

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 356 540**

21 Número de solicitud: 200930661

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **07.09.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.04.2011

71 Solicitante/s: **Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración (FUNHPAIIN)**
Finca La Peraleda, s/n
45071 Toledo, ES

72 Inventor/es: **Castro Soubriet, Fernando de; Arenzana Sanagérico, Francisco Javier; Clemente López, Diego y Ortega Muñoz, María Cristina**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método para predecir las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central.**

57 Resumen:

Método para predecir las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central.

La invención se refiere al uso de la proteína FGF-2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central (SNC) mediante la detección de la cantidad de dicha proteína en una muestra de fluido biológico aislado. Además, la presente invención se refiere a un método para conocer las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC y a un kit para llevar a cabo dicho método. Preferiblemente, la enfermedad desmielinizante del SNC es la esclerosis múltiple, y el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo (LCR).

ES 2 356 540 A1

DESCRIPCIÓN

Método para predecir las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere al uso de la proteína FGF-2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central (SNC) mediante la detección de la cantidad de dicha proteína en una muestra de fluido biológico aislado. Además, la presente invención se refiere a un método para conocer las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC a un kit para llevar a cabo dicho método. Preferiblemente, la enfermedad desmielinizante del SNC es la esclerosis múltiple, y el fluido biológico es líquido cefalorraquídeo (LCR).

Estado de la técnica anterior

Las enfermedades desmielinizantes son un grave problema clínico y social. Se trata de un conjunto de enfermedades neurológicas en las que, por diversas causas, se daña la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas, que actúa protegiendo y facilitando la conducción del impulso nervioso. La más importante de estas enfermedades es la esclerosis múltiple.

En muchos casos, la esclerosis múltiple comienza como una enfermedad que cursa con brotes (o fases agudas) en los cuales se experimentan las alteraciones neurológicas típicas de esta enfermedad. Cada brote se sigue de una fase de remisión tras la que el paciente puede quedar, o no, con secuelas que producen distinto grado de afectación. En la mayor parte de los casos, tras una fase de la esclerosis múltiple en brotes, la enfermedad deriva hacia una forma secundaria progresiva en el que el paciente experimenta los déficits neurológicos de manera continuada, aumenta la discapacidad de manera continua y progresiva (cfr. Confavreux y cols., N. Eng. J. Med. 2000, vol. 343, pp. 1430-1438).

En el caso de la esclerosis múltiple, los oligodendrocitos, células productoras de la mielina en el SNC, mueren en las zonas de lesión, también conocidas como placas de desmielinización. Los oligodendrocitos se originan durante el desarrollo pre- y postnatal a partir de precursores oligodendrogiales, células que también existen en el cerebro adulto de todos los mamíferos. En respuesta a una lesión, los precursores de oligodendrocitos se movilizan hacia la zona del cerebro lesionada, aunque, dependiendo de la fase de evolución de la lesión pueden entrar dentro de la misma y reparar las vainas de mielina o no (cfr. Wolswijk, J. Neurosci. 1998, vol. 18, pp. 601-609; Chang y cols., J. Neurosci. 2000, vol. 20, pp. 6404-6412; Chang y cols., N. Engl. J. Med. 2002, vol. 346, pp. 165-173; Reynolds y cols., J. Neurocytol. 2002, vol. 31, pp. 523-536; Chandran y cols., Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2008, vol. 363, pp. 171-183).

En los últimos años, las terapias existentes para paliar (que no curar) la esclerosis múltiple, tratan de rebajar el nivel de inflamación existente en el SNC, pero no están encaminadas a la movilización de los precursores de oligodendrocitos hacia el área a reparar. Por ello, la terapia celular, bien con células madre, con células mesenquimales o con los propios precursores de oligodendrocitos, es un futuro esperanzador para el tratamiento de la esclerosis múltiple. Por tanto, es muy importante conocer en cada paciente de esclerosis múltiple el balance entre las lesiones en las que la remielinización es posible y aquellas en que no lo es a la hora de elegir el tipo de tratamiento (mitigador de los efectos inflamatorios versus terapia celular reparadora).

