

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 968 038**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/26** (2006.01)

**A61K 38/38** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016 PCT/US2016/068378**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17112889**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016 E 16880108 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 3393496**

---

(54) Título: **Agonista GLP-1R de acción prolongada como terapia de afecciones neurológicas y neurodegenerativas**

(30) Prioridad:

**23.12.2015 US 201562387319 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.05.2024**

(73) Titular/es:

**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (100.0%)  
3400 North Charles Street  
Baltimore, MD 21218, US**

(72) Inventor/es:

**LEE, SEULKI;  
DAWSON, TED, M.;  
KO, HAN, SEOK;  
DAWSON, VALINA, L.;  
YUN, SEUNG, PIL y  
SCULLY, MAGDALENA**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 968 038 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

Agonista GLP-1R de acción prolongada como terapia de afecciones neurológicas y neurodegenerativas

Esta invención se realizó con apoyo gubernamental bajo R21 CA 198243 y P50 CA103175 otorgado por los National Institutes of Health (NIH). El gobierno tiene ciertos derechos sobre esta invención.

### 5 Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurodegenerativas engloban una serie de afecciones inducidas por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida su muerte. Diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH), se producen debido a procesos neurodegenerativos.

10 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo de aparición tardía que afecta aproximadamente a un millón de estadounidenses y de 7 a 10 millones de personas en todo el mundo. Aunque la sustitución dopamínérgica alivia la disfunción motora sintomática, su eficacia se reduce a medida que avanza la enfermedad, lo que provoca efectos secundarios inaceptables como fluctuaciones motoras graves y discinesias. Además, este enfoque terapéutico paliativo no aborda los mecanismos subyacentes de la enfermedad.

15 La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y representa más del 80% de los casos de demencia en todo el mundo. Esta conlleva la pérdida progresiva del deterioro mental, conductual, funcional y de la capacidad de aprendizaje. Los tratamientos aprobados actualmente, como los inhibidores de la acetilcolinesterasa, sólo proporcionan una mejoría sintomática, pero no modifican el proceso de la enfermedad. El número de nuevas estrategias, incluyendo la terapéutica basada en amiloide y tau, están en desarrollo clínico, sin embargo, ningún fármaco demostró una eficacia clara en seres humanos antes de la invención descrita en la presente memoria.

20 Dado que las personas viven más tiempo, cada vez son más las que desarrollan estos trastornos neurológicos comunes y debilitantes. Antes de la invención descrita en la presente memoria, no se había identificado una terapia neuroprotectora probada que pudiera tratar la enfermedad o detener el progreso de la misma en seres humanos. Por lo tanto, existe una importante necesidad insatisfecha de estrategias terapéuticas que traten este implacable trastorno crónico progresivo.

### Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones 1 a 14.

30 La presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de agonistas GLP-1r (receptor del péptido 1 similar al glucagón) de acción prolongada con efectos neuroprotectores y modificadores de la enfermedad en el sistema nervioso central. Se desarrolló una exenatida de acción prolongada administrada por vía subcutánea que, a pesar de tener un gran peso molecular, presenta una elevada bioactividad en el cerebro y efectos neuroprotectores y modificadores de la enfermedad significativos en modelos de ratón de trastornos del sistema nervioso central, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas. Los fármacos peptídicos de ingeniería fusionados con portadores de prolongación de la semivida de gran peso molecular, como la inmunoglobulina Fc, la albúmina o el PEG, no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) (Pardridge, W.M. 2005 NeuroRx 2(1): 3-14), a menos que la molécula se rediseñe para que se dirija a receptores BBB como el receptor de transferrina (Yu Y.J. et al. 2014. Sci. Transl. Med. 6(261):261ra154). Se describe en la presente memoria una exenatida PEGilada (NLY001) con una semivida y una media de tiempo de residencia significativamente mejorados en primates no humanos en comparación con exenatida BYETTA® (exendin-4 que tiene una semivida de 2 horas) y liraglutida (que tiene una semivida de 13 horas). La exenatida PEGilada mantiene su actividad biológica gracias a una molécula de polietilenglicol (PEG) unida específicamente a la exenatida (documento WO2013002580). Debido a su mayor semivida y potencia, este compuesto es adecuado para una frecuencia de dosificación clínica quincenal, bimensual o mensual. Esta frecuencia de dosificación supone una mejora con respecto al tratamiento actual de dos veces al día (exenatida, BYETTA®) o de una vez al día (liraglutida, VICTOZA®). Sin embargo, al igual que los fármacos peptídicos fusionados con portadores de gran peso molecular, no se esperaba que esta exenatida PEGilada mostrara eficacia en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson (EP) o la Enfermedad de Alzheimer (EA) tras una inyección sistémica. Como se describe en la presente memoria, un descubrimiento inesperado fue la administración subcutánea de un agonista GLP-1r de acción prolongada, la exenatida PEGilada, que demuestra claros efectos antienfermedad de Parkinson y antienfermedad de Alzheimer en modelos animales transgénicos de EP y EA clínicamente relevantes a través de un ataque eficiente a la microglía activada y a los astrocitos reactivos en el cerebro. Se describe en la presente memoria la utilización de un agonista GLP-1r de acción prolongada para el tratamiento de la EP y la EA, así como otras afecciones neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades que implican una patogénesis centrada en la activación de la microglía.

45 50 55

En adelante en la presente memoria, la frase "un agonista GLP-1r de acción prolongada" se refiere a exenatida (SEQ ID NÚM.: 1) conjugado en el extremo C terminal a un polietilenglicol (PEG) ramificado con un peso molecular de entre 40 kDa y 80 kDa, y preferentemente a NLY001.

Se han identificado composiciones y procedimientos para bloquear o revertir selectivamente la activación de la microglía y los astrocitos reactivos, que son células clave implicadas en el establecimiento y/o la progresión de enfermedades neurodegenerativas, para detener el desencadenamiento de una cascada de vías neurotóxicas. El procedimiento incluye la administración de un agonista GLP-1r de acción prolongada al individuo.

- 5 En una realización, el procedimiento para tratar o prevenir la enfermedad neurodegenerativa en un individuo mamífero incluye la administración de un agonista GLP-1r de acción prolongada con la capacidad de penetrar la BBB y activar el GLP-1r en el cerebro de la EP de forma continua sin "tiempo muerto" y sin toxicidad "fuera de la diana". Por ejemplo, un agonista del GLP-1r de acción prolongada, el NLY001, se acumula eficazmente en el cerebro de modelos de EP y EA y, lo que es más importante, demuestra una internalización lenta del GLP-1r en comparación con la de los agonistas del GLP-1r de acción corta. La activación constitutiva de GLP-1r en el cerebro contribuye a maximizar las propiedades sinérgicas antiinflamatorias y neuroprotectoras del agonista de GLP-1r.

En una realización, el procedimiento de protección de las células neuronales actúa bloqueando la gliosis (activación de la microglía y los astrocitos) y la liberación de moléculas tóxicas de la microglía activada y los astrocitos reactivos mediante la focalización de GLP-1r regulado al alza en la microglía activada.

- 10 15 En consecuencia, se proporcionan en la presente memoria procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno neurodegenerativo que comprenden administrar a un individuo que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurodegenerativo una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición que comprende un agonista GLP-1r de acción prolongada para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo. En algunos casos, la enfermedad o trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1) y un trastorno priónico. Opcionalmente, el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. En una realización ejemplar, los procedimientos comprenden además la identificación de un paciente que padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer.
- 20 25 30 Preferentemente, el agonista GLP-1r de acción prolongada bloquea la activación de las células inmunitarias innatas residentes. Por ejemplo, las células inmunitarias innatas comprenden microglía y/o astrocitos. En algunos casos, se impide que las proteínas anormalmente agregadas activen las células inmunitarias mediante la regulación al alza del GLP-1r. Por ejemplo, las proteínas anormalmente agregadas comprenden  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -amiloide o tau. La cantidad del agonista GLP-1r de acción prolongada es eficaz para inhibir la secreción de mediadores inflamatorios y/o neurotóxicos secretados por las células inmunitarias innatas activadas.

35 En algunos casos, el agonista de GLP-1r se administra en una cantidad eficaz para reducir los mediadores inflamatorios o neurotóxicos seleccionados del grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 y C1q en comparación con un control apropiado. En un aspecto, el agonista de GLP-1r se administra en una cantidad eficaz para reducir la población celular de microglía activada y astrocitos reactivos.

- 40 45 50 En una realización, los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 o C1q y/o microglía activada y astrocitos reactivos en el cerebro se reducen, mantienen o restauran a niveles normales en el individuo, en comparación con un control apropiado.

En una realización, los niveles de depósitos anormales de la proteína cerebral como la alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn) (cuerpos de Lewy) y las placas amiloides y tau se reducen, se mantienen o vuelven a niveles normales en el individuo, en comparación con un control apropiado.

En una realización, el tratamiento alivia o restaura el déficit motor, mejora las funciones de memoria y/o aumenta la esperanza de vida en el individuo, en comparación con un control apropiado.

- Los modos de administración adecuados incluyen la administración oral, la administración intravenosa, la administración tópica, la administración parenteral, la administración intraperitoneal, la administración intramuscular, la administración intratecal, la administración intralesional, la administración intracraneal, la administración intranasal, la administración intraocular, la administración intracardíaca, la administración intravítreo, administración intraósea, administración intracerebral, administración intraarterial, administración intraarticular, administración intradérmica, administración transdérmica, administración transmucosa, administración sublingual, administración enteral, administración sublabial, administración por insuflación, administración por suppositorio, administración inhalada y administración subcutánea. Un modo de administración ejemplar incluye la administración subcutánea.

En algunos casos, la composición se administra en una forma seleccionada del grupo que comprende píldoras, cápsulas, comprimidos, gránulos, polvos, sales, cristales, líquidos, sueros, jarabes, suspensiones, geles, cremas, pastas, películas, parches y vapores.

- 55 En un aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria, es decir, exenatida PEGilada, se administran aproximadamente 1-4 veces al mes. Por ejemplo, las composiciones se administran aproximadamente una o dos veces por semana. Alternativamente, las composiciones se administran aproximadamente cada dos semanas. En otros casos, las composiciones se administran una vez al mes. En otros casos, las composiciones se administran una

vez cada dos meses. En otros aspectos, las composiciones se administran unas 1-3 veces cada 6 meses. Alternativamente, las composiciones de la invención se administran aproximadamente 1-12 veces al año, por ejemplo, una vez al mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, una vez cada 7 meses, una vez cada 8 meses, una vez cada 9 meses, una vez cada 10 meses, una vez cada 11 meses, o una vez cada 12 meses.

Preferentemente, la composición descrita en la presente memoria, es decir, la exenatida PEGilada, tiene una semivida *in vivo* aumentada, por ejemplo, de al menos 2 horas a 200 horas. Por ejemplo, la exenatida PEGilada tiene una semivida *in vivo* de 2 horas, 6 horas, 12 horas, 20 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas, 72 horas, 88 horas, 100 horas, 112 horas, 124 horas, 150 horas, 175 horas o 200 horas. En una realización ejemplar, las 5 composiciones de la invención comprenden una semivida *in vivo* de 88 horas en primates no humanos.

Las composiciones descritas en la presente memoria se administran a una dosis de 0,001 mg/kg a 100 mg/kg, p. ej., 0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg o 100 mg/kg. Por ejemplo, las composiciones se administran en una 10 dosis de entre 0,2 mg/kg y 20 mg/kg en modelos de roedores. En seres humanos, las composiciones pueden 15 administrarse a una dosis entre 0,001 mg/kg y 10 mg/kg.

En un aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria se administran a un individuo durante 1 a 20 años, por ejemplo, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 20 años, 14 años, 15 años, 16 años, 17 años, 18 años, 19 años o 20 años. Opcionalmente, las composiciones descritas 25 en la presente memoria se administran durante 10 años. En un aspecto, los efectos del tratamiento duran al menos 1 año.

Preferentemente, las composiciones descritas en la presente memoria protegen contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas asociada a la alfa-sinucleína. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria protegen contra la toxicidad amiloide-beta y/o tau en las neuronas de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, las 30 composiciones descritas en la presente memoria protegen contra las placas amiloides y la pérdida de neuronas asociada a tau. En un aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria mejoran las habilidades motoras y cognitivas, así como la memoria, en un individuo en relación con un control. En otro aspecto, las composiciones descritas en la presente memoria protegen las sinapsis y/o las funciones sinápticas, potencian la neurogénesis, reducen la apoptosis, protegen las neuronas del estrés oxidativo, reducen la formación de placas y previenen la respuesta inflamatoria crónica en un individuo en relación con un control.

El agonista GLP-1r de acción prolongada comprende un análogo de Exendin-4 PEGilado que tiene la secuencia: HGETFTSDL SKQMEEEAVRL FIEWL KNGGPSSGAPPS (SEQ ID NÚM.: 1).

En un aspecto, el resto o derivado de PEG se selecciona del grupo que consiste en PEG lineal, PEG ramificado, PEG estrella, PEG peine, PEG dendrimérico, PEG succinimidilpropionato, PEG N-hidroxisuccinimida, PEG propionaldehído, Maleimida de PEG, metoxipoli(etilenglicol) lineal (mPEG), mPEG ramificado, Star mPEG, Comb mPEG, mPEG dendrimérico, succinimidilpropionato de mPEG, N-hidroxisuccinimida de mPEG, propionaldehído de mPEG y maleimida de mPEG. En algunos casos, el resto o derivado de PEG ramificado comprende fracciones de PEG monoméricas, diméricas y/o triméricas, o sus derivados. En algunos casos, el resto o derivado de PEG es maleimida de metoxipolietylenglicol trimérica.

40 El resto de PEG comprende un resto de PEG dentro del intervalo de 40.000-80.000 daltons. En una realización ejemplar, la exenatida PEGilada descrita en la presente memoria es NLY001, una exenatida PEGilada con un resto de PEG de 50.000 daltons.

#### **Definiciones**

A menos que se indique específicamente o resulte evidente por el contexto, tal como se utiliza en la presente memoria, 45 el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. "Aproximadamente" puede entenderse dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor declarado. A menos que el contexto indique claramente lo contrario, todos los valores numéricos indicados en la presente memoria se modifican con el término "aproximadamente"

50 Por "agente" se entiende cualquier compuesto pequeño, anticuerpo, molécula de ácido nucleico o polipéptido, o sus fragmentos.

Por "alteración" se entiende un cambio (aumento o disminución) en los niveles de expresión o actividad de un gen o polipéptido detectado por procedimientos conocidos de la técnica estándar como los descritos en la presente memoria. Como se utiliza en la presente memoria, una alteración incluye al menos un cambio del 1% en los niveles de expresión, 55 por ejemplo, al menos un cambio del 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en los niveles de expresión. Por ejemplo, una alteración incluye al menos un cambio del 5%-10% en los

niveles de expresión, preferentemente un cambio del 25%, más preferentemente un cambio del 40%, y lo más preferentemente un cambio del 50% o mayor en los niveles de expresión.

Por "mejorar" se entiende disminuir, suprimir, atenuar, reducir, detener o estabilizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad.

- 5 Por "unirse a" una molécula se entiende tener una afinidad fisicoquímica por esa molécula.

El término transitorio "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de procedimiento adicionales no repetidos. Por el contrario, la frase transitoria "consistente en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación. La frase transitoria "consistente esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificados "y aquellos que no afecten materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reivindicada.

10 Por "control" o "referencia" se entiende un estándar de comparación. Tal y como se utiliza en la presente memoria, por "cambio en comparación con una muestra o individuo de control" se entiende un nivel estadísticamente diferente al de una muestra normal, no tratada o de control. Las muestras de control incluyen, por ejemplo, células en cultivo, uno o más animales de experimentación de laboratorio, o uno o más individuos humanos. Los procedimientos para 15 seleccionar y probar las muestras de control están al alcance de los expertos en la técnica. Un analito puede ser una sustancia natural expresada o producida de forma característica por la célula u organismo (por ejemplo, un anticuerpo, una proteína) o una sustancia producida por un constructo reportero (por ejemplo, β-galactosidasa o luciferasa). Dependiendo del procedimiento utilizado para la detección, la cantidad y la medida del cambio pueden variar. La 20 determinación de la significación estadística está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, por ejemplo, el número de desviaciones estándar de la media que constituyen un resultado positivo.

"Detectar" se refiere a identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito a detectar.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "diagnosticar" se refiere a clasificar una patología o un síntoma, 25 determinar la gravedad de la patología (p. ej., grado o estadio), supervisar la progresión de la patología, pronosticar un resultado de la patología y/o determinar las perspectivas de recuperación.

Por los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de una formulación o componente de formulación se entiende una cantidad suficiente de la formulación o componente, solo o en combinación, para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, por "una cantidad eficaz" se entiende una cantidad de un compuesto, solo o en una combinación, necesaria para mejorar los síntomas de una enfermedad, por ejemplo, el cáncer de próstata, en relación con un paciente no tratado. La cantidad eficaz de compuesto(s) activo(s) utilizado(s) en la práctica de la presente invención para el tratamiento terapéutico de una enfermedad varía en función de la forma de administración, la edad, el peso corporal y el estado general de salud del individuo. En última instancia, el médico o veterinario que le atienda decidirá la cantidad y la pauta de dosificación adecuadas. Dicha cantidad se denomina cantidad "efectiva".

30 35 Por "fragmento" se entiende una porción de una molécula polipeptídica o de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferentemente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de toda la longitud de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

40 Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que está libre en diversos grados de los componentes que normalmente lo acompañan tal y como se encuentra en su estado nativo. "Aislar" denota un grado de separación de la fuente original o del entorno. "Purificar" denota un grado de separación superior al aislamiento.

Por "marcador" se entiende cualquier proteína o polinucleótido que tenga una alteración en el nivel de expresión o actividad que esté asociada con una enfermedad o trastorno.

45 Por "modular" se entiende alterar (aumentar o disminuir). Dichas alteraciones se detectan mediante procedimientos conocidos de la técnica estándar, como los descritos en la presente memoria.

Por "enfermedad o trastorno neurodegenerativo" se entiende un término general para la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida la muerte de las neuronas. Muchas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, el Parkinson, el Alzheimer y el Huntington, se producen como resultado de procesos neurodegenerativos. Estas enfermedades son incurables y provocan la degeneración progresiva y/o la muerte de las células neuronales.

50 55 El término "cantidad normal" se refiere a la cantidad normal de un complejo en un individuo que no ha sido diagnosticado con una enfermedad o trastorno. La cantidad de la molécula puede medirse en una muestra de prueba y compararse con el "nivel de control normal", utilizando técnicas como los límites de referencia, los límites de discriminación o los umbrales de definición de riesgo para definir los puntos de corte y los valores anormales (por

ejemplo, para el cáncer de próstata). Por "nivel de control normal" se entiende el nivel de una o más proteínas (o ácidos nucleicos) o índices combinados de proteínas (o índices combinados de ácidos nucleicos) que se encuentra típicamente en un individuo del que es sabido que no padece cáncer de próstata. Dichos niveles normales de control y puntos de corte pueden variar en función de si una molécula se utiliza sola o en una fórmula que combina otras proteínas en un índice. Alternativamente, el nivel de control normal puede ser una base de datos de patrones de proteínas de individuos previamente analizados que no se convirtieron en una enfermedad o trastorno durante un horizonte temporal clínicamente relevante.

