HAAP). Este último es un iniciador de la formación de radicales libres (Bhat V B, y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 275:20-25), lo que indica que este compuesto es un buen agente inhibidor de la peroxidación lipídica.

Por otra parte, la C-Fico actúa como un agente anticarcinogénico por inhibición del daño oxidativo al ADN mediado por ONOO-, limitando la proliferación de tumores (Li B, y otros Biomed Pharmacother. 2005; 59: 551-60). Por otra parte, se demostró que este compuesto natural es un inhibidor de la agregación plaquetaria (Hui-Fen Ch, y otros British Journal of Nutrition. 2006; 95: 435440).

La C-Fico a una concentración de 1-3 mg/mL, previene la muerte neuronal causada por la ausencia de potasio y suero durante 24 h en un cultivo de células granulosas cerebrales (Rimbau V, y otros Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2001; 364:96-104).

La actividad de la C-Fico también fue examinada en un modelo de daño cerebral en ratas inducido por ácido kaínico (Rimbau V, y otros Neuroscience Letters. 1999; 276: 75-78). La administración de una dosis de 100 mg/kg de C-Fico redujo los signos y alteraciones evidenciadas en los animales tratados respecto al grupo control sin tratamiento. Adicionalmente, se ha demostrado que la C-Fico inhibe la COX-2 mediante: 1) el ensayo de enzima aislada y (2) el ensayo sanguíneo completo (Reddy C M, y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 277:599-603).

La C-Fico logró reducir el edema cuando se administró por vía oral a una dosis de 100-200 mg/kg en modelos de inflamación de la pata inducida por carragenina y glucosa oxidasa en ratón y rata (Romay Ch, y otros Pharm. Pharmacol. 2000; 52: 367-368; Madhyastha HK, y otros J Cell Mol Med. 2008), y en el modelo de inflamación de la oreja del ratón, inducida con ácido araquidónico (Romay Ch, y otros Pharm. Pharmacol. 2000; 52: 367-368).

Un trabajo de revisión publicado con anterioridad (Curr Protein Pept Sci. 2003 jun; 4(3):207-16) resume los principales estudios realizados con C-Fico en diferentes modelos animales. En la mayoría de los experimentos se necesitaron dosis elevadas de C-Fico (mayor de 100 mg/kg y hasta de 300 mg/kg) para que un efecto terapéutico fuese observado.

La Ficocianobilina (FCB) es el cromóforo de la C-Fico; desde el punto de vista químico se caracteriza por la presencia de anillos pirrólicos sin el fragmento proteico.

Los Interferones (IFN) fueron inicialmente descubiertos como proteínas solubles con actividad antiviral, y se pueden clasificar en: IFN tipo I (IFN alfa y beta) y tipo II (IFN gamma). Aunque generalmente se considera que los IFN alfa y beta utilizan un complejo receptor común, varios reportes sugieren que hay diferencias en las capacidades de los IFN alfa y beta para inducir ciertos efectos biológicos. Estos incluyen la inducción preferencial de un gen IFN-específico (Rani MRS, y otros J Biol Chem 1996, 271: 22878- 22884; Platanius LC, y otros J Biol Chem 1994, 269:17761-17764), efectos inhibitorios de diferentes factores de crecimiento (Rosenblum MG, y otros J Interferon Res 1990, 10: 141-151) y

efectos eritropoyéticos (Means RT, y otros Exp Hematol 1996, 24: 204-208). De lo anteriormente expresado, se deduce que un efecto biológico identificado para el IFN alfa no tiene que ser identificado también en el IFN beta y viceversa.

Una explicación posible para eventos de señalización diferentes entre los IFN alfa y beta es la existencia de la fosfoproteína asociada al receptor específico de IFN-beta, la cual parece ser tirosina fosforilada, y estar asociada con el receptor 1 del IFN alfa (IFNAR1) (Croze E, y otros J Biol Chem. 1996; 271: 33165- 33168; Platanias LC, y otros J Biol Chem. 1996, 271: 23630-23633).

Los mecanismos de acción del IFN alfa y el beta son muy complejos. Estas dos citocinas ejercen su acción por vías de señalización diferentes. El planteamiento anterior está sustentado en varias evidencias. Los estudios realizados en células UIA, en las cuales está ausente la JAK quinasa TYK2 (Velazquez L, y otros 1992. Cell 70: 313-322) mostraron que estas células no eran capaces de unir y responder a IFN alfa pero sí a IFN beta (Pellegrini S, y otros 1989. Mol Cell Biol 9, 4605-4612). Esto sugiere que los sitios de unión para IFN alfa requieren de la presencia de TYK2. En el caso de los sitios de unión para IFN beta estos se podrían formar en ausencia de TYK2.

Los Ensayos Clínicos (EC) realizados con IFN alfa en EM han mostrado baja eficacia (Gilhus EN, World Neurology 1995, 5: 10-12; Sheridan P (ed), Multiple Sclerosis Research in progress 1993-1994. Clinical Trials. International Federation of Multiple Sclerosis Societies, London, 1995, pp. 3-35; Trials with Alferon, human leukocyte interferon alpha. Clinical Trials Monitor, 1997; 4 (12): 4).

El IFN beta es uno de los fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para la EM, existen reportes que reflejan también una baja eficacia del mismo y la dependencia de dosis altas para lograr un efecto (Zaragozá García F y otros Farm Hospit. 2002; 26:294-301).

Adicionalmente, para la terapia con IFN, se han descrito efectos secundarios dependientes de la dosis y de la vía de administración. Los pacientes pueden experimentar reacciones pseudogripales como fiebre, mialgias, escalofríos y en general malestar entre las 24 y 48 horas después de cada inyección. La necrosis en el lugar de inyección tiene lugar en un 5 % de los pacientes.

Por otra parte, una de las principales acciones de la interleucina 2 (IL-2) *in vivo* es promover el desarrollo tímico y la expansión periférica de células T reguladoras (Treg). La pérdida de la actividad de las Treg en ratones deficientes de IL-2 o IL-2Rbeta produce una linfadenopatía severa dependiente de antígeno seguida de autoinmunidad fatal. La existencia de Treg dependientes de IL-2 se fundamenta por numerosos experimentos genéticos y de transferencia adoptiva. Recientemente se ha demostrado que las Treg tienen un papel esencial como moduladores cerebroprotectores en el daño inflamatorio cerebral post-isquémico (Liesz A y otros Nat Med 2009; 15, 192 - 199).

Las enfermedades autoinmunes como la EM y la isquemia cerebral se caracterizan por una deficiencia relativa en Treg. Por tanto, una expansión de las Treg podría mejorar estas patologías. La IL-2 puede producir una expansión *in vivo* de las Treg lo que proporciona una aplicación clínica potencial de esta modalidad de tratamiento (Liu R. Eur J Immunol. 2010; 40:1577-89).

La IL-2, considerada un modificador de la respuesta biológica, se ha usado en el tratamiento del cáncer como el melanoma y el carcinoma de células renales así como el HIV. Se ha probado el uso de la IL-2 en regímenes con dosis elevadas, puesto que a dosis bajas no siempre se logra el efecto terapéutico deseado.

El régimen con dosis elevadas supone la administración de IL-2 por vía intravenosa cada ocho horas, en la medida que el paciente lo tolere, hasta alcanzar 15 dosis. Este régimen tiene efectos secundarios significativos, que aunque en la mayoría de los casos son reversibles cuando se interrumpe el tratamiento, debido a la gravedad de algunos de ellos, los pacientes son hospitalizados y algunas veces requieren cuidados de terapia intensiva mientras reciben este fármaco.

Otro producto de especial interés es el péptido conocido como GHRP-6 ("Growth Hormone Releasing Peptide-6"). Este péptido, que fue originalmente descrito como un agente derivado de la metaencefalina intestinal, posteriormente mostró un inesperado efecto secretagogo de la hormona de crecimiento (GH) en diferentes especies de mamíferos - incluyendo a los humanos (Bowers CY, y otros Endocrinology. 1984, 114: 1537-45; Pandya N, y otros J Clin Endocrinol Metab. 1998, 83:1186-9). Esta molécula ha sido administrada en humanos por vía endovenosa, como un agente secretagogo para el diagnóstico clínico diferencial de las diferentes formas de enanismo (Popovic V, y otros Lancet. 2000; 356: 1137-42).

