

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de enero de 2014 (23.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/013104 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01K 67/00 (2006.01) C07C 229/26 (2006.01)

Carmen Belén; Instituto de Química Médica del CSIC, C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/000177

(74) Mandatario: MAÑAS BAENA, Manuel; Av. de Seneca, 2, E-28040 - Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de julio de 2013 (19.07.2013)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201200745 20 de julio de 2012 (20.07.2012) ES

(71) Solicitantes: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Avenida Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores: ARAHUETES PORTERO, Rosa Ma.; Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Fisiología Animal II, Ciudad Universitaria, E-28040 - Madrid (ES). SOLAS ALADOS, Ma. Teresa; Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Biología Celular, Ciudad Universitaria, E-28040 - Madrid (ES). GÓMEZ MIGUEL, Begoña; Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Bioquímica y Biología Celular, Ciudad Universitaria, E-28040 - Madrid (ES). DE MUNK GARCÍA, Estefanía; Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Fisiología Animal II, Ciudad Universitaria, E-28040 - Madrid (ES). MUÑOZ SÁEZ, Emma; Facultad de Ciencias Biológicas, Dpto. Fisiología Animal II, Ciudad Universitaria, E-28040 - Madrid (ES). MARTÍNEZ GIL, Ana; Instituto de Química Médica del CSIC, C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). GIL AYUSO GONTAN,

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: ANIMAL MODEL FOR IDENTIFYING THERAPETUCIALLY USEFUL COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF SPORADIC AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

(54) Título : MODELO ANIMAL PARA IDENTIFICAR COMPUESTOS TERAPÉUTICAMENTE ÚTILES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA ESPORÁDICA

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying compounds that are potentially useful for the treatment of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), comprising the use of an animal model of rats, developed by means of the administration of β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA).

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para la identificación de compuestos potencialmente útiles para el tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) esporádica que comprende el empleo de un modelo animal de ratas desarrollado mediante la administración de β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA).



WO 2014/013104 A1

Título**Modelo animal para identificar compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica esporádica****Sector de la técnica**

- 5 La presente invención se encuadra dentro del sector de la Biotecnología y /o Biomedicina. Más concretamente se refiere a un método para la identificación de compuestos potencialmente útiles para la prevención y/o tratamiento de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) esporádica que comprende el empleo de un modelo animal desarrollado mediante la administración de β -N-metilamino-
- 10 L-alanina (L-BMAA).

Estado de la técnica

- La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, descrita por primera vez por el neurólogo francés Jean-Martin Charcot, en 1869. Se trata de una enfermedad de tipo neuromuscular, de causa aún desconocida, en la que las motoneuronas del sistema nervioso, que controlan el movimiento de la musculatura voluntaria, disminuyen gradualmente su funcionamiento y mueren. Cuando esto ocurre, el músculo no responde y, debido a la falta de estimulación, se atrofia. La disminución del volumen y el peso del músculo lleva a éste a la falta de
- 15 funcionalidad, provocando una parálisis muscular progresiva de pronóstico mortal, pues en sus etapas avanzadas los pacientes sufren parálisis total que se acompaña de una exaltación de los reflejos tendinosos (resultado de la pérdida de los controles musculares inhibitorios).

- La ELA afecta a cerca de 350.000 personas en todo el mundo y mueren por esta enfermedad 100.000 personas cada año. Las personas afectadas tienen a su disposición una serie de medicamentos para poder combatir los síntomas que acompañan a la enfermedad, como son los calambres, la espasticidad, las alteraciones del sueño, etc., sin embargo, todavía no existen fármacos con una capacidad terapéutica suficiente para frenar o revertir los
- 25

síntomas que provoca. Hoy en día sólo hay un tratamiento que vaya dirigido a las causas de la enfermedad: se denomina Rilutek® (Riluzole) (Wokke J. Riluzole. *Lancet*, 348:795-799, 1996), y es un agente bloqueante del glutamato que atenúa la progresión de la enfermedad, aunque no de manera llamativa: tiene un efecto modesto sobre la supervivencia, capacidad respiratoria y tasa de pérdida de fuerza, y no es efectivo sobre la fuerza global. Debido al esfuerzo que se está realizando para desarrollar tratamientos efectivos frente a la ELA, actualmente hay algunos fármacos en fase de ensayo clínico. Entre ellos, una molécula ha entrado recientemente en ensayos clínicos de fase III, se trata del dexpramipexol que parece ralentizar el avance de los síntomas de la ELA y aumentar la supervivencia de los pacientes (ES2330461T3, ES2351303T3).

Actualmente se conoce que entre el 5 y el 10% de casos de ELA son pacientes que tienen familiares que padecen o han padecido la enfermedad, por lo que se la conoce como ELA familiar. En el 20% de ellos existe una alteración genética, se trata de una mutación que afecta al gen de la superóxido dismutasa I. Sin embargo, se estima que más del 90% de los pacientes de ELA padece la forma esporádica de la enfermedad. En estos casos, la enfermedad se produce de manera aleatoria, sin ninguna causa conocida y sin que haya otras personas de la familia afectadas.

El único modelo animal de ELA existente en la actualidad consiste en ratas deficientes en SOD 1 (Nagai M, Aoki M, Miyoshi I, Kato M, Pasinelli P, Kasai N, Brown RH Jr, Itoyama Y. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J Neurosci*. 21(23):9246-54, 2001). Este modelo se corresponde con la ELA familiar y se caracteriza por la rápida aparición de los síntomas desde el comienzo de la enfermedad, alcanzando un estado irreversible de la patología en un tiempo muy corto. Este hecho dificulta el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas.

Durante los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados al análisis de la toxicidad del β -N-metilamino-L-alanina (L-

BMAA) y su implicación en la aparición de daños que implican neurodegeneración. (Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins*, 2: 2837-2850, 2010; Chiu AS, Gehringer MM, Welch JH, Neilan BA. Does α -amino- β -ethylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8: 3728-3746. 2011).