Las lesiones desmielinizantes que se observan en el SNC de un paciente de esclerosis múltiple se pueden clasificar histopatológicamente en tres tipos atendiendo a la distribución de las células destructoras de la mielina (linfocitos, macrófagos y microglía) y con el grado de destrucción de la mielina (cfr. Trapp y cols., J. Neuroimmunol., 1999, vol. 98, pp. 49-56; Benito y cols., J. Neurosci., 2007, vol. 27, pp. 2396-2402):

1.- *Lesiones activas*: lesiones en las que la desmielinización puede ser completa o incompleta y cuyo interior está lleno de células destructoras de la mielina, distribuidas de manera homogénea por toda el área de lesión. En estas lesiones, la remielinización es posible, presentan precursores de oligodendrocitos en su interior (pueden, por tanto, entrar) y son consideradas desde un punto de vista cronológico como las primeras en aparecer.

2.- *Lesiones crónicas*: lesiones en las que la desmielinización es completa, cuyo interior está desprovisto de células destructoras de la mielina, las cuales se acumulan en la periferia del área de lesión. En estas lesiones la remielinización (reparación de la vaina de mielina) es muy poco probable, no presentan precursores de oligodendrocitos en su interior (no entran o, si han entrado, han muerto) y son consideradas el siguiente paso a las lesiones activas.

3.- *Lesiones inactivas*: lesiones en las que la desmielinización es total y las células destructoras de mielina ya no están presentes ni en el interior ni en la periferia de la lesión. En estas lesiones la remielinización no es factible, careciendo también de precursores de oligodendrocitos en su interior y se consideran el paso final para una lesión desmielinizante.

Debido a que el ambiente inflamatorio de la esclerosis múltiple es continuo durante toda la enfermedad, a la hora de realizar una terapia celular, las posibilidades de éxito serán mayores en aquellos pacientes cuyas lesiones sean exclusivamente de tipo ACTIVO (y por tanto, susceptibles de reparación). Sin embargo, la única prueba fiable del

tipo de lesión que está presente en el SNC de un paciente de esclerosis múltiple es el análisis histopatológico. Por razones evidentes, es el método más invasivo y en la práctica totalidad de los casos es factible (y por tanto útil) sólo *post mortem*. La imagen obtenida mediante resonancia magnética nuclear, aun siendo hasta la fecha el método existente menos invasivo y más sensible, no permite concretar el tipo de lesiones que presenta un paciente de esclerosis múltiple, el estado de desarrollo en el que se encuentra o su posible evolución, no sólo en la sustancia blanca (donde se encuentran la gran mayoría de las vainas de mielina) sino también en la sustancia gris, donde podría desencadenarse daño en las propias neuronas (Brex y cols., N. Eng. J. Med. 2002, vol. 346, pp. 158-164; Sepulcre y cols., Arch. Neurol., 2009, vol. 66, pp. 173-179; Weiner, Ann. Neurol., 2009, vol. 65, pp. 239-248). Aunque el anteriormente citado trabajo de Sepulcre y cols. (Sepulcre y cols., Arch. Neurol., 2009, vol. 66, pp. 173-179) es un paso importante en el establecimiento de una relación causal entre la presencia de lesiones en la sustancia blanca y la atrofia de la sustancia gris en pacientes con esclerosis múltiple, en el editorial firmado por Reichert y cols. (Reichert y cols., Arch. Neurol., 2009, vol. 66, pp. 159-160) y aparecido en el mismo volumen de *Archives of Neurology* en el que se analizan dichas relaciones, se dice claramente como conclusión que “hasta que no se consiga mediante resonancia magnética nuclear medidas más sensibles de las lesiones cerebrales, el interesante trabajo de Sepulcre y cols. deberá ser corroborado mediante el análisis de tejido *post-mortem* de cerebros de pacientes con esclerosis múltiple”. Por ello, es necesario encontrar, mediante el uso de técnicas no invasivas, bio-marcadores (presentes en el LCR o el suero de los pacientes de esclerosis múltiple) que nos sirvan para determinar el tipo de lesiones presentes en el SNC, el tipo de tratamiento más eficiente a realizar para la reparación de dichas lesiones (incluyendo el diseño de ensayos clínicos) o la posible evolución de la enfermedad, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris.

