

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 971 898**

51 Int. Cl.:

A61P 25/28 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2018** **E 18158758 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023** **EP 3530320**

54 Título: **Nuevos compuestos peptídicos obtenidos a partir de IL-4-/IL-13 para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas o neuroinflamatorias**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ (100.0%)
Langenbeckstraße 1
55131 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**VOGELAAR, CHRISTINA FRANCISCA y
ZIPP, FRAUKE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 971 898 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

Nuevos compuestos peptídicos obtenidos a partir de IL-4-/IL-13 para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas o neuroinflamatorias

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos peptídicos que se obtienen a partir de interleucina-4 (IL-4) o interleucina-13 (IL-13) humana o animal y a los usos en un tratamiento o prevención de trastornos neuroinflamatorios o neurodegenerativos, neuropatías o lesiones traumáticas del sistema nervioso.

10 La patología axónica continua y acumulativa se considera la característica principal subyacente a la discapacidad, especialmente durante la fase progresiva de una enfermedad de trastornos neurodegenerativos (V. Siffrin, H. Radbruch, R. Glumm, R. Niesner, M. Paterka, J. Herz, T. Leuenberger, S. M. Lehmann, S. Luenstedt, J. L. Rinnenthal, G. Laube, H. Luche, S. Lehnhardt, H. J. Fehling, O. Griesbeck, F. Zipp, *In vivo* imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity* 33, 424-436 (2010); I. Nikic, D. Merkler, C. Sorbara, M. Brinkoetter, M. Kreutzfeld, F. M. Bareyre, W. Bruck, D. Bishop, T. Misgeld, M. Kerschensteiner, A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat. Med.* 17, 495-499 (2011)). Tras un ataque inflamatorio, la inflamación axonal y la regulación positiva persistente del calcio, finalmente culminan en la formación de cuentas y la degeneración. Esos procesos de lesión neuronal inflamatoria pueden revertirse, al menos en parte. Hasta la fecha, las estrategias de tratamiento de la EM no se han dirigido suficientemente al compartimento axónico (C. Laroche, T. Uphaus, A. Prat, F. Zipp, *Secondary Progression in Multiple Sclerosis: Neuronal Exhaustion or Distinct Pathology?* *Trends Neurosci.* 39, 325-339 (2016); R. J. M. Franklin, C. French-Constant, J. M. Edgar, K. J. Smith, *Neuroprotection and repair in multiple sclerosis.* *Nat. Rev. Neurol.* 8, 624-634 (2012), F. Zipp, R. Gold, H. Wiendl, *Identification of inflammatory neuronal injury and prevention of neuronal damage in multiple sclerosis: hope for novel therapies?* *JAMA Neurol* 70, 1569-1574 (2013)).

25 La interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-13 (IL-13) son citocinas canónicas de tipo 2 que desempeñan funciones solapantes pero distintas en las respuestas inmunitarias de los mamíferos frente a parásitos extracelulares, al estimular la producción de anticuerpos IgE de alta afinidad, la generación de macrófagos activados alternativamente y la diferenciación de las células Th2. La IL-4 es una citocina antiinflamatoria con respecto a sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC), pero la IL-4 sistémica desempeña un papel en las alergias, en particular en el asma. Se ha informado que la IL-4 tiene efectos beneficiosos sobre las neuronas tras una lesión traumática del SNC (J. T. Walsh, S. Hendrix, F. Boato, I. Smirnov, J. Zheng, J. R. Lukens, S. Gadani, D. Hechler, G. Golz, K. Rosenberger, T. Kammertons, J. Vogt, C. Vogelaar, V. Siffrin, A. Radjavi, A. Fernandez-Castaneda, A. Gaultier, R. Gold, T. D. Kanneganti, R. Nitsch, F. Zipp, J. Kipnis, *MHCII-independent CD4+ T cells protect injured CNS neurons via IL-4.* *J. Clin. Invest.* 125, 699-714 (2015)). Se ha informado tanto de una función reguladora inmune de la IL-4 aplicada sistemáticamente en la encefalomyelitis autoinmune experimental (EAE), el modelo murino de esclerosis múltiple (EM), como de un papel destructivo en un modelo de asma (N. L. Payne, A. Dantanarayana, G. Sun, L. Moussa, S. Caine, C. McDonald, D. Herszfeld, C. C. Bernard, C. Siatskas, *Early intervention with gene-modified mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-4 enhances anti-inflammatory responses and functional recovery in experimental autoimmune demyelination.* *Cell Adh. Migr.* 6, 179-189 (2012); M. K. Racke, A. Bonomo, D. E. Scott, B. Cannella, A. Levine, C. S. Raine, E. M. Shevach, M. Rocken, *Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease.* *J. Exp. Med.* 180, 1961-1966 (1994); J. I. Inobe, Y. Chen, H. L. Weiner, *In vivo administration of IL-4 induces TGF-beta-producing cells and protects animals from experimental autoimmune encephalomyelitis.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 778, 390-392 (1996); S. T. Holgate, *Innate and adaptive immune responses in asthma.* *Nat. Med.* 18, 673-683 (2012); C. M. Lloyd, E. M. Hessel, *Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells.* *Nat. Rev. Immunol.* 10, 838-848 (2010)).

Se sabe que la IL-4 tiene potencialmente efectos secundarios debido a sus efectos sobre el sistema inmunológico (S. T. Holgate, *Innate and adaptive immune responses in asthma.* *Nat Med* 18, 673-683 (2012); C. M. Lloyd, y E. M. Hessel, *Functions of T-cells in asthma: more than just T(H)2 cells.* *Nat Rev Immunol* 10, 838-848 (2010)). Además, sería extremadamente caro producir grandes cantidades de IL-4 recombinante para fines clínicos en los seres humanos. Además, la IL-4 tiene una semivida muy corta en el plasma sanguíneo (S. Gea-Sorli, and D. Closa, *In vitro, but not in vivo, reversibility of peritoneal macrophages activation during experimental acute pancreatitis.* *BMC Immunol* 10, 42 (2009); M. Khodoun, C. C. Lewis, J. Q. Yang, T. Orekov, C. Potter, T. Wynn, M. Mentink-Kane, G. K. Hershey, M. Wills-Karp, and F. D. Finkelman, *Differences in expression, affinity, and function of soluble (s)IL-4Rα and sIL-13Rα2 suggest opposite effects on allergic responses.* *J Immunol* 179, 6429-6438 (2007)). Por lo tanto, es deseable estar en posesión de compuestos que puedan producirse de forma rentable en grandes cantidades y que sean más estables que la IL-4 recombinante de longitud completa.

60 Si bien la identidad entre sus aminoácidos es baja (23%), la IL-4 y la IL-13 pueden unirse a un receptor común compuesto por las subunidades IL-4Rα e IL-13Rα1 (IL-4R de tipo II) y son las únicas citocinas conocidas por unirse a la cadena IL-4Rα del receptor. Además, la IL-4 puede unirse al IL-4R de tipo I, que está compuesto por IL-4Rα y la cadena γ común (T. Wang, and C. J. Secombes, *The evolution of IL-4 and IL-13 and their receptor subunits.* *Cytokine* 75, 8-13 (2015)). Para la transducción de señales, la IL-4 y la IL-13 ambas requieren la misma subunidad de receptor, IL-4Rα (T. D. Mueller, J. L. Zhang, W. Sebald, A. Duschl, *Structure, binding and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system,* *Biochimica Biophysica Acta* 1592, 237-250 (2002)). IL-4Rα forma parte de ambos complejos de receptores

heterodiméricos funcionales. Organiza la transducción de señales a través de moléculas de señalización asociadas con su gran dominio intracelular. IL-4 e IL-13 tienen un conjunto de subunidades de receptor dimerico idéntico, caracterizado por hélices yuxtapuestas antiparalelas α A, α C, α B, α D y dos bucles largos de extremo a extremo, bucle AB y CD, que están conectados por una lámina β corta empaquetada contra las hélices B y D. La hélice A, el bucle AB, la hélice BC en horquilla y el bucle CD más la hélice D están codificados por cuatro axones diferentes. Múltiples alineamientos de las secuencias de aa de las proteínas IL-4, IL-13 e IL-4/13 seleccionadas revelan que, en general, hay cuatro residuos de cisteína presentes en cada proteína, pero los patrones de los residuos de cisteína son específicos del linaje, es decir, IL-4 e IL-13 de mamífero, IL-4/13 de peces teleosteos e IL-4/13 de otros vertebrados (T. Wang, and C. J Secombes, The evolution of IL-4 and IL-13 and their receptor subunits. *Cytokine* 75, 8-13 (2015); F. J. Moy et al., Solution structure of human IL-13 and implication for receptor binding. *Journal of Molecular Bio* 310, 219-230 (2001); J. Zuegg et al., Structural model of human IL-13 defines the spatial interactions with the IL-13Ralpha/IL-4Ralpha receptor. *Immunology and cell biology* 79, 332-339 (2001)).

Las citocinas IL-4 e IL-13 están dominadas por un haz de 4 hélices α con un giro hacia la izquierda (M. L. Walter, W. J. Cook, B. G. Zhao, R. P. Cameron Jr, S. E. Ealick, R. L. Walter Jr, P. Reichert, T. L. Nagabhushan, P.P Trotta, C. E. Bugg, Crystal structure of recombinant human interleukin-4. *J Biol Chem* 267, 20371-6 (1992)). Las características estructurales secundarias de IL-13 son similares a las de IL-4. De manera similar, IL-13 contiene haces de 4 hélices α (E. L. Rael, R. F. Lockey, Interleukin-13 signaling and its role in asthma. *World Allergy Organ J* 4, 54-64 (2011)).

Tanto la citocina IL-4 como la IL-13 comparten un receptor heterodimérico común. Ambas pueden regular negativamente la síntesis de citocinas proinflamatorias de tipo T-cooperador. Se han propuesto efectos tanto neuroprotectores como neurotóxicos basándose en la evidencia de que las interleucinas 13 y 4 pueden reducir la inflamación al promover el fenotipo de microglía M2 y contribuir a la muerte del fenotipo de microglía M1, o al potenciar los efectos del estrés oxidativo sobre neuronas durante una neuroinflamación (S. Mori et al., *Neuroimmunology of the Interleukins 13 and 4. Brain sciences* 6, 18 (2016)).