El GHRP-6 incrementa la expresión del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) en el SNC (Frago L.M, y otros Endocrinology 2002, 143:4113-4122). El IGF-1 interviene en determinados procesos como son: (1) incrementar los eventos relacionados con maduración de los oligodendrocitos (Wilson H.C, y otros Glia 2003, 44:153-165), (2) bloquear las vías de apoptosis dependientes del TNF-alfa y (3) reducir la expresión de la molécula de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (Ito T, y otros Am. J. Pathol 2004, 164:623-634).

Se ha demostrado que la disminución de la secreción de GH e IGF-1 está relacionada con los procesos isquémicos cerebrales, los cuales son más frecuentes en personas de edad avanzada (Frutos MG, y otros *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007, 293:E1140-52).

- 5 El envejecimiento del eje GH/IGF-1 deberá ser restaurado con tratamientos que estimulen la producción y secreción de GH. El tratamiento sistémico crónico de ratas adultas con GHRP-6 incrementa los niveles de IGF-1 en varias regiones cerebrales como el hipotálamo y el cerebelo. Además, cascadas de señalización intracelular normalmente asociadas con acciones anti-apoptóticas son activadas en estas áreas. El glutamato de sodio en concentraciones anormalmente elevadas puede provocar la sobre-excitación de neuronas provocando daño y/o muerte celular. El GHRP-6 revierte la muerte celular inducida por glutamato mediante la disminución de la activación de las caspasas 7 y 9 (Delgado-Rubín de Céliz A, y otros *J Neurochem* 2006, 99:839-49).

- 15 A pesar del éxito de los péptidos sintéticos secretagogos de la GH, existe la problemática que tienen que ser inyectados en la mayoría de los casos varias veces al día, son costosos, tienen efectos secundarios y, probablemente, regulan los receptores internamente en la cascada de señalización, lo que significa que sus efectos disminuyen con el tiempo. Los efectos secundarios asociados con las inyecciones de GHRP-6 son: cáncer, hipotensión, enfermedad cardíaca congestiva, sangramiento incontrolado, síndrome del túnel carpiano, disminución de la sensibilidad a la insulina, hipoglicemia, ginecomastia, edema, leucemia en niños, cetogénesis y reacciones alérgicas.

- 20 La eritropoyetina (EPO) actúa de forma inespecífica sobre componentes de la "cascada final común" que determina la severidad o la progresión en un gran número de enfermedades cerebrales completamente diferentes. La EPO, tiene efectos anti-apoptóticos, antiinflamatorios, antioxidantes, neurotróficos, angiogénicos y moduladores de células madres, por lo que pudiera influenciar la plasticidad neural. Se han reportado propiedades protectoras y regeneradoras de la EPO, así como el mejoramiento de la función cognitiva en varios modelos animales de enfermedades neurológicas y psiquiátricas. El "Göttingen-EPO-stroke trial" aportó las primeras evidencias prometedoras en humanos para una terapia neuroprotectora en las enfermedades cerebrales agudas. El tratamiento experimental con EPO para mejorar la función cognitiva en pacientes con esquizofrenia representa una nueva estrategia para una enfermedad cerebral crónica. Un ensayo exploratorio en EM crónica progresiva, como ejemplo de enfermedad inflamatoria del sistema nervioso, arrojó los primeros resultados positivos del tratamiento con EPO sobre las funciones motoras y cognitivas. (Ehrenreich H, y otros (2008) *J Ren Nutr.* 18:146-53). La EPO tiene funciones hematopoyéticas en el cerebro y en otros órganos, particularmente durante el desarrollo. La asialoEPO, o EPO con bajo contenido en ácido siálico, ha sido identificada como un agente neurotrófico y neuroprotector en una amplia variedad de contextos experimentales, desde cultivos de células neuronales hasta modelos *in vivo* de daño cerebral. Han sido reconocidos diferentes mecanismos por los cuales la asialoEPO produce neuroprotección: i) disminución de la toxicidad por Glutamato de sodio, ii) inducción de la generación de factores anti-apoptóticos neuronales, iii) reducción de la inflamación, iv) disminución del daño mediado por óxido nítrico y, v) tiene efectos antioxidantes directos. Existen evidencias que sugieren que la asialoEPO puede ser una nueva estrategia para una gran variedad de desórdenes del SNC en adultos y niños, especialmente como una posible alternativa para la asfixia perinatal (S Juul. (2002) *Acta Paediatrica* 91 s438: 36-42).

- 40 El infarto isquémico está asociado con una variedad de cambios patofisiológicos que afectan el tejido cerebral neuronal y glial. Estos cambios se traducen en la liberación de proteínas específicas a sangre periférica. La proteína enolasa neurona-específica, la proteína S100B y la proteína específica fibrilar glial son posibles marcadores de daño cerebral post-infarto en humanos.

- 45 Aunque las proteínas EPO y asialoEPO se han empleado en el tratamiento de la isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas, también se han reportado efectos adversos asociados a su uso. La terapia con EPO y el aumento del hematocrito se asocian con efectos adversos como hipertensión y trombosis. En estos casos, también se justifica el uso de combinaciones de fármacos que muestren mayor eficacia, lo que pudiera conllevar al uso de dosis menores, otras vías de administración y disminución de efectos adversos.

- 50 Por tanto, existe la necesidad de encontrar medicamentos o combinaciones de moléculas más potentes para la terapia de las enfermedades del SNC con daño isquémico y neurodegenerativo de forma que disminuyan los eventos adversos asociados a las altas dosis de los medicamentos existentes necesarias para lograr el efecto deseado.

- 55 Romay, Ch., y otros, describen que la Ficocianina (Pc) es una ficobiliproteína que según se ha reportado recientemente exhibe una variedad de propiedades farmacológicas. (Romay, Ch., y otros, *Current Protein and Peptide Science*, 2003, 4, 207-16).

- 60 Arciero, D. M. y otros, describen la digestión con tripsina del aducto de apoficocianina-ficoeritrobilina (PEB) y la purificación de los péptidos de bilina resultantes (Arciero, D. M. y otros, *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, Vol. 263, núm. 34, edición de diciembre 5, pp. 18358-18363).

Descripción de la invención

- 65 La presente invención resuelve el problema antes mencionado al proveer péptidos cromogénicos (FCB-aa) con las secuencias que se muestran en el Listado de Secuencias y que tienen en su estructura un sistema tetrapirrólico. Por

primera vez se demuestra que estos compuestos tienen propiedades que avalan su uso en la profilaxis o el tratamiento de la isquemia o la degeneración tisular. En una modalidad particular se pueden emplear para el tratamiento de enfermedades cerebrales isquémicas y neurodegenerativas.

- 5 Los péptidos cromogénicos o FCB-aa de la invención consisten en secuencias de entre 3-6 aminoácidos de las cadenas alfa (α -C-Fico) y beta (β -C-Fico) de la C-Fico, obtenidos por digestión enzimática de la misma.

Estos péptidos son:

- 10 sec. con núm. de ident. 1: ⁷⁹MAABLR⁸⁴ (β -C-Fico);
 sec. con núm. de ident. 2: ⁸⁴BAR⁸⁶ (α -C-Fico);
 sec. con núm. de ident. 3: ⁸⁰AABLR⁸⁴ (β -C-Fico);
 sec. con núm. de ident. 4: ⁸²BLR⁸⁴ (β -C-Fico);
 sec. con núm. de ident. 5: ⁸¹ABLR⁸⁴ (β -C-Fico)

- 15 Donde B (en negritas) es una cisteína que tiene unida covalentemente la ficocianobilina (FCB).

Es también un objetivo de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido identificado como sec. con núm. de ident. 1-5 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 20 Una novedad de la invención consiste en demostrar un efecto neuroprotector y neuroregenerador superior de los péptidos cromogénicos y la FCB, respecto a la C-Fico, al mostrar protección del daño inducido por glutamato de sodio, mecanismo que remedia la isquemia cerebral, en la línea celular PC12 y en los modelos animales de isquemia cerebral y EM.