El L-BMAA es un aminoácido neurotóxico que ha sido relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas de etiología esporádica. Recientes descubrimientos han dado un nuevo impulso al estudio de esta toxina, habiéndose demostrado que el L-BMAA se bioacumula a través de las cadenas tróficas formando un reservorio neurotóxico dentro de los organismos.

En su forma libre, el L-BMAA y su aducto carbamilado, pueden mediar degeneración neuronal *in vitro* mediante un mecanismo regulado por la activación de los receptores de aminoácidos excitatorios. La forma β -carbamato del L-BMAA aumenta el calcio intracelular de forma concentración dependiente, lo que sugiere un posible papel del L-BMAA en la degeneración neuronal excitotóxica (Brownson DM, Mabry TJ, Leslie SW. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J Ethnopharmacol.*, 82(2-3):159-67, 2002).

Se ha propuesto que el mecanismo de neurotoxicidad del L-BMAA se basa en tres aspectos: 1) la acción directa sobre los receptores NMDA, 2) la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR5 y mGluR1) y 3) la inducción de estrés oxidativo. El L-BMAA inhibe el anti porte cistina/glutamato (Sistema Xc-) que media la absorción de cistina, lo que promueve la pérdida de glutatión y aumenta el estrés oxidativo. Además, esta toxina parece conducir la liberación de glutamato vía el Sistema Xc- (Chiu AS, Gehringer MM, Welch JH, Neilan BA. Does α -amino- β -ethylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8: 3728-3746. 2011).

En los últimos años, el estudio de esta neurotoxina ha cobrado una gran importancia debido a su relación con diversas enfermedades neurodegenerativas. El primer indicio de que el L-BMAA podría ser la causa de una de estas patologías, se debe a los estudios de Spencer et al. en relación con el Complejo Esclerosis Lateral Amiotrófica-Parkinson Demencia (ALS-PDC) en la Isla de Guam (revisado en Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.*, 82(5-6):233-46, 2008). Esta enfermedad era endémica de algunas áreas del Océano Pacífico Oeste: en la isla de Guam, especialmente entre la población nativa Chamorro, en la península japonesa de Kii y en Nueva Guinea. Después de descartar la etiología genética y estando la enfermedad limitada a áreas pequeñas, la investigación se centró en factores ambientales. En el ecosistema de Guam, el L-BMAA es producido por cianobacterias del género *Nostoc*, que son simbiontes de las raíces de *Cycas micronesica*. Murch et al. (Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA*, 17;101(33):12228-31, 2004) demostraron que, tanto el L-BMAA libre como unido a proteínas, pueden bioacumularse, desde las cianobacterias simbiontes a las semillas de *Cycas*, que son consumidas tanto por los Chamorro en su dieta tradicional como por animales que también forman parte de esta dieta.

Uno de los aspectos más importantes del ALS-PDC en Guam es el largo periodo de latencia de la enfermedad. Años e incluso décadas después de que nativos Chamorro salieran de Guam, la tasa de incidencia del ALS-PDC entre ellos es todavía cuatro veces superior a la incidencia de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) en todo el mundo. Esto sucede porque, a pesar de que el L-BMAA no es un aminoácido lipofílico, es capaz de formar un reservorio neurotóxico endógeno entrando a formar parte de las proteínas. Mediante el catabolismo proteico, esta neurotoxina se libera de forma lenta y continua en el tejido cerebral (Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and

neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci USA*, 17;101(33):12228-31, 2004).

Además, existen otros grupos poblacionales en los que la ELA tiene una prevalencia mucho más alta que entre la población normal, siendo los más conocidos: algunos grupos de deportistas, como jugadores de fútbol italianos (Chiò A, Benzi G, Dossena M, Mutani R, Mora G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*. 128(Pt 3):472-6, 2005) y de fútbol americano (Abel EL. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease, amyotrophic lateral sclerosis. *Percept Mot Skills*. 104(3 Pt 2):1251-4. 2007), y los veteranos de la Guerra del Golfo en el desierto de Qatar (Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph. Lateral Scler.*, 10 Suppl 2:109-17, 2009). El denominador común a todos ellos parece ser la exposición a toxinas ambientales, en el terreno de juego y en el polvo del desierto, habiéndose demostrado la presencia tanto de cianobacterias como de L-BMAA en dichos ambientes. Estos descubrimientos sugieren vías alternativas para la bioacumulación del L-BMAA en los ecosistemas y, un posible papel del L-BMAA en los cambios neuropatológicos observados en pacientes con enfermedades neurodegenerativas esporádicas.

Hasta el momento se han realizado muchos estudios sobre la toxicidad del L-BMAA en diferentes especies: pollo, rata, ratón, mono, rana, siendo además los animales de edades y pesos dispares en cada ensayo. También se han utilizado como vías de administración la intraperitoneal, perioral, intracerebral, intravenosa, etc., en dosis muy distintas según los experimentos y durante diferentes periodos (revisado en Chiu AS, Gehring MM, Welch JH, Neilan BA. Does α -amino- β -ethylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 8: 3728-3746. 2011; y en Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.*, 82(5-6):233-46, 2008).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro interés se centra en definir un método para el estudio de la ELA esporádica basado en un modelo animal

que reproduzca la aparición de síntomas semejantes a la afectación en humanos, que sea fácilmente reproducible y de evolución lenta en el tiempo, para que los síntomas puedan ser revertidos o frenados con moléculas terapéuticas.

5 ***Descripción de la invención***

La presente invención se refiere a un método para identificar moléculas potencialmente terapéuticas frente a la ELA esporádica que comprende la utilización de un modelo animal.

Un aspecto del método de la invención se refiere al uso de ratas como
10 modelo animal. Preferentemente, las ratas son individuos macho. Los animales se seleccionan entre el día 21 (destete) y el día 30 postnatal, momento en el que se les administra L-BMAA que, siguiendo el método de la invención, provoca en estos animales síntomas de afectación neurológica que reproducen la sintomatología de la ELA esporádica en enfermos de la especie
15 humana. El control de la evolución ponderal de los animales ha mostrado que el tratamiento con L-BMAA, tanto al destete como en la edad adulta, no afecta a su desarrollo general (Fig. 1). Estos resultados nos permiten descartar que las alteraciones sufridas por los tratamientos puedan deberse a una carencia nutricional, dado que los animales al destete se encuentran en un momento
20 clave de su desarrollo y crecimiento.