El documento WO 2006/036878 A2 describe antagonistas de polipéptidos quiméricos que incluyen una muteína de interleucina-4 unida a una muteína de IL-9 para reducir o inhibir la capacidad de respuesta de una célula frente a IL-4, IL-9 y/o IL-13.

Dada la función de IL-4/IL-13 en las respuestas inmunes y los trastornos neuroinflamatorios y neurodegenerativos, sería muy deseable poseer agentes que sean capaces de unirse a IL-4R de tipo I y/o de tipo II y mejorar los signos clínicos. El documento de patente US 5.017.691 describe polipéptidos de IL-4, en los que se analizó la actividad de IL-4 sobre el crecimiento de linfocitos B y T. Se describen proteínas de IL-4 naturales humanas y murinas y sus muteínas, y sus ADNc que codifican IL-4 de mamífero y sus muteínas. Sin embargo, esos polipéptidos de IL-4 provocan respuestas inmunitarias no deseadas que no se requieren para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

El documento EP 2365 983 A1 describe péptidos obtenidos a partir de IL-4 para la modulación de una respuesta inflamatoria crónica y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. El péptido comprende como máximo 35 aminoácidos contiguos, que se obtienen a partir de una hélice α de IL-4, consistiendo cada péptido en los aminoácidos A Q F H R H K Q L I R F L K R A.

Además, se han descrito nuevos péptidos sintéticos, denominados Ph8, obtenidos a partir de la hélice α de C de IL-4, que interactúan con el receptor α de IL-4 (IL-4 R α), y se ha descubierto que IL-4 R α unido a Ph imitaba los efectos antiinflamatorios de IL-4 al inhibir la producción de TNF- α a través de macrófagos *in vitro*. Ph8 inhibía la proliferación de células Th1/2 y regulaba negativamente la producción de EFN- γ en células Th1 estimuladas. También se descubrió que Ph8 no inducía la activación general de los linfocitos T ni respuestas inflamatorias sin inducir otros efectos secundarios, generalmente asociados con la señalización de IL-4 (B. Klementiev, M. N. Enevoldsen, S. Li, R. Carlsson, Y. Liu, S. Issazadeh-Navikas, E. Bock, V. Berezin, Antiinflammatory properties of a peptide derived from interleukin-4. *Cytokine* 64, 112-121 (2013)). Sin embargo, los péptidos Ph8 no son adecuados para fines neuroprotectores o neuroregenerativos, ya que tienen un efecto sobre los linfocitos y los macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la IL-4 podría mejorar los síntomas clínicos en ratones sometidos a encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo en ratón de esclerosis múltiple (EM), cuando se aplica por vía intratecal durante la fase crónica de la enfermedad. El efecto de la IL-4 y los derivados inventivos de la IL-4 estaba acompañado de una morfología axonal mejorada, así como de un aumento de los brotes regenerativos. Usando modelos *in vitro*, los inventores han observado que la IL-4 desempeña un papel en la neuroprotección, la regeneración de axones y el crecimiento sobre sustratos inhibidores. En particular, se ha descubierto que los efectos de la IL-4 se anulan en ratones con inactivación del receptor de IL-4 específico de neuronas (IL-4R). Se ha identificado una vía de señalización rápida y directa de IL-4R. Además, la aplicación nasal de IL-4 era igualmente efectiva, proporcionando una vía de administración clínicamente más relevante para el tratamiento de trastornos neuronales (C. F. Vogelaar, S. Mandal, S. Lerch, K. Birkner, J. Birkenstock, U. Bühler, A. Schnatz, C. S. Raine, S. Bittner, J. Vogt, J. Kipnis, R. Nitsch, F. Zipp, Fast direct neuronal signaling via the IL-4 receptor as therapeutic target in neuroinflammation. *Sci Transl Med* doi: 10.1126/scitranslmed.aao2304 (2018)).

El papel de IL-4 en la neuroinflamación, combinado con el papel neuroprotector en la lesión traumática y la vía de señalización neuronal identificada, sugieren que IL-4 y los derivados de IL-4 y de IL-13 son adecuados para el tratamiento o la prevención de enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas, en particular para la prevención o el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM).

5 En este contexto, el objeto de la presente invención es proporcionar compuestos alternativos que actúan positivamente sobre las neuronas, no tienen efectos secundarios sobre los linfocitos o los macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea y son adecuados para la prevención o el tratamiento de trastornos neuronales.

10 Este objeto se consigue mediante los compuestos reivindicados y sus usos en la prevención o el tratamiento de trastornos neuroinflamatorios o neurodegenerativos, neuropatías o lesiones traumáticas del sistema nervioso. En las reivindicaciones subordinadas se reivindican realizaciones preferidas de la invención.

15 Debido a la alta similitud estructural de las características estructurales secundarias de IL-4 e IL-13 y al hecho de que ambas citocinas contienen haces de 4 hélices α , designados en este documento con las letras αA , αB , αC , αD , los compuestos inventivos tienen en común que los aminoácidos cruciales se obtienen a partir de las regiones alfa helicoidales αA a αD de IL-4 e IL-13, respectivamente.

20 La expresión "derivado de IL-4", tal y como se usa en el contexto de la presente invención, designa un compuesto, preferiblemente un compuesto peptídico, que se basa en la IL-4 natural. Preferiblemente, un derivado de IL-4 de la presente invención tiene una secuencia y/o estructura de aminoácidos idéntica o muy similar a la de al menos tres dominios seleccionados a partir de las regiones de unión alfa helicoidales αA a αD relevantes de IL-4.

25 La expresión "derivado de IL-13", tal y como se usa en el contexto de la presente invención, designa un compuesto, preferiblemente un compuesto peptídico, que se basa en la IL-13 natural. Preferiblemente, un derivado de IL-13 de la presente invención tiene una secuencia y/o estructura de aminoácidos idéntica o muy similar a la de al menos tres dominios seleccionados a partir de las regiones de unión alfa helicoidales αA a αD relevantes de IL-13.

30 Los compuestos de la presente invención consisten en uno o varios péptidos que se obtienen a partir de las regiones alfa helicoidales αA a αD de IL-4 o IL-13, que comprenden la siguiente estructura general:

A - L1 - B - L2 - C

35 en donde

A se corresponde con una primera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal αA o αC de IL-4 o IL-13 humana o animal,

40 B se corresponde con una segunda secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal αA o αC de IL-4 o IL-13 humana o animal,

C se corresponde con una tercera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal αD o αB de IL-4 humana o animal, o de la región alfa helicoidal αD de IL-13 humana o animal,

45 L1 y L2 se corresponden con uno o más aminoácidos enlazadores.

La expresión "hélice alfa" (hélice α) designa un motivo común en la estructura secundaria de los péptidos. La hélice α puede tener una conformación enrollada hacia la derecha o hacia la izquierda, en donde cada grupo N-H de la cadena principal dona un enlace de hidrógeno al grupo C=O de la cadena principal del aminoácido cuatro residuos antes.

50 Por consiguiente, se pueden seleccionar una o más secuencias de aminoácidos de las regiones alfa helicoidales αA a αD de IL-4 o IL-13 para formar las partes A, B y C de los péptidos de la presente invención. Preferiblemente, los aminoácidos seleccionados son aminoácidos contiguos que se encuentran en las correspondientes regiones α helicoidales de IL-4 o IL-13 humana o animal, o variantes de las mismas en donde uno o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos determinada están delecionados, añadidos, sustituidos o modificados. Los péptidos preferidos de la invención comprenden secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de las regiones helicoidales αA - αC - αD de IL-4 y están unidas entre sí como se indica. Los péptidos alternativos preferidos están compuestos por secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de las regiones helicoidales αC - αA - αD de IL-4 o IL-13 y están unidas entre sí como se indica.

60 Es evidente que uno o más aminoácidos dentro de los residuos peptídicos A, B o C se pueden cambiar por un aminoácido alternativo, ya sea modificado o sin modificar, o sustituir por uno o más aminoácidos sin cambiar significativamente las capacidades de unión y/o la actividad biológica. Por lo tanto, cualquier péptido o variante del mismo que comprenda la estructura anterior pero que tenga un aminoácido diferente en una o varias posiciones y que sea capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales, está incluido en la presente invención. El crecimiento del axón

neuronal tal y como se define en el presente documento puede medirse mediante el ensayo de crecimiento de la corteza descrito en el presente documento.

En el contexto de la presente invención se aplica tanto el código estándar de una letra para residuos de aminoácidos como el código estándar de tres letras. Las abreviaturas de aminoácidos están de acuerdo con las recomendaciones de la Comisión Mixta IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica Eur. J. Biochem, 1984, vol. 184, págs. 9-37. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones se utiliza el código de tres letras o el código de una letra para aminoácidos naturales. Cuando no se especifica la forma L o D, se entiende que el aminoácido en cuestión tiene la forma L natural, véase, Pure & Appl. Chem. vol. (56(5) págs. 595-624 (1984) o la forma D, de modo que los péptidos formados pueden estar constituidos por aminoácidos en la forma L, en la forma D o por una secuencia con formas L y D mixtas.

El aminoácido C-terminal de un péptido suele encontrarse como un ácido carboxílico libre, que también puede especificarse como "-OH". Sin embargo, el aminoácido C-terminal de un péptido para uso según la presente invención también puede ser un derivado amidado, que se especifica como "-NH-2". Cuando no se indica nada más, el aminoácido N-terminal de un polipéptido comprende un grupo amino libre, a veces también especificado como "H-". Un péptido, un fragmento o una variante del mismo según la presente invención, también puede comprender uno o varios aminoácidos no naturales o naturales modificados.