- 25 Los péptidos FCB-aa y la FCB mostraron protección a concentraciones molares 25 veces menores para FCB-aa y 10 veces menores para FCB (2 μ M de FCB-aa y 5 μ M de FCB protegen el 100 % de las células sometidas al daño), mientras que se necesitó 50 μ M de C-Fico para proteger alrededor del 75 % de las células.

- 30 Adicionalmente, en una modalidad particular, se demostró una reducción del volumen del infarto en el modelo de isquemia I/R cerebral en Gerbils de Mongolia, cuando los animales fueron tratados con FCB-aa y FCB. Los resultados demuestran una efectividad superior para la FCB-aa (49,2 %) respecto a la FCB (43,1 %).

- 35 Por tanto, es también objeto de la presente invención el uso de un compuesto seleccionado del grupo compuesto por los péptidos identificados como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5, denominados FCB-aa de forma abreviada, y la FCB, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la isquemia o la degeneración tisular. En una modalidad particular, dicho medicamento se usa en la profilaxis o tratamiento de enfermedades del SNC que cursan con daño isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo.

- 40 Otro aspecto de la invención es que proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de la isquemia o la degeneración tisular que se caracteriza porque se administra una composición farmacéutica que comprende un compuesto seleccionado del grupo compuesto por los péptidos identificados en la presente invención como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y la FCB a un sujeto que lo necesita. En una modalidad particular, el método de la invención se caracteriza porque la isquemia o la degeneración tisular causa enfermedades del SNC que cursan con daño isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo.

- 45 En otra modalidad, la invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende un primer componente, seleccionado del grupo compuesto por los péptidos identificados en la presente invención como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y la ficocianobilina, y un segundo componente, seleccionado del grupo compuesto por Interferones del tipo I, que incluyen a los interferones alfa (IFN-a) y beta (IFN-b), interleucina-2 (IL-2), Eritropoyetina (EPO), asialoEPO y el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento humana (GHRP-6).

- 50 El efecto sinérgico de sus componentes activos, referente a sus propiedades neuroprotectoras y/o neuroregeneradoras, hace racional su uso en la isquemia cerebral de diferentes orígenes y en enfermedades neurodegenerativas como la EM, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia espinocerebelosa, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson.

- 55 Aunque los IFN alfa y beta son de la familia de interferones Tipo I y usan un complejo receptor común, un número de observaciones sugieren que existen diferencias en las propiedades de los IFN alfa y beta para inducir ciertos efectos biológicos.

- 60 En una modalidad particular se realizó la evaluación de la combinación FCB-aa/IFN-a y FCB/IFN-a en un esquema profiláctico en el modelo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) y se demostró un efecto sinérgico de las combinaciones mencionadas respecto a los principios activos independientes, en cuanto a la prevención del desarrollo de la enfermedad.

65

En otra modalidad particular, se evaluaron las combinaciones FCB-aa y FCB con IFN-a y con IFN-b comparándolas con sus principios activos independientes, se administraron a dosis de 3,375 mg/Kg de FCB-aa, 750 µg/Kg de FCB y 500 ng/Kg para ambos IFN, mostrando una eficacia relativa a disminución del volumen del infarto cerebral de 83,3 % y 89,3 %, para las combinaciones del IFN-a con la FCB y FCB-aa, respectivamente; y 87,0 % y 93,6 %, para las combinaciones del IFN-b con la FCB y FCB-aa, respectivamente, superior a la de los principios activos por separado en el modelo de I/R cerebral en gerbils de Mongolia.

Adicionalmente, en otra modalidad particular, se evaluaron las combinaciones FCB-aa/IFN-b y FCB/IFN-b, donde se administraron a una dosis diaria de 3,375 mg/Kg de FCB-aa/Kg, 750 µg/Kg de FCB y 6 dosis de 500 ng/Kg de IFN-b. Los resultados mostraron una eficacia relativa a disminución de los síntomas clínicos superior a la de los principios activos por separado en el modelo de EAE. Por lo tanto, un efecto terapéutico en el modelo animal de EAE también fue demostrado.

Otras modalidades incluyeron las evaluaciones de las combinaciones de FCB-aa/IFN-b y FCB/IFN-b como una combinación farmacéutica administrada por diferentes vías (intraperitoneal, nasal, oral y rectal) en el modelo de EAE, demostrándose un efecto farmacológico similar referente a los signos clínicos. Los compuestos que forman parte de las mencionadas combinaciones farmacéuticas pueden aplicarse simultáneamente o por separado en un mismo individuo en el curso de un único tratamiento. Las combinaciones farmacéuticas referidas en esta invención pueden ser para la administración parenteral, nasal, oral o rectal; con un excipiente apropiado para dichas rutas.

En otra modalidad particular, se evaluó el efecto de la FCB-aa, la FCB y la IL-2 en la isquemia cerebral. La combinación FCB-aa/IL-2 y FCB/IL-2 tuvo un efecto sinérgico en cuanto a reducción del volumen del infarto cerebral respecto a los componentes activos independientes (49,2 % de efectividad para FCB-aa, 43,1 % de efectividad para FCB, 25,8 % para IL-2 y 84,3 % para la combinación FCB-aa/IL-2 y 74,5 % para la combinación FCB/IL-2) en el modelo de isquemia cerebral en gerbils de Mongolia.

Por otra parte, se realizó la evaluación de la combinación FCB/GHRP-6 y los principios activos independientes los que se administraron por vía intraperitoneal en el modelo animal I/R cerebral en gerbils de Mongolia. Desde el punto de vista morfométrico se observó un efecto sinérgico en la combinación, que tuvo un valor de 85 % de efectividad; respecto a 35,8 % para la FCB y 36,1 % para el GHRP-6.

Otra novedad de esta invención consiste en el efecto sinérgico relativo a la reducción del volumen del infarto demostrado para las combinaciones FCB-aa/EPO y FCB-aa/asialoEPO; respecto a los componentes por separado (efectividad de 49,2 % de la FCB-aa, 36,9 % de la EPO, 39,4 % de la asialoEPO, 87,7 % de la combinación FCB/EPO, 90,5 % de la combinación FCB/asialoEPO, 91,7 % de la combinación FCB-aa/EPO y 94,5 % de la combinación FCB-aa/asialoEPO). Lo anterior hace racional el uso de dichas combinaciones en el tratamiento de enfermedades del SNC que cursan, o son el resultado, del daño isquémico.

Los componentes que forman la combinación terapéutica de la invención pueden ser administrados de forma simultánea o secuencial a un mismo individuo en el curso de un tratamiento médico.

Es también un objetivo de la invención el uso de la combinación farmacéutica que comprende un primer componente, seleccionado del grupo compuesto por los péptidos identificados en la presente invención como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y la ficocianobilina, y un segundo componente, seleccionado del grupo compuesto por IFN del tipo I, que incluye los IFN alfa (IFN-a) y beta (IFN-b), interleucina-2 (IL-2), Eritropoyetina (EPO), asialoEPO y el péptido secretagogo de la GH humana (GHRP-6), para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades del SNC de origen isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo. En un aspecto de la invención dicho medicamento protege el parénquima cerebral dañado a consecuencia de enfermedades agudas o crónicas.

La invención comprende además un método para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades del SNC de origen isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo, que se caracteriza porque se administra una combinación farmacéutica que comprende: un primer componente, seleccionado del grupo compuesto por los péptidos identificados en la presente invención como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y la ficocianobilina; y un segundo componente seleccionado del grupo compuesto por Interferones del Tipo I, que incluye el interferón alfa (IFN-a) y el interferón beta (IFN-b), interleucina-2 (IL-2), Eritropoyetina (EPO), asialoEPO y el péptido secretagogo de la hormona de crecimiento humana (GHRP-6) a un sujeto que lo necesita. Dicho método se caracteriza porque los componentes que forman la combinación pueden ser administrados de forma simultánea o secuencial a un mismo sujeto en el curso de un tratamiento médico. En una modalidad particular de la invención, dicho tratamiento se aplica a la isquemia cerebral de diferentes orígenes, la EM, la Enfermedad de Alzheimer, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la Ataxia Espinocerebelosa, la Enfermedad de Huntington y la Enfermedad de Parkinson.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización por espectrometría de masas de la FCB obtenida por tratamiento metanólico (**A**) y de los péptidos cromogénicos obtenidos por digestión con tripsina, definidos en conjunto como FCB-aa, **B**: sec. con núm. de ident. 1; **C**: sec. con núm. de ident. 2; **D**: sec. con núm. de ident. 3-5.