La administración de L-BMAA se lleva a cabo mediante una dosis diaria durante 5-10 días consecutivos, por vía intraperitoneal. La dosis administrada se selecciona en el intervalo de 200 a 400 mg/Kg/día, teniendo en cuenta que la aparición de los síntomas se acelera cuando aumenta la dosis, dentro de
25 este intervalo.

Otro aspecto de la invención se refiere a la realización de pruebas para la evaluación neurológica de los animales, después de la administración de L-BMAA. Las pruebas se inician en la primera semana post-tratamiento y se repiten con intervalos entre 7-10 días. La aparición y el empeoramiento de los
30 síntomas se producen de forma lenta y gradual en los animales tratados con L-BMAA siguiendo el método que aquí se describe. La principal ventaja que

presentan los animales tratados con L-BMAA según el método de la presente invención es que los síntomas progresan lentamente, por lo que se puede apreciar de forma precisa la evolución de los mismos, constituyendo así una herramienta adecuada para analizar los efectos de moléculas potencialmente terapéuticas frente a ELA.

Además de los animales tratados con L-BMAA, el método incluye animales control a los que sólo se inyecta intraperitonealmente el mismo vehículo empleado para administrar L-BMAA.

La escala de evaluación neurológica se elabora tomando como valor de referencia la evaluación de los animales control, a la que se le asigna un valor 0. Los niveles de la escala se han ido añadiendo mediante la observación de los distintos grupos de tratamiento, aumentando su puntuación según se manifestaban nuevos síntomas en la afectación de los animales. Así mismo, el valor máximo de la escala, con pérdida total de funcionalidad de las extremidades traseras y del control postural, no ha sido observado.

	Deambulaci3n	Suspensi3n de la cola	Test de fuerza
0	Apoyan toda la planta de las patas traseras a una velocidad normal.	Posici3n en T, pataleo coordinado. Tendencia a subir hacia la cola girando de forma lateral al eje principal del cuerpo.	No abren las patas traseras, responden al est3mulo del tir3n desde la cola.
1~2		P3rdida progresiva de la posici3n en T.	
3		No son capaces de hacer la T. Pataleo descoordinado.	
4	No apoyan toda la planta, deambulan de puntillas.		
5		Estiran las patas hacia atr3s (posici3n caudal).	Al estirar, abren las patas traseras y, progresivamente, pierden la posici3n de resistencia.
6	Al girar, dejan las patas debajo del cuerpo (lenta correcci3n de la postura).	Descoordinaci3n de las patas traseras.	
7	Mala postura, lateralizaci3n.	Al relajar las patas traseras quedan muy cerradas hacia la parte delantera del cuerpo.	Ausencia de resistencia (poca fuerza). Apertura de las patas traseras.
8	Mala respuesta de las patas traseras al deambular (se les deslizan).	Tendencia a agarrarse las patas traseras entre s3 y a intentar agarrarse a la cola girando hacia la parte delantera del cuerpo.	Apertura de las patas traseras por fuera de la silueta corporal m3s patente.
9	P3rdida de la coordinaci3n de la deambulaci3n, lateralizaci3n marcada.		Curvatura anormal de la espalda durante el test, clara lateralizaci3n y falta de fuerza en los cuartos traseros.
10	P3rdida total del control motor de las patas traseras (ESPERABLE).		

Tabla 1. Escala de evaluaci3n neurol3gica.

La molécula que se quiere estudiar, con posibilidades de ser terapéuticamente útil frente a la ELA esporádica, se administra a los animales tratados con el L-BMAA entre el momento en que inician los síntomas (valoración neurológica 3-5) y el momento en que alcanzan una valoración neurológica entre 7 y 9. Esto nos permite, en el primer caso, analizar si el fármaco frena la evolución de los síntomas y, en el segundo caso, comprobar si el fármaco es capaz de revertir los efectos de la enfermedad. De esta forma se dispone de una herramienta de trabajo para poder estudiar la efectividad del fármaco en animales con diferente grado de afectación, aprovechando la importante ventaja que aporta este modelo de ELA con la gradual aparición de los síntomas. La comparación de los resultados de la evaluación neurológica entre los animales a los que se les suministra la molécula potencialmente terapéutica y animales control inoculados con L-BMAA a los que no se administra el compuesto cuyo potencial terapéutico se desea estudiar, permite seleccionar aquellos compuestos que dan lugar a la disminución de los síntomas asociados a ELA y que, por lo tanto, presentan altas probabilidades de tener efectos terapéuticos frente a esta enfermedad.

La valoración neurológica a los animales tratados se realiza mediante tres observaciones que se efectúan periódicamente: el test de suspensión por la cola, la deambulación y el test de fuerza.

Opcionalmente, pueden complementarse con otras pruebas para comprobar la funcionalidad muscular y el control motor, entre ellas cabe destacar: Rota-rod, estudiando tanto el tiempo como la velocidad que puede soportar el animal subido al aparato, test de fuerza en ensayos con rejillas, distancia entre las huellas al dejarles caer de una altura de 30cm, y electromiografía.

Estas pruebas ponen de manifiesto que existen dificultades en la coordinación motora de los animales tratados compatibles con la aparición de los síntomas de ELA (Fig. 3).