Los compuestos preferidos de la presente invención son péptidos que son derivados de IL-4 o derivados de IL-13 que son capaces de unirse específicamente al receptor de IL-4 de tipo I y II, al incluir los aminoácidos dentro de las hélices α , αA , αB , αC y αD que se requieren para unirse a IL-4R α , combinados con los aminoácidos que se requieren para unirse a las co-cadenas de IL-13R $\alpha 1$ o la cadena y común.

Para obtener los compuestos de la presente invención, los inventores acoplaron los aminoácidos de unión a receptores más importantes y unieron las cadenas de correceptores entre sí. Los tramos de aminoácidos se seleccionaron basándose en su unión a la cadena de IL-4R α y a la cadena IL-13R $\alpha 1$ o la cadena y común, uniendo de ese modo las cadenas para formar IL-4R de tipo I o tipo II. Todos los compuestos se basan en el mismo principio de unión a la cadena del receptor y todos los derivados de IL-4 e IL-13 tienen mecanismos similares. Los aminoácidos seleccionados obtenidos a partir de la región helicoidal αA , αB , αC αD de IL-4 o IL-13 humana o animal, son los aminoácidos más esenciales necesarios para la unión del compuesto inventivo a IL-4R α o IL-13R α .

La presente invención incluye cualquier péptido o polipéptido, tanto en forma modificada como sin modificar, que se basa en una secuencia de aminoácidos de mamífero de una o más de las regiones helicoidales αA , αB , αC , αD de IL-4 o IL-13 de mamífero (por ejemplo, humana o murina). El compuesto de la presente invención puede comprender uno o más de dichos péptidos, opcionalmente unidos por puentes mediante aminoácidos estructuralmente neutros. Específicamente, la presente invención incluye la combinación de tramos de aminoácidos que se encuentran en las regiones helicoidales αA , αB , αC , αD de IL-4 o IL-13 en mamíferos, que son necesarias para unirse a IL-4R α e IL-13R $\alpha 1$ o la cadena y común. Aunque la presente invención se ejemplifica en el presente documento utilizando IL-4 e IL-13 humanas y murinas, la invención también incluye aminoácidos homólogos y tramos de aminoácidos que se encuentran en otras especies en las que se aplican los mismos principios de la interacción IL-4/IL-4R α e IL-13/IL-13R α .

Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones helicoidales αA , αB , αC y αD se obtienen a partir de IL-4 de mamífero. La secuencia de aminoácidos de IL-4 humana y murina que incluye las cuatro hélices alfa αA a αD se muestra en la Fig. 1A. En una realización alternativa, los péptidos de la presente invención se obtienen a partir de regiones helicoidales αA , αB , αC y αD seleccionadas a partir de IL-13 de mamífero. La secuencia de aminoácidos de IL-13 humana y murina que incluye las cuatro hélices alfa αA a αD se muestra en la Fig. 1D.

Se muestra la disposición de las diferentes secciones helicoidales para la generación de los compuestos de la invención. Dada la estructura general de los péptidos obtenidos a partir de IL-4 o IL-13 de la presente invención, A - L1 - B - L2 - C, se prefiere que A corresponda a la hélice αC de IL-4 o IL-13, seguida de una primera secuencia enlazadora que está conectada a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de la hélice αA de IL-4 o IL-13 seguida de una segunda secuencia enlazadora que está conectada a una secuencia de aminoácidos seleccionada obtenida a partir de la hélice αD de IL-4 o IL-13. Las secuencias enlazadoras son necesarias para la estructura tridimensional de los péptidos de la invención.

En una realización alternativa, A se corresponde con aminoácidos seleccionados obtenidos a partir de la hélice αA de IL-4 seguidos por la primera secuencia enlazadora que está conectada a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la hélice αC de IL-4 seguida de una segunda secuencia enlazadora que está conectada a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la hélice αB de IL-4. Preferiblemente, los aminoácidos seleccionados obtenidos a partir de uno o más, preferiblemente de al menos tres tramos de aminoácidos en las regiones helicoidales αA , αB , αC , αD , son aminoácidos contiguos que se pueden encontrar en dicha región de una especie seleccionada, preferiblemente IL-4 o IL-13 de una especie humana u otra especie de mamífero.

Los compuestos preferidos de la presente invención son péptidos, en donde

A se corresponde con los aminoácidos WNR, RAR, LMR, LIR, EIIKT o EIIGI
 B se corresponde con los aminoácidos EIIKT, EIIGI, ELIEELVNIT, ELIEELSNIT, RLDRNLWG o RLFRAFRC
 C se corresponde con los aminoácidos KTIMREKY, FVKDLLLHLLK, RAATVLRQFYS, KSIMQMDY,
 FITKLISYTKQ o RASKVLRIFYL,
 o una variante de los mismos que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales.

Una variante según la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de coincidencias positivas de aminoácidos con una secuencia seleccionada de las regiones helicoidales α A, α B, α C y α D, tal como un 71-80% de coincidencias positivas de aminoácidos, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% de coincidencias positivas de aminoácidos, por ejemplo, de 91 a 99% de coincidencias positivas de aminoácidos con una secuencia seleccionada de las regiones helicoidales α A, α B, α C y α D. Una coincidencia positiva de aminoácidos se define como la presencia en la misma posición en dos secuencias comparadas de residuos de aminoácidos que tienen propiedades físicas, biológicas y/o químicas similares. Las coincidencias positivas de aminoácidos preferidas que podrían usarse para sustituciones son K con R, E con D, L con M, Q con E, I con V, I con L, A con S, Y con W, K con Q, S con T, N con S y Q con R. Se requiere que un péptido o una variante de la presente invención tenga una capacidad de crecimiento axónico que pueda medirse mediante un ensayo de crecimiento axónico descrito en el presente documento.

Un péptido o una variante según la presente invención también puede comprender otros restos químicos tales como restos fosforilo, sulfuro, acetilo o glicosilo. Como tal, una secuencia peptídica determinada puede modificarse, por ejemplo, mediante adición, delección, sustitución o modificación química de uno o más residuos de aminoácidos. Para tales modificaciones, se pueden usar tanto L-aminoácidos como D-aminoácidos. Las posibles modificaciones químicas pueden comprender derivados como azúcares o ésteres, por ejemplo, ésteres metílicos o acetílicos, o modificaciones con polietilenglicol. Además, un grupo amino del péptido se puede convertir en una amida, que comprende un ácido graso. Un péptido o una variante de la invención también puede modificarse mediante biotina en su extremo C-terminal o mediante un marcador His en su extremo N-terminal.

Según la presente invención, las variantes de las secuencias de aminoácidos pueden comprender una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, que son independientes entre sí, en donde (i) al menos una glicina (Gly) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consisten en Ala, Val, Leu e Ile.

- (ii) al menos una alanina (Ala) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Val, Leu,
- (iii) al menos una valina (Val) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Leu e Ile,
- (iv) al menos una leucina (Leu) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val e Ile,
- (v) al menos una isoleucina (Ile) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val y Leu,
- (vi) al menos un ácido aspártico (Asp) de dicha variante está sustituido con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Glu, Asn y Gln,
- (vii) al menos una aspargina (Asn) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu y Gln,
- (viii) al menos una glutamina (Gln) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu y Asn,
- (ix) al menos una fenilalanina (Phe) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Tyr, Trp, His, Pro, preferiblemente seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Tyr y Trp,
- (x) al menos una tirosina (Tyr) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Trp, His, Pro, preferiblemente un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Phe y Trp,
- (xi) al menos una arginina (Arg) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Lys e His,
- (xii) al menos una lisina (Lys) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Arg e His
- (xiii) al menos una prolina (Pro) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Tyr, Trp e His,
- (xiv) al menos una cisteína (Cys) de dicha variante está sustituida con un aminoácido seleccionado a partir del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr y Tyr.

Por lo tanto, de lo anterior se deduce que la misma variante de un péptido o un fragmento del mismo puede comprender más de una sustitución de aminoácidos conservadora u homóloga de más de un grupo de aminoácidos conservadores como se han definido en este documento anteriormente.

5 Se pueden introducir sustituciones conservadoras de aminoácidos en cualquier posición de un péptido o una variante de la presente invención. Sin embargo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservadoras, particularmente, pero sin limitarse a, una sustitución no conservadora en una o más posiciones. La sustitución de aminoácidos se puede realizar basándose en sus valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y en la similitud relativa de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, como el tamaño y la carga.

10 Los grupos de aminoácidos conservadores son preferentemente los siguientes, dependiendo de sus propiedades químicas conocidas:

15 (i) A, G; (ii) Q, N, S, T; (iii) E, D; (iv) Q, N, S, T; (v) H, K, R; (vi) L, P, I, V, M, F, Y, W

Los péptidos preferidos de la presente invención se obtienen a partir de IL-4 humana, en donde

20 A se corresponde con los aminoácidos WNR,
B se corresponde con los aminoácidos EI IKT,
C se corresponde con los aminoácidos KTIMREKY,
o una variante de los mismos que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales.

25 Los péptidos preferidos de la presente invención son péptidos obtenidos a partir de IL-13 humana, en donde

30 A se corresponde con los aminoácidos LMR,
B se corresponde con los aminoácidos ELIEELVNIT,
C se corresponde con los aminoácidos FVKDLLLHLLK,
o una variante de los mismos que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales.

Los péptidos preferidos de la presente invención son derivados de IL-4, en donde

35 A se corresponde con los aminoácidos EI IKT,
B se corresponde con los aminoácidos RLDRNLWG,
C se corresponde con los aminoácidos RAATVLRQFYS,
o una variante de los mismos que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales.

40 La actividad biológica de un péptido de la presente invención se define por su capacidad para unirse a IL-4R de tipo I o II, en donde la unión del péptido o de la variante de la invención da como resultado los efectos neuroprotectores y neurorregenerativos deseados. Esos efectos biológicos pueden medirse mediante sistemas de modelos *in vitro* o *in vivo* como la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) u otros modelos en ratón para la esclerosis múltiple (EM). Además, la actividad biológica de un péptido o de una variante de la invención se puede medir mediante un ensayo de crecimiento de la corteza.