Figura 2. Estudio "*in vitro*" del efecto neuroprotector de la C-Ficocianina (C-Fico) (**A**) y de la FCB y FCB-aa (**B**) ante el daño inducido por Glutamato de sodio (50 mM) en la línea neuronal PC12. Los símbolos indican la presencia (+), la ausencia (-) o las concentraciones de los respectivos compuestos en el medio de cultivo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, según un ANOVA seguido de la prueba de Newman-Keuls de comparaciones múltiples, $p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ el Error Estándar Medio (EEM).

Figura 3. Efecto del tratamiento terapéutico con los FCB-aa (péptidos 1 al 5) sobre el volumen de infarto cerebral, 24 h después de la oclusión transitoria (10 min) de las Arterias Carótidas Comunes (ACC) en gerbils de Mongolia. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas, según un ANOVA seguido de la prueba de Newman-Keuls de comparaciones múltiples, $p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ EEM.

Figura 4. Efecto del tratamiento terapéutico con la FCB, FCB-aa (péptido 1), IFN-a e IFN-b y las combinaciones FCB/IFN-a, FCB/IFN-b, FCB-aa/IFN-a y FCB-aa/IFN-b sobre el volumen de infarto cerebral, 24 h después de la oclusión transitoria (10 min) de las ACC en gerbils de Mongolia. Letras diferentes indican las diferencias significativas con respecto al grupo I/R + salina, $p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ EEM.

Figura 5. Efecto de las combinaciones FCB-aa (péptido 1)/IFN-b, FCB/IFN-b y sus principios activos independientes sobre el curso clínico de la EAE en ratones C57BL6. Los valores están graficados como los promedios del índice clínico de cada grupo.

Figura 6. Efecto de la combinación FCB-aa (péptido 1)/IFN-b administrada por diferentes vías: intraperitoneal, nasal, oral y rectal sobre el índice clínico de los ratones C57BL6 enfermos de EAE. Los valores están graficados como los promedios del índice clínico de cada grupo.

Figura 7. Efecto terapéutico con la FCB, FCB-aa (péptido 2), la IL-2, o las combinaciones FCB/IL-2 y FCB-aa (péptido 2)/IL-2, sobre el volumen de infarto cerebral, 24 h después de la oclusión transitoria (10 min) de las ACC en gerbils de Mongolia. Letras diferentes indican las diferencias significativas con respecto al grupo I/R + salina, $*p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ EEM.

Figura 8. Evaluación morfométrica del efecto terapéutico con FCB-aa (péptido 3), el péptido GHRP-6, o su combinación en gerbils de Mongolia sujetos a la oclusión transitoria (10 min) de las ACC. **A**: imágenes representativas (aumento 4x) del hipocampo izquierdo de animales falsamente operados (sham), o tratados con solución salina, o con FCB-aa (péptido 3) y GHRP-6 (6,25 μ g/kg, vía intraperitoneal), o con FCB-aa (péptido 3)/GHRP-6 (manteniendo la dosis y la vía de administración correspondiente) por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico. **B**: conteo celular bilateral realizado en las regiones C2, CA3 y CA4 de ambos hipocampos para cada grupo experimental. Letras diferentes indican las diferencias significativas con respecto al grupo I/R + salina, $*p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ EEM.

Figura 9. Efecto del tratamiento terapéutico con la FCB, FCB-aa (péptido 4), EPO, asialoEPO, o sus respectivas combinaciones FCB/EPO, FCB/asialoEPO, FCB-aa (péptido 4)/EPO y FCB-aa (péptido 5)/asialoEPO sobre el volumen de infarto cerebral, 24 h después de la oclusión transitoria (10 min) de las ACC en gerbils de Mongolia. Letras diferentes indican las diferencias significativas con respecto al grupo I/R + salina, $p < 0,05$. Los valores están graficados como medias $\pm$ EEM.

Descripción detallada de las modalidades preferidas/ Ejemplos

Ejemplo 1. Espectrometría de masas de la ficocianobilina obtenida por tratamiento metanólico (FCB) y de los péptidos cromogénicos (FCB-aa).

La Figura 1A muestra la señal m/z 587,26 correspondiente al cromóforo FCB, obtenido por ultrafiltración diferencial del extracto metanólico de la C-Fico.

Las Figuras 1 B, C y D muestran el patrón de espectrometría de masas de FCB-aa obtenidos por digestión con tripsina de la C-Fico.

Ejemplo 2. Efecto neuroprotector de la C-Fico, la FCB y los FCB-aa ante el daño inducido por Glutamato de sodio en la línea celular PC12.

Las células PC12 ($1,5 \times 10^4$ células/pozo) fueron pre-tratadas con C-Fico (25, 50 μ M) o FCB (0,5; 1; 5 μ M) o FCB-aa (0,25; 1; 2 μ M), durante 24 h, y luego sometidas a la co-incubación con 50 μ M de Glutamato de sodio junto al producto correspondiente (diferentes dosis) durante 4 h. Se midió la viabilidad celular por el método del bromuro de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés) y se reportó el por ciento respecto al control, como se muestra en la Figura 2. Se puede observar que para lograr una viabilidad celular similar a la de la C-Fico se

necesitaron concentraciones menores de FCB y FCB-aa. Las concentraciones del FCB-aa (péptido 1) que lograron un efecto similar que la FCB y la C-Fico fueron incluso menores respecto a dichos compuestos.

Ejemplo 3. Demostración de las propiedades neuroprotectoras y/o neuroregeneradoras de los péptidos FCB-aa, a través de la reducción del volumen del infarto, en el modelo de I/R en gerbils de Mongolia.

Los animales fueron tratados con solución salina o con una dosis acumulativa de los péptidos FCB-aa (3,375 mg/kg cada uno), por vía intraperitoneal por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico.

El por ciento de efectividad de cada tratamiento se calculó según la siguiente fórmula: % de efectividad = $(1 - V_i / V_i/R) \times 100$. V_i : volumen de infarto del grupo isquémico tratado con el producto correspondiente; V_i/R : volumen de infarto del grupo isquémico tratado con solución salina.

Como se observa en la Figura 3, los animales tratados con los péptidos cromogénicos (FCB-aa) que consisten en las sec. con núm. de ident.: 1 a la sec. con núm. de ident.: 5, mostraron una reducción significativa del volumen de infarto respecto al grupo isquémico tratado con solución salina.

Ejemplo 4. Efecto de las combinaciones FCB/ IFN-a, FCB-aa (péptido 1)/ IFN-a, FCB/IFN-b y FCB-aa (péptido 1)/IFN-b en el modelo de isquemia-reperfusión bilateral en Gerbils.

Los animales fueron tratados con solución salina (por vía intraperitoneal) o con los compuestos individuales a una dosis de FCB (750 µg/Kg, vía intraperitoneal), o FCB-aa (péptido 1) (3,375 mg/kg), IFN-a e IFN-b (500 ng/Kg, vía subcutánea) o con las combinaciones FCB/IFN-a, FCB/IFN-b, FCB-aa (péptido 1)/IFN-a y FCB-aa (péptido 1)/IFN-b según las dosis indicadas en la Figura 4 por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico. El por ciento de efectividad se calculó como se describe en el Ejemplo 3.