Como ya se ha comentado, todavía no se ha identificado ningún fármaco realmente efectivo en el tratamiento de la ELA y, por lo tanto, no se cuenta con ninguna molécula con la que contrastar el método de la invención. Para

comprobar que el modelo animal de la invención reproduce la sintomatología de la ELA esporádica, se ha realizado una serie de ensayos a partir de 30-100 días post-tratamiento con L-BMAA, según la dosis de L-BMAA utilizada y el número de administraciones, en los animales que han alcanzado una
5 evaluación neurológica no inferior a 7 (estado alcanzado por al menos el 95% de los animales tratados):

1. Microscopía electrónica: se ha comprobado que las motoneuronas espinales se ven afectadas, a nivel lumbar, como se ha descrito para pacientes de ELA.
- 10 2. Bioquímicos de posibles marcadores de ELA: los animales afectados muestran niveles elevados de GSK-3 (glicógeno sintasa quinasa 3), que es un marcador de ELA, en extractos totales de médula espinal.
3. Resonancia magnética nuclear (HRMAS): las motoneuronas muestran un descenso de NAA (N-acetil-aspartato) en las ratas tratadas con L-
15 BMAA, junto con una reducción de los cocientes: NAA/Cho (N-acetil-aspartato/colina), NAA/Cr (N-acetil-aspartato/ creatina y fosfocreatina) y NAA/Cho+Cr en médula espinal lumbar y en corteza motora, lo que coincide con lo esperado para ELA.

Breve descripción de los dibujos

20 Para facilitar la comprensión de las principales características de la invención y formando parte integrante de esta memoria descriptiva, se acompaña una serie de figuras. Con carácter ilustrativo se ha representado lo siguiente:

Figura 1. A) Representación gráfica de la evolución ponderal de los animales control y tratados con L-BMAA, desde el día 21 postnatal (día de inicio del
25 tratamiento). B) Análisis de regresión sigmoidal de Boltzman, muestra que no existen diferencias significativas entre las curvas. El número de animales por grupo es $n \geq 10$.

Figura 2. A) Evaluación neurológica. EE: escala de evaluación; PT: días post-tratamiento. B) regresión lineal. %EN: porcentaje de evaluación neurológica;
30 T: tiempo en días.

Figura 3. Test de funcionalidad motora: A) RotaRod a velocidad constante de 15 rpm. %T: porcentaje de tiempo de permanencia en el RotaRod; T (días): tiempo en días. ■ grupo control; ▲ grupo tratado. B) Test de huellas: se representa la distancia entre las patas traseras en el aterrizaje. D (cm): distancia en centímetros; C: grupo control; T: grupo tratado con L-BMAA 300 mg/Kg/ 5 días consecutivos al destete.

Figura 4. Imágenes de microscopía electrónica de médula lumbar de rata. A y B son imágenes tomadas de animales controles y el resto pertenecen a tratados del grupo L-BMAA 300 mg/Kg/ 5 días consecutivos al destete. En A (8k) se muestra una vista general de una motoneurona control. B (25k) es un detalle de A, donde se muestra la estructura normal de los orgánulos (retículo endoplásmico y mitocondria). La imagen C (12K) es una vista panorámica de una motoneurona perteneciente a un animal tratado. En D (25k), se observan muchas mitocondrias desorganizadas y en E (25k) hay una fragmentación del retículo endoplásmico. La imagen F (50k) es un detalle de mitocondrias degeneradas. G y H (40K y 200K, respectivamente) son imágenes de inmunohistoquímica, marcando caspasa-3 en el área perinuclear de neuronas espinales motoras procedentes de animales tratados con el aminoácido.

Figura 5. A) (4k) es una panorámica de médula espinal mostrando dos oligodendrocitos señalados por flechas. La ilustración B) (15k) muestra un detalle ampliado de un oligodendrocito con un núcleo típicamente apoptótico.

Figura 6. Valoración de GSK3 β por *Western Blot* en médula lumbar de animales control (C) y tratados del grupo L-BMAA 300 mg/Kg/ 5 días consecutivos al destete.

25 **Modo de realización de la invención**

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Tratamiento con L-BMAA.

Se utilizaron ratas macho, *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza *Wistar*, que se mantuvieron en condiciones de estabulario estándar (ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, con comida y bebida *ad libitum*). Todos los ensayos se

llevaron a cabo con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Se utilizaron 60 animales distribuidos en 6 grupos de 10 animales cada uno. Dos de los grupos constituyeron los grupos control y los otros 4 recibieron distintas concentraciones de L-BMAA, disuelto en PBS, y durante distintos periodos de tiempo. Con el fin de preservar el desarrollo normal del sistema nervioso, no se actuó antes el destete; el tratamiento comenzó el día 21 postnatal. Las dosis administradas a los distintos grupos fueron las siguientes:

1. 200 mg/Kg/día durante 5 días consecutivos;
2. 300 mg/Kg/día durante 5 días consecutivos;
3. 400 mg/Kg/día durante 5 días consecutivos;
4. 200 mg/Kg/día durante 10 días consecutivos.

Los grupos control fueron inoculados únicamente con PBS durante 5 y 10 días consecutivos, respectivamente. Dado que no existen diferencias entre ambos grupos control, se ha unificado la representación gráfica de los diferentes parámetros analizados de ambos.

Ejemplo 2. Pruebas para evaluación neurológica.

Una vez concluido el tratamiento que se ha descrito en el ejemplo 1, se realizaron pruebas neurológicas en los animales tratados y en los grupos control. Las pruebas se iniciaron en la primera semana post-tratamiento y se repitieron con intervalos entre 7-10 días. La aparición y el empeoramiento de los síntomas se produjeron de forma lenta y gradual en los animales tratados con L-BMAA.

Se realizaron las siguientes pruebas neurológicas:

Test de suspensión por la cola: se suspendió a los animales, a unos 10 cm de la superficie, agarrándolos por la cola. Se evaluó la capacidad que tenían para mantener las patas traseras en "T" (postura normal que adoptan los roedores en esta posición), así como la rigidez de las mismas y la coordinación del pataleo.

Deambulaci3n: se evalu3 el control postural del animal as3 como la forma de apoyo de la planta de las extremidades traseras durante la deambulaci3n. Las observaciones se realizaron introduciendo a los animales en un pasillo de dimensiones 20x20x100 cm y grab3ndolos en v3deos que, posteriormente, fueron examinados analizando las im3genes y compar3ndolas con las de los animales del grupo control.

Test de fuerza: se coloc3 al animal sobre una superficie plana con las cuatro patas apoyadas y se tir3 ligeramente de la cola en el sentido contrario al avance. Se observ3 la capacidad del animal para oponer resistencia, evaluando su capacidad para mantener las extremidades traseras debajo del cuerpo, sin que se abrieran hacia los lados.