El nivel que se determina puede ser el mismo que un nivel de control o un nivel de corte o un nivel umbral, o puede aumentar o disminuir en relación con un nivel de control o un nivel de corte o un nivel umbral. En algunos aspectos, el 10 individuo de control es un control emparejado de la misma especie, sexo, etnia, grupo de edad, hábito de fumar, índice de masa corporal (IMC), estado actual del régimen terapéutico, historial médico o una combinación de los mismos, pero difiere del individuo diagnosticado en que el control no padece la enfermedad en cuestión o no está en riesgo de padecerla.

En relación con un nivel de control, el nivel determinado puede ser un nivel aumentado. Tal como se utiliza en la 15 presente memoria, el término "aumentado" con respecto al nivel (por ejemplo, nivel de expresión, nivel de actividad biológica, etc.) se refiere a cualquier % de aumento por encima de un nivel de control. El nivel aumentado puede ser de al menos o aproximadamente un 1% de aumento, al menos o aproximadamente un 5% de aumento, al menos o aproximadamente un 10% de aumento, al menos o aproximadamente un 15% de aumento, al menos o 20% de aumento, al menos o aproximadamente un 25% de aumento, al menos o aproximadamente un 30% de aumento, al menos o aproximadamente un 35% de aumento, al menos o aproximadamente un 40% de aumento, al menos o aproximadamente un 45% de aumento, al menos o aproximadamente un 50% de aumento, al menos o aproximadamente un 55% de aumento, al menos o aproximadamente un 60% de aumento, al menos o aproximadamente un 65% de aumento, al menos o aproximadamente un 70% de aumento, al menos o aproximadamente un 75% de aumento, al menos o aproximadamente un 80% de aumento, al menos o aproximadamente un 85% de aumento, al menos o aproximadamente un 90% de aumento, o al menos o aproximadamente un 95% de aumento, en relación con un nivel de control.

En relación con un nivel de control, el nivel que se determina puede ser un nivel disminuido. Tal como se utiliza en la 30 presente memoria, el término "disminuido" con respecto al nivel (por ejemplo, nivel de expresión, nivel de actividad biológica, etc.) se refiere a cualquier % de disminución por debajo de un nivel de control. El nivel disminuido puede ser de al menos o aproximadamente un 1% de disminución, al menos o aproximadamente un 5% de disminución, al menos o 35% de disminución, al menos o aproximadamente un 10% de disminución, al menos o aproximadamente un 15% de disminución, al menos o aproximadamente un 20% de disminución, al menos o aproximadamente un 25% de disminución, al menos o aproximadamente un 30% de disminución, al menos o aproximadamente un 35% de disminución, al menos o 40% de disminución, al menos o aproximadamente un 45% de disminución, al menos o aproximadamente una disminución del 50%, al menos o aproximadamente una disminución del 55%, al menos o 45% de disminución, al menos o aproximadamente una disminución del 60%, al menos o aproximadamente una disminución del 65%, al menos o aproximadamente una disminución del 70%, al menos o aproximadamente una disminución del 75%, al menos o aproximadamente una disminución del 80%, al menos o aproximadamente una disminución del 85%, al menos o 50% de disminución, al menos o aproximadamente una disminución del 90%, o al menos o aproximadamente una disminución del 95%, en relación con un nivel de control.

La frase "portador farmacéuticamente aceptable" está reconocida en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para administrar compuestos de la presente invención a mamíferos. Los portadores incluyen cargas líquidas o sólidas, diluyentes, excipientes, disolventes o materiales de encapsulación 45 que intervienen en el transporte del agente de un órgano o parte del cuerpo a otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, como almidón de maíz y almidón de 50 patata; celulosa, y sus derivados, como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, como el propilenglicol; polioles, como la glicerina, el sorbitol, el manitol y el polietilenglicol; ésteres, como el oleato de etilo y el laurato de etilo; agar; agentes tamponadores, como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Por "proteína", "polipéptido" o "péptido" se entiende cualquier cadena de más de dos aminoácidos naturales o no naturales, independientemente de la modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), que constituya la totalidad o parte de un polipéptido o péptido natural o no natural, tal como se describe en la presente memoria.

60 Un ácido nucleico o una proteína "purificados" o "biológicamente puros" están lo suficientemente libres de otros materiales como para que cualquier impureza no afecte materialmente a las propiedades biológicas de la proteína o

cause otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención está purificado si está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad suelen determinarse mediante técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. El término "purificado" puede denotar que un ácido nucleico o una proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede ser sometida a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

Por "sustancialmente puro" se entiende un nucleótido o polipéptido que ha sido separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Típicamente, los nucleótidos y polipéptidos son sustancialmente puros cuando son al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, o incluso 99%, en peso, libres de proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que están naturalmente asociados.

Los intervalos que se proporcionan en la presente memoria se entienden como una abreviatura de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo formado por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50, así como todos los valores decimales intermedios entre los números enteros antes mencionados, como por ejemplo 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 y 1.9. Con respecto a los subintervalos, se contemplan específicamente los "subintervalos anidados" que se extienden desde cualquier punto final del intervalo. Por ejemplo, un subintervalo anidado de un intervalo ejemplar de 1 a 50 puede comprender de 1 a 10, de 1 a 20, de 1 a 30 y de 1 a 40 en una dirección, o de 50 a 40, de 50 a 30, de 50 a 20 y de 50 a 10 en la otra dirección.

Por "reduce" se entiende una alteración negativa de al menos el 1%, por ejemplo, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, o al menos el 99%.

Por "referencia" se entiende una condición estándar o de control.

Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias o una comparación de expresión génica. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de una secuencia completa de ADNc o de un gen, o la secuencia completa de ADNc o de un gen. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia polipeptídica de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, preferentemente de al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 25 aminoácidos, y aún más preferentemente de aproximadamente 35 aminoácidos, aproximadamente 50 aminoácidos o aproximadamente 100 aminoácidos. En el caso de los ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferentemente de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 75 nucleótidos, y aún más preferentemente de aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 o aproximadamente 500 nucleótidos o cualquier número entero o intermedio.

Como se usa en la presente memoria, "obtener" como en "obtener un agente" incluye sintetizar, comprar o adquirir de otra manera el agente.

Por "individuo" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, un mamífero humano o no humano, como un bovino, equino, canino, ovino o felino. El individuo es preferentemente un mamífero que necesita tratamiento, por ejemplo, un individuo al que se le ha diagnosticado una enfermedad o una predisposición a la misma. El mamífero es cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate, un ratón, una rata, un perro, un gato, un caballo, así como ganado o animales criados para el consumo alimentario, por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cerdos, pollos y cabras. En una realización preferente, el mamífero es un ser humano.

Por "sustancialmente idéntica" se entiende una molécula polipeptídica o de ácido nucleico que presenta al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria). Preferentemente, dicha secuencia es al menos un 60%, más preferentemente un 80% u 85%, y más preferentemente un 90%, 95% o incluso un 99% idéntica a nivel de aminoácidos o ácidos nucleicos a la secuencia utilizada para la comparación.

El término "muestra", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una muestra biológica obtenida con fines de evaluación *in vitro*. Con respecto a los procedimientos en la presente memoria desvelados, la muestra o la muestra del paciente puede comprender preferentemente cualquier fluido corporal o tejido. En algunas realizaciones, el fluido corporal incluye, pero sin limitación, sangre, plasma, suero, linfa, leche materna, saliva, mucosa, semen, secreciones vaginales, extractos celulares, fluidos inflamatorios, líquido cefalorraquídeo, heces, humor vítreo u orina obtenidos del individuo. En algunos aspectos, la muestra es un panel compuesto de al menos dos de una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero y una muestra de orina. En aspectos ejemplares, la muestra comprende

sangre o una fracción de la misma (por ejemplo, plasma, suero, fracción obtenida mediante leucoféresis). Las muestras preferentes son sangre total, suero, plasma u orina. Una muestra también puede ser una fracción parcialmente purificada de un tejido o fluido corporal.

- 5 Una muestra de referencia puede ser una muestra "normal", de un donante que no tenga el fluido de la enfermedad o afección, o de un tejido normal de un individuo que tenga la enfermedad o afección. Una muestra de referencia también puede proceder de un donante no tratado o de un cultivo celular no tratado con un agente activo (por ejemplo, ningún tratamiento o administración de vehículo únicamente). También se puede tomar una muestra de referencia en un "punto de tiempo cero" antes de poner en contacto la célula o el individuo con el agente o la intervención terapéutica que se va a probar o al inicio de un estudio prospectivo.
- 10 Por "se une específicamente" se entiende un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido de la invención, pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente un polipéptido de la invención.
- 15 El término "individuo", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye a todos los miembros del reino animal propensos a sufrir el trastorno indicado. En algunos aspectos, el individuo es un mamífero, y en algunos aspectos, el individuo es un ser humano. Los procedimientos también son aplicables a los animales de compañía, como perros y gatos, y al ganado, como vacas, caballos, ovejas, cabras, cerdos y otros animales domésticos y salvajes.
- 20 Un individuo que "padece o se sospecha que padece" una enfermedad, afección o síndrome específicos tiene un número suficiente de factores de riesgo o presenta un número o combinación suficiente de signos o síntomas de la enfermedad, afección o síndrome, de modo que una persona competente diagnosticaría o sospecharía que el individuo padece la enfermedad, afección o síndrome. Los procedimientos para la identificación de individuos que padecen o se sospecha que padecen afecciones asociadas a enfermedades cardíacas, trastornos neurodegenerativos y similares están al alcance de los expertos en la técnica. Los individuos que padecen y los que se sospecha que padecen una enfermedad, afección o síndrome específicos no son necesariamente dos grupos distintos.
- 25 Como se usa en la presente memoria, "susceptible a" o "propenso a" o "predisposto a" o "en riesgo de desarrollar" una enfermedad o condición específica se refiere a un individuo que basado en factores genéticos, ambientales, de salud y/u otros factores de riesgo es más propenso a desarrollar una enfermedad o condición que la población general. Un aumento de la probabilidad de desarrollar una enfermedad puede ser un aumento de aproximadamente 10%, 20%, 50%, 100%, 150%, 200% o más.
- 30 Por "sustancialmente idéntica" se entiende una molécula polipeptídica o de ácido nucleico que presenta al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria). Preferentemente, dicha secuencia es al menos un 60%, más preferentemente un 80% u 85%, y más preferentemente un 90%, 95% o incluso un 99% idéntica a nivel de aminoácidos o ácidos nucleicos a la secuencia utilizada para la comparación.
- 35 Los términos "tratar", "tratamiento" y similares utilizados en la presente memoria se refieren a la administración de un agente o formulación a un individuo clínicamente sintomático aquejado de una afección, trastorno o enfermedad adversos, con el fin de reducir la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o su causa subyacente, y/o facilitar la mejora o reparación del daño. Se apreciará que, aunque no se excluye, el tratamiento de un trastorno o afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados al mismo se eliminen por completo.
- 40 El término "PEGilación" se refiere a un procedimiento de unión o amalgama tanto covalente como no covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol (PEG) a moléculas y macroestructuras, como un fármaco, una proteína terapéutica o una vesícula.
- 45 Los términos "prevenir", "previniendo", "prevención", "tratamiento profiláctico" y similares se refieren a la administración de un agente o composición a un individuo clínicamente asintomático que está en riesgo de desarrollar, susceptible o predisposto a una condición adversa particular, trastorno o enfermedad, y por lo tanto se relaciona con la prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente.
- 50 En algunos casos, una composición de la invención se administra por vía oral o sistémica. Otros modos de administración incluyen las vías rectal, tópica, intraocular, bucal, intravaginal, intracisternal, intracerebroventricular, intratraqueal, nasal, transdérmica, implantes internos/superficiales o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son especialmente adecuadas para la terapia y profilaxis a largo plazo. Sin embargo, podrían ser preferentes en situaciones de emergencia. Las composiciones que comprenden una composición de la invención pueden añadirse a un fluido fisiológico, como la sangre. La administración oral puede ser preferente para el tratamiento profiláctico debido a la comodidad para el paciente, así como el calendario de dosificación. Las modalidades parenterales (subcutáneas o intravenosas) pueden ser preferentes para enfermedades más agudas, o para la terapia en pacientes que no pueden tolerar la administración enteral debido a intolerancia gastrointestinal, ileo u otros concomitantes de la enfermedad

crítica. La terapia inhalada puede ser la más adecuada para las enfermedades vasculares pulmonares (por ejemplo, la hipertensión pulmonar).

Las composiciones farmacéuticas pueden ensamblarse en kits o sistemas farmacéuticos para su uso en la detención del ciclo celular en células que se dividen rápidamente, por ejemplo, células cancerosas. Los kits o sistemas farmacéuticos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden un medio portador, tal como una caja, cartón, tubo, teniendo en estrecho confinamiento en el mismo uno o más medios recipientes, tales como viales, tubos, ampollas, botellas, jeringas o bolsas. Los kits o sistemas farmacéuticos de la invención también pueden comprender instrucciones asociadas para utilizar el kit.

A menos que se indique específicamente o resulte evidente por el contexto, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "o" se entiende inclusivo. A menos que se indique específicamente o resulte evidente por el contexto, los términos "un", "una" y "el/la" se entienden en singular o plural.

A menos que se indique específicamente o resulte evidente por el contexto, tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente puede entenderse dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% o 0,01% del valor declarado. A menos que el contexto indique claramente lo contrario, todos los valores numéricos indicados en la presente memoria se modifican con el término aproximadamente.

La mención de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos enumerados. La mención de una realización para una variable o aspecto en la presente memoria incluye esa realización como cualquier realización única o en combinación con cualquier otra realización o parte de la misma.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones.

Cualquiera de las composiciones o procedimientos en la presente memoria proporcionados pueden combinarse con uno o más de cualquiera de las otras composiciones y procedimientos en la presente memoria proporcionados.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los perfiles farmacocinéticos (FC) de NLY001, una exenatida PEGilada. La FIG. 1 muestra los perfiles PK de exenatida y NLY001 administrados por vía subcutánea en monos cynomolgus (n=2). t1/2: semivida, TRM: media de tiempo de residencia. La semivida de exenatida y Olaedin es de 2,7±0,9 h y 88,0±10,9 h, respectivamente. El media de tiempo de residencia de exenatida y Olaedin es de 2,5±0,3 h y 114,0±17,5 h, respectivamente.

La FIG. 2 es una serie de gráficos de barras que muestran los perfiles de expresión del ARNm GLP-1r en (FIG. 2A) células microgliales primarias activadas por PFF de  $\alpha$ -sinucleína (n=4) y tejidos cerebrales humanos post-mortem de pacientes sanos y con (FIG. 2B) enfermedad de Parkinson (n=10) y (FIG. 2C) Enfermedad de Alzheimer (n=6). \*P<0,05, \*\*P<0,001.

La FIG. 3 es un esquema que muestra los experimentos de co-cultivo de microglía-neurona activada. Se activaron microglías primarias con  $\alpha$ -sinucleína con o sin NLY001 y se co-cultivaron microglías con neuronas primarias durante 72 horas seguidas de ensayos de muerte neuronal.

La FIG. 4A y la FIG. 4B son diagramas que muestran una línea de tiempo que representa la estrategia experimental en modelos de ratón de EP complementarios, (FIG. 4A) modelos de EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína y (FIG. 4B) Modelos transgénicos de EP con  $\alpha$ -sinucleína A53T.

La FIG. 5 es una serie de microfotografías que muestran que el tratamiento con NLY001 en ratones con EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína inhibe significativamente la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro. La FIG. 5 muestra inmunotinción con anticuerpo selectivo para  $\alpha$ -sinucleína LB (marrón, flecha) en los tejidos cerebrales.

La FIG. 6 muestra el análisis de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para ratones hA53T  $\alpha$ -sinucleína transgénicos (Tg) PD con PBS o NLY001. Los ratones fueron tratados con vehículo (PBS) o NLY001 a los 6 meses de edad.

La FIG. 7 muestra una línea de tiempo que representa la estrategia experimental en modelos de ratón de EA.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de laberinto acuático de Morris (MWM) en ratones 3xTg-AD tratados con NLY001. ± M.E.S., n=7 ratones por grupo. ####P < 0,001 frente al grupo WT + PBS. \*\*P < 0,01, \*\*P < 0,001 frente a 3xTg AD + PBS.

La FIG. 9 es una serie de imágenes que muestran video de detección de movimiento representativo de ratones de tipo salvaje (WT) y 3xTg-AD tratados con vehículo (PBS) o NLY001.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas engloban una serie de afecciones inducidas por la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluida su muerte. Diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH), se producen debido a procesos neurodegenerativos.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo de aparición tardía que afecta aproximadamente a un millón de estadounidenses y de 7 a 10 millones de personas en todo el mundo. Aunque la sustitución dopaminérgica alivia la disfunción motora sintomática, su eficacia se reduce a medida que avanza la enfermedad, lo que provoca efectos secundarios inaceptables como fluctuaciones motoras graves y discinesias. Además, este enfoque terapéutico paliativo no aborda los mecanismos subyacentes de la enfermedad (Nagatsua, T. and M. Sawada, *Parkinsonism Relat Disord*, 2009. 15 Suppl 1: p. S3-8).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y representa más del 80% de los casos de demencia en todo el mundo. Conduce a la pérdida progresiva del deterioro mental, conductual, funcional y de la capacidad de aprendizaje (Anand R et al., *Neuropharmacology*, 2014. 76 Pt A:27-50). Los tratamientos aprobados actualmente, como los inhibidores de la acetilcolinesterasa, sólo proporcionan una mejoría sintomática, pero no modifican el proceso de la enfermedad. Se están desarrollando clínicamente varias estrategias nuevas, como las terapias basadas en el amiloide y la tau, pero todavía no hay ningún fármaco que demuestre una eficacia clara en seres humanos.

Dado que las personas viven más tiempo, cada vez son más las que desarrollan estos trastornos neurológicos comunes y debilitantes. Antes de la invención descrita en la presente memoria, no se había identificado una terapia neuroprotectora probada que pudiera tratar la enfermedad o detener el progreso de la misma en seres humanos. Por lo tanto, existe una importante necesidad insatisfecha de estrategias terapéuticas que traten este implacable trastorno crónico progresivo.

Antes de la invención descrita en la presente memoria, los mecanismos patogénicos subyacentes a los trastornos neurodegenerativos eran complejos y en gran medida desconocidos. Entre los muchos factores relacionados con la patología de los trastornos neurodegenerativos, se cree que la microglía y la neuroinflamación son uno de los principales responsables de este trastorno (Sanchez-Guajardo et al. *Neuroscience*, 2015. 302:47-58). En el contexto de la EP y la EA, se ha discutido el papel deletéreo predominante de la microglía activada. Durante la progresión de la enfermedad en el cerebro, la microglía en reposo se activa y causa neuroinflamación y daño neuronal directamente o a través de la activación de los astrocitos mediante la liberación de moléculas tóxicas que incluyen citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral-a (TNF-a), interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 o C1q (Hirsch EC et al. *Lancet Neurol*, 2009. 8:382-397; Saito K et al. *Cell*, 2009. 137:47-59;

Farber K et al., *J Neurosci Res*, 200. 87(3):644-652). Por naturaleza, la microglía activada y los astrocitos reactivos son las principales dianas de las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, el diseño de un agente altamente selectivo que pueda bloquear la activación microglial y detener la liberación de moléculas tóxicas sin toxicidades fuera de la diana podría producir marcados efectos terapéuticos en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la falta de formas sólidas de atacar selectivamente la microglía activada sin efectos secundarios en el cerebro dificulta esta estrategia.