La disminución del volumen de infarto cerebral, por grupos, evidencia una efectividad de los tratamientos evaluados (Figura 4), observándose una reducción del índice de infarto en el grupo tratado con FCB con una eficacia de 43,1 %; con FCB-aa (péptido 1) de 49,2 %; en el grupo tratado con IFN-a de 35,4 %; con IFN-b de 37,0 %; en el grupo tratado con FCB/IFN-a de 83,3 %; FCB-aa (péptido 1)/IFN-a de 89,3 %; FCB/IFN-b de 87,0 %; y FCB-aa (péptido 1)/IFN-b de 93,6 %; evidenciándose un efecto sinérgico de ambos principios activos en los animales tratados con la combinación.

Ejemplo 5. Demostración del efecto farmacológico de las combinaciones FCB/ IFN-a y FCB-aa (péptido 1)/IFN-a respecto a los principios activos independientes, referente a los signos clínicos en el modelo de EAE.

Por otra parte, se realizó la evaluación de las combinaciones FCB/IFN-a y FCB-aa (péptido 1)/IFN-a en esquema profiláctico, en el modelo de EAE (Tabla 1), donde se demostró un efecto sinérgico de la combinación mencionada en cuanto a la prevención del desarrollo de la enfermedad, a las dosis anteriormente reflejadas.

Tabla 1. Evaluación de las combinaciones FCB-aa (péptido 1)/IFN-a y FCB/IFN-a y sus principios activos independientes en esquema profiláctico en el modelo de EAE.

Grupos	Incidencia (%)	Día de comienzo (Media ± DS)	Índice Clínico	
			Puntaje Clínico (Media ± DS)	Días de la enfermedad
Control	0	0	0	0
FCB-aa (péptido 1) (3,375 mg/Kg)	75	9,5 ± 0,2	1,23 ± 1,1	7,2 ± 0,3
FCB (750 µg/Kg)	70	10,5 ± 0,5	1,37 ± 1,7	8,5±0,1
IFN-a (500 ng/Kg)	60	10,7 ± 0,3	1,5 ± 1,6	7,3 ± 0,7
FCB-aa (peptide 1) (3,375 mg/Kg) + IFN-a (500 ng/Kg)	0	0	0	0
FCB-aa (péptido 1) (0,9 mg/Kg) + IFN-a (5000 ng/Kg)	12	11,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	4,5 ± 0,5
FCB (750 µg/Kg) + IFN-a (500 ng/Kg)	10	12,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	5,4 ± 0,6
FCB (300 µg/Kg) + IFN-a (5000 ng/Kg)	15	12,8 ± 0,3	1,12 ± 0,5	6,6 ± 0,2
EAE	100	10,2 ± 0,7	2,7 ± 0,4	15,2 ± 1,1

Como se muestra en la Tabla 1, las combinaciones con distintas dosis de FCB/IFN-a y FCB-aa (péptido 1)/IFN-a ofrecen una protección entre el 85 % y 100 % de los animales inducidos a desarrollar EAE, respectivamente.

Ejemplo 6. Demostración del efecto farmacológico de las combinaciones FCB/ IFN-b y FCB-aa (péptido 1)/IFN-b respecto a los principios activos independientes, referente a los signos clínicos en el modelo de EAE.

Para demostrar que el efecto farmacológico de las combinaciones FCB/IFNb y FCB- aa (péptido 1)/IFN-b, tanto en esquema profiláctico (Tabla 2) como en esquema terapéutico (Figura 5), respecto a la reducción de los signos clínicos en ratones C57BL6 se usaron los compuestos individuales siguientes: FCB (750 µg/kg, vía intraperitoneal), FCB-aa (3,375 mg/kg, vía intraperitoneal) administrados diariamente durante 15 días e IFNb (500 ng/Kg, vía subcutánea) 6 dosis, 3 veces a la semana, o sus combinaciones según las dosis indicadas en la Tabla 2.

El por ciento de efectividad de cada tratamiento se calculó según la siguiente fórmula: % de efectividad = $(1 - AC_i / AC_{EAE}) \times 100$. AC_i : área bajo la curva del grupo tratado con el producto correspondiente; AC_{EAE} : área bajo la curva del grupo EAE.

En el esquema profiláctico se realizó el tratamiento 15 días antes de la inducción de la EAE y en el esquema terapéutico a partir del comienzo de los signos clínicos. El grupo control corresponde a los animales sanos que no recibieron tratamiento alguno.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el esquema profiláctico, donde las combinaciones FCB/IFN-b y FCB-aa (péptido 1)/IFN-b protegieron entre el 90 % y 100 % de los animales del desarrollo de la EAE, respectivamente. Por lo tanto un efecto sinérgico fue observado respecto a los principios activos independientes.

Tabla 2. Evaluación de las combinaciones FCB-aa (péptido 1)/IFN-b y FCB/IFN-b, y sus principios activos independientes, en esquema profiláctico en el modelo de EAE.

Grupos	Incidencia (%)	Día de comienzo (Media ± DS)	Índice Clínico	
			Puntaje Clínico (Media ± DS)	Días de enfermedad
Control	0	0	0	0
FCB-aa (péptido 1) (3,375 mg/Kg)	70	9.5 ± 0,2	1,23 ± 1,1	7.2 ± 0,3
FCB (750 µg/Kg)	60	12,3 ± 0,1	1,55±0,3	7.3 ± 0,4
IFN-b (500 ng/Kg)	70	12,6 ± 0,5	1,4 ± 0,2	7.1 ± 0,3
FCB-aa(péptido 1) (3,375 mg/Kg) + IFN-b (500 ng/Kg)	0	0	0	0
FCB-aa (péptido 1) (0,9 mg/Kg) + IFN-a (5000 ng/Kg)	10	12,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	4.2 ± 0,2
FCB 750 µg/Kg) + IFN-b (500 ng/Kg)	5	12,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1	4.4 ± 0,3
FCB (300 µg/Kg) + IFN-b (5000 ng/Kg)	10	12,5 ± 0,2	1,21 ± 0,4	6.2 ± 0,1
EAE	100	10,1 ± 0,3	2,3 ± 0,6	1,2 ± 1,1

En la Figura 5 se observa una disminución de los signos clínicos superior a la obtenida con los principios activos independientes, FCB (750 µg/kg, vía intraperitoneal), FCB-aa (3,375 mg/kg, vía intraperitoneal), IFN-b (500 ng/Kg, vía subcutánea), evidenciando también en el esquema terapéutico un efecto sinérgico en el grupo tratado con las combinaciones en el modelo de EAE, FCB (750 µg/kg) / IFN-b (500 ng/Kg) o FCB-aa (3,375 mg/kg) / IFN-b (500 ng/Kg), con una efectividad de 87,7 % para la combinación FCB/IFN-b; 94,5 % para la combinación FCB-aa/IFN-b; 46,1 % para FCB; 53,9 % para la FCB-aa y 34,8 % para IFN beta.

Ejemplo 7. Demostración del efecto terapéutico de la combinación FCB-aa (péptido 1)/ IFNb por diferentes vías en el modelo de EAE.

Los animales del grupo EAE recibieron una administración diaria de solución salina por vía intraperitoneal. Los ratones tratados con la combinación FCB-aa (péptido 1)/IFN-b (FCB-aa 3,375 mg/kg + 500 ng de IFN-b/Kg) se dividieron en diferentes grupos, según la ruta de administración: intraperitoneal, oral, nasal y rectal. El esquema terapéutico se siguió por 15 días consecutivos, desde el día 9 y hasta el día 24 después de la inmunización. El grupo control corresponde a

los ratones sanos que no recibieron tratamiento alguno. La evaluación clínica se realizó en el día 27 después de la inmunización.

5 Como se evidencia en la Figura 6, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes vías evaluadas (intraperitoneal, nasal, oral y rectal), lo que indica que pueden ser usadas con igual efectividad.

Ejemplo 8. Efecto neuroprotector y/ neurorregenerador de la combinación FCB/IL-2 y FCB-aa (péptido 2)/IL-2 en el modelo de I/R bilateral en gerbils.

10 Los animales fueron tratados con solución salina (por vía intraperitoneal) o con una dosis acumulativa de FCB (750 µg/Kg, por vía intraperitoneal), FCB-aa (péptido 2) (3,375 mg/kg), IL-2 (100 ng/Kg, vía subcutánea) o con FCB/IL-2 y FCB-aa (péptido 2)/IL-2 (manteniendo la dosis y la vía de administración correspondiente) por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico. En la Figura 7 se observa una disminución del volumen de infarto cerebral por grupos.