En la Fig. 2 se muestran los resultados de las pruebas de evaluaci3n neurol3gica descritas, poniendo de manifiesto el diferente comportamiento entre animales control y tratados, y c3mo en los animales tratados se reproducen los s3ntomas encontrados en ELA desde las etapas iniciales de la enfermedad. Cuando la evaluaci3n neurol3gica de los animales tratados con L-BMAA alcanza un valor de entre 3 y 4 (etapa inicial de la manifestaci3n de los s3ntomas de la enfermedad), y hasta que llegan a valores de 7-9 (etapa tard3a con empeoramiento de los s3ntomas de la enfermedad), es el periodo de tiempo en que se utilizan los animales, administr3ndoles el compuesto cuyo potencial terap3utico se desea estudiar, en el m3todo de identificaci3n de mol3culas potencialmente terap3uticas frente a ELA en seres humanos.

Ejemplo 3. Pruebas para la evaluaci3n de la funcionalidad muscular y el control motor.

Los animales del ejemplo 1 se sometieron a pruebas de funcionalidad muscular y control motor. Estas pruebas se iniciaron en la primera semana post-tratamiento y se repitieron con intervalos entre 7-10 d3as.

Las pruebas que se realizaron fueron las siguientes:

- Rota-rod (Harvard Apparatus): se analizaron los reflejos de equilibrio y coordinaci3n motora de los individuos en estudio mediante dos ensayos:

1. Se determinó el tiempo que se mantenían los animales sobre el RotaRod a una velocidad constante de 15 rpm, hasta un tiempo máximo de 10 minutos.
 2. Se determinó la velocidad máxima que podían aguantar sobre el
5 aparato los animales en aceleración de 4 a 40 rpm en 30 segundos.
- Rejilla: se situó a los animales en una rejilla (50x30 cm) y, una vez que la rata se había agarrado a la misma, se volteó sobre un cajón, de forma que el animal quedaba suspendido a 40 cm del fondo. Se midió el tiempo que aguantaba en esta posición hasta un máximo de 10 minutos.
 - 10 - Huellas: se impregnaron las extremidades traseras de las ratas con tinta de tampón y se suspendió a los animales desde la espalda con ambas manos, con su cuerpo paralelo a la superficie de aterrizaje. Se soltaron desde una altura de aproximadamente 30 cm, midiéndose la distancia entre las huellas de las extremidades traseras que dejaba la rata cuando entraba en contacto
15 con la superficie.

Mediante estas pruebas se demostró que existen dificultades en la coordinación motora de los animales tratados con L-BMAA según se describe en el ejemplo 1, que reproducen la sintomatología de ELA (Fig. 3).

Ejemplo 4. Comprobación del modelo animal

- 20 Estas pruebas se realizaron con los animales del ejemplo 1 que habían alcanzado una valoración neurológica no inferior a 7 en el ejemplo 2, que se correspondían con animales de 4 meses de edad y 80-100 días post-tratamiento; se realizaron las siguientes pruebas para verificar el estado de las motoneuronas:
- 25 - Microscopía electrónica: los estudios realizados mediante microscopía electrónica, confirmaron la afectación de las motoneuronas, a nivel de la médula espinal lumbar, en los animales tratados con L-BMAA. Se observó abundante retículo endoplásmico fragmentado y numerosos polirribosomas libres, lo cual concuerda con el estrés de retículo descrito en la ELA, debido a
30 la acumulación de proteínas mal plegadas. Igualmente se observó que las

mitocondrias de estas neuronas motoras muestran hinchamiento, vacuolización y rotura, dato que coincide con el encontrado en otros estudios en esta patología (Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.*, 82(5-6):233-46, 2008).

- 5 La disfunción mitocondrial puede provocar o propagar neurodegeneración y puede constituir un punto crítico en el desarrollo de la ELA. La activación de receptores de glutamato por L-BMAA incrementa la concentración de calcio citosólico y seguidamente la concentración de calcio mitocondrial, dando lugar al hinchamiento mitocondrial y a la ruptura de la membrana externa de
10 las mitocondrias causando la muerte celular.

El daño prolongado sobre las mitocondrias induce apoptosis por activación de caspasa 3, tal y como hemos demostrado en estudios inmunohistoquímicos (Fig. 4) que muestran abundante caspasa 3 en el área perinuclear de neuronas espinales motoras procedentes de animales tratados con L-BMAA.

- 15 La aparición de oligodendrocitos apoptóticos (Fig. 5) señala una afectación a nivel de la glía, punto investigado en otros estudios que relacionan esta disfunción con las alteraciones neuronales en ELA (Lasiene J and Yamanaka K .Glial Cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol. Res. Int.*, doi:10.1155/2011/718987,2011).
- 20 Análisis bioquímicos: los análisis bioquímicos mediante *western blot*, indicaron que los animales afectados por el tratamiento con L-BMAA muestran niveles elevados de GSK-3 (utilizado como marcador de ELA) en extractos totales de médula espinal (Fig. 6).

- Resonancia Magnética Nuclear: La Resonancia magnética nuclear es un
25 método muy adecuado para detectar y cuantificar neurodegeneración en sistema nervioso a través del análisis de ciertos metabolitos presentes en el parénquima cerebral, los cuales pueden servir como marcadores de la progresión de la enfermedad o de la respuesta a un determinado tratamiento. Los metabolitos cuantificados han sido, principalmente, N- acetil-aspartato
30 (NAA), un marcador de la integridad neuronal; creatina y fosfocreatina (Cr), marcadores de la capacidad energética, y colina (Cho), asociada con la

síntesis de membranas celulares, que se han utilizado anteriormente en el diagnóstico de la ELA en humanos (Álvarez-Uría Tejero, MJ, Sáiz Ayala, A, Fernández Rey, C Santamarta Liébana, ME, Costilla García, S. Diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica: avances en RM. *Radiologia*. 53:146-155,2011; Rooney WD, Miller RG, Gelinas D, Schuff N, Maudsley AA, Weiner MW. Decreased N-acetylaspartate in motor cortex and corticospinal tract in ALS. *Neurology*.50(6):1800-5,1998).