Antes de la invención descrita en la presente memoria, existía la necesidad de terapias que previnieran, detuvieran y/o mejoraran las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar composiciones y procedimientos para tratar y prevenir enfermedades neurodegenerativas sin toxicidad fuera de la diana. Es otro objeto de la invención proporcionar composiciones y procedimientos para bloquear o reducir la activación microglial en enfermedades neurodegenerativas dejando indemnes a las células normales. Es otro objeto de la invención proporcionar las composiciones y los procedimientos para bloquear o reducir astrocitos reactivos en enfermedades neurodegenerativas mientras que deja las células normales ileas. Es otro objeto de la invención proporcionar las composiciones y los procedimientos para proteger las neuronas contra microglial activado y/o astrocitos reactivos en enfermedades neurodegenerativas mientras que deja las células normales ileas.

En consecuencia, la presente invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de composiciones y procedimientos para tratar la enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) con agonistas GLP-1r (receptor del péptido 1 similar al glucagón) de acción prolongada con la alta bioactividad en el cerebro. En particular, como se describe en la presente memoria, las formas PEGiladas del análogo GLP-1 presentan efectos modificadores de la enfermedad con semividas más largas en comparación con los tratamientos existentes. Esto permite una dosificación menos frecuente y un mejor cumplimiento por parte del paciente en el tratamiento de individuos que padecen o corren el riesgo de padecer EP y/o EA.

Los individuos pueden padecer o estar en riesgo de padecer EP o EA en presencia o ausencia de una o más afecciones no neurológicas. Las afecciones no neurológicas incluyen la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2, las enfermedades

proliferativas, como el cáncer, las enfermedades autoinmunes y otras enfermedades locales o sistémicas como la inflamación y la infección.

Como se describe en la presente memoria, la presente invención incluye un fármaco inyectable, por ejemplo, una vez a la semana o una vez al mes, basado en péptidos con efectos modificadores de la enfermedad en EP y EA. La

5 exenatida, un péptido aprobado por la FDA (BYETTA®) y un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1r), se investigó recientemente en varios pacientes con EP, y los resultados demostraron una mejora de los síntomas motores y cognitivos, lo que indica una posible terapia de la EP (Aviles-Olmos, I., et al., J Clin Invest, 2013. 123(6): p. 2730-6; Simuni, T. and P. Brundin, J Parkinsons Dis, 2014. 4(3): p. 345-7). Como se describe en detalle más adelante, la justificación de la aplicación de este agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1r) se basa en investigaciones experimentales que demuestran efectos neuroprotectores mediados por agonistas del GLP-1r que promueven una neuroplasticidad funcionalmente beneficiosa en modelos animales de neurodegeneración. Los resultados clínicos de la exenatida demuestran una mejora de los síntomas motores y cognitivos incluso un año después de la administración del fármaco (Aviles-Olmos, I., et al., J Clin Invest, 2013. 123(6): p. 2730-6; Simuni, T. and P. Brundin, J Parkinsons Dis, 2014. 4(3): p. 345-7). La capacidad de la exenatida para tratar la EP se está

10 examinando en ensayos clínicos de fase 2. Sin embargo, la exenatida tiene una semivida corta (la t<sub>1/2</sub> humana es de 2 horas o menos) y requiere inyecciones subcutáneas (s.c.) dos veces al día que resultan incómodas y difíciles para los pacientes con EP, especialmente en estadios avanzados. Las composiciones descritas en la presente memoria proporcionan beneficios farmacológicos similares a la exenatida en la EP con una frecuencia de dosificación reducida, por ejemplo, una dosificación una vez al mes.

15 20 La exenatida (Exendin-4) es un agonista peptídico del GLP-1r que facilita la liberación de insulina en la diabetes de tipo dos (DMT2) y actualmente se comercializa como BYETTA® para la DMT2 (Meier, J.J., Nat Rev Endocrinol, 2012. 8(12): p. 728-42). Este péptido controla la liberación de insulina de forma dependiente de la glucosa y, por tanto, es seguro para los pacientes no diabéticos. La exenatida también reduce una serie de procesos neurodegenerativos (Holscher, C., J Endocrinol, 2014. 221(1): p. T31-41). En modelos preclínicos, la exenatida atraviesa la barrera 25 hematoencefálica (BHE), protege la formación de la memoria en la EA o la actividad motora en la EP, protege las sinapsis y las funciones sinápticas, potencia la neurogénesis, reduce la apoptosis, protege las neuronas del estrés oxidativo, así como reduce la formación de placas y la respuesta inflamatoria crónica en los cerebros de modelos de ratón de EA y EP. En un ensayo clínico reciente, los pacientes con EP moderadamente avanzada que fueron tratados con exenatida durante 12 meses mostraron una mejoría de los síntomas motores y cognitivos y los efectos persistieron 30 hasta 12 meses después de finalizar el tratamiento (Aviles-Olmos, I., et al., J Clin Invest, 2013. 123(6): p. 2730-6; Simuni, T. and P. Brundin, J Parkinsons Dis, 2014. 4(3): p. 345-7).

35 Los agonistas GLP-1r de acción corta (exenatida y liraglutida) muestran efectos neuroprotectores en modelos animales agudos de EP y EA basados en toxinas (Holscher, C., J Endocrinol, 2014. 221(1): p. T31-41). Cabe señalar que ninguno de los agonistas de GLP-1r ha demostrado eficacia contra la EP en modelos animales genéticos de EP asociada a la α-sinucleína. En la EA, los agonistas GLP-1r de acción corta mostraron propiedades neuroprotectoras en modelos de EA basados en toxinas, pero sus efectos anti EA en ratones transgénicos genéticos de EA (Tg) son controvertidos. Por ejemplo, la liraglutida mostró eficacia anti-PD en modelos basados en toxinas, pero no demostró efectos similares en modelos de ratones Tg con EA genética tras un tratamiento a largo plazo (Hansen HH et al., PLoS One. 2016, 11(7):e0158205). Por lo general, los compuestos cuya eficacia sólo se ha demostrado en modelos de enfermedades 40 neurodegenerativas inducidas por toxinas suelen fracasar en los ensayos clínicos. Recientemente, se ha informado de que la liraglutida no consiguió modificar las puntuaciones cognitivas en pacientes con EA tras un tratamiento a largo plazo. En conjunto, esto implica que se necesita un agonista alternativo de GLP-1r con una fuerte eficacia terapéutica en modelos clínicamente relevantes asociados con la patobiología de la EP (fenotipos de EP de α-sinucleína) o la EA (fenotipos de amiloide y tau) para garantizar el éxito de los ensayos clínicos en pacientes. Las composiciones descritas en la presente memoria proporcionan fuertes eficacias terapéuticas anti-PD y anti-AD de un agonista GLP-1r de acción 45 prolongada en modelos de PD asociados a α-sinucleína y modelos 3xTg-AD que se consideran representan modelos cercanos del proceso neurodegenerativo de PD y AD, respectivamente.

50 La exenatida, al igual que otros fármacos peptídicos, es intrínsecamente efímera e inestable en el torrente sanguíneo, por lo que requiere inyecciones frecuentes. Aunque la PEGilación es un procedimiento de referencia para prolongar la semivida de los fármacos proteicos (Harris, J.M. and R.B. Chess, Nat Rev Drug Discov, 2003. 2(3): p. 214-21), generalmente no se aplica a fármacos peptídicos más pequeños, porque la conjugación con una molécula grande de PEG suele disminuir la actividad biológica del péptido (por ejemplo, a menos del 1% de actividad biológica frente al péptido nativo). Como se describe en detalle en la presente memoria, para potenciar los péptidos potentes y de acción prolongada, se desarrolló una tecnología única de PEGilación que prolonga la semivida circulante de los péptidos de acción corta, preservando al mismo tiempo las actividades terapéuticas de la exenatida (publicaciones de patentes WO2013002580 y US20130217622). NLY001 es una forma de exenatida de acción prolongada que utiliza esta tecnología de PEGilación y se está investigando como tratamiento de la T2D una vez a la semana, dos veces al mes o una vez al mes (FIG. 1), con resultados prometedores en comparación con otros agonistas de GLP-1r del mercado.

55 60 NLY001, como forma PEGilada de exenatida de acción prolongada, tiene una semivida extendida (88 horas en primates). Las características de acción prolongada del NLY001 se han conseguido mediante una tecnología exclusiva de prolongación de la semivida que permite que la composición siga la misma diana y mecanismo de acción que la

exenatida. Un péptido agonista del GLP-1r, la exenatida, retrasa numerosos procesos neurodegenerativos (Holscher, C., J Endocrinol, 2014. 221(1): p. T31-41) además de facilitar la liberación de insulina en pacientes con T2D mediante la estimulación de GLP-1r. Este péptido controla la liberación de insulina de forma dependiente de la glucosa y, por tanto, es seguro para los pacientes no diabéticos.

- 5 Como terapia de acción prolongada basada en exenatida, NLY001 ofrece un enfoque de administración de fármacos mejorado en comparación con la exenatida, al tiempo que mantiene sus efectos farmacológicos. Por ejemplo, como se describe en detalle más adelante, de manera similar a la exenatida, el NLY001 mejora los síntomas motores y cognitivos en la EP. A diferencia de las terapias con exenatida identificadas antes de la invención descrita en la 10 presente memoria, NLY001 se administra a los pacientes con una inyección única o bimensual, lo que evita las inyecciones múltiples diarias y mejora el cumplimiento terapéutico.

Debido a que el NLY001 tiene un polímero de poli(etilenglicol) de gran peso molecular (PEG, 50.000 Da) conjugado con el pequeño péptido exenatida (~4.000 Da), la eficacia farmacológica similar a la exenatida en la EP y la EA fue completamente inesperada debido a la probable incapacidad de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) (Pardridge, W.M., NeuroRx, 2005. 2(1): p. 3-14). Como se describe en detalle más adelante, se descubrió inesperadamente que 15 NLY001 administrado por vía subcutánea se acumula significativamente más en el cerebro de modelos animales de EP y EA y demuestra claros efectos benéficos en varios modelos animales de EP recientemente establecidos (véase también, Luk, K.C., et al., Science, 2012. 338(6109): p. 949-53) y modelos animales de EA. Como se describe en detalle a continuación, los resultados demuestran que la administración de NLY001 protege contra la pérdida de 20 neuronas dopaminérgicas inducida por las fibrillas preformadas de alfa-sinucleína (PFF), reduce la patología similar a los cuerpos de Lewy inducida por las PFF, inhibe la reducción de la densidad de terminales dopaminérgicos estriatales inducida por las PFF, y restaura los déficits conductuales inducidos por las PFF, así como aumenta la esperanza de vida de los modelos de EP Tg. Cabe destacar que NLY001 bloqueó significativamente la activación de la microglía y disminuyó la formación de astrocitos reactivos en el cerebro. En conjunto, los hallazgos descritos en detalle a 25 continuación indican claramente que el NLY001 tiene efectos neuroprotectores/modificadores de la enfermedad beneficiosos contra los déficits conductuales inducidos por los PFF de alfa-sinucleína. Del mismo modo, en modelos Tg de EA, el tratamiento con NLY001 mejoró el deterioro de la memoria y redujo la agregación amiloide y la formación de tau, el sello distintivo de la EA. En consonancia con los estudios sobre la EP, el NLY001 demostró inhibir significativamente la activación de la microglía y la población de astrocitos reactivos en el cerebro de la EA.

30 Las eficacias anti-PD de los agonistas GLP-1r de acción prolongada, como los análogos del péptido GLP-1 portadores de un portador de extensión de semivida de gran peso molecular, eran desconocidas anteriormente. Los hallazgos descritos en la presente memoria demuestran los efectos anti-PD y anti-AD del agonista GLP-1r de acción prolongada en una serie de modelos animales complementarios (preformados en modelos de ratón de EP  $\alpha$ -sinucleinopatía inducida por fibrillas, modelos de ratón Tg  $\alpha$ -sinucleína A53T y modelos de ratón AD 3xTg) y elucida los mecanismos de acción. La exenatida de acción prolongada revoluciona la terapia de la EP y la EA, junto con una gran mejora del 35 cumplimiento terapéutico por parte del paciente: una opción de tratamiento semanal o mensual. La introducción de una terapia basada en exenatida con inyecciones significativamente menos frecuentes es una opción de tratamiento eficaz para los pacientes afectados y sus familias.

40 La patogénesis de la EP se debe a: 1) neuroinflamación y neurotoxicidad inducidas por la microglía activada y los astrocitos reactivos, 2) disfunción mitocondrial, 3) disfunción sináptica y 4) niveles más bajos de factor neurotrófico. Aunque los mecanismos de acción neuroprotectora de la exenatida son inciertos, cada vez hay más pruebas que sugieren que regula/retrasa algunos o todos estos procesos que contribuyen al proceso neurodegenerativo de la EP. Por lo tanto, como se describe en detalle más adelante, NLY001 confiere efectos neuroprotectores beneficiosos también en estas vías. Como se describe a continuación, las fibrillas preformadas (PFF) recientemente establecidas 45 del modelo de ratón de EP de  $\alpha$ -sinucleína y del modelo de ratón de EP A53T Tg exhiben niveles anormales de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a un aumento del estrés oxidativo y posteriormente a la disfunción mitocondrial, y recapitulan la patología de la EP como cuerpos de Lewy (LBs) a través de una vía de transmisión célula a célula. Todos estos procesos contribuyen al proceso patológico de la EP. Como se describe en detalle en la presente memoria, dado que la administración de NLY001 en dos modelos complementarios de ratón de EP protege contra la patología de la EP asociada a la  $\alpha$ -sinucleína, NLY001 también participa y manipula estas vías.

50 La etiología de las enfermedades neurodegenerativas, incluidas la EP y la EA, está ya bien definida en gran medida. Existen pruebas del aumento de la activación inmunitaria en las enfermedades neurodegenerativas. La mayoría de las investigaciones se centraron en el papel de la microglía y los astrocitos, las células inmunitarias innatas residentes del cerebro, en la patología de la EP y la EA (Sanchez-Guajardo V et al. Neuroscience. 2015. 302:47-58, Perry VH et al., Nat Rev Neurol. 2014. 10:217-224). En respuesta a la neurodegeneración y a la acumulación de proteínas 55 anormalmente agregadas, como la  $\alpha$ -sinucleína y la  $\beta$ -amiloide, la microglía en reposo pasa a un estado activado y libera diversas citocinas y moléculas neurotóxicas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y C1q, que impulsan su proliferación y activan a los astrocitos (astrocitos A1). En consecuencia, dichos mediadores inflamatorios liberados por la microglía activada o los astrocitos reactivos, inducidos por la microglía activada, provocan daños neuronales y contribuyen a la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, la microglía activada puede describirse como uno de los principales actores secundarios en las enfermedades neurodegenerativas. La inhibición de la activación de la microglía sin toxicidad fuera de la diana es una estrategia lógica para prevenir, detener y/o revertir el proceso de neurodegeneración. Sin embargo, antes de la invención descrita en la presente memoria, la falta de procedimientos 60 de neurodegeneración. Sin embargo, antes de la invención descrita en la presente memoria, la falta de procedimientos

traslacionales para dirigirse específicamente a la activación de la microglía obstaculizaba esta estrategia. Por ejemplo, los ensayos clínicos de diversos agentes antiinflamatorios, incluidos los AINE (de Jong D et al. PLoS ONE. 2008. 23:e1475), rosiglitazona (Gold M et al. Dement Geriatr Cogn Disord. 2010. 30:131-146), las estatinas (Feldman HH et al. Neurology. 2010. 74:956-964) y prednisona (Aisen PS et al. Neurology. 2000. 54:588-593), no han logrado frenar la progresión de la EA. Los decepcionantes resultados de los ensayos clínicos pueden deberse a una permeabilidad limitada de la BBB y/o a una supresión inadecuada de las citocinas proinflamatorias y neurotóxicas clave.

Los estudios describen una estrategia única para atacar y bloquear selectivamente la activación de la microglía y los astrocitos y la liberación de moléculas inflamatorias y neurotóxicas de las células inmunitarias innatas residentes activadas; de este modo se previene, detiene y/o mejora la progresión de las enfermedades neurodegenerativas. Inesperadamente, se descubrió que la microglía activada por proteínas anormalmente agregadas regula al alza el GLP-1r y que un agonista del GLP-1r de acción prolongada unido a la microglía activada inhibe significativamente la liberación de moléculas tóxicas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y C1q y protege a las neuronas. Inesperadamente, mediante el ensayo de internalización de GLP-1r, se descubrió que un agonista de GLP-1r de acción prolongada demuestra una internalización lenta de GLP-1r, reduce la tasa de reciclaje de GLP-1r en comparación con la de los agonistas de GLP-1r de acción corta (exenatida y liraglutida), por lo que puede activar continuamente GLP-1r e inducir la señalización de GLP-1r en el cerebro. Los pacientes tratados con un agonista del GLP-1r de acción corta experimentarían un "tiempo muerto" que estropearía el efecto terapéutico durante un tratamiento crónico. En cambio, el NLY001 tiene la capacidad de penetrar la BBB y activar el GLP-1r en el cerebro de forma continua, sin "tiempo muerto" y sin toxicidad fuera de la diana. Esta propiedad única de un agonista del GLP-1r de acción prolongada es fundamental para maximizar las propiedades sinérgicas antiinflamatorias y neuroprotectores del agonista del GLP-1r en las enfermedades neurodegenerativas.

### **Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP, también conocida como parkinsonismo idiopático o primario, síndrome rígido hipocinético (SRH) o parálisis agitante) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que afecta principalmente al sistema motor. Los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson son el resultado de la muerte de las células generadoras de dopamina en la sustancia negra, una región del mesencéfalo. No se conocen bien las causas de esta muerte celular. Al principio de la enfermedad, los síntomas más evidentes están relacionados con el movimiento: temblores, rigidez, lentitud de movimientos y dificultad para caminar y andar. Más adelante, pueden surgir problemas de pensamiento y comportamiento, y la demencia suele aparecer en las fases avanzadas de la enfermedad, siendo la depresión el síntoma psiquiátrico más frecuente. Otros síntomas incluyen problemas sensoriales, de sueño y emocionales. La enfermedad de Parkinson es más común en personas mayores, y la mayoría de los casos se producen después de los 50 años; cuando se observa en adultos jóvenes, se denomina EP de inicio joven (YOPD).

Los principales síntomas motores se denominan colectivamente "parkinsonismo" o "síndrome parkinsoniano". La enfermedad puede ser primaria o secundaria. La enfermedad de Parkinson primaria se denomina idiopática (sin causa conocida), aunque algunos casos atípicos tienen un origen genético, mientras que el parkinsonismo secundario se debe a causas conocidas, como las toxinas. La patología de la enfermedad se caracteriza por la acumulación de una proteína en cuerpos de Lewy en las neuronas, y una formación y actividad insuficientes de dopamina en ciertas partes del mesencéfalo. La localización de los cuerpos de Lewy suele estar relacionada con la expresión y el grado de los síntomas de un individuo. El diagnóstico de los casos típicos se basa principalmente en los síntomas, y para confirmarlo se utilizan pruebas como la formación de imágenes cerebrales.