Descripción de la invención

Los autores de esta invención proporcionan una nueva herramienta que permite conocer a través de los niveles de FGF-2 en el LCR del paciente, el grado en el que se encuentran sus lesiones cerebrales, el ambiente favorecedor o inhibidor de la migración de los precursores de oligodendrocitos, células reparadoras de la vaina de mielina, el pronóstico de la posible evolución de la enfermedad hacia el daño neuronal en la sustancia gris, así como la asignación de un tratamiento u otro para las mismas (incluyendo el diseño de ensayos clínicos).

La presente invención proporciona, por tanto, una herramienta no invasiva de catalogación histopatológica de las lesiones presentes en la sustancia blanca de los pacientes de esclerosis múltiple únicamente analizando el nivel de FGF- 2 en el LCR.

Según se demuestra en los ejemplos de la presente invención, los niveles en el LCR de la molécula FGF-2 reflejan el tipo o tipos de lesiones del SNC de un paciente de esclerosis múltiple, sin necesidad de pruebas invasivas ni errores de diagnóstico, con el mismo nivel de certeza que si se realizara una biopsia, única prueba fiable del grado de afectación en el que se encuentra el SNC de cualquier paciente neurológico, incluidos los pacientes con esclerosis múltiple. Los pacientes de esclerosis múltiple que poseen niveles de FGF-2 similares a los presentes en los individuos control, presentan, únicamente, lesiones pequeñas y numerosas del denominado tipo ACTIVO. Sin embargo, aquellos pacientes que presentan un nivel de FGF-2 en el LCR significativamente superior al nivel presente en los individuos control (al menos, del doble -2 veces mayor-), presentan en su sustancia blanca grandes lesiones de tipo CRÓNICO o INACTIVO, en número menor que en los casos anteriores, pero de mayor volumen.

Además, en la presente invención se demuestra que los niveles en LCR de FGF-2 reflejan el estado del ambiente molecular favorecedor o inhibidor de la llegada de las células reparadoras de la vaina de mielina a la lesión desmielinizante dentro de la sustancia blanca.

En aquellos pacientes con niveles de FGF-2 en el LCR similares a los encontrados en los pacientes control, las lesiones ACTIVAS nunca van asociadas a la presencia de la molécula motogénica y quimioatrayente de los precursores de oligodendrocitos, FGF-2, ni de su receptor, FGFR1, en los alrededores de la placa de desmielinización, ni la presencia en su interior de moléculas que impidan la migración de los mismos, como la Anosmina-1, indicando claramente que en dichas lesiones se dan las circunstancias adecuadas para una posible remielinización y, por tanto, la reparación de las mismas. En el caso de aquellos pacientes de esclerosis múltiple que poseen un nivel de FGF-2 en su LCR al menos 2 veces superior al presente en condiciones de no desmielinización, sus lesiones CRÓNICAS y/o INACTIVAS presentan histopatológicamente tanto FGF-2 como su receptor FGFR1 alrededor de las mismas; el FGF-2 actúa como molécula motogénica y quimioatrayente, en un intento de atraer los precursores de oligodendrocitos hacia la zona a reparar. Sin embargo, las lesiones CRÓNICAS y/o INACTIVAS que presentan los pacientes de esclerosis múltiple con estos niveles de FGF-2 en su LCR, muestran una elevada presencia de Anosmina-1 en su interior, lo que es perjudicial para la migración de los precursores de oligodendrocitos, células reparadoras de la lesión, por lo que se produce el fallo en la entrada de los mismos y por tanto, la reparación de la vaina de mielina no se lleva a cabo.

Por otra parte, la medida del nivel de FGF-2 en el LCR de pacientes de esclerosis múltiple refleja alteraciones en la sustancia gris, tanto a nivel celular como del estado de la barrera hematoencefálica de la sustancia gris, por lo que sirve de pronóstico a la aparición de daños en las neuronas.