Los análisis se realizaron mediante HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) y pusieron de manifiesto un descenso de NAA en las ratas tratadas con L-BMAA, junto con una reducción de los cocientes: NAA/Cho, NAA/Cr y NAA/Cho+Cr en médula espinal lumbar y un importante descenso del NAA/Cho en corteza motora (Tabla 2). En corteza motora, este perfil de resultados coincide con lo esperado para la ELA.

	Médula lumbar		Corteza motora	
	Control	Tratado	Control	Tratado
NAA	1.559	1.349	2.246	1.569
NAA/Cr	1.145	0.946	1.212	1.145
NAA/Cho	1.559	1.349	2.246	1.569
NAA/Cr+Cho	0.660	0.556	0.785	0.664

Tabla 2. Análisis de metabolitos por HRMAS en médula lumbar y corteza motora.

Todos los resultados obtenidos de los diferentes análisis se pusieron de manifiesto en, al menos, el 90% de los animales tratados con L-BMAA siguiendo el ejemplo 1.

Reivindicaciones

1. Procedimiento para obtener un modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica esporádica que comprende la inoculación intraperitoneal en rata de 200-400 mg/kg/día de β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), a partir del día
5 21-30 postnatal, durante 5-10 días consecutivos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 en que la dosis de L-BMAA administrada a las ratas es de 300 mg/kg/día.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en que las ratas son individuos macho.
- 10 4. Procedimiento para identificar compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica esporádica que comprende:
 - a) la inoculación intraperitoneal en rata de 200-400 mg/kg/día de β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), a partir del día 21-30 postnatal, durante 5-10 días consecutivos;
 - 15 b) la evaluación neurológica de las ratas del paso a);
 - c) la administración del compuesto cuyo potencial terapéutico se desea estudiar a las ratas que muestren deterioro neurológico;
 - d) la comparación de los resultados de la evaluación neurológica entre los animales del paso c) y animales control inoculados con L-BMAA según el
20 paso a) y a los que no haya administrado el compuesto cuyo potencial terapéutico se desea estudiar, en donde el compuesto se considera como potencialmente terapéutico si da lugar a una disminución de los síntomas asociados a ELA.
5. Procedimiento según la reivindicación 4 en que evaluación neurológica se
25 realiza mediante las pruebas: deambulación, suspensión de la cola y/o test de fuerza.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4-5 en que se añade un paso e) de evaluación de la función motora mediante: Rota-Rod, rejilla, distancia entre huellas y/o electromiografía.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4-6 en que la dosis de L-BMAA administrada a las ratas es de 300 mg/kg/día.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4-7 en que las ratas son individuos macho.
- 5 9. Modelo animal de esclerosis lateral amiotrófica esporádica que comprende ratas inoculadas por vía intraperitoneal con 200-400 mg/kg/día de β -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA), a partir del día 21-30 postnatal, durante 5-10 días consecutivos.
- 10 10. Modelo animal según la reivindicación 9 en que la dosis de L-BMAA administrada a las ratas es de 300 mg/kg/día.
11. Modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 en que las ratas son individuos macho.
12. Modelo animal obtenible mediante el procedimiento definido en las reivindicaciones 1-3.

Fig. 1A

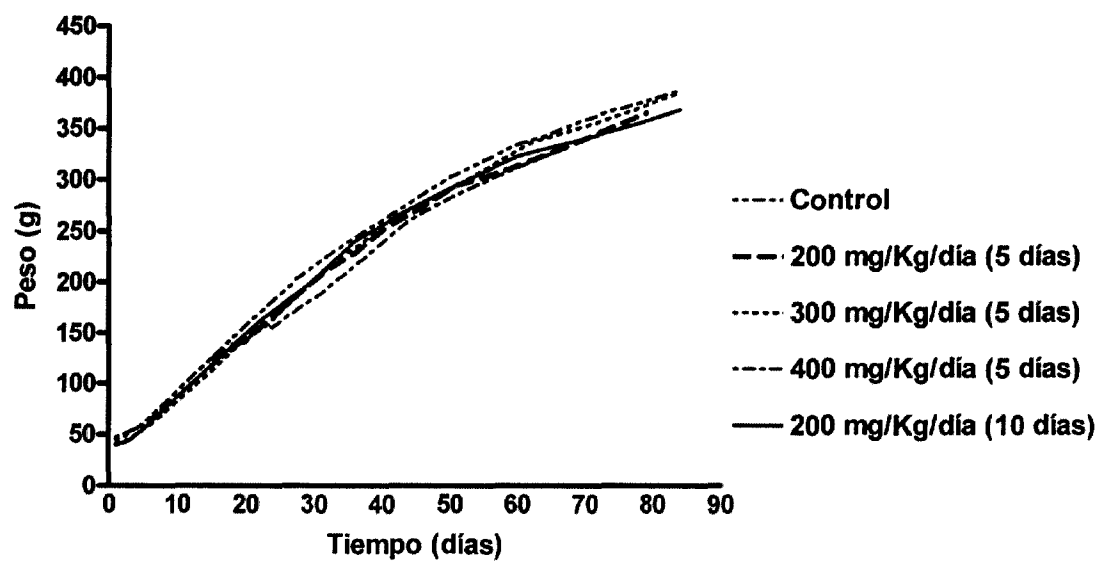
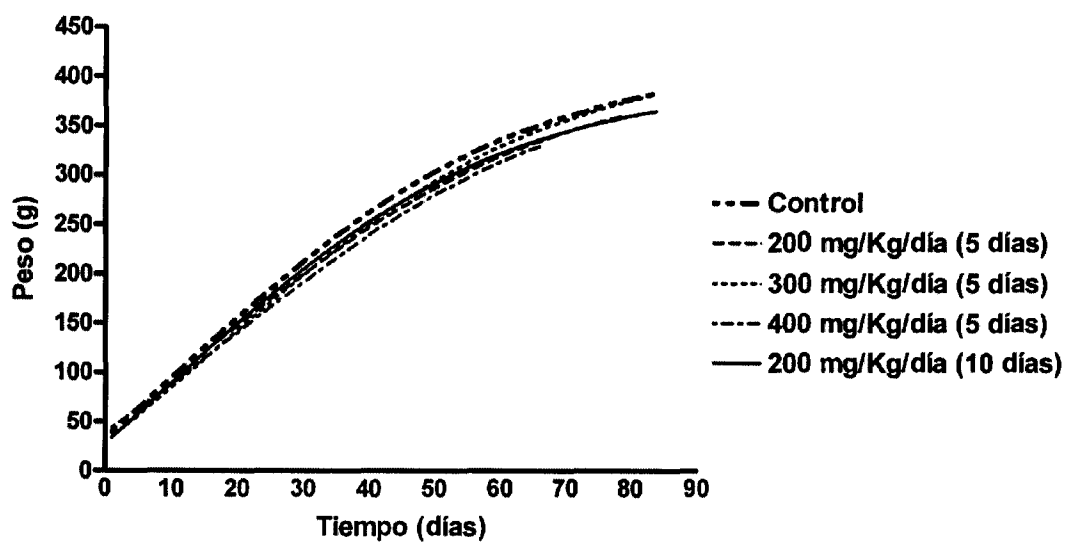