El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson implica que un médico realice una historia clínica y un examen neurológico. No existe ninguna prueba de laboratorio que identifique claramente la enfermedad, pero a veces se utilizan exploraciones cerebrales para descartar trastornos que podrían dar lugar a síntomas similares. Las personas pueden recibir levodopa y el alivio resultante del deterioro motor tiende a confirmar el diagnóstico. El hallazgo de cuerpos de Lewy en el mesencéfalo en la autopsia suele considerarse una prueba de que la persona padecía la enfermedad de Parkinson. La evolución de la enfermedad a lo largo del tiempo puede revelar que no se trata de la enfermedad de Parkinson, y algunas autoridades recomiendan revisar periódicamente el diagnóstico. Otras causas que pueden producir secundariamente un síndrome parkinsoniano son la enfermedad de Alzheimer, el infarto cerebral múltiple y el parkinsonismo inducido por fármacos. Deben descartarse síndromes de Parkinson plus como la parálisis supranuclear progresiva y la atrofia multisistémica. Los medicamentos antiparkinsonianos suelen ser menos eficaces para controlar los síntomas en los síndromes de Parkinson plus. Tasas de progresión más rápidas, disfunción cognitiva temprana o inestabilidad postural, temblor mínimo o simetría al inicio pueden indicar una enfermedad de Parkinson plus en lugar de EP propiamente dicha. Las formas genéticas suelen clasificarse como EP, aunque los términos enfermedad de Parkinson familiar y parkinsonismo familiar se utilizan para entidades patológicas con un patrón de herencia autosómico dominante o recesivo.

Los criterios del PD Society Brain Bank requieren lentitud de movimiento (bradicinesia) más rigidez, temblor en reposo o inestabilidad postural. Es necesario descartar otras posibles causas de estos síntomas antes de diagnosticar la EP. Por último, 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 discinesias inducidas por la ingesta de un exceso de levodopa. La precisión de los criterios diagnósticos evaluados en la autopsia es del 75-90%, siendo los especialistas

como los neurólogos los que presentan las tasas más elevadas. Las tomografías computarizadas (TC) y las exploraciones cerebrales por imágenes por resonancia magnética (IRM) convencionales de las personas con EP suelen parecer normales. No obstante, estas técnicas son útiles para descartar otras enfermedades que pueden ser causas secundarias de parkinsonismo, como los tumores de los ganglios basales, la patología vascular y la hidrocefalia.

- 5 Se ha informado de que una técnica específica de IRM, la IRM de difusión, es útil para discriminar entre el parkinsonismo típico y el atípico, aunque su valor diagnóstico exacto aún se está investigando. La función dopaminérgica en los ganglios basales puede medirse con diferentes radiotrazadores PET y SPECT. Algunos ejemplos son el ioflupano ( $^{123}\text{I}$ ) (nombre comercial DaTSCAN) y el iometopano (Dopascan) para SPECT o la fluorodesoxiglucosa ( $^{18}\text{F}$ ) y la DTBZ para PET. Un patrón de actividad dopaminérgica reducida en los ganglios basales 10 puede ayudar a diagnosticar la EP.

Los tratamientos, normalmente los medicamentos L-DOPA y los agonistas dopaminérgicos, mejoran los primeros síntomas de la enfermedad. A medida que la enfermedad avanza y se siguen perdiendo neuronas dopaminérgicas, estos fármacos acaban siendo ineficaces para tratar los síntomas y, al mismo tiempo, producen una complicación caracterizada por movimientos involuntarios de torsión. La cirugía y la estimulación cerebral profunda se han utilizado

- 15 para reducir los síntomas motores como último recurso en casos graves en los que los fármacos no son eficaces. Aunque la sustitución dopaminérgica alivia la disfunción motora sintomática, su eficacia se reduce a medida que avanza la enfermedad, lo que provoca efectos secundarios inaceptables como fluctuaciones motoras graves y discinesias. Además, no existe ninguna terapia que detenga el progreso de la enfermedad (Lang, A.E. and A.M. Lozano, N Engl J Med, 1998. 339(15): p. 1044-53; Lang, A.E. and A.M. Lozano, N Engl J Med, 1998. 339(16): p. 1130-20). Además, este enfoque terapéutico paliativo no aborda los mecanismos subyacentes de la enfermedad (Nagatsua, T. and M. Sawada, Parkinsonism Relat Disord, 2009. 15 Suppl 1: p. S3-8).

El término parkinsonismo se utiliza para designar un síndrome motor cuyos principales síntomas son temblor en reposo, rigidez, enfleñecimiento del movimiento e inestabilidad postural. Los síndromes parkinsonianos pueden dividirse en cuatro subtipos según su origen: primario o idiopático, secundario o adquirido, parkinsonismo hereditario y síndromes de Parkinson plus o degeneración multisistémica. Clasificada habitualmente como un trastorno del movimiento, la EP también da lugar a varios tipos de síntomas no motores, como déficits sensoriales, dificultades cognitivas o problemas de sueño. Las enfermedades de Parkinson plus son parkinsonismos primarios que presentan características adicionales. Incluyen la atrofia multisistémica, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración corticobasal y la demencia con cuerpos de Lewy.

- 30 En términos de fisiopatología, la EP se considera una sinucleopatía debida a una acumulación anormal de proteína alfa-sinucleína en el cerebro en forma de cuerpos de Lewy, a diferencia de otras enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, en la que el cerebro acumula proteína tau en forma de ovillos neurofibrilares. No obstante, existe un solapamiento clínico y patológico entre las tauopatías y las sinucleinopatías. El síntoma más típico de la enfermedad de Alzheimer, la demencia, aparece en fases avanzadas de la EP, mientras que es habitual encontrar ovillos neurofibrilares en los cerebros afectados por la EP. La demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es otra sinucleinopatía que presenta similitudes con la EP, y especialmente con el subconjunto de casos de EP con demencia. Sin embargo, la relación entre la EP y la DCL es compleja y aún debe aclararse. Pueden representar partes de un continuo o pueden ser enfermedades separadas.

- 35 Se ha demostrado de forma concluyente que las mutaciones en genes específicos causan EP. Estos genes codifican la alfa-sinucleína (SNCA), la parkina (PRKN), la quinasa 2 de repetición rica en leucina (LRRK2 o dardarina), la quinasa putativa 1 inducida por PTEN (PINK1), DJ-1 y ATP13A2. En la mayoría de los casos, las personas con estas mutaciones desarrollarán EP. Sin embargo, a excepción de LRRK2, sólo representan una pequeña minoría de los casos de EP. Los genes relacionados con la EP más estudiados son SNCA y LRRK2. Se ha descubierto que las mutaciones en genes como SNCA, LRRK2 y glucocerebrosidasa (GBA) son factores de riesgo de la EP esporádica. 45 Es sabido que las mutaciones en GBA causan la enfermedad de Gaucher. Los estudios de asociación de genoma completo, que buscan alelos mutados con baja penetrancia en los casos esporádicos, han dado ya muchos resultados positivos.

- 50 El papel del gen SNCA es importante en la EP porque la proteína alfa-sinucleína es el componente principal de los cuerpos de Lewy. La histopatología (anatomía microscópica) de la sustancia negra y de varias otras regiones cerebrales muestra pérdida neuronal y cuerpos de Lewy en muchas de las células nerviosas restantes. La pérdida neuronal va acompañada de la muerte de los astrocitos (células gliales en forma de estrella) y la activación de la microglía (otro tipo de célula glial). Los cuerpos de Lewy son una característica patológica clave de la EP.

### Enfermedad de Alzheimer

- 55 La enfermedad de Alzheimer (EA) representa entre el 60% y el 70% de los casos de demencia. Es una enfermedad neurodegenerativa crónica que suele empezar lentamente, pero que empeora progresivamente con el tiempo. El síntoma precoz más común es la pérdida de memoria a corto plazo. A medida que la enfermedad avanza, los síntomas incluyen problemas con el lenguaje, cambios de humor, pérdida de motivación, desorientación, problemas de comportamiento y autocuidado mal gestionado. Gradualmente, se pierden las funciones corporales, lo que finalmente conduce a la muerte. Aunque la velocidad de progresión puede variar, la esperanza de semivida tras el diagnóstico es de tres a nueve años. La causa de la enfermedad de Alzheimer no se conoce bien. Se cree que aproximadamente el

70% del riesgo es genético, con muchos genes implicados. Otros factores de riesgo son antecedentes de traumatismos craneoencefálicos, hipertensión o depresión. El proceso de la enfermedad está asociado a placas y ovillos en el cerebro.

- 5 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y ciertas regiones subcorticales. Esta pérdida provoca una atrofia macroscópica de las regiones afectadas, incluida la degeneración del lóbulo temporal y el lóbulo parietal, así como de partes del córtex frontal y el giro cingulado. Se ha planteado la hipótesis de que la enfermedad de Alzheimer es una proteopatía causada por la acumulación en el cerebro de proteínas A-beta y tau plegadas de forma anormal. Las placas están formadas por pequeños péptidos, de 39-43 aminoácidos de longitud, denominados beta-amiloide (también escrito como A-beta o A $\beta$ ). El beta-amiloide es un fragmento de una proteína mayor llamada proteína precursora del amiloide (APP), una proteína transmembrana que penetra a través de la membrana de la neurona. La APP es fundamental para el crecimiento neuronal, la supervivencia y la reparación tras una lesión. En la enfermedad de Alzheimer, un proceso desconocido hace que las enzimas dividan la APP en fragmentos más pequeños mediante proteólisis. Uno de estos fragmentos da lugar a fibrillas de beta-amiloide, que forman cúmulos que se depositan fuera de las neuronas en formaciones densas conocidas como placas seniles.

- 10 Un diagnóstico probable se basa en la historia de la enfermedad y en pruebas cognitivas con imágenes médicas y análisis de sangre para descartar otras posibles causas. Los síntomas iniciales suelen confundirse con el envejecimiento normal. El examen del tejido cerebral es necesario para un diagnóstico definitivo. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica mediante una evaluación médica completa. No existe ninguna prueba clínica que pueda determinar si una persona padece Alzheimer. Normalmente se realizan varias pruebas para descartar cualquier otra causa de demencia. El único procedimiento definitivo de diagnóstico es el examen del tejido cerebral obtenido mediante biopsia o autopsia. Se realizan pruebas (como análisis de sangre e imágenes cerebrales) para descartar otras causas de síntomas similares a la demencia. Las pruebas de laboratorio y de cribado incluyen: recuento completo de células sanguíneas; panel de electrolitos; panel metabólico de cribado; pruebas de función de la glándula tiroides; niveles de folato de vitamina B-12; pruebas de sífilis y, en función de los antecedentes, de anticuerpos contra la inmunodeficiencia humana; análisis de orina; electrocardiograma (ECG); radiografía de tórax; tomografía computarizada (TC) de la cabeza; y un electroencefalograma (EEG). Una punción lumbar también puede ser informativa en el diagnóstico global.

- 15 20 25 30 No existen medicamentos o suplementos que disminuyan el riesgo. Ningún tratamiento detiene o invierte su progresión, aunque algunos pueden mejorar temporalmente los síntomas.

#### Agonistas de GLP-1 (p. ej., Exenatida)

- 35 La exenatida (comercializada como BYETTA®, Bydureon) es un medicamento agonista del péptido-1 similar al glucagón (agonista del GLP-1), perteneciente al grupo de los miméticos de la incretina, aprobado en abril de 2005 para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2. Exenatida en su forma BYETTA® se administra como inyección subcutánea (bajo la piel) del abdomen, muslo o brazo, en cualquier momento dentro de los 60 minutos anteriores a la primera y última comida del día. Desde el 27 de enero de 2012 está autorizada una inyección semanal con la marca Bydureon. Lo fabrica Amylin Pharmaceuticals y lo comercializa AstraZeneca.

- 40 La exenatida es una versión sintética de la exendina-4, una hormona que se encuentra en la saliva del monstruo de Gila. Presenta propiedades biológicas similares al péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) humano, un regulador del metabolismo de la glucosa y la secreción de insulina. De acuerdo con el prospecto, la exenatida aumenta la secreción de insulina dependiente de la glucosa por la célula beta pancreática, suprime la secreción inapropiadamente elevada de glucagón y ralentiza el vaciado gástrico, aunque el mecanismo de acción aún está en estudio.

- 45 La exenatida es un péptido de 39 aminoácidos, secretagogo de insulina, con efectos glucorreguladores. La secuencia peptídica de la exenatida es:

- 50 H(His)G(Gly)E(Glu)G(Gly)T(Thr)F(Phe)T(Thr)  
S(Ser)D(Asp)L(Leu)S(Ser)K(Lys)Q(Gln)M(Met)E(Glu)E(Glu)A(Ala)V(Val)R(Arg)L  
(Leu)F(Phe)I(Ile)E(Glu)W(Trp)L(Leu)K(Lys)N(Asn)G(Gly)G(Gly)P(Pro)S(Ser)S(Ser)G(Gly)  
)A(Ala)P(Pro)P(Pro)P(Ser) (SEQ ID NÚM.: 1). La exenatida fue aprobada por la FDA el 28 de abril de 2005 para pacientes cuya diabetes no estaba bien controlada con otra medicación oral. La medicación se inyecta por vía subcutánea dos veces al día mediante un dispositivo relleno similar a un bolígrafo.

- 55 Las hormonas incretinas GLP-1 y el péptido insulinotrópico dependiente de la glucosa (GIP) son producidas por las células endocrinas L y K del intestino tras la ingestión de alimentos. El GLP-1 y el GIP estimulan la secreción de insulina de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Sólo el GLP-1 provoca la secreción de insulina en el estado diabético; sin embargo, el GLP-1 por sí mismo es ineficaz como tratamiento clínico de la diabetes, ya que tiene una semivida muy corta *in vivo*. La exenatida tiene un 50% de homología aminoacídica con el GLP-1 y su semivida *in vivo* es más larga. Por lo tanto, se probó su capacidad para estimular la secreción de insulina y reducir la glucemia en mamíferos, y se comprobó su eficacia en el estado diabético. En estudios sobre roedores, también se ha demostrado que aumenta el número de células beta del páncreas.

Comercialmente, la exenatida se produce por síntesis química directa. Históricamente, la exenatida se descubrió como Exendin-4, una proteína segregada de forma natural en la saliva y concentrada en la cola del monstruo de Gila. Exendin-4 comparte una amplia homología y función con el GLP-1 de mamíferos, pero tiene una ventaja terapéutica en su resistencia a la degradación por la DPP-IV (que descompone el GLP-1 en los mamíferos), lo que permite una semivida farmacológica más prolongada. Las características bioquímicas de Exendin-4 permitieron considerar y desarrollar la exenatida como estrategia de tratamiento de la diabetes mellitus. Las pruebas clínicas posteriores permitieron descubrir los también deseables efectos supresores del glucagón y del apetito.

En su forma BYETTA® dos veces al día, la exenatida eleva los niveles de insulina rápidamente (en aproximadamente diez minutos tras la administración) y los niveles de insulina disminuyen sustancialmente en una o dos horas. Una dosis tomada después de las comidas tiene un efecto mucho menor sobre la glucemia que una dosis tomada antes. Los efectos sobre el azúcar en sangre disminuyen al cabo de seis a ocho horas. En su forma BYETTA®, el medicamento está disponible en dos dosis: 5 mcg. y 10 mcg. El tratamiento suele iniciarse con la dosis de 5 mcg., que se aumenta si los efectos adversos no son significativos. Bydureon, que se administra una vez a la semana, no se ve afectado por el tiempo que transcurre entre la inyección y la ingesta de alimentos. Bydureon tiene la ventaja de proporcionar una cobertura de 24 horas para la reducción del azúcar en sangre, mientras que BYETTA® tiene la ventaja de proporcionar un mejor control del pico de azúcar en sangre que se produce justo después de comer. Según la etiqueta de Bydureon de la FDA, Bydureon reduce la glucemia HbA1c en un promedio del 1,6%, mientras que BYETTA® la reduce en un promedio del 0,9%. Tanto BYETTA® como Bydureon tienen beneficios similares para la pérdida de peso. Según la etiqueta de Bydureon aprobada por la FDA, los niveles de náuseas son menores en los pacientes de Bydureon que en los de BYETTA®.

Un ejemplo de composición de GLP-1 de fusión Fc utilizada para tratar la EP o la EA es la dulaglutida. La dulaglutida es un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (agonista del GLP-1) para el tratamiento de la diabetes de tipo 2 que puede utilizarse una vez por semana. La dulaglutida consiste en GLP-1(7-37) unido covalentemente a un fragmento Fc de IgG4 humana, protegiendo así el resto de GLP-1 de la inactivación por la dipeptidil peptidasa 4. El GLP-1 es una hormona que interviene en la normalización del nivel de glucosa en sangre (glucemia). El GLP-1 es secretado normalmente por las células L de la mucosa gastrointestinal en respuesta a una comida. La dulaglutida se une a los receptores del péptido 1 similar al glucagón, ralentiza el vaciado gástrico y aumenta la secreción de insulina por las células Beta pancreáticas. Simultáneamente, el compuesto reduce la elevada secreción de glucagón mediante la inhibición de las células alfa del páncreas, que se sabe que es inapropiada en el paciente diabético. Un ejemplo de composición de albúmina-fusión de GLP-1 utilizada para tratar la EP o la EA es la albiglutida. La albiglutida es un fármaco agonista del péptido-1 similar al glucagón (agonista del GLP-1) utilizado para el tratamiento de la diabetes de tipo 2. Se trata de un dímero del péptido-1 similar al glucagón resistente a la dipeptidil peptidasa-4 fusionado con albúmina humana. La albiglutida tiene una semivida de cuatro a siete días.

#### Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol (PEG) es un compuesto poliéster con muchas aplicaciones, desde la fabricación industrial hasta la medicina. La estructura del PEG es (cabe destacar el elemento repetido entre paréntesis): H-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH El PEG también se conoce como óxido de polietileno (PEG) o polioxietileno (POE), en función de su peso molecular. PEG, PEO o POE se refiere a un oligómero o polímero de óxido de etileno. Los tres nombres son químicamente sinónimos, pero históricamente el PEG se prefiere en el campo biomédico, mientras que el PEO es más frecuente en el campo de la química de polímeros. Debido a que las diferentes aplicaciones requieren diferentes longitudes de cadena polimérica, PEG ha tendido a referirse a oligómeros y polímeros con una masa molecular inferior a 20.000 g/mol, PEO a polímeros con una masa molecular superior a 20.000 g/mol, y POE a un polímero de cualquier masa molecular. El PEG y el PEO son líquidos o sólidos poco fundibles, según su peso molecular. Los PEG se preparan por polimerización de óxido de etileno y están disponibles comercialmente en un amplio intervalo de pesos moleculares, desde 300 g/mol hasta 10.000.000 g/mol. Aunque el PEG y el PEO con diferentes pesos moleculares se utilizan en distintas aplicaciones y tienen propiedades físicas diferentes (por ejemplo, viscosidad) debido a los efectos de la longitud de la cadena, sus propiedades químicas son casi idénticas. También existen diferentes formas de PEG, dependiendo del iniciador utilizado para el procedimiento de polimerización - el iniciador más común es un éter metílico monofuncional PEG, o metoxipoli(etilenglicol), abreviado mPEG. Los PEG de menor peso molecular también están disponibles como oligómeros más puros, denominados monodispersos, uniformes o discretos. Recientemente se ha demostrado que el PEG de muy alta pureza es cristalino, lo que permite determinar una estructura cristalina mediante difracción de rayos X. Dado que la purificación y separación de oligómeros puros es difícil, el precio de este tipo de calidad suele ser 10-1000 veces superior al del PEG polidisperso.