15 El por ciento de efectividad de cada tratamiento se calculó como se describió en el Ejemplo 3, el que fue de 43,1 % para la FCB; 49,2 % para FCB-aa (péptido 2); 25,8 % para IL-2; 74,5 % para la combinación FCB/IL-2; y 84,3 % para FCB-aa (péptido 2)/IL-2), lo que evidencia un efecto sinérgico de ambos principios activos en los animales tratados con la combinación.

20 Ejemplo 9. Efecto terapéutico de la combinación FCB/GHRP-6 y sus principios activos independientes, en el modelo de isquemia-reperfusión bilateral en gerbils.

25 Se realizó la evaluación por morfometría del tratamiento terapéutico con FCB-aa (péptido 3), el péptido GHRP-6 o su combinación en gerbils de Mongolia sujetos a la oclusión transitoria (10 min) de las ACC. Se evaluaron dosis acumulativas de FCB-aa (péptido 3) (750 µg/Kg, por vía intraperitoneal), GHRP-6 (6,25 µg/kg, vía intraperitoneal), o con FCB-aa (péptido 3)/GHRP-6 (manteniendo la dosis y la vía de administración correspondiente) por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico. Se realizó conteo celular bilateral en las regiones C2, CA3 y CA4 para cada grupo experimental y se expresó en por ciento con respecto al grupo sham (control negativo o falsos operados). Los resultados permiten plantear que en los animales del grupo I/R, hubo una pérdida casi total de la línea de células que abarca prácticamente todas las zonas del hipocampo (CA2, CA3, CA4).

30 Se observó un efecto sinérgico en el grupo tratado con la combinación FCB-aa (péptido 3)/GHRP-6 (85 % de efectividad), respecto a los principios activos independientes con una efectividad de 35,8 % para el FCB-aa (péptido 3) y 36,1 % para el GHRP-6 (Figura 8).

35 Ejemplo 10. Efecto terapéutico de las combinaciones FCB/EPO, FCB-aa (péptido 4) /EPO, FCB/asialoEPO y FCB-aa (péptido 5) /asialoEPO y sus principios activos independientes en el modelo de I/R bilateral en gerbils.

40 Los animales fueron tratados con solución salina (por vía intraperitoneal) o con una dosis acumulativa de FCB (750 µg/Kg, por vía intraperitoneal), FCB-aa (péptido 4) 3,375 mg/kg, EPO (500 U/Kg, por vía intraperitoneal), asialoEPO (200 U/Kg, por vía nasal) o con FCB/EPO o FCB-aa (péptido 4)/EPO, FCB/asialoEPO y FCB-aa (péptido 5)/asialoEPO (manteniendo la dosis y la vía de administración correspondiente) por 30 min, 3, 6 y 12 h después del evento isquémico. Se realizó la evaluación del efecto terapéutico de las combinaciones y sus componentes independientes. El por ciento de efectividad de cada tratamiento fue calculado como se describe en el Ejemplo 3.

45 Se observó una disminución del volumen del infarto cerebral por grupos, lo que evidenció una efectividad de los tratamientos evaluados (Figura 9), con una reducción del volumen de infarto en el grupo tratado con FCB de 43,1 % de efectividad; FCB-aa (péptido 4) de 49,2 %; EPO de 36,9 %; asialoEPO de 39,4 %; y en mayor medida en los grupos tratados con FCB/EPO (87,7 % de efectividad), FCB/asialoEPO (90,5 % de efectividad), FCB-aa (péptido 4)/EPO (91,7 %) y FCB-aa (péptido 5)/asialoEPO (94,5 %), lo que evidencia un efecto sinérgico de los principios activos en las combinaciones.

55

LISTA DE SECUENCIAS

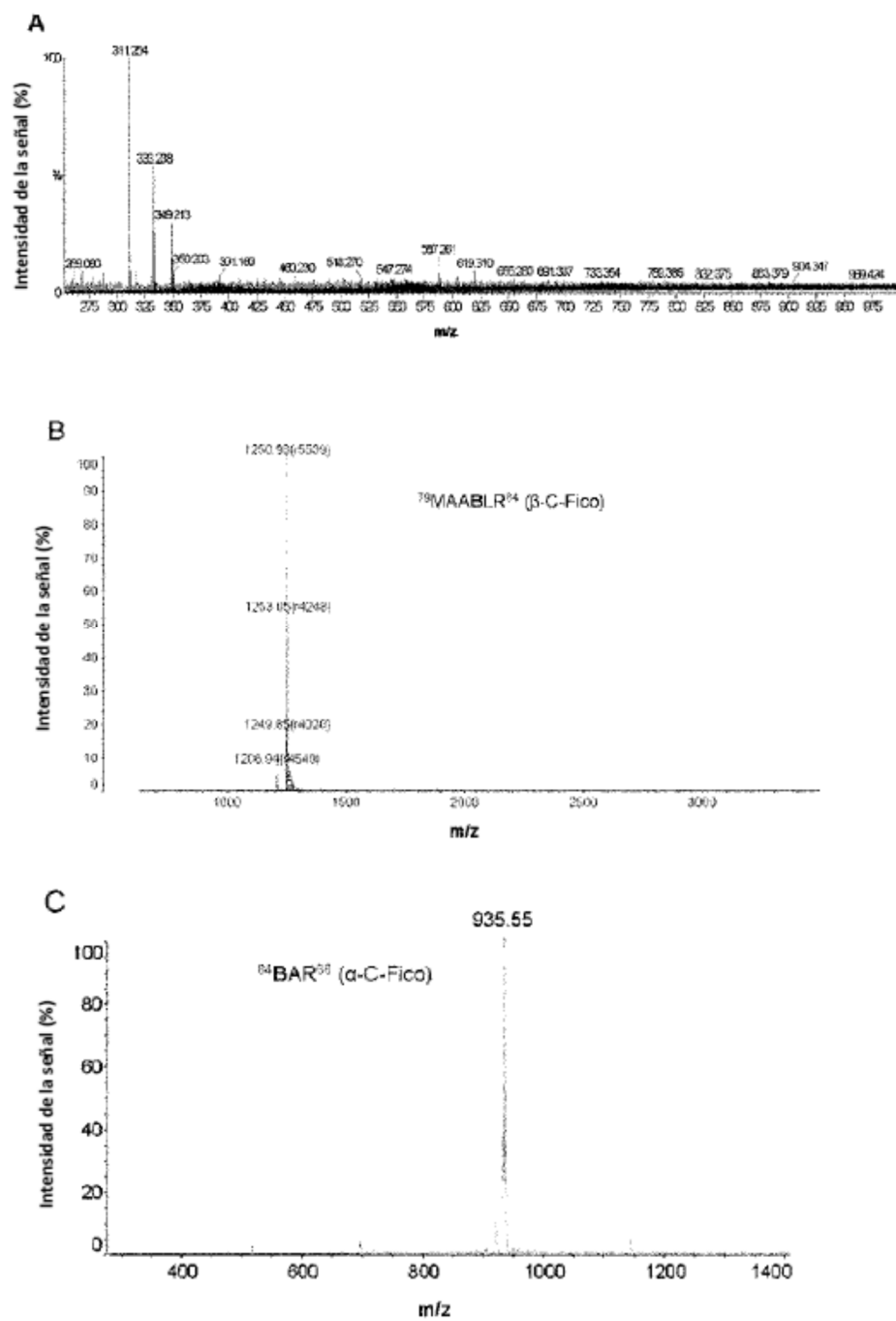
5	<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
	<120> COMPUESTOS Y COMBINACIONES FARMACÉUTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBRALES ISQUÉMICAS Y NEURODEGENERATIVAS
10	<130> Isquemia
	<150> CU 2011-146
	<151> 2011-07-01
15	<160> 5
	<170> PatentIn versión 3.5
20	<210> 1
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Spirulina platensis
25	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (4)..(4)
	<223> Residuo de cisteína unido covalentemente a ficocianobilina por un enlace tioéter
30	<400> 1
	Met Ala Ala Cys Leu Arg
	1 5
35	<210> 2
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> Spirulina platensis
40	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(1)
	<223> Residuo de cisteína unido covalentemente a ficocianobilina por un enlace tioéter
45	<400> 2
	Cys Ala Arg
	1
50	<210> 3
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> Spirulina platensis
55	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (3)..(3)
	<223> Residuo de cisteína unido covalentemente a ficocianobilina por un enlace tioéter
60	<400> 3
	Ala Ala Cys Leu Arg
	1 5