45 Para conectar los tramos de aminoácidos A, B, C de un compuesto que comprende la fórmula anterior, se usan secuencias de enlazadores que están compuestas preferiblemente por uno o más aminoácidos, preferiblemente el enlazador consiste en 1 a 10, más preferiblemente de 1 a 5 aminoácidos. Una primera secuencia enlazadora conecta los aminoácidos de A y B, mientras que una segunda secuencia enlazadora conecta los aminoácidos de B y C en la fórmula anterior. Preferiblemente, la primera secuencia enlazadora (L1) y/o la segunda secuencia enlazadora (L2) se corresponden con S, GS, SGS, P, GP o PGP. Es evidente para el experto en la técnica que también se pueden usar otros aminoácidos o enlazadores para conectar los tramos de aminoácidos obtenidos a partir de las regiones α helicoidales de IL-4 e IL-13. Cualquier enlazador que sea adecuado para este fin entra dentro de la definición de la presente invención. El enlazador es necesario para combinar entre sí las regiones helicoidales α seleccionadas e imitar la estructura tridimensional de la región de unión al receptor.

50 En una realización preferida, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-4 humana que comprende una secuencia de aminoácidos WNRSEI IKTGSKTIMREKY (SEQ ID NO: 1), o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α C, α A y α D unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

65 En una realización alternativa, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-13 humana que comprende una secuencia de aminoácidos LMRSELIEELVNITGSFVKDLLLHLLK (SEQ ID NO: 2), o una variante de la misma que

tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α C, α A y α D unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

5 En una realización alternativa, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-4 humana que comprende una secuencia de aminoácidos EIIKTGSRLDRNLWGSGSRAATVLRQFYS (SEQ ID NO: 3), o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α A, α C y α B unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

10 En una realización alternativa, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-4 murina que comprende una secuencia de aminoácidos RARSEIIGGSKSIMQMDY (SEQ ID NO: 4), o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α C, α A y α D unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

15 En una realización alternativa, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-13 murina que comprende una secuencia de aminoácidos LIRSELIEELSNITGSFITKLLSYTKQ (SEQ ID NO: 5), o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α C, α A y α D unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

20 En una realización alternativa, el péptido de la presente invención es un derivado de IL-4 murina que comprende una secuencia de aminoácidos EIIIGPRLFRFRCSGSRASKVLRIFYL (SEQ ID NO: 6), o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una o más posiciones, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales. Ese péptido está compuesto por las regiones helicoidales α A, α C y α B unidas entre sí por una primera y una segunda secuencia ácida enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos.

25 Los derivados de IL-4 e IL-13 de la presente invención son capaces de actuar sobre las neuronas de la misma manera que la IL-4 pero sin los efectos secundarios de afectar a las poblaciones de linfocitos o a las células mieloides. La presente invención también muestra que los derivados de IL-4 e IL-13 no son tóxicos y exhiben efectos beneficiosos sobre la encefalomiелitis autoinmune *in vivo* como lo muestra el modelo de EAE. Los compuestos también muestran efectos beneficiosos sobre el crecimiento de los axones y la señalización neuronal y tienen solo efectos mínimos sobre las células inflamatorias. Como se muestra en el presente documento, los derivados de IL-4 e IL-13 de la presente invención conducen a una mejora significativa de la puntuación clínica similar a la de IL-4 natural.

30 Como tal, la presente invención también incluye una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la presente invención y un portador, vehículo o agente farmacéuticamente adecuado. Preferiblemente ese portador, vehículo o agente es adecuado para la administración de un ingrediente farmacéuticamente activo, por ejemplo, una administración transmucosa a través de la mucosa nasal. Un vehículo tal como se usa en la composición farmacéutica, puede comprender disolventes, codisolventes, potenciadores, agentes tamponadores del pH, antioxidantes, aditivos o similares. Los diversos componentes del vehículo no son tóxicos y no interaccionan con otros componentes de la composición total de una manera nociva.

35 Preferiblemente, el compuesto de la presente invención está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz en la composición farmacéutica, es decir, en una concentración que no es tóxica, pero es suficiente para actuar como fármaco o agente activo para proporcionar un efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, una o más dosis de un compuesto de la presente invención serán eficaces en el tratamiento de un trastorno neuroinflamatorio o neurodegenerativo, o neuropatías o lesiones traumáticas del sistema nervioso. Los compuestos de la presente invención actúan sobre las neuronas sin afectar a los linfocitos T ni a las células mieloides.

40 Tal y como se ejemplifica con los datos *in vitro* o *in vivo* descritos en el presente documento, los compuestos de la presente invención son adecuados para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neuroinflamatorio o neurodegenerativo. Los trastornos neuroinflamatorios o neurodegenerativos preferidos incluyen todas las formas de esclerosis múltiple (EM), neuromielitis óptica (NMO), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer u otras formas de demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Huntington.

45 Los compuestos de la presente invención también son adecuados para uso en el tratamiento o la prevención de neuropatías o lesiones traumáticas del sistema nervioso. Las neuropatías preferidas son la enfermedad de Charcot Marie Tooth, el síndrome de Guillain Barré, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica y las neuropatías diabéticas.

50 Las lesiones traumáticas del sistema nervioso preferidas son lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales traumáticas, accidentes cerebrovasculares y lesiones de los nervios periféricos.

55

La aplicabilidad farmacéutica se ejemplifica en el presente documento mediante punción lumbar (inyección intratecal), aplicación nasal e inyección sistémica.

La presente invención se ilustra con más detalle en los siguientes ejemplos:

Diseño de los derivados de IL-4 y los derivados de IL-13

Los derivados de IL-4 y los derivados de IL-13 de la invención son compuestos que se definen por la estructura A - L1 - B - L2 - C. Siguiendo esa estructura, los inventores sometieron a ensayo diversos derivados de IL-4 que se habían obtenido a partir de diferentes regiones helicoidales de IL-4 humana y murina. Esos derivados de IL-4 recién generados se denominan en el presente documento "Link4" y "AvoC".

Los inventores también sometieron a ensayo diversos derivados de IL-13 que se habían obtenido a partir de las regiones α helicoidales de IL-13 humana y murina y seguían la fórmula anterior. Esos derivados de IL-13 recién generados se denominan en el presente documento "Link13".

En la Fig. 1 se describe el diseño de los derivados Link4 y Link13. Basándose en la estructura tridimensional conocida de IL-4 y del receptor de IL-4, los inventores combinaron los tramos de aminoácidos que se requieren para la unión a IL-4R. A continuación, los inventores identificaron qué aminoácidos estaban ubicados en la superficie de la proteína de IL-4 para decidir qué combinaciones realizar de las hélices α A a α D. Una parte de la hélice α C se giró y se conectó con un aminoácido enlazador a una parte de la hélice α A que se había unido con dos aminoácidos enlazadores a una parte de la hélice α D. Se identificaron y acoplaron los aminoácidos que se unían al receptor, lo que proporcionó derivados de IL-4 e IL-13 en los que las cadenas de los correceptores estaban unidas entre sí. Los derivados de IL-4 e IL-13 se diseñaron de manera similar basándose en la homología de secuencia de IL-4 e IL-13.

El derivado de IL-4 AvoC se diseñó basándose en otro principio de unión de IL-4 a su receptor. La secuencia de unión de IL-4 está definida por las denominadas agrupaciones de tipo aguacate en donde un núcleo está rodeado por residuos hidrofóbicos (T. D. Mueller, J. L. Zhang, W. Sebald, A. Duschl, Structure, binding and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system, *Biochimica Biophysica Acta* 1592, 237-250 (2002)). Se dispusieron tramos de aminoácidos de tal manera que imitaban la estructura superficial de IL-4. Además, es probable que este derivado una las dos cadenas del receptor, ya que la secuencia obtenida a partir de la hélice α A se une a ambas cadenas del receptor.

La Fig. 1A muestra las secuencias de aminoácidos de IL-4 humana y murina alineadas con la ubicación de las hélices α A, α B, α C, α D y los enlazadores β . Las puntas de flecha negras indican sitios de unión a la cadena de IL-4Ra, las puntas de flecha grises señalan sitios de unión a las cocadenas, ya sea IL-13R α 1 o la cadena y común. Los aminoácidos en negrita son los aminoácidos que se usan para la construcción de los derivados de IL-4 de la presente invención como se muestra en las Fig. 1B y 1C.

La Fig. 1B muestra el derivado de IL-4 Link4 con los aminoácidos seleccionados de las regiones helicoidales α C, α A y α D en negrita.

La Fig. 1C muestra el derivado de IL-4 AvoC con los aminoácidos seleccionados de las regiones helicoidales α A, α C y α B en negrita.

La Fig. 1D muestra las secuencias de aminoácidos alineadas de IL-13 humana y murina que comprenden las hélices α A, α B, α C, α D. Se representan los aminoácidos utilizados para diseñar el derivado de IL-13 Link13 de la presente invención.

La Fig. 1E muestra el derivado de IL-13 Link13 con los aminoácidos seleccionados de las regiones helicoidales α C, α A y α D en negrita.

La Fig. 2 muestra un ensayo de toxicidad para fibroblastos embrionarios de ratón (Mef) (Fig. 2A) y neuronas del hipocampo (HT22) (Fig. 2B). La toxicidad se comprobó sometiendo los fibroblastos embrionarios de ratón (Mef) y la línea celular del hipocampo HT22 a un ensayo de viabilidad celular CellTiter-blue (ctb). Link4 y AvoC, utilizados en concentraciones crecientes, no tenían efectos tóxicos sobre los fibroblastos (Fig. 2A) o las neuronas del hipocampo (Fig. 2B).

La Fig. 3 muestra los efectos *in vivo* del derivado de IL-4 Link4. El tratamiento de los ratones durante la fase crónica de EAE (barra gris) mediante inyección intratecal lumbar (A) o aplicación nasal (B) mostraba una mejora significativa en la puntuación clínica de los animales tratados con IL-4 y Link4, en comparación con los controles de PBS que permanecían con un alto nivel de enfermedad. También se muestra el tratamiento lumbar con el péptido Ph8, que no tenía ningún efecto sobre el curso de la enfermedad.