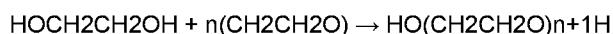
Los PEG también están disponibles con diferentes geometrías. Los PEG ramificados tienen de tres a diez cadenas de PEG que emanan de un grupo central. Los PEG en forma de estrella tienen de 10 a 100 cadenas de PEG que emanan de un grupo central. Los PEG en forma de peine tienen múltiples cadenas de PEG normalmente injertadas en una espina dorsal polimérica. Los números que se suelen incluir en los nombres de los PEG indican sus pesos moleculares promedio (por ejemplo, un PEG con n = 9 tendría un peso molecular promedio de aproximadamente 400 daltons, y se etiquetaría como PEG 400). La mayoría de los PEG incluyen moléculas con una distribución de pesos moleculares (es decir, son polidispersos). La distribución de tamaños puede caracterizarse estadísticamente por su peso molecular promedio en peso (Mw) y su peso molecular promedio en número (Mn), cuya relación se denomina índice de polidispersidad (Mw/Mn). Mw y Mn pueden medirse por espectrometría de masas.

La PEGilación es el acto de acoplar covalentemente una estructura de PEG a otra molécula mayor, por ejemplo, una proteína terapéutica, que se denomina entonces proteína PEGilada. El interferón PEGilado alfa-2a o -2b son tratamientos inyectables de uso común para la infección por Hepatitis C. El PEG es soluble en agua, metanol, etanol, acetonitrilo, benceno y diclorometano, e insoluble en éter dietílico y hexano. Se acopla a moléculas hidrófobas para producir tensioactivos no iónicos. Los PEG contienen impurezas potencialmente tóxicas, como óxido de etileno y 1,4-dioxano. El etilenglicol y sus éteres son nefrotóxicos si se aplican sobre la piel dañada.

El polietilenglicol (PEG) y los polímeros relacionados (construcciones de fosfolípidos de PEG) se suelen sonicar cuando se utilizan en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, el PEG es muy sensible a la degradación sonolítica y los productos de degradación del PEG pueden ser tóxicos para las células de mamíferos. Por lo tanto, es imperativo evaluar la posible degradación del PEG para garantizar que el material final no contenga contaminantes no documentados que puedan introducir artefactos en los resultados experimentales.

La consistencia de los PEG y los metoxipolietilenglicoles varía de líquida a sólida, en función del peso molecular, como indica el número que sigue al nombre. Se utilizan comercialmente en numerosas aplicaciones, como tensioactivos, en alimentos, en cosméticos, en farmacia, en biomedicina, como agentes dispersantes, como disolventes, en ungüentos, en bases de supositorios, como excipientes de comprimidos y como laxantes. Algunos grupos específicos son los lauromacrogoles, los nonoxinoles, los octoxinoles y los poloxámeros.

El polietilenglicol se produce por la interacción del óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción es catalizada por catalizadores ácidos o básicos. El etilenglicol y sus oligómeros son preferentes como material de partida en lugar del agua, porque permiten crear polímeros con una baja polidispersidad (distribución estrecha del peso molecular). La longitud de la cadena del polímero depende de la proporción de reactivos.



Dependiendo del tipo de catalizador, el mecanismo de polimerización puede ser catiónico o aniónico. La polimerización del óxido de etileno es un proceso exotérmico.

El óxido de polietileno, o polietilenglicol de alto peso molecular, se sintetiza por polimerización en suspensión. Es necesario mantener en solución la cadena polimérica en crecimiento durante el proceso de policondensación. La reacción es catalizada por compuestos de elementos orgánicos de magnesio, aluminio o calcio. Para evitar la coagulación de las cadenas poliméricas de la solución, se utilizan aditivos quelantes como la dimetilgioxima. Para preparar polietilenglicol de bajo peso molecular se utilizan catalizadores alcalinos como hidróxido sódico ( $\text{NaOH}$ ), hidróxido potásico ( $\text{KOH}$ ) o carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

El PEG se utiliza como excipiente en numerosos productos farmacéuticos. Las variantes de menor peso molecular se utilizan como disolventes en líquidos orales y cápsulas blandas, mientras que las variantes sólidas se emplean como bases de pomadas, aglutinantes de comprimidos, revestimientos peliculares y lubricantes. El PEG también se utiliza en colirios lubricantes.

El polietilenglicol tiene una baja toxicidad y se utiliza en una gran variedad de productos. El polímero se utiliza como revestimiento lubricante para diversas superficies en entornos acuosos y no acuosos. Como el PEG es un polímero flexible y soluble en agua, puede utilizarse para crear presiones osmóticas muy elevadas (del orden de decenas de atmósferas). Tampoco es probable que tenga interacciones específicas con sustancias químicas biológicas. Estas propiedades hacen del PEG una de las moléculas más útiles para aplicar presión osmótica en experimentos de bioquímica y biomembranas, en particular cuando se utiliza la técnica del estrés osmótico.

La PEGilación (también denominada a menudo pegilación) es el proceso de unión o amalgama tanto covalente como no covalente de cadenas poliméricas de polietilenglicol (PEG) a moléculas y macroestructuras, como un fármaco, una proteína terapéutica o una vesícula, que se describe entonces como PEGilado (pegilado). La PEGilación se consigue habitualmente mediante la incubación de un derivado reactivo del PEG con la molécula diana. La unión covalente de PEG a un fármaco o proteína terapéutica puede "enmascarar" el agente frente al sistema inmunitario del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas) y aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente, lo que prolonga su tiempo circulatorio al reducir la depuración renal. La PEGilación también puede aportar solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrófobas.

La PEGilación es el proceso de unir las hebras del polímero PEG a moléculas, más típicamente péptidos, proteínas y fragmentos de anticuerpos, que pueden mejorar la seguridad y eficacia de muchas terapéuticas. Produce alteraciones en las propiedades fisicoquímicas, incluidos cambios en la conformación, la unión electrostática, la hidrofobicidad, etc. Estos cambios físicos y químicos aumentan la retención sistémica del agente terapéutico. Además, puede influir en la afinidad de unión del resto terapéutico a los receptores celulares y alterar los patrones de absorción y distribución.

El PEG es un polímero particularmente atractivo para la conjugación. Las características específicas de las moléculas de PEG relevantes para las aplicaciones farmacéuticas son: solubilidad en agua, alta movilidad en solución, ausencia de toxicidad y baja inmunogenicidad, fácil eliminación del organismo y distribución alterada en el organismo.

Proceso de PEGilación

La primera etapa de la PEGilación es la funcionalización adecuada del polímero de PEG en uno o ambos terminales. Los PEG que se activan en cada extremo terminal con el mismo resto reactivo se denominan "homobifuncionales", mientras que si los grupos funcionales presentes son diferentes, el derivado de PEG se denomina "heterobifuncional" o "heterofuncional". Los derivados químicamente activos o activados del polímero de PEG se preparan para unir el PEG a la molécula deseada.

Los procesos generales de PEGilación para la conjugación de proteínas pueden clasificarse a grandes rasgos en dos tipos, a saber, un proceso por lotes en fase de solución y un proceso por lotes alimentado en columna. El proceso por lotes, sencillo y comúnmente adoptado, consiste en mezclar los reactivos en una solución tampón adecuada, preferentemente a una temperatura comprendida entre 4° y 6 °C, seguido de la separación y purificación del producto deseado mediante una técnica adecuada basada en sus propiedades fisicoquímicas, como la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), la cromatografía de intercambio iónico (IEX), la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) y las membranas o los sistemas acuosos de dos fases.

La selección del grupo funcional adecuado para el derivado de PEG se basa en el tipo de grupo reactivo disponible en la molécula que se acoplará al PEG. En el caso de las proteínas, los aminoácidos reactivos típicos son la lisina, la cisteína, la histidina, la arginina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, la treonina y la tirosina. El grupo amino de extremo N terminal y el ácido carboxílico de extremo C terminal también pueden utilizarse como sitio específico mediante conjugación con polímeros funcionales aldehídicos. Las técnicas utilizadas para formar derivados de PEG de primera generación consisten generalmente en hacer reaccionar el polímero de PEG con un grupo reactivo con grupos hidroxilo, típicamente anhídridos, cloruros ácidos, cloroformatos y carbonatos. En la segunda generación de la química de PEGilación, se dispone de grupos funcionales más eficientes como aldehídos, ésteres, amidas, etc. para la conjugación.

A medida que las aplicaciones de la PEGilación se han vuelto cada vez más avanzadas y sofisticadas, ha aumentado la necesidad de PEG heterobifuncionales para la conjugación. Estos PEG heterobifuncionales son muy útiles para unir dos entidades, cuando se necesita un espaciador hidrófilo, flexible y biocompatible. Los grupos finales preferentes para los PEG heterobifuncionales son la maleimida, las vinil sulfonas, el disulfuro de piridilo, la amina, los ácidos carboxílicos y los ésteres de NHS. Se dispone de agentes de pegilación de tercera generación, en los que la forma del polímero ha sido ramificada, en forma de Y o de peine, que muestran una viscosidad reducida y ausencia de acumulación de órganos. La imprevisibilidad de los tiempos de eliminación de los compuestos PEGilados puede conducir a la acumulación de compuestos de gran peso molecular en el hígado dando lugar a cuerpos de inclusión sin consecuencias toxicológicas conocidas. Además, la alteración de la longitud de la cadena puede dar lugar a tiempos de eliminación inesperados *in vivo*.

**PEGilación del agonista GLP-1r (NLY001, PB-119, LY2428757)**

Como se describe a continuación, el rendimiento de exenatida puede aumentarse mediante la PEGilación selectiva y puede aumentarse el efecto terapéutico de los medicamentos. Dicha tecnología aumenta el peso molecular, la defensa de un sitio de metabolismo y la inhibición de un sitio de inmunogenicidad, aumentando la semivida y la estabilidad *in vivo* y reduciendo la inmunogenicidad. Además, la excreción renal de péptidos y proteínas unidos con PEG se reduce debido al aumento de los pesos moleculares de los péptidos y proteínas por el PEG, por lo que la PEGilación tiene ventajas de aumentar los efectos tanto farmacocinética como farmacodinámicamente.

Además, el polietilenglicol o un derivado del mismo según la presente invención es de tipo lineal o de tipo ramificado, y para el tipo ramificado, puede utilizarse preferentemente un tipo dimérico o un tipo trimérico, y más preferentemente puede utilizarse un tipo trimérico. Específicamente, el derivado de polietilenglicol es, por ejemplo, succinimidilpropionato de metoxipolietilenglicol, N-hidroxisuccinimida de metoxipolietilenglicol, propionaldehído de metoxipolietilenglicol, maleimida de metoxipolietilenglicol, o múltiples tipos ramificados de estos derivados. Preferentemente, el derivado de polietilenglicol es metoxipolietilenglicol maleimida lineal, metoxipolietilenglicol maleimida ramificada o metoxipolietilenglicol maleimida trimérica, y más preferentemente es metoxipolietilenglicol maleimida trimérica.

Como se describe en la presente memoria, una vez preparada la exenatida PEGilada con polietilenglicol o su derivado, la estructura molecular del análogo puede confirmarse mediante un espectroscopio de masas, una cromatografía líquida, un análisis de difracción de rayos X, una polarimetría y la comparación entre los valores calculados y los valores medidos de los elementos representativos que constituyen la exenatida PEGilada.

Cuando la composición de la presente invención se utiliza como medicamento, la composición farmacéutica que contiene la exenatida PEGilada con polietilenglicol o un derivado de la misma puede administrarse después de ser formulada en diversas formas de administración oral o no oral como las siguientes en caso de administración clínica, pero no se limita a las mismas.

Para la formulación destinada a la administración oral, por ejemplo, existen comprimidos, pellets, cápsulas duras/blandas, líquidos, suspensiones, emulsionantes, jarabes, gránulos, elixires, pastillas, etc., y estas formulaciones incluyen diluyentes (ejemplo: lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina), modificadores del deslizamiento (ejemplo: sílice, talco, estearato y su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol) además del principio

activo. Los comprimidos también pueden incluir aglutinantes como silicato de aluminio y magnesio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidina, y pueden incluir agentes desintegradores como almidón, agar, ácido algínico o sal sódica del mismo o mezcla en ebullición y/o absorbentes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes si es necesario.

- 5 La composición farmacéutica que contiene el análogo de Exendin-4 PEGilado con polietilenglicol o un derivado del mismo puede administrarse por vía no oral, y la administración se realiza mediante inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intratorácica o administración tópica.

La exenatida PEGilada con polietilenglicol o un derivado del mismo puede prepararse como líquido o suspensión mezclándola con estabilizador o tampón en agua para formularla en una formulación no destinada a la administración oral, y puede prepararse en forma de ampolla o vial de administración unitaria. La composición está esterilizada y/o puede incluir adyuvantes como antisépticos, estabilizantes, hidratantes o estimuladores de la emulsión, sales y/o tampones que controlan la presión osmótica y otras sustancias beneficiosas para los tratamientos, y puede formularse de acuerdo con los procedimientos tradicionales de mezcla, granulación o revestimiento.

10 15 La dosis corporal humana de la composición farmacéutica que contiene la exenatida PEGilada con polietilenglicol o un derivado de la misma según la presente invención puede variar en función de la edad, el peso corporal, el sexo, la forma de administración, el estado de salud y el nivel de enfermedad de los pacientes, y puede administrarse por vía oral o no oral siguiendo las decisiones de los médicos o farmacéuticos con dosis preferentemente de 0,01 a 200 mg/kg/día.

#### **Barrera hematoencefálica (BHE)**

20 25 30 La barrera hematoencefálica (BHE) es una barrera de permeabilidad altamente selectiva que separa la sangre circulante del líquido extracelular cerebral (LECC) en el sistema nervioso central (SNC). La barrera hematoencefálica está formada por células endoteliales cerebrales, conectadas por uniones estrechas con una resistividad eléctrica extremadamente alta. Los astrocitos son necesarios para crear la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica permite el paso de moléculas liposolubles, agua y algunos gases por difusión pasiva, así como el transporte selectivo de moléculas como los aminoácidos y la glucosa, que son cruciales para la función neuronal. La barrera hematoencefálica se produce a lo largo de todos los capilares cerebrales y consiste en uniones estrechas alrededor de los capilares que no existen en la circulación normal. Las células endoteliales restringen la difusión de objetos microscópicos (por ejemplo, bacterias) y moléculas grandes o hidrófilas en el líquido cefalorraquídeo (LCR), al tiempo que permiten la difusión de moléculas hidrófobas pequeñas (por ejemplo, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, hormonas). Las células de la barrera transportan activamente productos metabólicos como la glucosa a través de la barrera con proteínas específicas.

35 Esta "barrera" resulta de la selectividad de las uniones estrechas entre las células endoteliales en los vasos del SNC que restringe el paso de solutos. En la interfaz entre la sangre y el cerebro, las células endoteliales están unidas por estas uniones estrechas, compuestas por subunidades más pequeñas, con frecuencia dímeros bioquímicos, que son proteínas transmembrana como la ocludina, las claudinas, la molécula de adhesión de unión (JAM) o la ESAM, por ejemplo. Cada una de estas proteínas transmembrana está anclada en las células endoteliales por otro complejo proteico que incluye zo-1 y proteínas asociadas.

40 45 50 55 La barrera hematoencefálica está formada por el endotelio capilar cerebral y excluye del cerebro el 100% de los neuroterapéuticos de molécula grande y más del 98% de todos los fármacos de molécula pequeña. Superar la dificultad de administrar agentes terapéuticos a regiones específicas del cerebro supone un reto importante para el tratamiento de la mayoría de los trastornos cerebrales. En su función neuroprotectora, la barrera hematoencefálica impide la llegada al cerebro de muchos agentes terapéuticos y de diagnóstico potencialmente importantes. Las moléculas terapéuticas y los anticuerpos que podrían ser eficaces en el diagnóstico y la terapia no atraviesan la BHE en cantidades adecuadas. Los mecanismos de administración de fármacos en el cerebro implican atravesar la barrera biológica o ir por detrás de ella. Las modalidades de administración/dosificación de fármacos a través de la BHE implican su interrupción por medios osmóticos; bioquímicamente mediante el uso de sustancias vasoactivas como la bradicinina; o incluso mediante la exposición localizada a ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU). Otros procedimientos utilizados para atravesar la BHE pueden implicar el uso de sistemas de transporte endógenos, incluidos los transportadores mediados por portadores, como los transportadores de glucosa y aminoácidos; la transcritosis mediada por receptores para la insulina o la transferrina; y el bloqueo de transportadores de eflujo activos, como la p-glicoproteína. Sin embargo, se ha observado que los vectores dirigidos a los transportadores de la BHE, como el receptor de transferrina, permanecen atrapados en las células endoteliales de los capilares cerebrales, en lugar de ser transportados a través de la BHE al parénquima cerebral. Los procedimientos de administración de fármacos detrás de la BHE incluyen la implantación intracerebral (por ejemplo, mediante agujas) y la distribución por convección. Además, el manitol puede utilizarse para eludir la BHE.

Es bien sabido que los fármacos biológicos peptídicos o proteicos sin capacidad de dirigirse a receptores de la barrera hematoencefálica, como el receptor de transferrina, no atraviesan la BHE. Debido al alto peso molecular del análogo de exenatida PEGilado o del análogo de GLP-1 y a la falta de ligandos que se dirijan a los receptores de la barrera

hematoencefálica, era inesperado que las composiciones descritas en la presente memoria atravesaran la barrera hematoencefálica y trataran la EP y la EA.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: La microglía activada regula al alza el GLP-1r y los agonistas del GLP-1r bloquean selectivamente la activación microglial e inhiben la liberación de múltiples moléculas neurotóxicas.

La microglía activada es uno de los orígenes de las enfermedades neurodegenerativas. La activación microglial conduce a una mayor producción de mediadores proinflamatorios y neurotóxicos como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y C1q. Como resultado, estos mediadores inflamatorios, directamente o a través de la activación de los astrocitos, inducen la neuroinflamación y el daño neuronal. Por ejemplo, el TNF- $\alpha$  se expresa a niveles muy bajos en una variedad de células cerebrales, incluidas las neuronas, pero cuando la microglía y los astrocitos se activan por patógenos o daños, expresan y liberan altos niveles de TNF- $\alpha$ . Se ha informado de que el TNF- $\alpha$  producido por la microglía activada es necesario y suficiente para desencadenar la apoptosis en las células neuronales (Guadagno J et al. Cell Death and Disease. 2013. 4:e538), y existen pruebas de que el TNF- $\alpha$  contribuye a diversas patologías cerebrales como la EP, la EA, la esclerosis múltiple y otras enfermedades neurodegenerativas. Antes de la invención descrita en la presente memoria, no existían procedimientos robustos clínicamente probados para dirigirse selectivamente y afectar a la activación microglial y astrocitaria en seres humanos.