En aquellos pacientes de esclerosis múltiple en que el nivel de FGF-2 en el LCR sea similar al de los individuos sin lesiones desmielinizantes, su sustancia gris no presentan FGF-2 ni alteraciones aparentes de su barrera hematoencefálica, lo que supone un menor riesgo para lo cuerpos neuronales. Por el contrario, los pacientes con niveles de FGF-2 en el LCR significativamente más elevados (al menos 2 veces mayor) que en los casos de no desmielinización, presentan

ES 2 356 540 A1

astrocitos perivasculares productores de FGF-2, y que también expresan su receptor FGFR1, en lugares en los que la barrera hematoencefálica se ve comprometida, en un intento por recomponerla. Este daño en la barrera hematoencefálica da lugar, en etapas siguientes de la enfermedad, a lesiones en los cuerpos neuronales en dichas zonas. Esto puede ser causa de daños motores más severos o incluso de alteraciones en las funciones cognitivas de la persona.

Por tanto, la medida de los niveles de FGF-2 en LCR sirve como bioindicador del nivel de afectación histopatológica, de la susceptibilidad a su reparación mediante el empleo de precursores de oligodendrocitos, así como de la afectación de la sustancia gris.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína FGF-2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC mediante la detección de la cantidad de dicha proteína en una muestra de fluido biológico aislado.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para obtener datos útiles para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del SNC (de ahora en adelante, método primero de la invención) que comprende los siguientes pasos:

- a) obtener una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto,
- b) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en la muestra biológica del paso (a), y
- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del SNC (de ahora en adelante, método segundo de la invención) que comprende los siguientes pasos:

- a) obtener una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto,
- b) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en la muestra biológica del paso (a),
- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia, e
- d) predecir la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o de la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris en el sujeto.

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos primero o segundo de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c). Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante estos métodos.

El término “predecir”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de clasificar las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC según sus características histopatológicas como, por ejemplo, el tipo de lesiones presentes en la sustancia blanca o la existencia de alteraciones en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de la proteína FGF-2 y en la comparación de dicha cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0.1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término “sustancia blanca”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la parte del SNC y, más preferiblemente, del cerebro, compuesta principalmente de fibras nerviosas mielinizadas. El término “sustancia gris”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la parte del SNC y, más preferiblemente, del cerebro, compuesta principalmente por las dendritas y cuerpos neuronales, que no poseen mielina.

La proteína factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), también conocida factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), está codificada por un gen *FGF-2*, perteneciente a la familia de factores de crecimiento fibroblástico. Ha sido implicada en diversos procesos biológicos como el desarrollo del SNC, la reparación de heridas y el crecimiento tumoral.

ES 2 356 540 A1

El término “proteína FGF-2”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquiera de las proteínas resultantes de la expresión del gen *FGF-2* humano (*GenID*: 2247). La secuencia de aminoácidos prototípica de la proteína FGF-2 es SEQ ID NO: 1 (NP_001997.5). Por tanto, el término “proteína FGF-2” también se refiere a la proteína cuya secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 1, a una variante de la misma o a un fragmento de los anteriores, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína FGF-2. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína FGF-2” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta descripción, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término “fragmento”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína FGF-2 o de una sus variantes.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que la variante o el fragmento en cuestión mantienen esencialmente las propiedades inmunológicas descritas en este documento. Dichas propiedades inmunológicas se pueden determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

La expresión “detección de la cantidad de la proteína FGF-2” en una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de la proteína FGF-2, basada en una señal que se obtiene directamente de la proteína, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de la proteína, presente en la muestra. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de la proteína FGF-2. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de la proteína, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con las mismas o que pueda derivarse de éstas. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de la proteína, obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de la proteína FGF-2 de la muestra biológica obtenida en el paso (a) de los métodos primero o segundo de la invención con una cantidad de la proteína FGF-2 de referencia. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad del producto de expresión que permite clasificar las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC según la presencia o ausencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o según la existencia o no de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris.