	<210> 4
	<211> 3
	<212> PRT
5	<213> Spirulina platensis
	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (1)..(1)
10	<223> Residuo de cisteína unido covalentemente a ficocianobilina por un enlace tioéter
	<400> 4
	Cys Leu Arg
	1
15	<210> 5
	<211> 4
	<212> PRT
	<213> Spirulina platensis
20	<220>
	<221> PÉPTIDO
	<222> (2)..(2)
	<223> Residuo de cisteína unido covalentemente a ficocianobilina por un enlace tioéter
25	<400> 5
	Ala Cys Leu Arg
	1
30	

Reivindicaciones

1. Péptidos cromogénicos (FCB-aa), que consiste de una secuencia de aminoácidos de entre 3 y 6 aminoácidos y comprende una estructura ficocianobilina, caracterizados porque la secuencia de aminoácidos es seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias identificadas como sec. con núm. de ident. 3- sec. con núm. de ident. 5.
2. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos cromogénicos (FCB-aa) de la reivindicación 1 y excipientes farmacéuticamente aceptables.
3. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos cromogénicos (FCB-aa) de las sec. con núm. de ident.: 1 a la sec. con núm. de ident.:5 en un intervalo de 0,9 – 3,375 mg y excipientes farmacéuticamente aceptables para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedades isquémicas y neurodegenerativas.
4. Compuesto seleccionado del grupo que consiste en los péptidos cromogénicos (FCB-aa) identificados como sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y ficocianobilina, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la isquemia o la degeneración cerebral.
5. Compuesto según la reivindicación 4 para su uso en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) que cursan con daño isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo.
6. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos definidos en la reivindicación 4, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la isquemia o la degeneración tisular.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6 en donde dicha isquemia o degeneración tisular produce enfermedades en el SNC que cursan con daño isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo.
8. Combinación farmacéutica caracterizada porque sus componentes tienen un efecto sinérgico, en donde dicha combinación comprende un primer componente seleccionado del grupo que consiste en los péptidos de sec. con núm. de ident. 1- sec. con núm. de ident. 5 y ficocianobilina según la reivindicación 4, y un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en Interferones del Tipo I, Interleucina-2 (IL-2), Eritropoyetina (EPO), asialoEPO y el secretagogo de la hormona de crecimiento humana (GHRP-6).
9. La combinación según la reivindicación 8 en donde el segundo componente es interferón alfa o interferón beta.
10. La combinación según la reivindicación 8, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades del SNC de origen isquémico, inflamatorio o neurodegenerativo en donde la composición se usa de 0,9 -3,375 mg/Kg de peso de cualquiera de los péptidos identificados como sec. con núm. de ident.:1 a sec. con núm. de ident.:5, o 300 - 750 µg/Kg de peso de ficocianobilina, y 500 - 5000 ng/Kg de peso de los interferones alfa o beta.
11. Combinación para el uso según la reivindicación 10 en donde dicha profilaxis o tratamiento protege el parénquima cerebral dañado a consecuencia de enfermedades agudas o crónicas.
12. Combinación para el uso según la reivindicación 11 en donde las enfermedades del SNC comprenden la isquemia cerebral de diferentes orígenes, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.
13. Combinación para el uso según la reivindicación 10, en donde los componentes que forman la combinación pueden administrarse de forma simultánea o secuencial a un mismo sujeto en el curso de un tratamiento médico en enfermedades del SNC como la isquemia cerebral de diferentes orígenes, la Esclerosis Múltiple, la Enfermedad de Alzheimer, la Esclerosis Lateral Amiotrófica, la Ataxia Espinocerebelosa, la Enfermedad de Huntington y la Enfermedad de Parkinson.