### Resultados

Se identificó que NLY001, un agonista GLP-1r de acción prolongada, se dirigía a la microglía activada transformada de la microglía en reposo e inhibía simultáneamente múltiples mediadores inflamatorios y neurotóxicos en enfermedades neurodegenerativas. Cuando la microglía primaria fue activada por proteínas anormalmente agregadas, por ejemplo, fibrillas preformadas de  $\alpha$ -sinucleína (PFF), la microglía activada reguló al alza los niveles de ARNm de GLP-1r (FIG. 2A, FIG. 2B, y FIG. 2C). Los tejidos cerebrales de pacientes con EP y EA muestran un GLP-1r regulado al alza en comparación con los tejidos cerebrales sanos (FIG. 2A, FIG. 2B, y FIG. 2C). Es importante destacar que cuando la microglía es tratada con  $\alpha$ -sinucleína PFF (1 $\mu$ g/ml) y NLY001 (1 $\mu$ M) durante 6 hr, NLY001 bloqueó la activación microglial y redujo significativamente la liberación de múltiples mediadores inflamatorios incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. In vivo, se descubrió que NLY001 administrado por vía subcutánea inhibe simultáneamente los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y C1q (Tabla 1). Este resultado indica que un agonista de GLP-1r de acción prolongada es capaz de dirigirse selectivamente a la microglía activada a través de GLP-1r regulado al alza y, al mismo tiempo, cerrar el paso a la microglía activada

30 **Tabla 1.** Niveles de ARNm (pliegue relativo) de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en microglía primaria de ratón normal y activada por  $\alpha$ -sinucleína PFF tratada con o sin NLY001.  $\pm$  M.E.S., n=3 por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS), P < 0,001 frente al grupo PFF + PBS.

aRNm	PBS		$\alpha$ -sinucleína PFF	
	PBS	NLY001 (1 $\mu$ M)	PBS	NLY001 (1 $\mu$ M)
TNF- $\alpha$	1 + 0,07	1,9 + 0,27	113,2 $\pm$ 18,9***	11,3 $\pm$ 3,15###
IL-6	1 + 0,02	1,6 + 0,04	70,9 $\pm$ 0,75***	12,3 $\pm$ 2,38###
IL-1 $\beta$	1 + 0,02	1,6 + 0,02	506,5 $\pm$ 13,58***	57 $\pm$ 1,58###
IL-1 $\alpha$	1 + 0,02	1,5 + 0,02	276,8 $\pm$ 4***	142,2 $\pm$ 4,1###

35 la liberación de múltiples mediadores inflamatorios y tóxicos que pueden inducir daños neuronales en las enfermedades neurodegenerativas.

#### Ejemplo 2: NLY001 protege a las neuronas contra la muerte celular neuronal mediada por la microglía activada.

### Materiales y procedimientos

Para determinar los efectos de NLY001 sobre la neurotoxicidad microglial inducida por  $\alpha$ -sinucleína PFF, se probó NLY001 para determinar si protege a las neuronas primarias contra la muerte celular neuronal mediada por microglía

activada por  $\alpha$ -sinucleína PFF. Para ello, se activaron células microgliales con  $\alpha$ -sinucleína PFF (1 $\mu$ g/ml) con o sin NLY001 (1 $\mu$ M) durante 6 h y luego se lavó el medio de cultivo. A continuación, se co-cultivaron neuronas primarias con microglía activada durante 72 horas, tal como se describe en la FIG. 3. La toxicidad neuronal se evaluó mediante tinción con PI.

## 5 Resultados

Como se resume en la Tabla 2, las neuronas co-cultivadas con microglía activada por  $\alpha$ -sinucleína PFF mostraron un aumento de la muerte celular. Por el contrario, cuando las neuronas fueron co-cultivadas con células microgliales tratadas con PFF y NLY001 demostraron una muerte celular neuronal significativamente reducida. Estos resultados implican que NLY001 puede proteger a las células neuronales de las células microgliales transformadas o de los astrocitos activados por proteínas anormalmente agregadas durante la progresión de las enfermedades neurodegenerativas.

**10 Tabla 2.** Ensayo de muerte celular neuronal en co-cultivo de microglía primaria y neuronas corticales primarias.  $\pm$  M.E.S., n=4 por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS), ###P < 0,001 frente al grupo PFF + PBS.

	Microglía en reposo + neuronas		Microglía activada por PFF + neuronas	
	PBS	NLY001 (1 $\mu$ M)	PBS	NLY001 (1 $\mu$ M)
Muerte celular (%)	8,7 + 0,8	8,6 + 1,6	46,1 $\pm$ 9,6***	13,8 $\pm$ 4,8###

**Ejemplo 3: Un agonista de GLP-1r de acción prolongada, el NLY001, activa de forma constitutiva el GLP-1r a través de una internalización retardada del GLP-1r en comparación con los agonistas de GLP-1r de acción corta.**

20 La eficacia de los agonistas GLP-1r de acción corta en modelos de ratón transgénicos clínicamente relevantes de enfermedad neurodegenerativa no está clara. Por ejemplo, la liraglutida (inyección una vez al día) no mostró ningún efecto sobre la carga de placa  $\beta$ -amiloide en modelos de EA 2xTg tras un tratamiento a largo plazo (Hansen HH et al. PLoS One. 2016; 11(7):e0158205). En la EP, ninguno de los agonistas de GLP-1r (de acción corta o larga) demostró la eficacia en modelos de EP Tg o mutantes clínicamente relevantes. En general, los agonistas GLP-1r de acción corta 25 demostraron su eficacia en modelos agudos de EP y EA basados en toxinas, pero no en modelos crónicos transgénicos. Los agonistas de acción corta del GLP-1r pueden mostrar una eficacia reducida o nula en modelos crónicos de EP o EA. Históricamente, los compuestos cuya eficacia sólo se ha demostrado en modelos neurodegenerativos basados en toxinas fracasan en su mayoría en los ensayos clínicos. En contraste, como se describe en los ejemplos, el NLY001 demostró claramente fuertes eficacias anti-PD y anti-AD en múltiples y complementarios modelos crónicos de PD y AD.

30 A diferencia de los agonistas GLP-1r de acción corta, el NLY001 es un agonista GLP-1r de acción prolongada e inesperadamente penetra la BHE y muestra una alta acumulación en el cerebro de enfermedades neurodegenerativas (Tabla X). Se planteó la hipótesis de que los agonistas del GLP-1r de acción corta no son eficaces en modelos Tg crónicos con enfermedad neurodegenerativa debido a su falta de capacidad para activar de forma continua el GLP-1r 35 en el cerebro. Además de una semivida plasmática prolongada del NLY001 que puede suministrar continuamente el ligando GLP-1 activo al cerebro, se identificó que, a nivel de molécula, el NLY001 retrasa significativamente la internalización del GLP-1r, por lo que es capaz de amplificar la singularización del GLP-1, en comparación con la de los agonistas del GLP-1r de acción corta (Tabla 3). Por lo tanto, combinado con una semivida plasmática prolongada 40 y la capacidad de penetrar la BHE, NLY001 puede activar continuamente el GLP-1r e inducir la señalización del GLP-1 en las células diana del cerebro sin "tiempo muerto", en comparación con los agonistas del GLP-1r de acción corta.

45 Las propiedades de internalización del GLP-1r de acción corta y de acción larga se investigaron utilizando el kit PathHunter eXpress GLP1RA activated GPCR Internalization Assay (DiscoverRx, CA). Brevemente, el kit detecta la interacción de la detención con el receptor activado utilizando la complementación de fragmentos enzimáticos como se describe en el manual del fabricante. Se colocaron células PathHunter eXpress activadas por internalización de GPCR en una placa de 96 pocillos ( $10^5$  células por pocillo) y se estimularon con dos agonistas de GLP-1r de acción corta (exenatida y liraglutida) y un agonista de GLP-1r de acción larga, NLY001, a concentraciones de  $10^{-12}$  a  $10^{-6}$  M. Tras la estimulación, se detectó la señal de acuerdo con los protocolos recomendados por el fabricante. Como se resume en la Tabla 3, NLY001 demostró un retraso de 10 a 20 veces en la internalización de GLP-1r en términos de EC50 para la estimulación del agonista (nM) en comparación con los agonistas GLP-1r de acción corta, exenatida y 50 liraglutida.

**Tabla 3.** Internalización de GLP-1r humano por agonistas de GLP-1r de acción corta y larga.  $\pm$  M.E.S., n=4 por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. ####P < 0,001 frente a agonistas GLP-1r de acción corta.

	Agonista GLP-1r de acción corta		Agonista GLP-1 de acción prolongada
Agonista GLP-1r	exenatida	liraglutida	NLY001
EC50 para estimulación agonista (nM)	6,5 + 2,8	3,9 + 2,9	60 $\pm$ 2,6##

5 **Ejemplo 4: NLY001 reduce la gliosis asociada a la  $\alpha$ -sinucleína (activación de microglía y astrocitos), inhibe la agregación de  $\alpha$ -sinucleína y mejora la patología LB/LN y alivia el déficit motor en ratones con EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína.**

#### Materiales y procedimientos

##### Animales

10 Todos los procedimientos experimentales se siguieron de acuerdo con las directrices del Laboratory Animal Manual of the National Institute of Health Guide to the Care and Use of Animals, que fueron aprobadas por el Johns Hopkins Medical Institute Animal Care and Use Committee. Se prepararon ratones con EP inducida por  $\alpha$ -sinucleína PFF (Luk, K.C., et al., Science, 2012. 338(6109): p. 949-53) para la inyección estereotáctica de  $\alpha$ -sinucleína PFF, se anestesiaron ratones macho de 12 semanas de edad con xilaceno y ketamina. Se aplicó una cánula de inyección (calibre 26,5) 15 estereotácticamente en el cuerpo estriado (anteroposterior, a 3,0 mm del bregma; mediolateral, a 0,2 mm; dorsoventral, a 2,6 mm) unilateralmente (aplicada en el hemisferio derecho). La infusión se realizó a una velocidad de 0,2  $\mu$ l por minuto, y se inyectaron en el ratón 2  $\mu$ l de  $\alpha$ -sinucleína PFF (5ug/ml en PBS) o el mismo volumen de PBS. La piel de la cabeza se cerró mediante sutura y se supervisó la cicatrización de la herida y la recuperación tras la intervención. 20 Para el análisis estereológico, los animales fueron perfundidos y fijados intracardialmente con PBS helado seguido de paraformaldehido al 4% 6 meses después de la inyección de  $\alpha$ -sinucleína PFF estriatal. Se extrajo el cerebro y se procesó para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. La prueba conductual se realizó 6 meses después de la inyección unilateral de  $\alpha$ -sinucleína estriatal PFF. El tratamiento con NLY001 (3mg/kg) se realizó después de 1 mes de inyección unilateral de  $\alpha$ -sinucleína estriatal PFF, 2 veces por semana, como se describe en la FIG. 4A.

#### Efectos neuroprotectores beneficiosos de NLY001 contra los déficits conductuales inducidos por $\alpha$ -sinucleína PFF

25 Las cuatro pruebas conductuales diferentes se realizaron en ratones tratados con vehículo (PBS) o con NLY001 a los 6 meses después de la inyección de  $\alpha$ -sinucleína PFF.

Prueba del poste: Los animales se aclimataron en la sala de procedimientos conductuales durante 30 minutos. El poste se compone de una varilla de metal de 2,5 pies (76,2 cm) con 9 mm de diámetro y envuelto con una gasa vendaje. Brevemente, los ratones se colocaron en la parte superior del poste (a 3 pulgadas de la parte superior del poste) mirando hacia arriba. Se registró el tiempo total empleado en llegar a la base del poste. Antes de la prueba propiamente dicha, los ratones fueron entrenados durante dos días consecutivos y cada sesión de entrenamiento consistió en tres ensayos de prueba. El día de la prueba se evaluó a los ratones en tres sesiones y se registraron los tiempos totales. El corte máximo de tiempo para detener la prueba y el registro fue de 30 seg. Los resultados se expresaron en tiempo total (en seg), la inyección de  $\alpha$ -sinucleína PFF condujo a un aumento significativo en el tiempo para llegar a la base del poste mientras que el tratamiento de NLY001 redujo el déficit conductual inducido por  $\alpha$ -sinucleína PFF, similar al de los ratones sanos (Tabla 4). Prueba del Rotarod: Para la prueba del rotarod, se colocó a los ratones en un cilindro rotarod acelerador y se midió el tiempo que los animales permanecían en el rotarod. La velocidad se aumentó lentamente de 4 a 40 rpm en 5 minutos. Un ensayo finalizaba si el animal se caía de los peldaños o agarraba el dispositivo y giraba durante 2 revoluciones consecutivas sin intentar caminar sobre los peldaños. Los animales fueron entrenados 3 días antes de la prueba. Los datos de la prueba motora se presentan como porcentaje de la duración media (3 ensayos) en el rotarod en comparación con el control. El tratamiento con NLY001 mejoró significativamente el desempeño del rotarod comparado con el de los modelos de EP inducida por PFF tratados con PBS (Tabla 4).

40 45 Prueba del cilindro: El movimiento espontáneo se midió colocando a los animales en un pequeño cilindro transparente (altura, 15,5 cm; diámetro, 12,7 cm). Se registró la actividad espontánea durante 5 minutos. Se midió el número de toques con la pata delantera, de encabritamientos y de glooming. Los archivos de registro fueron visualizados y valorados a cámara lenta por un experimentador ciego al tipo de ratón y al tratamiento NLY001. Los ratones con EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína muestran déficits en el uso de las extremidades anteriores en la tarea del cilindro, 50 mientras que los ratones con EP tratados con NLY001 alivian el déficit motor con un uso equilibrado de ambas extremidades anteriores (Tabla 4).

5 Rotación estereotípica inducida por anfetamina: Se administraron 5 mg/kg de anfetamina (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal a ratones. Los ratones se colocaron en un cilindro de papel blanco de 20 cm de diámetro y se controlaron durante 30 minutos. Se filmó el comportamiento de los ratones en tres intervalos de un minuto entre 20 y 30 minutos después de la administración de anfetamina. Se contaron las rotaciones ipsilaterales de todo el cuerpo (en el sentido de las agujas del reloj) durante una sesión de un minuto para cada ratón a partir de las grabaciones de vídeo. La inyección de  $\alpha$ -sinucleína multiplicó por 7 el comportamiento de rotación inducido por la anfetamina, lo que indica la pérdida de neuronas dopaminérgicas. En contraste, NLY001 previene la rotación inducida por anfetamina indicando que las neuronas dopaminérgicas son funcionales (Tabla 4).

10 **Tabla 4.** Ensayo conductual en modelos de EP sanos y en modelos de EP inducida por  $\alpha$ -sinucleína (PFF).  $\pm$  M.E.S., n=10 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS), ##P < 0,01, ###P < 0,001 frente al grupo inyectado con PFF.

Prueba	PBS sano (SC)	NLY001 sano (SC)	PFF	PFF
			PBS (SC)	NLY001 (SC)
Rotarod (latencia a la caída, seg)	143,60 $\pm$ 8,28	156,66 $\pm$ 9,39	67,75 $\pm$ 6,48***	115,05 $\pm$ 7,34
Ensayo en poste (tiempo de descenso, s)	11,87 $\pm$ 1,25	9,91 $\pm$ 0,82	22,69 $\pm$ 1,17***	13,7 $\pm$ 1,07##
Prueba del cilindro (toque de la pata delantera en 5 min)	21,83 $\pm$ 1,35	21,54 $\pm$ 2,10	14,50 $\pm$ 2,08***	22,54 $\pm$ 2,05##
Prueba de anfetamina (giro/min)	1,57 $\pm$ 0,21	1,42 $\pm$ 0,23	7,13 $\pm$ 0,27***	2,29 $\pm$ 0,55###

15 **NLY001 rescata las neuronas dopaminérgicas (DA) y mejora la patología LB en ratones con EP inducida por  $\alpha$ -sinucleína PFF.**

20 La acumulación de  $\alpha$ -sinucleína patológica está relacionada con la degeneración de las neuronas DA. Como se describe en la presente memoria, se examinó la capacidad de NLY001 administrado sistémicamente para proteger contra la pérdida de neuronas DA inducida por la inoculación de  $\alpha$ -sinucleína PFF. Los ratones fueron sacrificados y la pérdida de neuronas DA se midió contando el número de neuronas tiroxina hidroxilasa (TH) positivas y Nissl-positivas en el SNpc utilizando estereología no sesgada. Además, se analizó la densidad relativa de fibras TH-positivas en el cuerpo estriado (STR) mediante la medición de la densidad óptica. La inmunotinción de las secciones SNpc y STR y la cuantificación de las neuronas DA teñidas TH-positivas y la densidad de fibras muestran una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en ratones inyectados con PFF en comparación con los controles tratados con PBS. Por el contrario, la administración de NLY001 protege significativamente contra la pérdida neuronal TH inducida por PFF (Tabla 5).

25 **Tabla 5.** NNY001 rescata las neuronas DA en ratones con EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína.  $\pm$  M.E.S., n=10 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS), ##P < 0,01 frente al grupo inyectado con PFF.

Prueba	PBS sano (SC)	NLY001 sano (SC)	PFF (BI)	PFF (BI)
			PBS (SC)	NLY001 (SC)
Neurona TH en SNpc ( $\times 10^4$ )	5,62 $\pm$ 0,51	5,77 $\pm$ 0,62	2,90 $\pm$ 0,37***	4,54 $\pm$ 0,27##
Células Nissle positivas ( $\times 10^4$ )	7,22 $\pm$ 0,56	7,41 $\pm$ 0,20	4,31 $\pm$ 0,26***	6,53 $\pm$ 0,44##
Densidad relativa de fibras en STR	1,00 $\pm$ 0,07	0,972 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,06***	0,87 $\pm$ 0,04##

30 A continuación, se investigó la capacidad de NLY001 para mejorar la propagación de la patología LB/neuritas de Lewy (LN) inducida por la inoculación de PFF con  $\alpha$ -sinucleína. Tras el tratamiento descrito anteriormente, se visualizaron depósitos de  $\alpha$ -sinucleína hiperfosforilada, un marcador de LB/LN humana, en el lugar de la inyección (STR) y la sustancia negra (SN) utilizando el anticuerpo p-Syn<sup>Ser129</sup>. Las neuronas positivas para p-Syn<sup>Ser129</sup> mostraron un

aumento significativo de la patología similar a LB/LN en el estriado y la SN de los ratones inyectados con PFF en comparación con los controles tratados con PBS. Como se muestra en la FIG. 5, NLY001 reduce la patología LB/LN en el cerebro de la EP.

**NLY001 inhibe la gliosis en el cerebro de la EP reduciendo la activación de la microglía y los astrocitos asociada a la  $\alpha$ -sinucleína.**

La microglía y el astrocito de la región SNpc se tiñeron con anti-Iba-1 (1: 1000, Wako) o anti-GFAP (1:2000, Dako), seguidos de incubación con anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina y reactivos ABC. A continuación, las secciones se revelaron con el sustrato de peroxidasa SigmaFast DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). El número de microglías y las densidades de astrocitos en la región SNpc se midieron con el software ImageJ. En los modelos de EP, las poblaciones celulares de Iba-1-positivo (microglía activada) y GFAP-positivo (astrocitos reactivos) están muy aumentadas. El tratamiento con NLY001 bloqueó significativamente la activación de la microglía y disminuyó la formación de astrocitos reactivos en modelos de EP inducida por PFF (Tabla 6).