Dicha cantidad de referencia puede ser calculada mediante métodos estadísticos conocidos en el estado de la técnica a partir de una población de sujetos para los cuáles se conoce la cantidad de expresión de FGF-2 presente en su LCR y las características histopatológicas de las lesiones presentes en su sustancia blanca y/o sustancia gris. La detección de la cantidad de expresión de FGF-2 presente en el LCR y el análisis de las características histopatológicas de las lesiones presentes en su sustancia blanca y/o sustancia gris de esta población de sujetos puede realizarse mediante cualquier procedimiento descrito en el estado de la técnica, como por ejemplo, pero sin limitarnos, los descritos en los ejemplos de la presente descripción.

ES 2 356 540 A1

Preferiblemente, dicha cantidad de referencia define una cantidad umbral. Las cantidades de referencia o umbrales adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad umbral puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control.

En una realización preferida, en el paso (d) del método segundo de la invención una cantidad de la proteína FGF-2 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de al menos una lesión CRÓNICA o INACTIVA en la sustancia blanca y/o la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris. En una realización preferida, la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es 200 pg/ml.

En una realización preferida, la detección de la cantidad de la proteína FGF-2 se realiza mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o *microarrays* de proteína.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína FGF-2. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')₂ que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítomos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína FGF-2 y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. Anticuerpos que reconocen a la proteína FGF-2 son conocidos en el estado de la técnica, como los que se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente descripción.

En una realización preferida, el inmunoensayo es un *immunoblot* o *Western blot*. Para llevar a cabo un *immunoblot*, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína FGF-2.

La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. Algunas variaciones de esta técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional (2D-PAGE). La electroforesis puede llevarse a cabo en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, y antes de la detección, las proteínas se transfieren a un soporte o a una membrana, por ejemplo, pero sin limitarse, PDVF, nitrocelulosa o acetato de celulosa. Esta membrana se hibrida con un anticuerpo específico (también llamado anticuerpo primario) que reconoce a la proteína FGF-2. A continuación, la membrana se hibrida con un anticuerpo (también llamado anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína FGF-2 el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Una vez detectada la proteína, se puede determinar su tamaño molecular relativo, comparando su migración con la migración de una proteína control que se detecte de forma simultánea, preferiblemente en el mismo soporte, que tiene un tamaño conocido.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador.

Existen diferentes tipos de ELISA. En el ELISA directo o ensayo ELISA simple de dos capas, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo que reconoce a la proteína FGF-2, conjugada o unida a

ES 2 356 540 A1

un compuesto marcador. En el ELISA indirecto, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo primario, que reconoce a la proteína FGF-2 y, a continuación, un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo primario, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA *sándwich* o ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo que reconoce y se une a la proteína FGF-2, se aplica la muestra biológica problema, de manera que la proteína FGF-2 será retenida en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo, y después se le aplica un segundo anticuerpo que reconoce a la proteína FGF-2, conjugado o unido a un compuesto marcador.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un *microarray* de proteínas consiste en una colección de proteínas inmovilizadas sobre un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. Existen varios factores importantes a tener en cuenta en el diseño de *microarrays* de proteínas, como son, por ejemplo, la naturaleza del soporte sobre el cual inmovilizar, la técnica de inmovilización de las proteínas, el formato del *microarray*, el agente de captura empleado o el método de detección a emplear. Son conocidos en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que pueden ser empleados para la realización de este aspecto preferido de los métodos primero o segundo de la invención.

Tal y como se utiliza en la presente descripción los términos “muestra de fluido biológico aislado” o, simplemente, “muestra biológica”, tal y como se utilizan en la presente descripción se refieren a un fluido biológico de un sujeto, obtenido mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. En una realización preferida, la muestra de fluido biológico aislado se selecciona de la lista que comprende: LCR, sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo. En una realización más preferida, la muestra de fluido biológico aislado es LCR.

El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. Preferiblemente, este término se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado de una enfermedad desmielinizante del SNC.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, la expresión “enfermedad desmielinizante del SNC” se refiere a una enfermedad caracterizada por la pérdida o la disfunción de la mielina en el SNC.