Fig. 1B



2/6

Fig. 2A

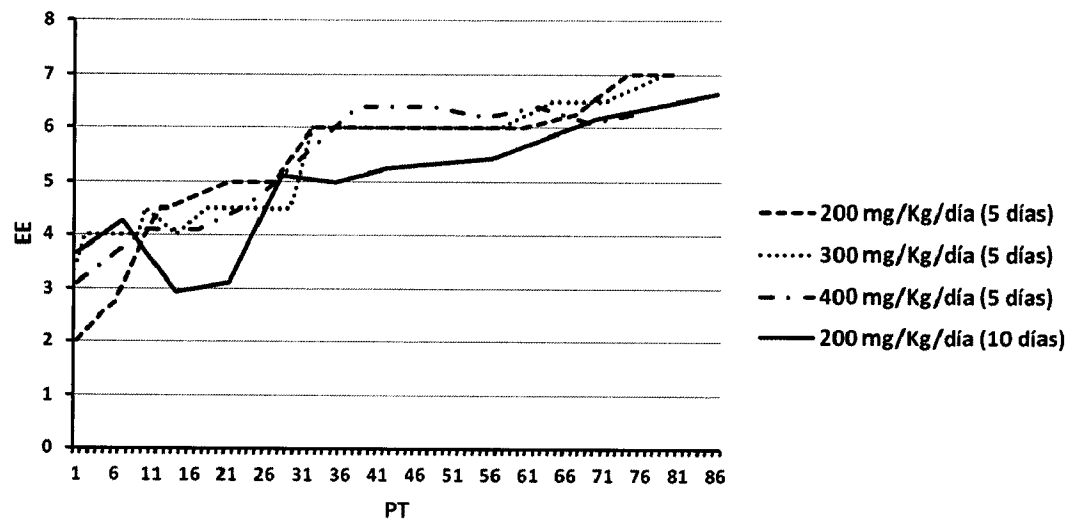


Fig. 2B

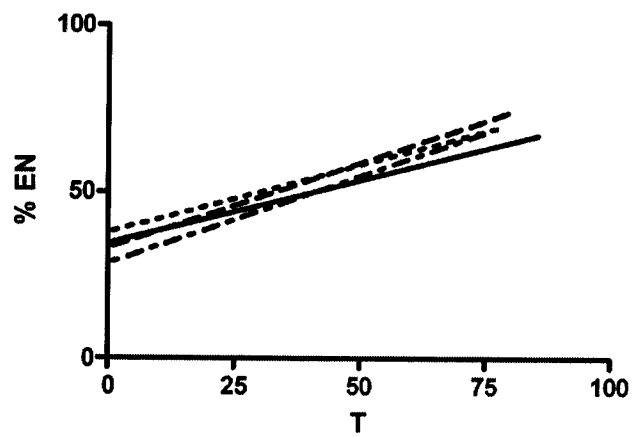


Fig. 3A

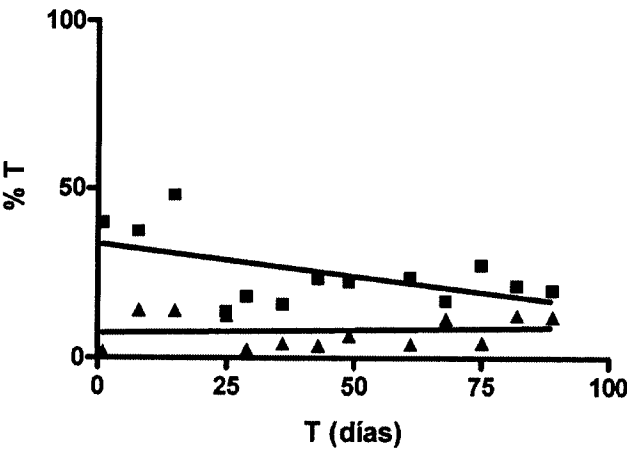


Fig. 3B

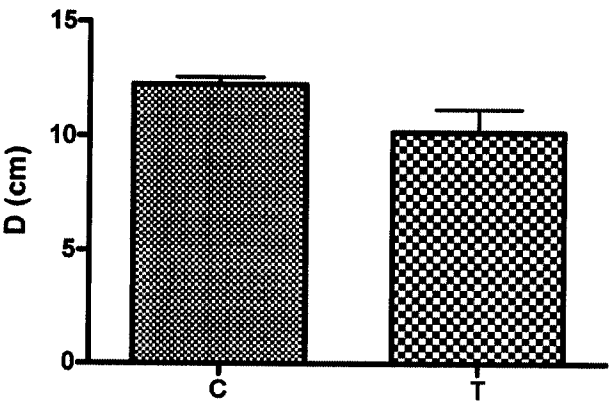


Fig. 4

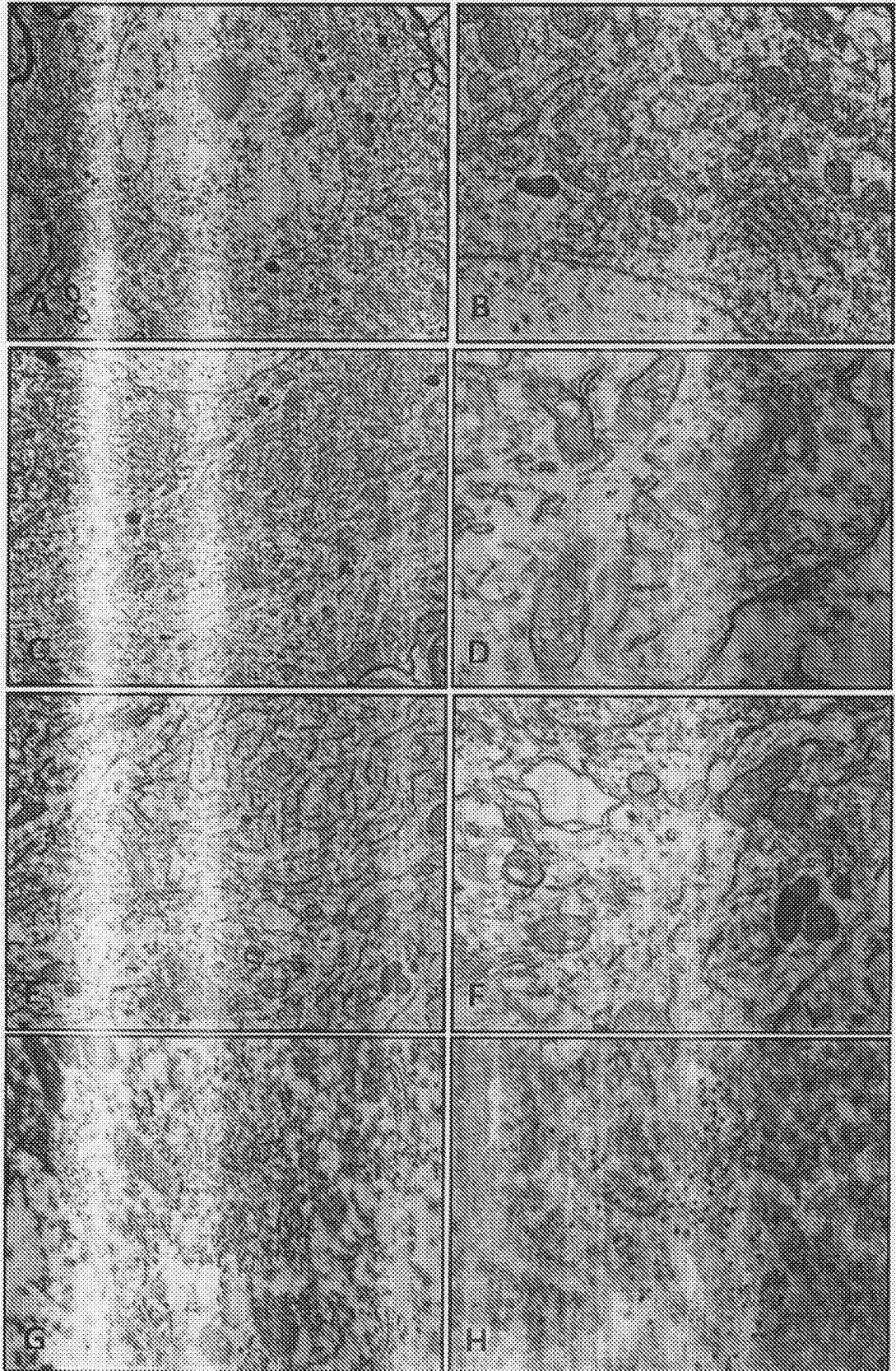


Fig. 5A



Fig. 5B



Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/000177

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/00 (2006.01)

C07C229/26 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K, C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, BIOSIS, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KARLSSON O. ET AL., Selective Brain Uptake and Behavioral Effects of the Cyanobacterial Toxin BMAA (b-N-Methylamino-L-alanine) following Neonatal Administration to Rodents." Toxicological Sciences, (2009), vol. 109(2), págs. 286–295, the whole document.	1-12
Y	KARLSSON O. ET AL., "Long-term Cognitive Impairments in Adult Rats Treated Neonatally with b-N-Methylamino-L-Alanine" Toxicological Sciences (2009), vol. 112(1), pag. 185–195, the whole document.	1-12
A	KARAMYAN VARDAN T AT AL., "Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review." Life sciences (2008), vol. 82, págs. 233 - 246, the whole document.	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26/11/2013

Date of mailing of the international search report
(11/12/2013)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498409

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/000177

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BUENZ J E ET AL, "Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo." Neurotoxicology (2007), vol. 28, pág. 702-704, the whole document.	1-12

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/000177

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01K67/00 (2006.01)

C07C229/26 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01K, C07C

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, WPI, BIOSIS, CAPLUS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	KARLSSON O. ET AL., Selective Brain Uptake and Behavioral Effects of the Cyanobacterial Toxin BMAA (b-N-Methylamino-L-alanine) following Neonatal Administration to Rodents." Toxicological Sciences, (2009), vol. 109(2), pág.286–295, todo el documento.	1-12
Y	KARLSSON O. ET AL., "Long-term Cognitive Impairments in Adult Rats Treated Neonatally with b-N-Methylamino-L-Alanine" Toxicological Sciences (2009), vol. 112(1), pag. 185–195, todo el documento.	1-12
A	KARAMYAN VARDAN T AT AL., "Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review." Life sciences (2008), vol. 82 , pág. 233 - 246, todo el documento.	1-12

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
26/11/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
11 de diciembre de 2013 (11/12/2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Hernandez Cuellar
Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/000177

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	BUENZ J E ET AL, "Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo." Neurotoxicology (2007), vol. 28, pág. 702-704, todo el documento.	1-12