Para someter a ensayo si Link4 tenía efectos similares a IL-4 *in vivo*, se realizaron dos experimentos piloto. En el primer experimento (Fig. 3A), ratones B16 se sometieron a EAE y se trataron con IL-4, Link4, Ph8 y PBS (n = 6-7 animales por grupo) mediante inyección intratecal lumbar, directamente en el líquido cefalorraquídeo (LCR) cada dos

días durante 14 días, en la fase crónica de la enfermedad a partir del día 5 después del primer pico de la enfermedad (barra gris). El tratamiento con Link4 conducía a una mejora significativa de la puntuación clínica, similar a IL-4, mientras que el conocido agonista parcial Ph8 no mejoraba los signos clínicos. Para una mejor traducción clínica, el tratamiento se cambió a tratamiento nasal con IL-4 y Link4 (Fig. 3B; 2 experimentos agrupados, n = 15-16 por grupo). Los tratamientos aplicados por vía nasal pueden entrar al cerebro a través de la placa cribiforme, en donde las fibras nerviosas olfatorias atraviesan el hueso, lo que da lugar a una conexión entre el techo de la cavidad nasal y el cerebro (C. F. Xiao, F. J. Davis, B. C. Chauhan, K. L. Viola, P. N. Lacor, P. T. Velasco, W. L. Klein, and N. B. Chauhan, Brain transit and ameliorative effects of intranasally delivered anti-amyloid-beta oligomer antibody in 5XFAD mice. J Alzheimers Dis 35, 777-788 (2013)). Nuevamente, tanto el tratamiento con IL-4 como el Link4 eran beneficiosos.

La Fig. 4 muestra los efectos de los derivados de IL-4 e IL-13 inventivos sobre el sistema inmunológico. A-B: Efectos de la incubación con IL-4 y diferentes concentraciones de Link4 y Link13 sobre la diferenciación de A: macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea (BMDMs) CD11b⁺ en células F80⁺ CD206⁺, y B: linfocitos T CD4⁺ en células Gata3⁺. C-D: resultados de FACS para diferentes poblaciones de linfocitos T y monocitos/macrófagos/microglía CD11b⁺ MHCII⁺ de células inmunes aisladas de C: bazo y D: sistema nervioso central (SNC) de ratones con EAE tratados con PBS, IL-4 o Link4.

Para investigar si Link4 y Link13 son capaces de modular las células inmunes, se realizaron ensayos *in vitro* en macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea (BMDM) y en linfocitos T vírgenes. El tratamiento de BMDMs con IL-4 aumentaba la expresión de los marcadores de diferenciación F80 y CD206 en los BMDMs CD11b⁺. Esa diferenciación no ocurría en la respuesta a Link4 o Link13 (Fig. 4A). La diferenciación esperada en los linfocitos T CD4⁺ Gata3⁺ observada con IL-4 nuevamente no tenía lugar cuando las células se incubaban con Link4 o Link13 (Fig. 4B). Para descartar que los análogos de Link eran necesarios en una concentración mayor que IL-4, los ensayos se realizaron con cantidades crecientes, lo que no marcó ninguna diferencia.

Posteriormente, se analizaron los efectos de IL-4 y Link4 sobre células inmunes cuando se aplicaban por vía intranasal, de manera similar a en la Fig. 3B. Dado que los tratamientos aplicados por vía nasal pueden llegar a la periferia (pulmones, torrente sanguíneo), era de suma importancia comprobar si las sustancias afectaban a las poblaciones de linfocitos en el bazo. Se encontró una reducción de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos para Link4, mientras que todos los tipos de linfocitos T colaboradores se mantuvieron sin cambios. La población de monocitos/macrófagos CD11b⁺ MHCII⁺ tampoco cambiaba. Para las poblaciones de linfocitos que entraban en el cerebro y la médula espinal (ambos se toman juntos como SNC, sistema nervioso central), solo se observaba un aumento significativo en las células IL-10⁺.

La Fig. 5 muestra los efectos de los derivados de IL-4 e IL-13 de la invención sobre las neuronas. A: Crecimiento cortical como respuesta a 50 ng/ml de IL-4, Link4 o Link13, en comparación con el control de PBS. El aumento del crecimiento a las 48 h se calculó sobre el crecimiento basal (sin tratamiento) a las 24 h. B: Efectos sobre la fosforilación de moléculas de señalización después de 10 minutos de tratamiento de neuronas corticales disociadas con IL-4, Link4 o PBS. Link4 mostraba los mismos efectos de señalización neuronal que IL-4.

Materiales y métodos

Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Para la EAE activa, se inmunizaron ratones C57Bl6 hembras de 9 a 10 semanas de edad como se ha descrito anteriormente (M. Paterka, J. O. Voss, J. Werr, E. Reuter, S. Franck, T. Leuenberger, J. Herz, H. Radbruch, T. Bopp, V. Siffrin, and F. Zipp, Dendritic cells tip the balance towards induction of regulatory T cells upon priming in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Autoimmun 67, 108-114 (2017)) mediante inyección subcutánea de 200 µg de proteína de mielina de oligodendrocito 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) mezclada con adyuvante completo de Freund (CFA). Después de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅, se administraron 400 ng de toxina pertussis (PTX) por vía intraperitoneal el día de la inmunización y después de 24 h. Los signos clínicos se calificaron utilizando los siguientes parámetros:

Puntuación	Signos de EAE
0	sin signos detectables
0,5	debilidad de la cola
1	parálisis completa de la cola
2	parálisis parcial de las extremidades posteriores
2,5	parálisis unilateral completa de las extremidades posteriores
3	parálisis bilateral completa de las extremidades
3,5	parálisis completa de las extremidades posteriores y parálisis parcial de las extremidades anteriores

Puntuación	Signos de EAE
4	parálisis total de las extremidades anteriores y posteriores
5	muerte

5 El tratamiento con rIL-4 (1 µg, Peprotech), Ph8 (1 µg, sintetizado de forma personalizada, Schafer N), Link4 (1 µg, sintetizado de forma personalizada, Schafer N) o vehículo (PBS) se realizó durante la fase crónica de los modelos de enfermedad mediante inyección intratecal lumbar (R. Lu and A. Schmidtko, Direct intrathecal drug delivery in mice for detecting in vivo effects of cGMP on pain processing. *Methods Mol Biol* 1020, 215-221 (2013)) o la aplicación nasal de IL-4 y Link4 se realizó según procedimientos publicados (C. F. Xiao, F. J. Davis, B. C. Chauhan, K. L. Viola, P. N. Lacor, P. T. Velasco, W. L. Klein, and N. B. Chauhan, Brain transit and ameliorative effects of intranasally delivered anti-amyloid-beta oligomer antibody in 5XFAD mice. *J Alzheimers Dis* 35, 777-788 (2013)). Los ratones se adiestraron previamente para evitar el estrés y se mantuvieron en un ángulo de 45 grados para aplicar la solución de IL-4 (1 µg, Peprotech) en las fosas nasales usando una punta de pipeta.

Citometría de flujo (FACS)

15 Se extrajeron el SNC y el bazo de ratones con EAE tratados por vía nasal con IL-4, Link4 o PBS el día 35 y se aislaron células inmunitarias como se ha descrito anteriormente (M. Paterka, J. O. Voss, J. Werr, E. Reuter, S. Franck, T. Leuenberger, J. Herz, H. Radbruch, T. Bopp, V. Siffrin, and F. Zipp, Dendritic cells tip the balance towards induction of regulatory T cells upon priming in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun* 67, 108-114 (2017)). Para la estimulación *in vitro* de los linfocitos T, se emplearon anticuerpos anti-CD3 (145-2C11) y anti-CD28 (37,51).
 20 Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la citometría de flujo con BD FACSCanto II (BD Bioscience): anti-CD4 PEcy7 (RM4-5), anti-CD8 FITC (53-6.7), anti-CD3APC (145-2c11), anti-CD11b bio (M1/70), anti-MHCII PE (AF6-120.1), anti-CD11b V450 (HL311B), anti-CD45 AF605 (30-F11), anti-GM-CSF PE (MP1-22E9), anti-IL17 APC (eBio17B7), anti-TNFα AF700 (MP6-XT22), anti-IFN-γV450 (XMG1.2), anti-GATA-3 PE (TWAZ), anti-FOXP3 PEcy7(FZK-16s), anti-IL-10 APC (JES5-16E3), anti-CD4 V450 (RM4-5). Todos los anticuerpos se adquirieron en eBioscience o Biolegend.

Aislamiento de linfocitos murinos (CD4+CD62L+)

30 Para el aislamiento de linfocitos T, se sacrificaron ratones C57BL/6 de 5 a 8 semanas de edad mediante dislocación cervical y se aislaron el bazo y los ganglios linfáticos (GL) y se frotaron a través de un colador de células de 100 µm en un tubo de 50 ml con medio de lavado (FCS al 5%, P/S al 1%, HEPES al 1% en PBS). Después del lavado, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 550 g a 4°C. Para eliminar los glóbulos rojos, el material sobrenadante se resuspendió en tampón de lisis seguido de centrifugación (5 min, 550 g, 4°C). Las células se resuspendieron en tampón MACS y se realizó una clasificación magnética de linfocitos sobre hielo, utilizando los separadores MidiMACS y QuadroMACS. Se realizó una clasificación de células CD4 intactas y CD8 manipuladas (no intactas) en una etapa de lavado en ml de tampón MACS (5 min, 550 g, 4°C).