En una realización preferida, la enfermedad desmielinizante del SNC se selecciona de la lista que comprende: esclerosis múltiple, neuromielitis óptica de Devic, encefalitis diseminada aguda, mielitis transversa aguda, leucoencefalitis hemorrágica aguda o subaguda, desmielinización diseminada aguda, esclerosis difusa, desmielinización central del cuerpo calloso, mielínolisis central pontica, mielitis necrotizante subaguda, esclerosis concéntrica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, enfermedad de Krabbe o síndrome de Zellweger.

La esclerosis múltiple es la enfermedad desmielinizante del SNC más frecuente. Los hallazgos patológicos incluyen múltiples áreas bien definidas de desmielinización de toda la sustancia blanca del SNC. Las manifestaciones clínicas incluyen pérdida de visión, movimientos extraoculares anómalos, parestesias, pérdida de sensibilidad, debilidad, disartria, espasticidad, ataxia y disfunción de la vejiga. En una realización más preferida, la enfermedad desmielinizante del SNC es la esclerosis múltiple, en cualquiera de sus variantes clínicas.

Las variantes clínicas de la enfermedad más comunes son: Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente, Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva, Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva y Esclerosis Múltiple Progresiva Recidivante.

La Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente es la variante clínica más común de la Esclerosis Múltiple, caracterizada por brotes o exacerbaciones agudas y recurrentes de disfunción neurológica seguidas por recuperaciones parciales o completas. Las manifestaciones clínicas comunes incluyen pérdida de la función visual, motora, sensorial o de la vejiga. Pueden ocurrir episodios agudos de desmielinización en cualquier sitio del SNC, que afectan comúnmente a los nervios ópticos, la médula espinal, el cerebro, el tronco cerebral y el cerebelo.

La Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva es la evolución clínica habitual de la Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente; cursa con la disminución del número de brotes y la progresión de la discapacidad.

La Esclerosis Múltiple Primaria Progresiva se caracteriza por una progresión gradual de la incapacidad desde el comienzo; los pacientes no experimentan recaídas, sino un deterioro funcional constante desde que comienza la enfermedad.

Finalmente, la Esclerosis Múltiple Progresiva Recidivante, mucho menos frecuente que las anteriores, comienza con un curso primario progresivo, sobre el cual se sobreponen brotes.

En una realización aún más preferida, la enfermedad desmielinizante del SNC es la esclerosis múltiple en su variante clínica primaria progresiva o secundaria progresiva.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de la proteína FGF-2. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro

ES 2 356 540 A1

compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{33}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

5 La presente invención también se refiere a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos primero o segundo de la invención.

10 Por tanto, un cuarto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit para obtener datos útiles para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del SNC que comprende los elementos necesarios para:

- a) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto, y
- 15 b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

20 Un quinto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del SNC que comprende los elementos necesarios para:

- a) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto,
- b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia, e
- 25 c) predecir la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o de la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris en el sujeto.

30 Dichos kits pueden contener todos aquellos reactivos necesarios para la cantidad de la proteína FGF-2 por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, anticuerpos específicos de la proteína FGF-2, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

Los métodos y kits descritos en la presente invención permiten clasificar las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC según la presencia o ausencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca. Los métodos y kits descritos en la presente invención son, por tanto, útiles para seleccionar el tipo de tratamiento que se pueda realizar en un paciente con esta enfermedad (incluyendo ensayos clínicos), ya que niveles elevados de esta molécula en el LCR indican un mayor grado de afectación y, por tanto, la imposibilidad de remielinización, incluso mediante la utilización de terapias celulares reparadoras basadas en el empleo de trasplante con precursores de oligodendrocitos (u otros tipos celulares), sean de la procedencia que sean (autotrasplante, donantes, etc). Sin embargo, niveles de FGF-2 similares a los encontrados en condiciones de no desmielinización indican que las lesiones presentes en el SNC de dichos pacientes son susceptibles de regeneración, y, por tanto, se pueden emplear en ellos terapias celulares que ayuden a dicha reparación mediante el empleo de trasplantes de precursores de oligodendrocitos (así como otros tipos de células) del mismo individuo o de un donante.