Fig. 1



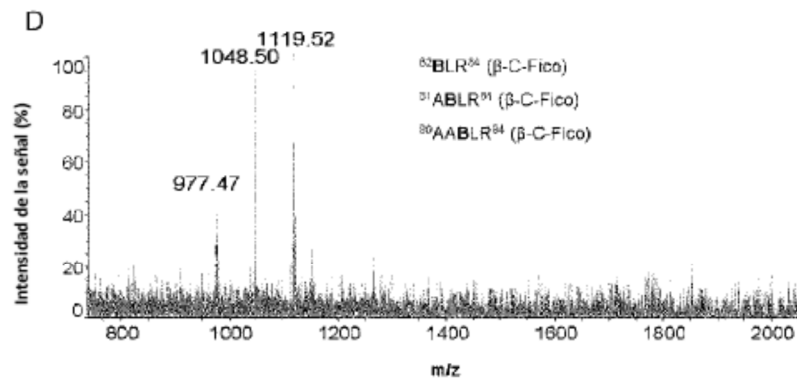


Fig. 2

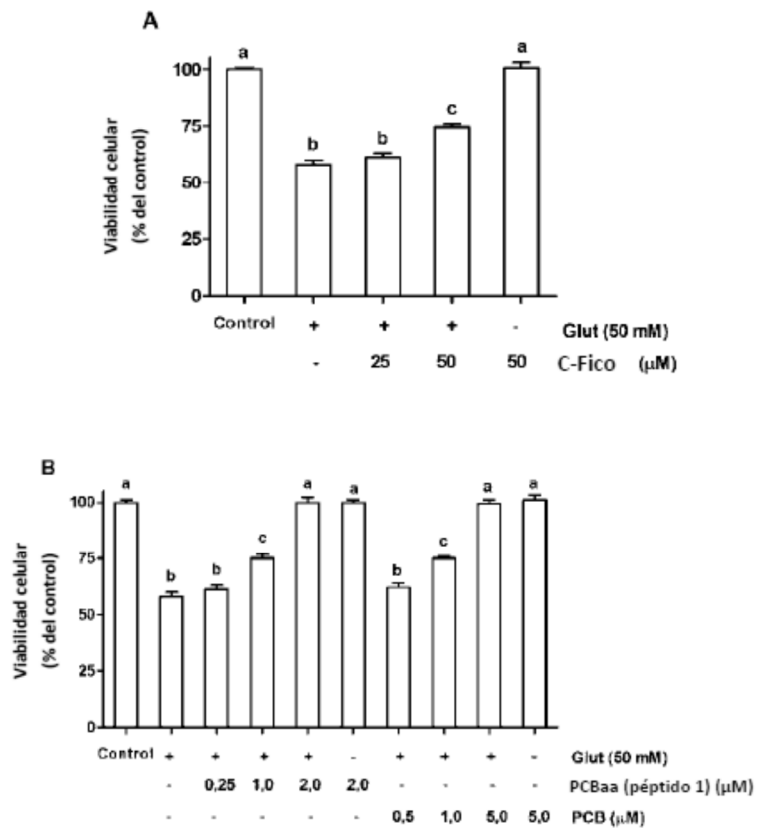


Fig. 3

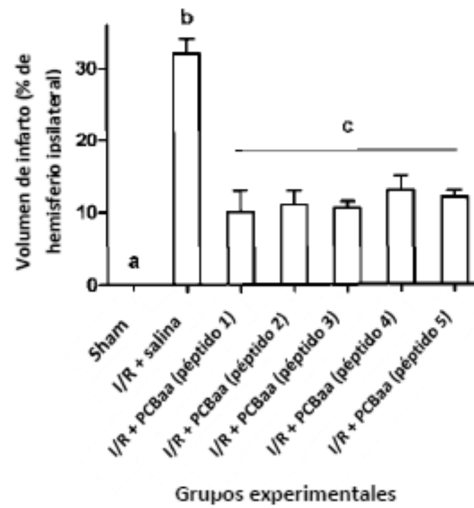


Fig. 4

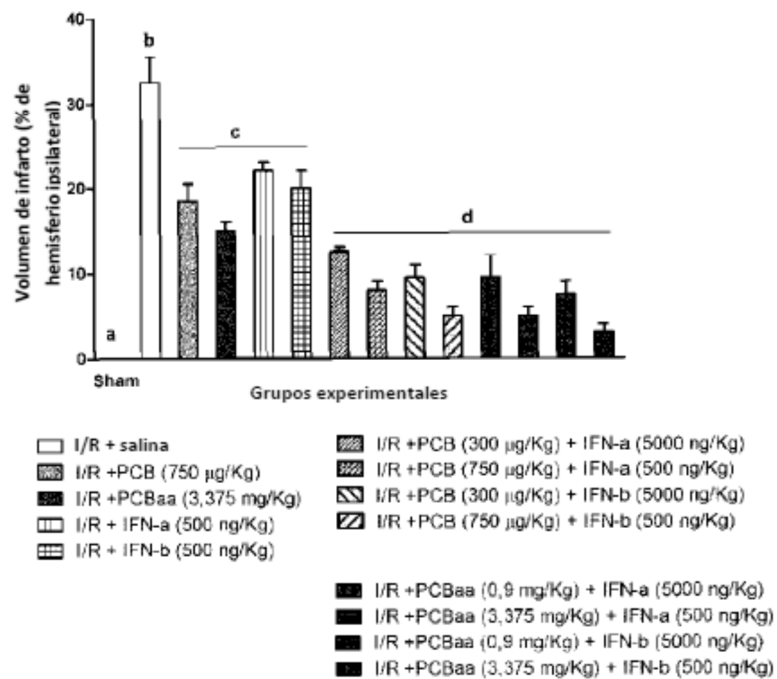


Fig. 5

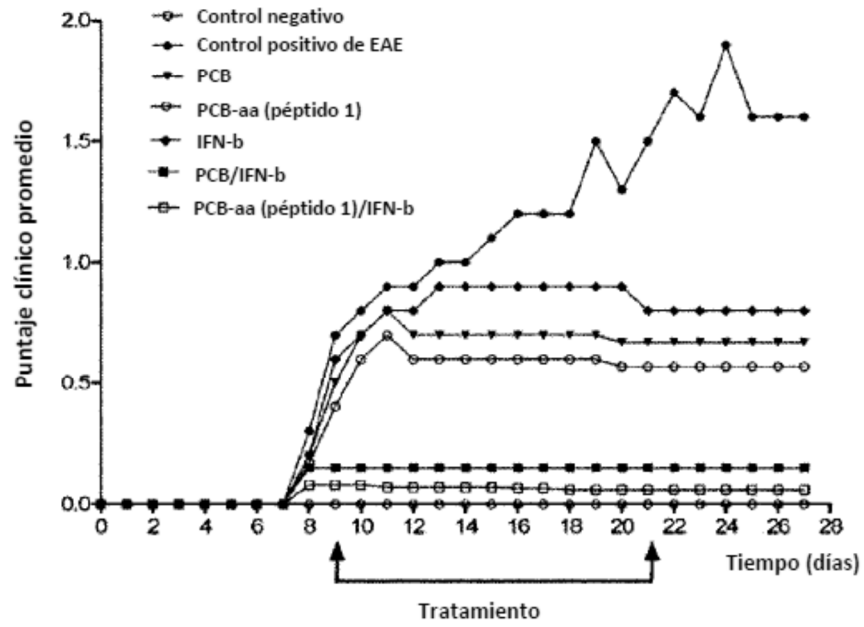


Fig. 6

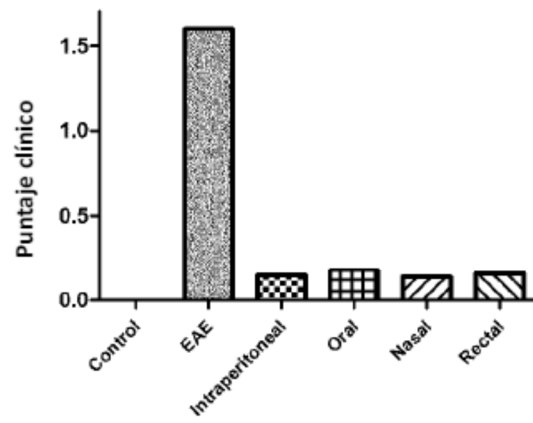


Fig. 7

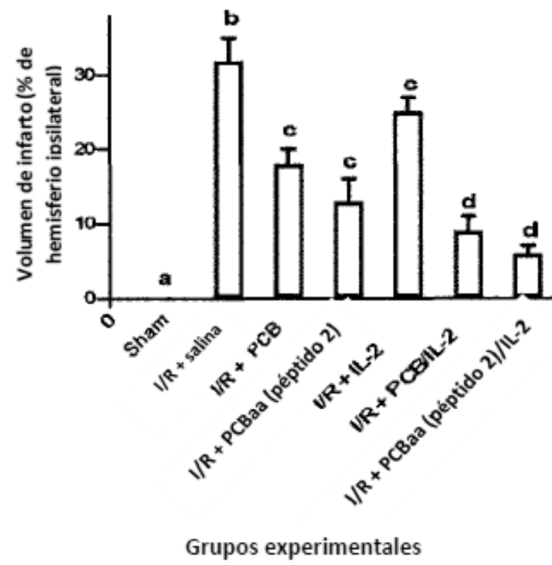
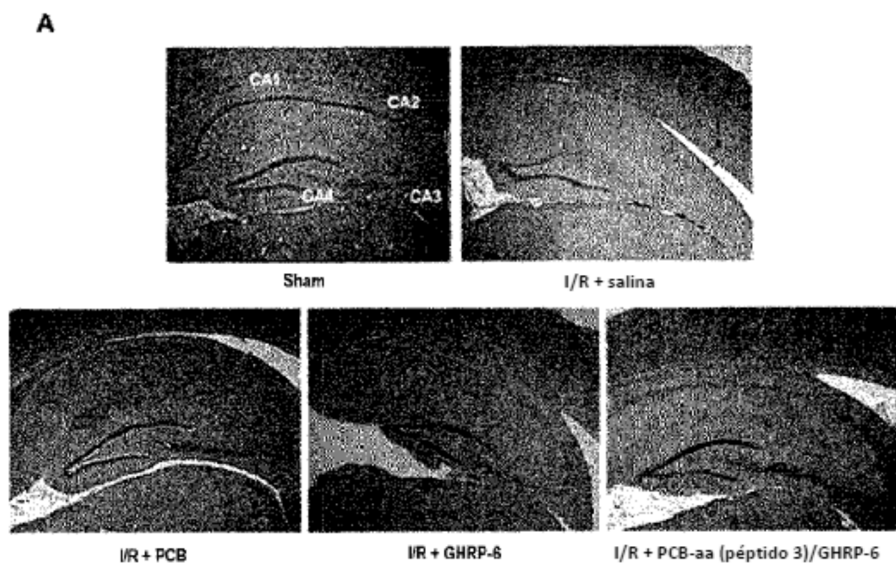


Fig. 8



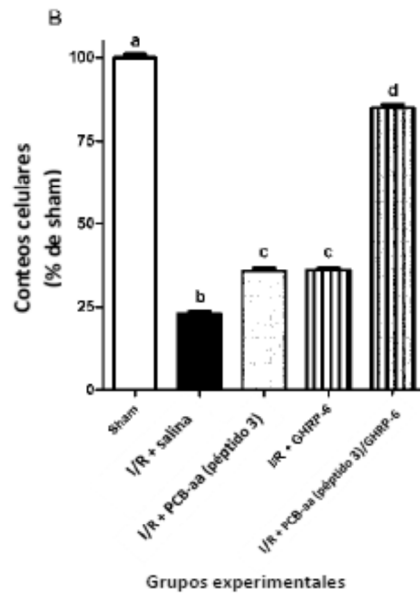


Fig. 9