40 Las células se incubaron con una mezcla de anticuerpos de biotina de linfocitos T CD4 (Miltenyi Biotec) en tampón MACS durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadieron microperlas de anti-biotina y microperlas de CD8 en tampón MACS. Se añadieron microperlas de CD8 para reducir la posible contaminación de linfocitos CD8+. Después de 10 minutos de incubación a 4°C, las células se lavaron nuevamente y se resuspendieron en tampón MACS. Las columnas MACS se equilibraron previamente y se cubrieron con filtros de separación previa (30 µm). Se añadió un máximo de 300 x 10⁶ células a cada columna, seguido de 3 etapas de lavado consecutivas con tampón MACS. El flujo a través enriquecido en CD3+CD4+CD8⁻ se recogió para la siguiente clasificación de CD62L manipuladas. Después de la centrifugación (5 min, 550 g, 4°C), se añadieron a las células microperlas CD62L en tampón MACS y se incubaron durante 15 min a 4°C. Después del lavado, las células se resuspendieron en tampón MACS y se cargaron en una nueva columna. Las células CD4+CD62L⁺ marcadas positivamente se enriquecieron en la columna y se recogieron en tampón MACS. La pureza de las clasificaciones magnéticas de las células se evaluó comparando muestras previas y posteriores a la clasificación mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron con CD4-Horizon (1:400), CD3-APC (1:600) y CD62L-APC (1:200). La pureza CD4+CD62L⁺ de las células CD4⁺ era generalmente de aproximadamente >97%.

Aislamiento de células presentadoras de antígenos (APCs) murinas

55 Las células presentadoras de antígenos se aislaron mediante lisis del bazo de ratones adultos C57BL/6 y clasificación magnética de células inmunes con separadores MidiMACS y QuadroMACS. La suspensión celular se lavó con tampón MACS y se centrifugó (5 min, 550 g, 4°C). Posteriormente, las células se resuspendieron en 95 µl de tampón MACS y microperlas CD90.2 intactas y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Después de lavar con tampón MACS y centrifugar (5 min, 550 g, 4°C), las células se resuspendieron en tampón MACS, se cargaron en las columnas y se recogieron en tampón MACS. Para detener su ciclo de proliferación, las APCs purificadas se radiaron con 30 Gy/3000 rad.

Diferenciación de T_H2

Para la estimulación inicial, las células CD4⁺CD62L⁺ se cocultivaron con células presentadoras de antígenos (APCs) en una proporción de 1:5 con una concentración de 6 millones de células en 2 ml de medio de ratón (FCS al 10%, P/S al 1%, L-glutamina al 1%, β-mercaptoetanol al 0,1%, HEPES al 1% en tampón RPMI) por pocillo en una placa de 24 pocillos. Para la activación inespecífica del receptor de linfocitos T se añadieron al cultivo 2 µg/ml de anti-CD3. Para la diferenciación en células T_H2 se añadió IL-4 (10 ng/ml), α-IL-12 (10 µg/ml) y α-tFND (10 µg/ml). Los días 3 y 5, las células se dividieron y se sembraron en placas en medio de nuevo aporte que contenía 10 µg/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4. El día 7, las células se estimularon con anti-CD3/anti-CD28 y se trataron con Brefeldin A para bloquear la secreción. Después de 4 horas de incubación, se realizó una verificación de las citocinas en los diferentes cultivos de linfocitos T mediante citometría de flujo, utilizando CD4-PECy7 (1:1000) para una tinción extracelular, bloqueo del receptor de Fc (1:100) e IFN-γ-Horizon (1:200), TNFα-AF700 (1:200) e IL-10-APC (1:200) para tinción intracelular. Las células T_H2 se tiñeron adicionalmente para Gata3-PE intranuclear (1:100).

Generación de macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea (BMDMs)

Se aislaron BMDMs murinos a partir de ratones C57BL/6 adultos. Los huesos de tibia y fémur se lavaron con PBS estéril y la médula ósea se recogió en medio de lavado. Después de filtrar la suspensión celular a través de una malla de nailon de 100 µm, las células se centrifugaron (5 min, 550 g, 4°C) y se resuspendieron en medio de ratón (FCS al 10%, P/S al 1%, L-glutamina al 1%, β-mercaptoetanol al 0,1%, HEPES al 1% en tampón RPMI). Para la generación *in vitro* de células BMDMs, se sembraron en placas de 6 pocillos y se expusieron a 20 ng/ml de factor estimulante de macrófagos (M-CSF) durante 4 días. Para la activación de las células se añadió al cultivo dexametasona (5 x 10⁻⁷ M), LPS (10 µg/ml) e IL-4 (10 ng/ml) durante los siguientes 3 días.

Ensayo de la viabilidad celular CellTiter-blue (ctb)

Se cultivaron fibroblastos embrionarios de ratón (Mef) (Sigma-Aldrich) y células HT22 del hipocampo (ThermoScientific) según los protocolos del fabricante. Los ensayos de ctb se realizaron según los protocolos del fabricante (Promega).

Ensayo del crecimiento de la corteza y neuronas corticales disociadas

Se diseccionaron explantes de corteza neonatal (P1-3) a partir de secciones de vibratomo de 250 µm de espesor (HM650V, Thermo Fisher) de Bregma 0 a -1,5 (corteza motora). Se microdisecionó la capa cortical V, se extendió sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-D-lisina (0,5 mg/ml) y laminina (1 mg/ml) y se cultivó durante 24 h en medio neurobasal con suero de caballo al 2%, B27 al 2%, glutamax al 1% y penicilina/estreptomina al 0,5%. Los explantes se trataron durante 48 h con rIL-4 (50 ng/ml), Link4 (50 ng/ml), Link13 (50 ng/ml) o PBS. La longitud del axón se evaluó utilizando Adobe Photoshop midiendo la distancia de los 40 axones más largos, corregida con el crecimiento inicial a las 24 h. Las neuronas corticales disociadas se prepararon como se ha descrito anteriormente (J. T. Walsh, S. Hendrix, F. Boato, I. Smirnov, J. Zheng, J. R. Lukens, S. Gadani, D. Hechler, G. Golz, K. Rosenberger, T. Kammertons, J. Vogt, C. Vogelaar, V. Siffrin, A. Radjavi, A. Fernandez-Castaneda, A. Gaultier, R. Gold, T. D. Kanneganti, R. Nitsch, F. Zipp, and J. Kipnis, MHCII-independent CD4⁺ T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *J Clin Invest* 125, 699-714 (2015)). Se incubaron cortezas de ratones embrionarios del día 18 (E18) con solución de tripsina/DNasa y se disociaron mediante trituración. Las células se resuspendieron en medio de cultivo (1x MEM-Glutamax, glucosa al 20%, HS al 10%, 1x PenStrep), se esterilizaron por filtración 600.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Cinco horas después del cultivo en placas, se aspiró el medio, los pocillos se lavaron 2 veces con PBS tibio y las células se cultivaron en medio NB. Se permitió que los cultivos se expandieran durante 3 días, antes del tratamiento con 50 ng/ml de IL-4, 50 ng/ml de Link4 o volúmenes equivalentes de PBS. Después de 10 minutos, las células se recogieron en tampón de lisis y se procesaron para una transferencia Western. Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Fisher Scientific y Sigma. Para los experimentos de señalización, las células se incubaron con 50 ng/ml de IL-4 (Peprotech) o volúmenes equivalentes de PBS durante 10 minutos.

Transferencia Western

Para la transferencia Western se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-IRS1 (EMD Millipore), anti-fosfo-IRS1 (Cell Signaling Technology), anti-MAPK y anti-fosfo-MAPK (Cell Signaling Technology), anti-PKCγ (Santa-Cruz), anti-fosfo-PKCγ (Biozol). Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a DyLight 800/600 para un análisis cuantitativo de las proteínas utilizando el sistema de formación de imágenes Li-Cor Odyssey FC (Li-Cor Bioscience). En las transferencias sometidas a ensayo con los fosfoanticuerpos se eliminaron los anticuerpos después de la visualización, para permitir una incubación con los anticuerpos totales para una detección paralela en las mismas muestras.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc). Las puntuaciones clínicas se analizaron mediante ANOVA bidireccional de mediciones repetidas con corrección posthoc de Bonferroni. Los datos obtenidos a partir de los ensayos *in vitro* y las transferencias Western se sometieron a una prueba t no apareada o ANOVA unidireccional con la prueba de Tukey para comparación múltiple.

5

Secuencias de aminoácidos de Link4, Link13, AvoC humano (hu) y murino (mu)

Se determinaron las siguientes secuencias de aminoácidos para los derivados de IL-4 e IL-13:

10

huLink4 (SEQ ID NO 1):
Trp Asn Arg Ser Glu Ile Ile Lys Thr Gly Ser Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr

huLink13 (SEQ ID NO 2):
Leu Met Arg Ser Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gly Ser Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu
His Leu Lys Lys

15

huAvoC (SEQ ID NO 3):
Glu Ile Ile Lys Thr Gly Ser Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Ser Gly Ser Arg Ala Ala Thr Val
Leu Arg Gln Phe Tyr Ser

20

muLink4 (SEQ ID NO 4):
Arg Ala Arg Ser Glu Ile Ile Gly Ile Gly Ser Lys Ser Ile Met Gln

muLink13 (SEQ ID NO 5):
Leu Ile Arg Ser Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gly Ser Phe Ile Thr Lys Leu Leu Ser Tyr
Thr Lys Gln

25

muAvoC (SEQ ID NO 6):
Glu Ile Ile Gly Ile Gly Pro Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg Cys Ser Gly Ser Arg Ala Ser Lys Val
Leu Arg Ile Phe Tyr Leu

Lista de secuencias:

30

<110> Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

<120> Nuevos compuestos peptídicos obtenidos a partir de IL-4-/IL-13 para el tratamiento o la prevención de enfermedades neurodegenerativas o neuroinflamatorias

35

<130> LINK4

<160> 6

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

45

<400> 1

Trp Asn Arg Ser Glu Ile Ile Lys Thr Gly Ser Lys Thr Ile Met Arg
1 5 10 15

Glu Lys Tyr

ES 2 971 898 T3

<210> 2
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

Leu Met Arg Ser Glu Leu Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gly Ser
1 5 10 15

Phe Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys

10

20 25

<210> 3
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400> 3

Glu Ile Ile Lys Thr Gly Ser Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ser Arg Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser

20

20 25

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

25

<400> 4

Arg Ala Arg Ser Glu Ile Ile Gly Ile Gly Ser Lys Ser Ile Met Gln
1 5 10 15

30

Met Asp Tyr

<210> 5
<211> 27
<212> PRT
<213> Mus musculus

35

<400> 5

40

Leu Ile Arg Ser Glu Leu Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gly Ser
1 5 10 15