Los métodos y kits descritos en la presente invención permiten clasificar las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del SNC según la existencia o no de alteraciones en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris. Los métodos y kits descritos en la presente invención son, por tanto, útiles para pronosticar la evolución de un paciente con una enfermedad desmielinizante hacia un posible daño a las neuronas, lo que ocurriría en el caso de encontrarse en su LCR el nivel de FGF-2 significativamente superior al encontrado en condiciones de no desmielinización. Por tanto, esta medida a nivel del LCR del paciente sirve de base para la utilización de otras terapias (incluidos nuevos diseños de ensayos clínicos) que conduzcan a la neuroprotección, no sólo a la neuroreparación, es decir, orientadas hacia la protección de las neuronas más que hacia la reparación de las vainas de mielina que envuelven sus axones.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

65 Descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra cómo la comparación del nivel de FGF-2 en el LCR de un paciente de esclerosis múltiple con respecto al nivel de los pacientes control refleja a nivel histopatológico el tipo de placas de desmielinización que

presenta en su sustancia blanca. A: Niveles medios de FGF-e en el LCR de pacientes control y con esclerosis múltiple. “**” es $P < 0,01$ (test de la t de Student o test Mann-Whitney para muestras no paramétricas). B: Correlación existente entre el nivel de FGF-2 y el tipo de lesiones presentes en la sustancia blanca de pacientes con esclerosis múltiple. Correlación mostrada según test de correlación de Pearson. C-D: Doble mareaje inmunohistoquímico para HLA-DR (MHC-II) y tinción de mielina eriocromo cianina de un paciente control (C), con una lesión activa (D) y con una lesión inactiva (E). Por debajo, nivel de FGF-2 que presentó cada uno de dichos pacientes en su LCR.

La Figura 2 ilustra cómo la comparación del nivel de FGF-2 en el LCR de un paciente de esclerosis múltiple con respecto al nivel de los pacientes control refleja el ambiente molecular relacionado con la migración de los precursores de oligodendrocitos. A-B: Doble mareaje inmunohistoquímico para HLA-DR (A) o Anosmina-1 (B) y tinción de mielina eriocromo cianina (A y B) donde se muestra una lesión activa que no posee inmunomarcaje para Anosmina-1. C-D: Secciones adyacentes de un paciente con una lesión crónica donde se ve que la zona de lesión teñida con eriocromo cianina y HLA-DR (C) presenta por fuera inmunomarcaje para FGF-2 (D). E-F: Doble mareaje inmunohistoquímico para HLA-DR (MHC-II) y tinción de mielina eriocromo cianina (E) e inmunohistoquímico simple para Anosmina-1 de una lesión crónica en la que se muestra cómo la lesión desmielinizante aparece rellena con Anosmina-1. A la derecha de cada par de paneles se refleja el nivel de FGF-2 en el LCR de cada uno de los pacientes a los que hacen referencias dichas fotografías.

En la Figura 3 se muestra la relación entre la comparación del nivel de FGF-2 en el LCR de los pacientes de esclerosis múltiple con respecto al de los pacientes control y la presencia de alteraciones en la sustancia gris, tanto a nivel de expresión de FGF-2 como en la composición de la integridad de la barrera hematoencefálica. A-C: Inmunohistoquímica para FGF-2 en corteza cerebral de un paciente control (A) y uno con esclerosis múltiple (B-C) donde se aprecia un fuerte incremento del mareaje para FGF-2 en el paciente lesionado, correspondiente a células perivasculares. D-F: Doble inmunohistoquímica fluorescente para FGF-2 (D) y GFAP (E), así como la mezcla de ambas con una contratinción para núcleos (F) donde se demuestra la naturaleza astrocítica de dichas células. G-L: Doble inmunohistoquímica fluorescente donde se muestra mareaje para la proteína de barrera hematoencefálica ZO-1 (G, J), junto con FGF-2 (H, K) así como la mezcla de ambas junto con una contratinción de núcleos (I, L) en la sustancia gris de un paciente control (G-I) y uno con lesiones crónicas e inactivas en su sustancia blanca (J-L). Se aprecia cómo la alteración de la barrera hematoencefálica (J) se asocia a la aparición de astrocitos positivos para FGF-2 (K). En la parte inferior de la figura se muestra el nivel de FGF-2 en el LCR que mostró cada uno de los pacientes a los que se refieren las imágenes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

En este ejemplo, los inventores ponen de manifiesto cómo la medida del nivel de FGF-2 en el LCR de pacientes de esclerosis múltiple, se correlaciona con el tipo de lesiones encontradas histopatológicamente en la corteza cerebral de dichos pacientes.