**Tabla 6.** NLY001 bloquea la activación de microglía y astrocitos asociada a  $\alpha$ -sinucleína en ratones con EP inducida por PFF de  $\alpha$ -sinucleína.  $\pm$  M.E.S., n=10 ratones por grupo. Se utilizó ANOVA de dos vías para el análisis estadístico y seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS), ###P < 0,001 frente al grupo inyectado con PFF.

Prueba	PBS sano (SC)	NLY001 sano (SC)	PFF (BI)	PFF (BI)
	PBS (SC)	NLY001 (SC)		
Intensidad relativa de GFAP	1,00 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,04	1,92 $\pm$ 0,13***	1,31 $\pm$ 0,06###
Intensidad relativa Iba-1	1,00 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,09	2,66 $\pm$ 0,31***	1,55 $\pm$ 0,14###
Densidad de microglía (células/mm <sup>2</sup> )	26,50 $\pm$ 4,00	24,21 $\pm$ 4,55	138,22 $\pm$ 11,21***	55,12 $\pm$ 6,14###

**Ejemplo 5:** NLY001 reduce la gliosis asociada a la  $\alpha$ -sinucleína (activación de microglía y astrocitos), inhibe la agregación de  $\alpha$ -sinucleína, mejora la patología de LB/LN y aumenta la esperanza de vida en ratones con EP A53T Tg mejora la patología LB/LN y aumenta la esperanza de vida en ratones con EP A53T Tg.

**Animales**

Los ratones transgénicos de  $\alpha$ -sinucleína A53T (A53T) se obtuvieron de Jackson Lab (B6; Prnp-SNCA\*A53T, PMID: 12084935). Los ratones se aparearon con ratones C57BL/6 (Jackson Lab), y se generaron para el presente estudio. NLY001 y PBS fueron tratados subcutáneamente (3mg/kg, dos veces por semana) en ratones control de tipo salvaje (WT) y ratones A53T PD después de los 6 meses de edad hasta los 10 meses de edad y la fecha de muerte, como se describe en la Fig. 4B.

**NLY001 se acumula significativamente más alto en el cerebro de la EP comparado con el cerebro del ratón WT.**

Los ratones fueron sacrificados a los 10 meses de edad y la concentración de NLY001 en el cerebro (cerebelo y hemisferio) se midió mediante un inmunoensayo como se describió anteriormente. NLY001 se extrajo de los tejidos cerebrales utilizando C-18 SEP-Column (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) y se analizó mediante el kit Exendin-4 EIA (Phoenix Pharmaceuticals Inc). Inesperadamente, NLY001 administrado subcutáneamente penetró la BHE y se acumuló significativamente más alto (10 a 30 veces) en el cerebro de la EP (A53T) comparado con el cerebro del ratón WT sano (Tabla 7).

**Tabla 7.** La acumulación cerebral de NLY001.  $\pm$  M.E.S., n=6-8 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control WT + NLY001.

Cerebro	WT	WT	A53T
	PBS (SC)	NLY001 (SC)	NLY001 (SC)
Cerebelo (pg por mg de tejido cerebral)	0,00 $\pm$ 0,00	28,48 $\pm$ 1,41	961,29 $\pm$ 202,73***
Hemisferio (pg por mg de tejido cerebral)	3,00 $\pm$ 0,73	40,48 $\pm$ 2,6	445,55 $\pm$ 22,95***

**El tratamiento con NLY001 aumenta el peso corporal en modelos de EP.**

Los modelos de ratón de EP avanzada generalmente muestran una disminución del peso corporal. En la clínica, la pérdida de peso en la EP es un problema crítico. Los tratamientos de EP que se complican por la pérdida de peso tienen como resultado un peor resultado global del tratamiento y una menor calidad de vida. Es sabido que los agonistas del GLP-1r aprobados para pacientes con diabetes/obesidad reducen eficazmente el peso corporal durante un tratamiento crónico. La liraglutida ha demostrado ser especialmente eficaz para la pérdida de peso a largo plazo en la diabetes de tipo 2, y recientemente se ha aprobado una dosis alta de liraglutida como medicamento contra la obesidad (Sexenda). A diferencia de otros agonistas de GLP-1r, NLY001 no reduce el peso corporal en modelos de enfermedades neurodegenerativas y aumenta el peso corporal al tiempo que mejora la progresión de la enfermedad (Tabla 8).

**Tabla 8.** Peso corporal de los modelos de ratones WT y A53T PD a los 12 meses de edad tratados con PBS o NLY001.  $\pm$  M.E.S., n=20 ratones por grupo. \*\*\*P < 0,001 frente a grupos control WT,###P < 0,001 frente a grupo A53T + PBS.

Ratones	WT	WT	A53T	A53T
	PBS (SC)	NLY001 (SC)	PBS (SC)	NLY001 (SC)
Peso corporal (g)	37,94 $\pm$ 0,56	38,76 $\pm$ 1,96	27,01 $\pm$ 0,28***	33,60 $\pm$ 0,50###

**NLY001 aumenta la esperanza de vida de los ratones A53T α-sinucleína Tg.**

Los ratones Tg de α-sinucleína A53T muestran una vida más corta debido a la degeneración de las neuronas del tronco cerebral y de la médula espinal que conduce a la parálisis de las extremidades, disfunción autómata y muerte prematura (Lee MK et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(13):8969-8973). En la mayoría de los animales afectados, la enfermedad progresó rápidamente hasta la muerte, posiblemente debido a la imposibilidad de alimentarse y a la deshidratación. En este estudio, los ratones A53T presentaron letalidad prematura entre los 11 y los 14 meses de edad. Por el contrario, el tratamiento con NLY001 aumentó significativamente la vida útil de A53T (FIG. 6 y Tabla 9).

**Tabla 9.** La mediana de supervivencia se calculó mediante GraphPad Prism 6.  $\pm$  M.E.S., n=20 ratones por grupo. ###P < 0,001 frente al grupo A53T + PBS.

Ratones	WT	WT	A53T	A53T
	PBS (SC)	NLY001 (SC)	PBS (SC)	NLY001 (SC)
Mediana de supervivencia (meses)	ninguna muerte	ninguna muerte	12,9	17,1###

**NLY001 inhibe la gliosis en el cerebro con EP y reduce la agregación de α-sinucleína en ratones con EP A53T α-sinucleína Tg en ratones con EP A53T α-sinucleína Tg.**

Las activaciones de microglía y astrocitos se analizaron como se ha descrito anteriormente. El número de microglías y las densidades de astrocitos en el cerebro se midieron con el software ImageJ. En los modelos de EP A53T Tg, las poblaciones celulares de Iba-1-positivo (microglía activada) y GFAP-positivo (astrocitos reactivos) estaban altamente incrementadas. El tratamiento con NLY001 bloqueó significativamente la activación de la microglía y disminuyó la formación de astrocitos reactivos en los modelos de EP A53T Tg (Tabla 10). Es importante destacar que las expresiones proteicas relativas de α-sinucleína <sup>p-ser129</sup>, α-sinucleína agregada y β-actina se analizaron mediante inmunoblot en la fracción insoluble en detergente del tronco cerebral de ratones A53T Tg de 10 meses de edad y controles de camada emparejados por edad con PBS o NLY001. Además, se analizó la formación de inclusiones ubiquitina-positivas en el tronco cerebral de los ratones A53T Tg mediante imágenes de inmunohistoquímica de p-α-sinucleína. Como se ha visto en ratones con EP inducida por PFF, NLY001 bloqueó significativamente la agregación de α-sinucleína en ratones con EP A53T Tg. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 10.** NLY001 bloquea la activación de microglía y astrocitos asociada a α-sinucleína en ratones con EP A53T α-sinucleína Tg.  $\pm$  M.E.S., n=7 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. \*\*\*P < 0,001 frente al grupo de control (PBS),##P < 0,01,###P < 0,001 frente al grupo A53T + PBS.

Prueba	WT PBS (SC)	WT NLY001 (SC)	A53T PBS (SC)	A53T NLY001 (SC)
Intensidad relativa de GFAP	1,00 ± 0,04	0,98 ± 0,08	1,95±0,05***	1,24±0,03##
Intensidad Iba-1 relativa	1,00 ± 0,11	0,98 ± 0,09	2,66±0,31***	1,55±0,14##
Densidad de microglía (células/mm <sup>2</sup> )	29,10 ± 3,00	27,33 ± 2,89	141,33±8,49***	50,66 ± 5,06###

**Tabla 11.** NLY001 reduce las expresiones de  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina en ratones con EP A53T  $\alpha$ -sinucleína Tg. ± M.E.S., n=3 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de dos vías, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación de grupos múltiples. ###P< 0,001 frente al grupo A53T + PBS.

Prueba	A53T PBS (SC)	A53T NLY001 (SC)
$\alpha$ -sinucleínarelativa p-ser129	1,00 ± 0,10	0,48 ± 0,06###
Agregación relativa de $\alpha$ -sinucleína	1,00 ± 0,04	0,43 ± 0,05###
Intensidad relativa de la ubiquitina	1,00 ± 0,08	0,52 ± 0,06###

5

**Ejemplo 6: NLY001 mejora la patología similar a la enfermedad de Alzheimer y el deterioro de la memoria en ratones 3xTg AD.**

**Materiales y procedimientos**

Animales: los ratones AD 3xTg se obtuvieron de Jackson Lab. Estos ratones, ampliamente utilizados, contienen tres 10 mutaciones, la sueca AAP, la MAPT 3P01L y la PSEN1 M126V, asociadas a la enfermedad de Alzheimer familiar. los ratones 3xTg muestran patología tanto de placa como de espiga. El depósito de B-amiloide es progresivo y aparece intracelularmente a partir de los tres o cuatro meses de edad y los depósitos extracelulares aparecen a los seis meses en el córtex frontal y se hacen más extensos a los doce meses. En este estudio se utilizaron ratones macho 3xTg AD de 6 meses de edad. NLY001 y PBS fueron tratados subcutáneamente (1mg/kg y 10mg/kg, dos veces por semana) 15 en ratones control de tipo salvaje (WT) y ratones AD 3xTg después de edades de 7 meses durante 5 meses, como se describe en la FIG. 7.

**NLY001 mejora la memoria en ratones 3xTg AD. Dos pruebas conductuales diferentes (Webster SJ et al., Front Genet. 2014. 5:88) en ratones tratados con vehículo (PBS) o con NLY001.**

Prueba del laberinto acuático de Morris (MWM): El laberinto acuático de Morris es una piscina circular blanca (100 cm de diámetro y 35 cm de altura) con una superficie interior sin rasgos característicos. La piscina circular se llenó con agua y un tinte blanco hidrosoluble no tóxico. La piscina se dividió en cuatro cuadrantes de igual superficie. Se centró una plataforma (de 8 cm de diámetro y 10 cm de altura) en uno de los cuadrantes de la piscina y se sumergió 1 cm por debajo de la superficie del agua para que fuera invisible a nivel del agua. La piscina estaba situada en una sala de pruebas que contenía varias señales visuales destacadas. La ubicación de cada ratón nadador, desde la posición inicial hasta la plataforma, se controló mediante un sistema de video de detección de movimiento (sistema ANY-maxe, Wood Dale, IL, EE.UU.). El día anterior al experimento se dedicó al entrenamiento de natación durante 60 en ausencia de la plataforma. A continuación, se sometió a los ratones a tres sesiones de ensayo diarias durante cinco días consecutivos, con un intervalo entre ensayos de 15 minutos, y se registraron las latencias de escape. Este parámetro se promedió para cada sesión de ensayos y para cada ratón. Una vez que el ratón localizaba la plataforma, se le permitía permanecer en ella durante 10s. Si el ratón no localizaba la plataforma en 60 segundos, se colocaba en la plataforma durante 10 segundos y el experimentador lo retiraba del grupo. El día 6, la prueba de la sonda consistió en retirar la plataforma de la piscina. Esta prueba se realizó con un tiempo de corte de 60 segundos. El punto de entrada del ratón en la piscina y la ubicación de la plataforma para escapar permanecieron invariables entre los ensayos 1 y 2, pero se cambiaron cada día a partir de entonces.

Como se describe en la FIG. 8 y FIG. 9, los ratones 3xTg AD tratados con PBS mostraron defectos en el aprendizaje en comparación con los ratones WT. El día 4 y el día 5, los ratones 3xTg tratados con PBS emplearon más tiempo que sus compañeros de camada WT para localizar la plataforma oculta. Por el contrario, los ratones 3xTg AD tratados con NLY001 mostraron un rendimiento significativamente mejorado en comparación con el de los ratones 3xTg tratados con PBS, lo que indica que el tratamiento con NLY001 alivió el deterioro del aprendizaje espacial en los ratones 3xTg. 35 Para evaluar la fuerza de la memoria del aprendizaje espacial, se examinaron los ensayos de sondeo el día 5. Los ratones 3xTg tratados con NLY001 pasaron significativamente más tiempo buscando la plataforma en el cuadrante 40

diana en comparación con los ratones 3xTg AD tratados con PBS (Tabla 12). El tratamiento con NLY001 no influyó en la velocidad ni en la distancia de nado.

**Tabla 12.** Prueba de la sonda y prueba de natación en ratones AD 3xTg tratados con NLY001.  $\pm$  M.E.S., n=7 ratones por grupo. \*P < 0,05 frente a WT + PBS, #P < 0,05, ###P < 0,001 frente al grupo 3xTg AD + PBS.

Prueba de la sonda	WT		3xTg-AD		
	PBS	NLY001 10mg/kg	PBS	NLY001 1mg/kg	NLY001 10mg/kg
Tiempo de nado en el cuadrante diana (seg)	26,26 5,49	+ 27,02 + 4,19	17,52 9,63*	$\pm$ 24,49 $\pm$ 6,17#	32,66 $\pm$ 7,16###
Velocidad de nado (m/s)	0,21 + 0,02	0,19 + 0,02	0,20 + 0,03	0,20 + 0,02	0,20 + 0,02

5

**Prueba de evasión pasiva:** Los efectos del aprendizaje/memoria del NLY001 se evaluaron mediante un procedimiento de evitación pasiva por etapas, en el que los animales aprenden a evitar una descarga eléctrica suprimiendo su preferencia natural por los entornos oscuros. Las pruebas comenzaron con un entrenamiento en el que se colocaba a un ratón en una cámara iluminada; cuando el ratón cruzaba a la cámara oscura, recibía una descarga leve (0,25mA/1 s) en el pie. Esta latencia inicial para entrar en el compartimento oscuro (descarga) sirvió como medida de referencia. Durante las pruebas de sondeo, 24 horas después del entrenamiento, se volvió a colocar al ratón en el compartimento de la luz y se midió la latencia para volver al compartimento oscuro como índice de evitación pasiva del miedo. El tratamiento con NLY001 mejoró significativamente el aprendizaje en ratones 3xTg AD evaluado mediante la prueba de evitación pasiva en comparación con el de ratones 3xTg AD tratados con PBS (Tabla 13).

10

15

**Tabla 13.** Aprendizaje evaluado mediante la prueba de evitación pasiva en ratones WT y 3xTg AD tratados con PBS o NLY001. Las barras de error representan la media  $\pm$  E.S.M., n=7 ratones por grupo. \*P < 0,05 frente al grupo WT + PBS, #P < 0,05 frente al grupo 3xTg AD + PBS.

Evasión pasiva	WT		3xTg-AD		
	PBS	NLY001 10mg/kg	PBS	NLY001 1mg/kg	NLY001 10mg/kg
Tiempo para entrar en oscuridad (seg)	213,3 93,3	+ 242,4 + 96,7	148,0 125,2*	$\pm$ 242,1 $\pm$ 91,5#	228,9 $\pm$ 121,7#

20

#### NLY001 se acumula significativamente más en el cerebro de la EA en comparación con el cerebro del ratón WT.

Como se describió en los modelos de EP, los ratones fueron sacrificados después del estudio y la concentración de NLY001 en todo el cerebro se midió mediante un inmunoensayo como se describió anteriormente. NLY001 fue extraído de los tejidos cerebrales utilizando Columna-SEP C-18 y analizado por Exendin-4 EIA kit. Como se ha demostrado en modelos de EP, el NLY001 administrado por vía subcutánea penetró en la BHE y se acumuló entre dos y cinco veces más en el cerebro de la EA 3xTg en comparación con el cerebro sano del ratón WT.

25

#### NLY001 inhibe la gliosis en el cerebro de la EA reduciendo la activación de la microglía y los astrocitos.

La microglía y el astrocito de los tejidos cerebrales fijados se tiñeron con anticuerpos anti-Iba-1 o anti-GFAP seguidos de incubación con anticuerpo anti-conejo conjugado con biotina y reactivos ABC como se ha descrito anteriormente. En los modelos de EA, las poblaciones celulares de Iba-1-positivo (microglía activada) y GFAP-positivo (astrocitos reactivos) están muy aumentadas. El tratamiento con NLY001 bloqueó significativamente la activación de la microglía y disminuyó la formación de astrocitos reactivos en modelos de EA 3xTg. Además, también se validó que el GLP-1r está altamente expresado en las células Iba-1-positivas (microglía activada) pero no en las células MAP2-positivas (neurona). Estos resultados respaldan los descubrimientos *in vitro*, según los cuales un agonista de acción prolongada del GLP-1r bloquea la gliosis y detiene la liberación de moléculas inflamatorias y neurotóxicas al unirse al GLP-1r expresado en las células inmunitarias innatas residentes en el cerebro, incluida la microglía.