Phe Ile Thr Lys Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln

45

20 25

<210> 6
<211> 29
<212> PRT
<213> Mus musculus

50

<400> 6

ES 2 971 898 T3

Glu Ile Ile Gly Ile Gly Pro Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg Cys Ser

1 5 10 15

Gly Ser Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe Tyr Leu

20 25

5

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que consiste en uno o varios péptidos que presentan la siguiente estructura general

5

A - L1 - B - L2 - C

en donde

10 A se corresponde con una primera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αA o αC de IL-4 o IL-13 humana,
B se corresponde con una segunda secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αA o αC de IL-4 o IL-13 humana,
15 C se corresponde con una tercera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αD o αB de IL-4 humana, o de la región alfa helicoidal αD de IL-13 humana,
L1 y L2 se corresponden con 1 a 10 aminoácidos enlazadores,

en donde

20 A se corresponde con los aminoácidos WNR,
B se corresponde con los aminoácidos EIIKT,
C se corresponde con los aminoácidos KTIMREKY
o
A se corresponde con los aminoácidos LMR,
25 B se corresponde con los aminoácidos ELIEELVNIT,
C se corresponde con los aminoácidos FVKDLLLHLKK
o
A se corresponde con los aminoácidos EIIKT,
30 B se corresponde con los aminoácidos RLDRNLWG,
C se corresponde con los aminoácidos RAATVLRQFYS,

en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales y no tiene efectos secundarios sobre linfocitos o macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea.

2. Un compuesto que consiste en uno o varios péptidos que presentan la siguiente estructura general

35

A - L1 - B - L2 - C

en donde

40

A se corresponde con una primera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αA o αC de IL-4 o IL-13 animal,
B se corresponde con una segunda secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αA o αC de IL-4 o IL-13 animal,
45 C se corresponde con una tercera secuencia de aminoácidos que se obtiene a partir de la región alfa helicoidal
αD o αB de IL-4 animal, o de la región alfa helicoidal αD de IL-13 animal,
L1 y L2 se corresponden con 1 a 10 aminoácidos enlazadores,

en donde

50

A se corresponde con los aminoácidos RAR,
B se corresponde con los aminoácidos EIIGI,
C se corresponde con los aminoácidos KSIMQMDY
o
55 A se corresponde con los aminoácidos LIR,
B se corresponde con los aminoácidos ELIEELSNIT,
C se corresponde con los aminoácidos FITKLISYTKQ
o
A se corresponde con los aminoácidos EIIGI,
60 B se corresponde con los aminoácidos RLFRAFRC,
C se corresponde con los aminoácidos RASKVLRIFYL,

en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de axones neuronales y no tiene efectos secundarios sobre linfocitos o macrófagos obtenidos a partir de la médula ósea.

65

3. El compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que L1 y/o L2 se corresponden con S, GS, SGS, P, GP o PGP.
- 5 4. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido es un derivado de IL-4 humana que comprende una secuencia de aminoácidos WNRSEIIKTGSKTIMREKY (SEQ ID NO: 1) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 10 5. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido es un derivado de IL-13 humana que comprende una secuencia de aminoácidos LMRSELIEELVNITGSFVKDLLLHLKK (SEQ ID NO: 2) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 15 6. El compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido es un derivado de IL-4 humana que comprende una secuencia de aminoácidos EIIKTGSRLDRNLWGSGSRAATVLRQFYS (SEQ ID NO: 3) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 20 7. El compuesto según la reivindicación 2, en el que el péptido es un derivado de IL-4 murina que comprende una secuencia de aminoácidos RARSEIGIGSKSIMQMDY (SEQ ID NO: 4) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 25 8. El compuesto según la reivindicación 2, en el que el péptido es un derivado de IL-13 murina que comprende una secuencia de aminoácidos LIRSELIEELSNITGSFITKLLSYTKQ (SEQ ID NO: 5) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 30 9. El compuesto según la reivindicación 2, en el que el péptido es un derivado de IL-4 murina que comprende una secuencia de aminoácidos EIIGIPRLFRFRCSGRASKVLRIFYL (SEQ ID NO: 6) o una variante de la misma que tiene un aminoácido diferente en una posición, en donde dicho péptido es capaz de estimular el crecimiento de los axones neuronales.
- 35 10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y un portador, vehículo o agente farmacéuticamente adecuado.
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neuroinflamatorio o neurodegenerativo.
- 40 12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento o la prevención de neuropatías o lesiones traumáticas del sistema nervioso.