**El tratamiento con NLY001 reduce la expresión de moléculas inflamatorias y neurotóxicas en el cerebro de ratones 3xTg AD.**

Para confirmar aún más si la eficacia anti-AD del NLY001 en ratones 3xTg se debe a la inhibición de la liberación de moléculas inflamatorias y neurotóxicas secretadas por la microglía activada y los astrocitos reactivos, se analizaron homogeneizados de tejido cerebral mediante PCR en tiempo real para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 y C1q. Se observó que los niveles de expresión de los marcadores inflamatorios eran significativamente superiores en los ratones 3xTg en comparación con los ratones WT. En forma consistente con los resultados del estudio en células in vitro, los ratones 3xTg tratados con NLY001 demostraron una reducción significativa en la expresión de marcadores inflamatorios y neurotóxicos como se resume en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Efectos de NLY001 en ratones 3xTg AD. Los niveles de ARNm de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, y C1q en el cerebro fueron analizados por PCR en tiempo real.  $\pm$  M.E.S., n=5 ratones por grupo. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 frente al grupo WT + PBS, #P < 0,05, ##P < 0,01 frente al grupo 3xTg AD + PBS.

aRNm	WT		3xTg-AD		
	PBS	NLY001 10mg/kg	PBS	NLY001 1mg/kg	NLY001 10mg/kg
TNF- $\alpha$	1,0 + 0,5	1,0 + 0,4	3,7 ± 3,1**	1,8 ± 0,5#	2,0 ± 0,7#
IL-1 $\beta$	1,0 + 0,4	0,9 + 0,5	2,9 ± 1,4***	1,4 ± 0,5##	1,6 ± 0,9##
IFN- $\gamma$	1,0 + 0,7	0,6 + 0,3	5,3 ± 5,7**	1,4 ± 0,5#	1,6 ± 0,8##
IL-6	1,0 + 0,4	0,8 + 0,1	1,9 ± 0,4*	1,4 + 0,4	1,1 ± 0,3#
C1q	1,0 + 0,3	1,0 + 0,1	1,6 ± 0,3*	1,2 + 0,3	1,1 + 0,2, 1,1 ± 0,2#

## REIVINDICACIONES

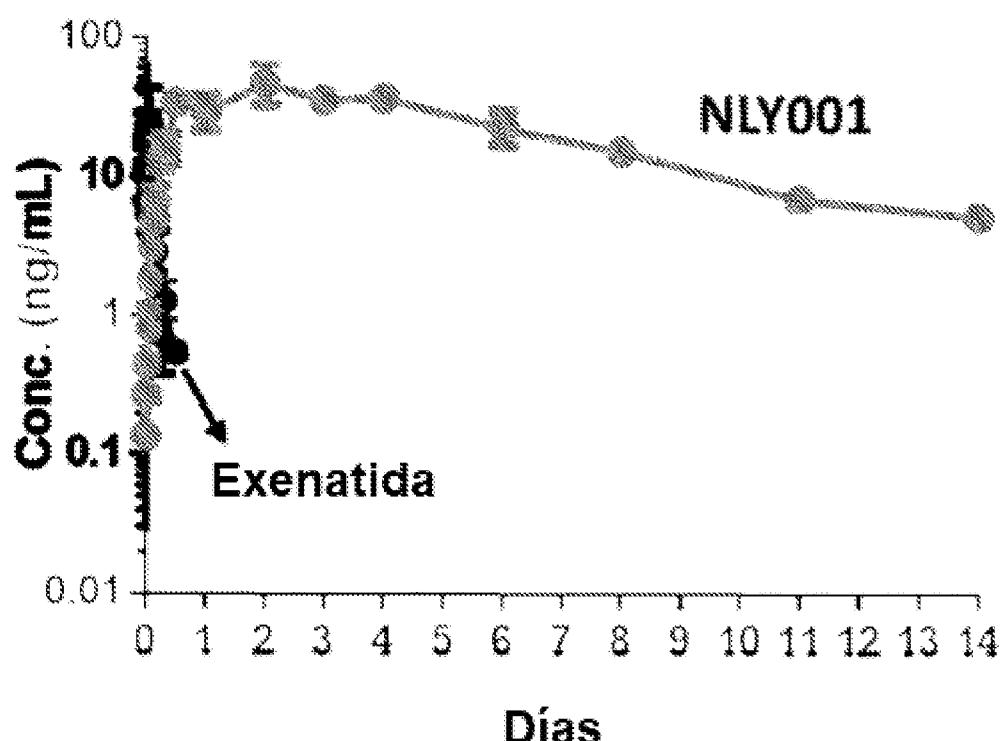
1. Una composición para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un individuo que padece o tiene riesgo de padecer una enfermedad o trastorno neurodegenerativo, en la que dicha composición comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agonista GLP-1r de acción prolongada que es exenatida (SEQ ID NÚM.: 1) conjugado en el extremo C terminal a un polietilenglicol (PEG) ramificado con un peso molecular de entre 40 kDa y 80 kDa para bloquear o reducir la activación de células inmunitarias innatas residentes seleccionadas del grupo formado por microglía y astrocitos, o inhibir la secreción de mediadores inflamatorios y/o neurotóxicos secretados por las células inmunitarias innatas activadas para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno neurodegenerativo.
- 5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en la que se inhibe que las proteínas anormalmente agregadas activen las células inmunitarias mediante la regulación al alza de GLP-1r, opcionalmente en la que las proteínas anormalmente agregadas son  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -amiloide o tau.
- 10 3. La composición para uso de la reivindicación 1 o 2, en la que el PEG ramificado es un PEG trimérico, o derivado del mismo, preferentemente de 50 kDa, en la que el derivado del PEG es metoxipolietilenglicol succinimidopropionato, metoxipolietilenglicol N-hidroxisuccinimida, metoxipolietilenglicol propionaldehído, o metoxipolietilenglicol maleimida.
- 15 4. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el agonista GLP-1r de acción prolongada está en una cantidad eficaz para reducir mediadores inflamatorios o neurotóxicos seleccionados del grupo que consiste en TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 y C1q en comparación con un control apropiado.
- 20 5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la cantidad eficaz de un agonista GLP-1r de acción prolongada reduce las poblaciones celulares de microglía activada y astrocitos reactivos.
- 25 6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica.
- 30 7. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición se administra mediante administración oral, administración intravenosa, administración tópica, administración parenteral, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intratecal, administración intralesional, administración intracraneal, administración intranasal, administración intraocular, administración intracardíaca, administración intravítreo, administración intraósea, administración intracerebral, administración intraarterial, administración intraarticular, administración intradérmica, administración transdérmica, administración transmucosa, administración sublingual, administración enteral, administración sublabial, administración por insuflación, administración por suppositorio, administración inhalada o administración subcutánea; preferentemente, la composición se administra por vía subcutánea.
- 35 8. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición se administra en una forma seleccionada del grupo que consiste en píldoras, cápsulas, comprimidos, gránulos, polvos, sales, cristales, líquidos, sueros, jarabes, suspensiones, geles, cremas, pastas, películas, parches, y vapores.
9. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición se administra
- 40 (a) entre 1 y 4 veces al mes;
- (b) una vez a la semana;
- (c) cada dos semanas;
- (d) aproximadamente una vez al mes;
- (e) una vez cada dos meses; o
- (f) entre 1 y 3 veces cada 6 meses.
- 45 10. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición comprende una semivida *in vivo* de entre 12 horas y 200 horas en primates no humanos o humanos.
11. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición se administra a un humano en una dosis dentro del intervalo de entre 0,001 mg/kg y 100 mg/kg; preferentemente dentro del intervalo de entre 0,001 mg/kg y 10 mg/kg.
- 50 12. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que los efectos del tratamiento duran al menos un año.
13. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el procedimiento protege contra

- (a) pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por fibrillas preformadas de alfa-sinucleína; y/o
- (b) toxicidad amiloide-beta y/o tau en las neuronas de la enfermedad de Alzheimer.

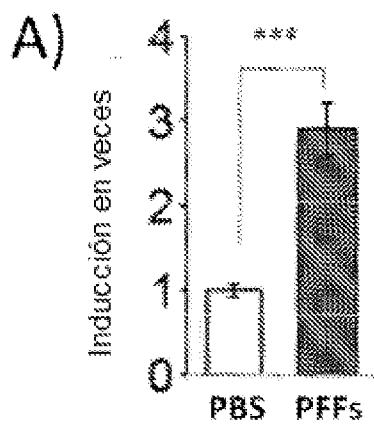
14. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que las habilidades motoras, de memoria y cognitivas mejoran en el individuo en relación con un control; y/o en la que las sinapsis y/o las funciones sinápticas se protegen, la neurogénesis se potencia, la apoptosis se reduce, las neuronas se protegen del estrés oxidativo, la formación de placas se reduce y la respuesta inflamatoria crónica se previene en el individuo en relación con un control.

5

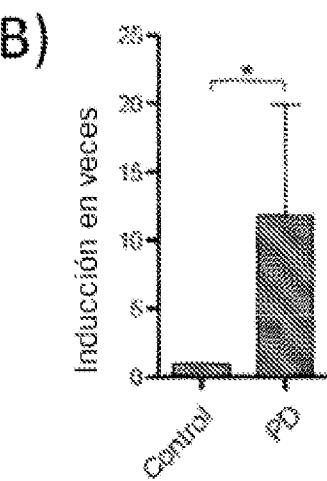
FIG. 1



**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**

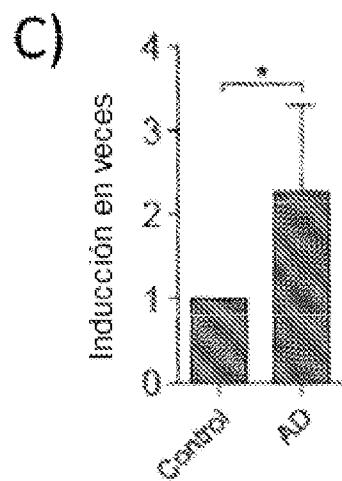


FIG. 3

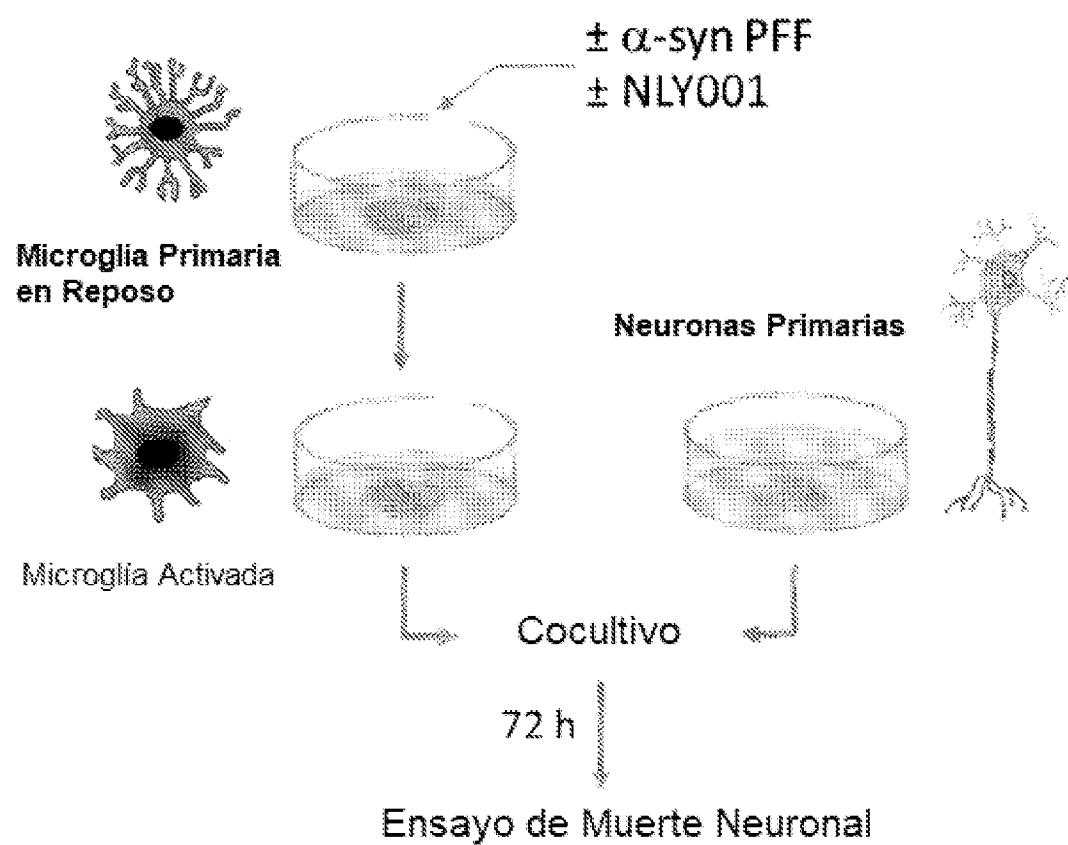


FIG. 4A

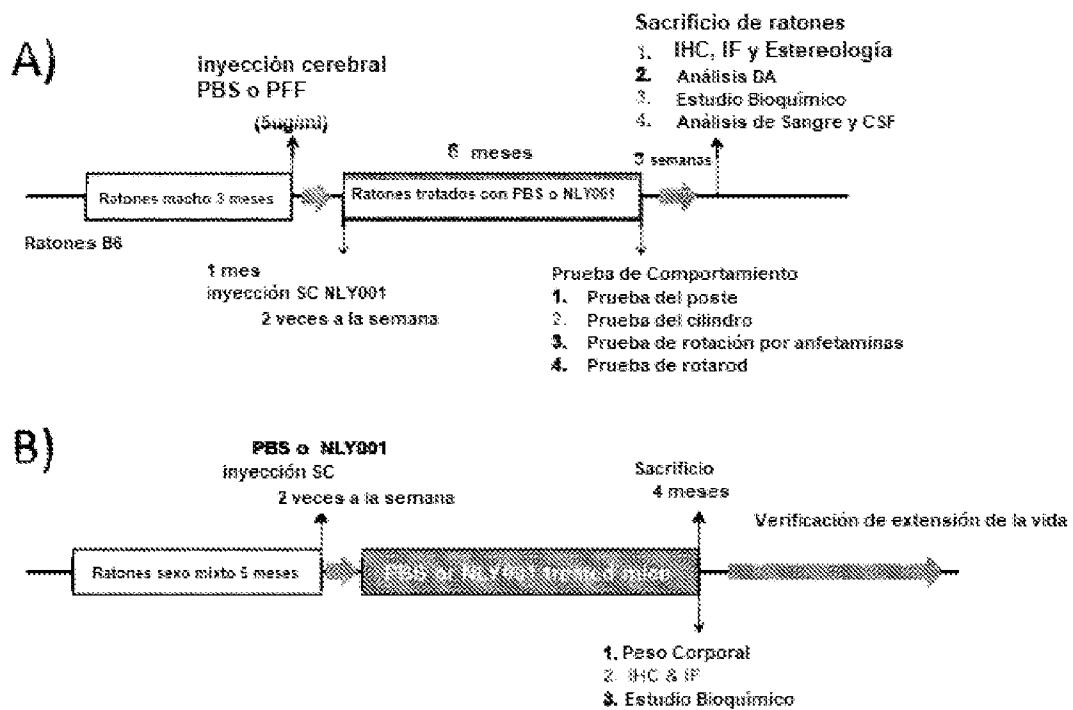


FIG. 4B

# ES 2 968 038 T3

**FIG. 5**

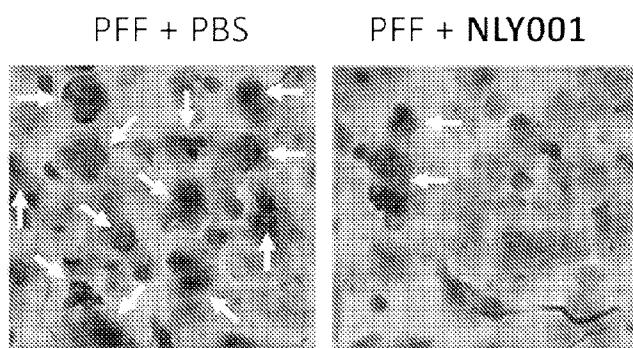
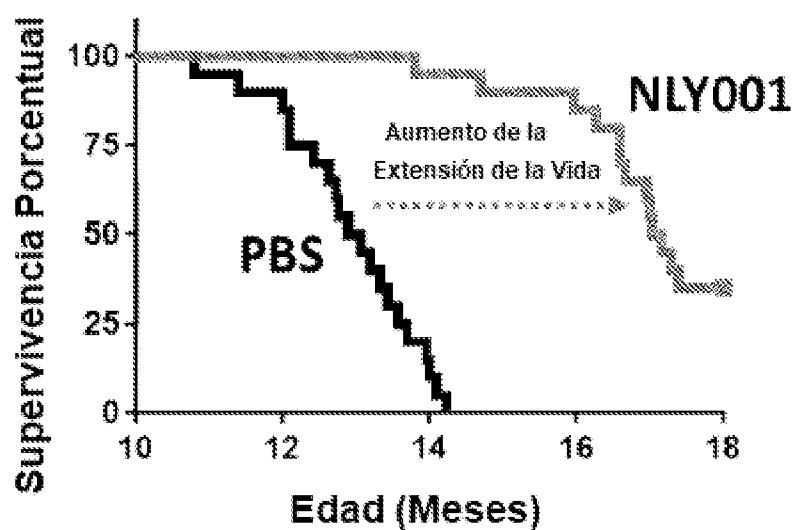
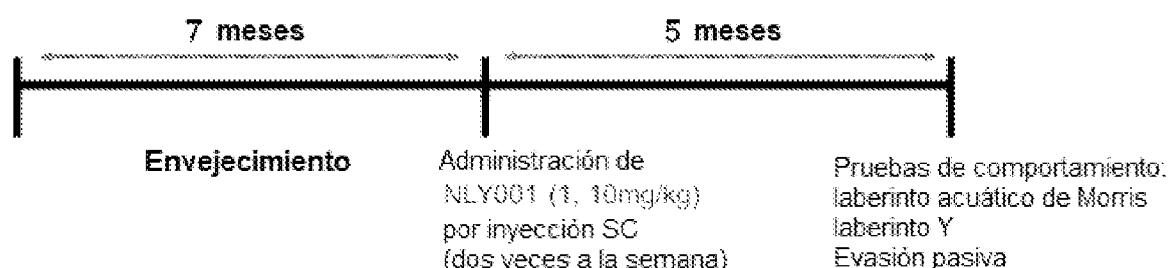
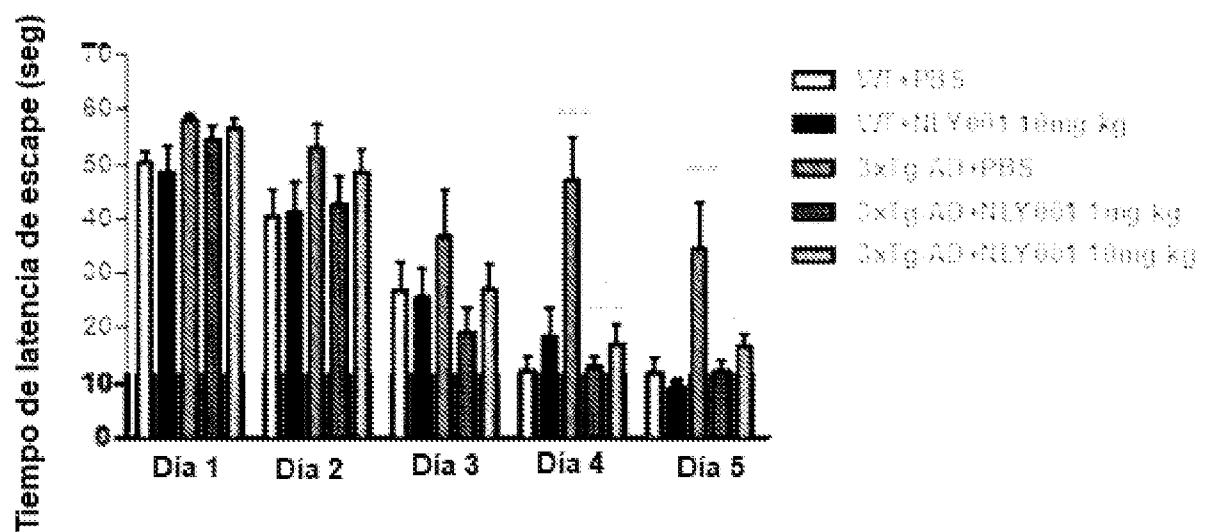


FIG. 6



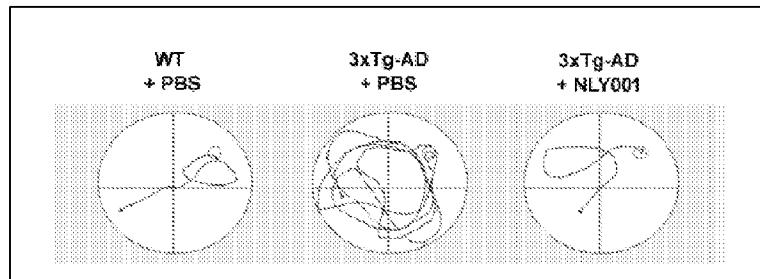
**FIG. 7**



**FIG. 8**

# ES 2 968 038 T3

**FIG. 9**



65792148v.1