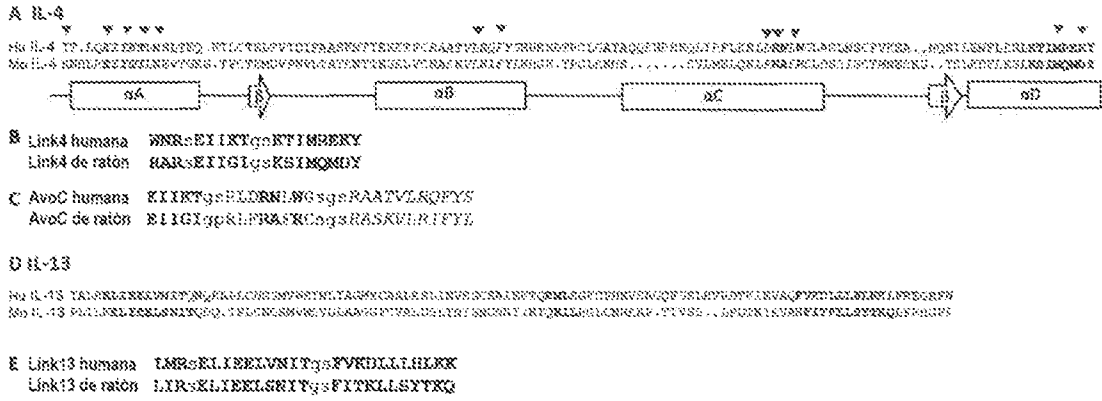


Fig. 1

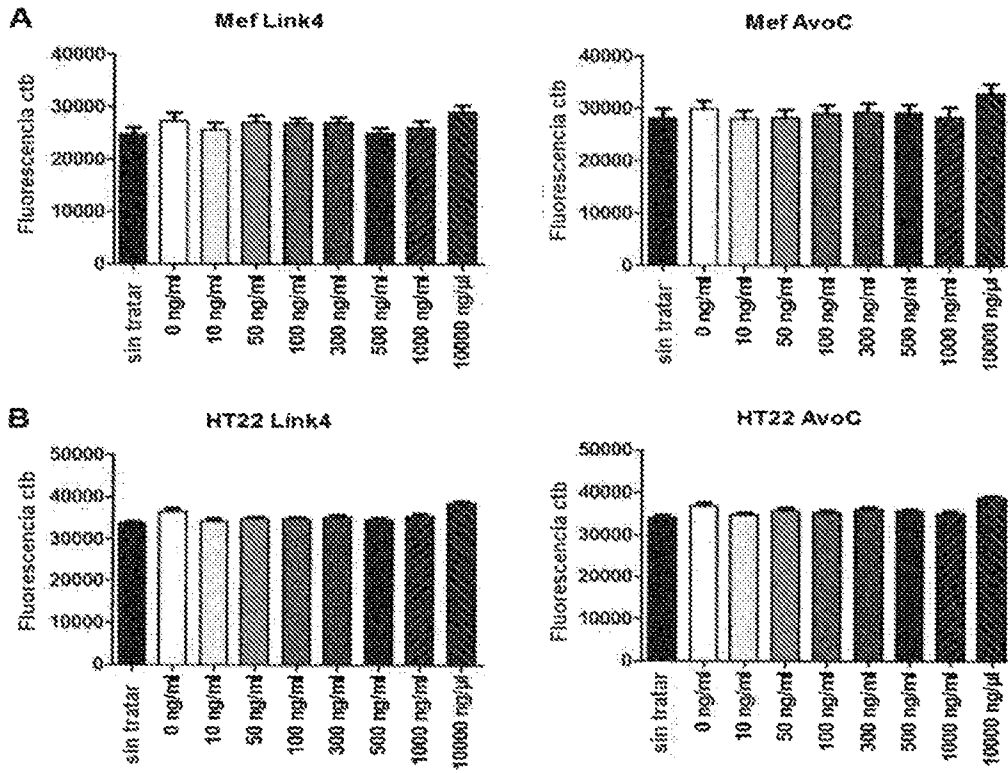


Fig. 2

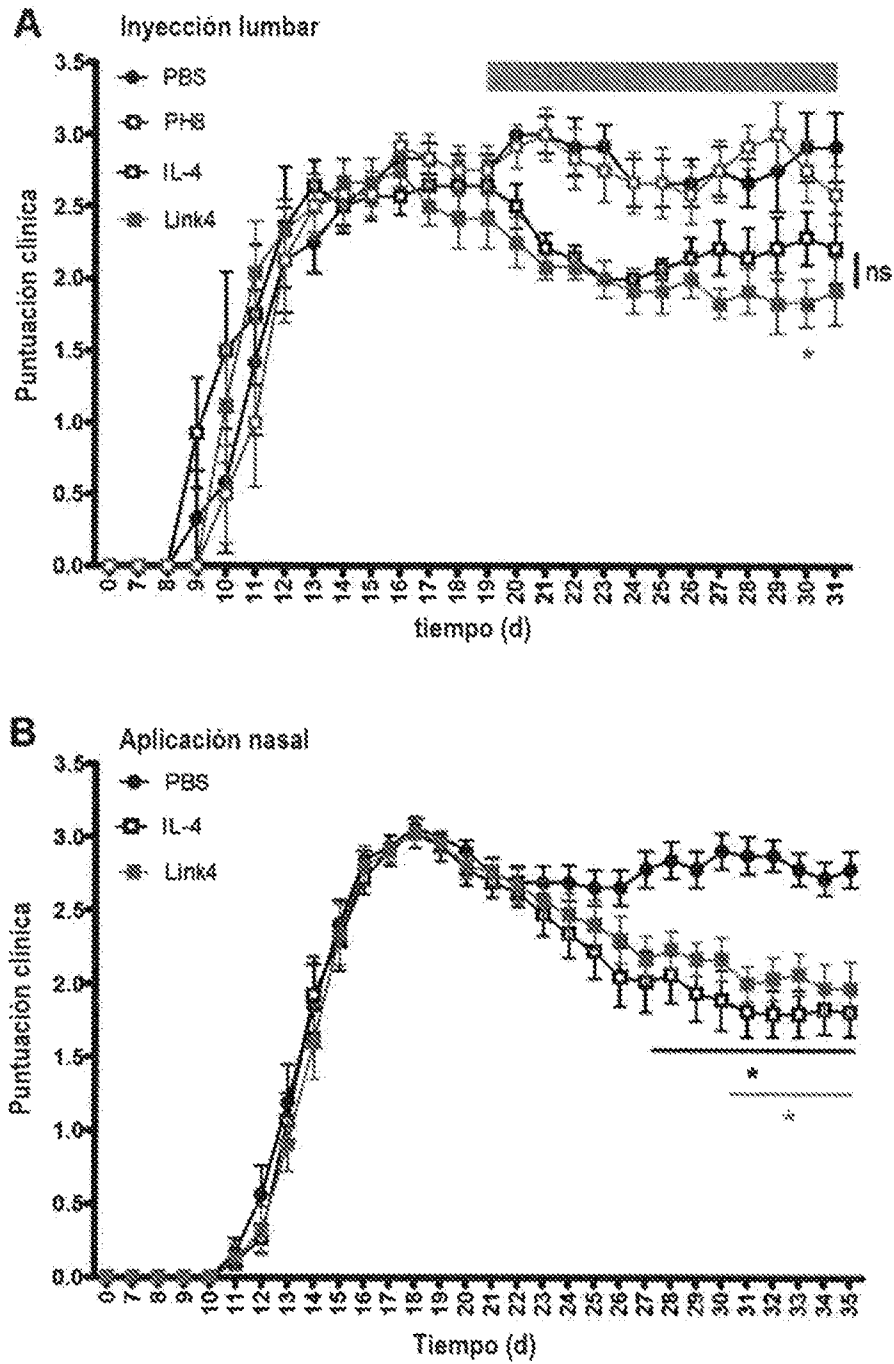


Fig. 3

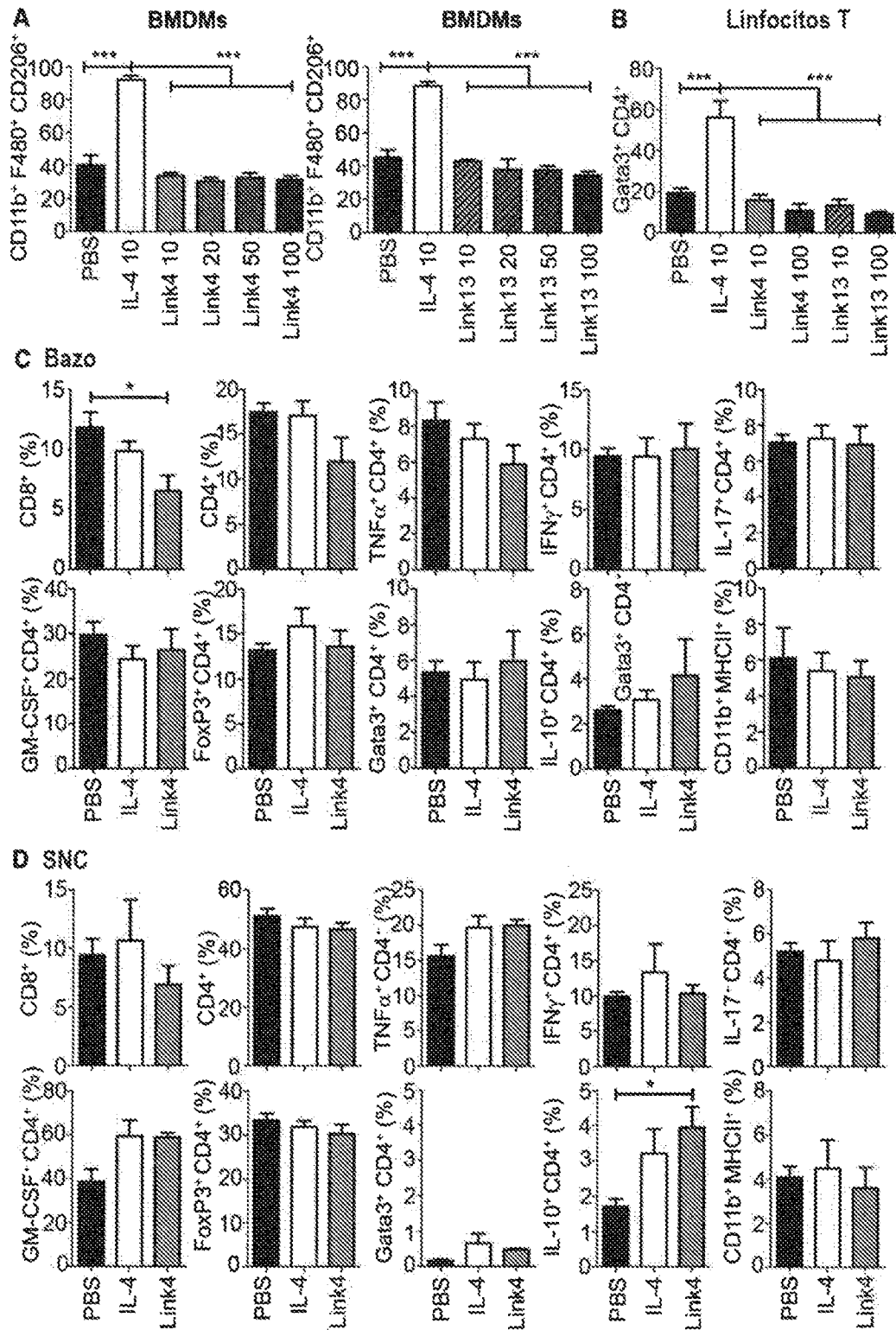


Fig. 4

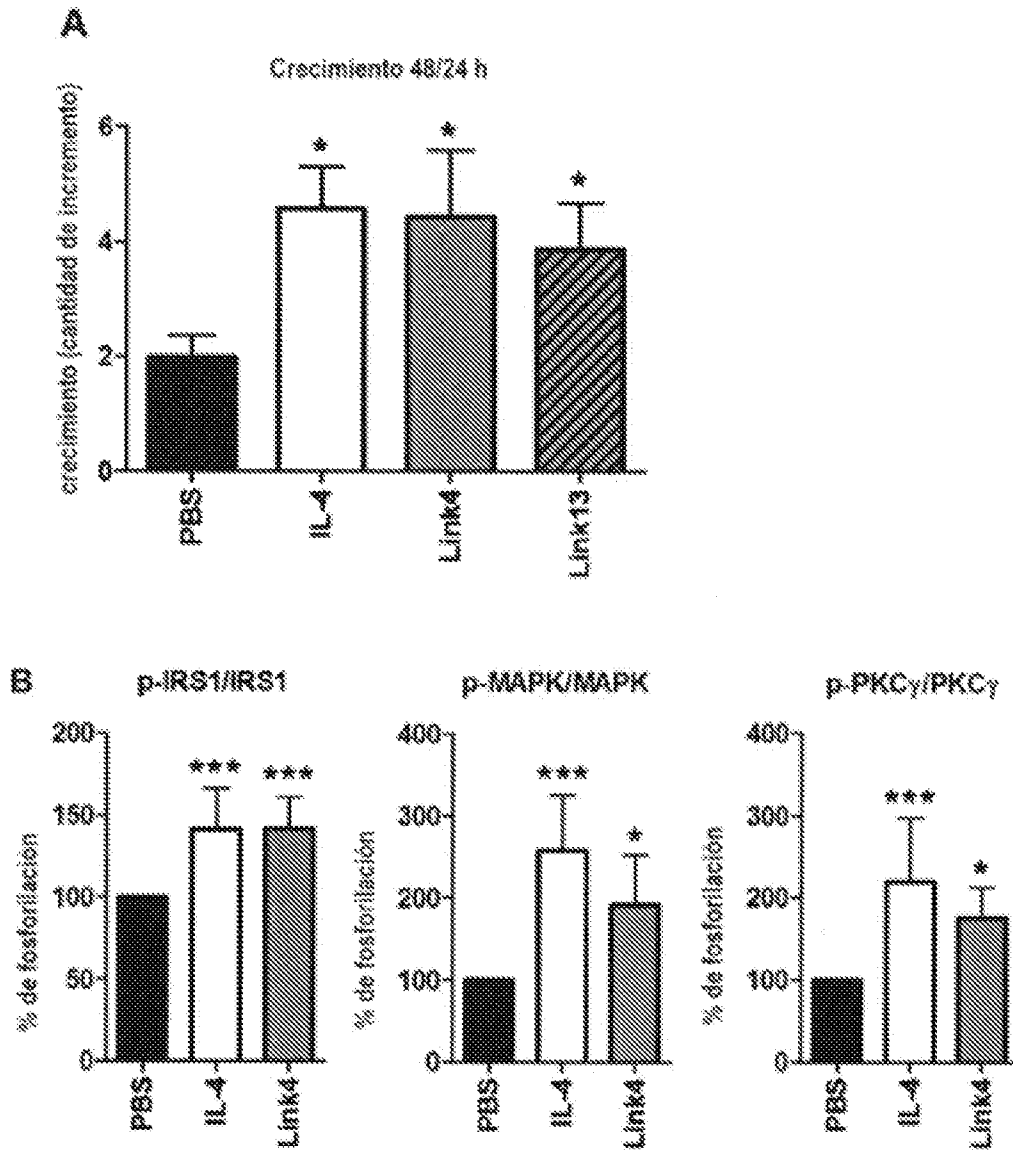


Fig. 5