Como fuente tanto de tejido, como de LCR, se utilizaron muestras de pacientes de diversas edades y con distintos tipos de esclerosis múltiple (Tabla 1), todas ellas procedentes del *UK Multiple Sclerosis Tissue Bank*, de Londres (Reino Unido).

TABLA 1

Resumen de los casos analizados para este estudio

Paciente	Edad/Sexo	Diagnóstico	TP	Número de placas	Tipo de lesión ¹		
					Activa	Crónica	Inactiva
CO08	93/M	Normal	9h				
CO41	54/V	Normal	20h				
MS94	42/M	PP	11h	4	1	2	1
MS115	75/M	SP	21h	0			
MS125	76/M	SP	13h	2		2	
MS149	82/M	SP	15h	4	1	2	1
MS218	56/M	SP	7h	9	9		
MS230	42/M	SP	31h	2	2		

CO: control; M: mujer; h: horas; MS: esclerosis múltiple; PP: primaria progresiva; SP: secundaria progresiva; TP: tiempo *post-mortem*; V: varón. ¹ Criterios de clasificación descritos en Benito y cols., J. Neurosci., 2007, vol. 27, pp. 2396-2402.

La clasificación de las lesiones se llevó a cabo mediante una doble tinción para HLA-DR (MHC-II) y la tinción histológica eriocromo cianina para mielina. Se obtuvieron secciones histológicas de 50 μ m de grosor empleando un microtomo de deslizamiento acoplado a una fuente de frío y se recogieron y almacenaron hasta su uso.

En primer lugar, una vez lavadas, las secciones se sumergieron en un medio que contenía tampón citrato (pH 6,0) a 90°C, durante 10 minutos. Posteriormente, se les inactivo la peroxidasa endógena mediante un pre-tratamiento de 20 minutos en tampón fosfato (0,1 M, pH 7,4), con un 10% de metanol y un 3% de H₂O₂. A continuación se pre-incubaron durante 1 hora en un medio que contenía tampón fosfato salino (pH 7,4), con un 5% (v/v) de suero normal de caballo y un 0,2% de Tritón X-100 (v/v), y posteriormente se incubaron en este mismo medio de pre-incubación con el anticuerpo anti-HLA-DR (1:200) durante toda la noche (a 4°C). Para el revelado de la inmunohistoquímica se empleó un anticuerpo secundario anti-ratón, seguido del método de detección ABC y el cromógeno DAB en presencia de H₂O₂, para la visualización de las células a las que se unió el anticuerpo primario.

A continuación, las secciones se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente y 2 horas más a 37°C, trascurridas las cuales, se sumergieron en acetona durante 5 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente 30 minutos. Las secciones se tiñeron durante una hora con eriocromo cianina y se lavaron posteriormente en agua corriente, tras lo que se llevó a cabo el proceso de diferenciación: i) alumbre de hierro al 5% (p/v) durante 5 minutos, ii) lavado en agua corriente y iii) borax-ferricianuro potásico al 1% (p/v) y 1,25% (p/v), respectivamente, durante 10 minutos, controlando el color al microscopio.

Los LCRs de los pacientes de esclerosis múltiple se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se analizaron mediante el empleo de un kit de ELISA específico para FGF-2 humano, con una límite de sensibilidad en los 2 pg/ml.

Un resumen de la presencia de inmunodetección de FGF-2 en tejido y LCR de pacientes de esclerosis múltiple está descrito en la Tabla 2. Los pacientes control no presentaron lesiones desmielinizantes (Figura 1A-C). Los pacientes con esclerosis múltiple cuyos niveles de FGF-2 fueron similares a los de los pacientes control mostraron, únicamente en su sustancia blanca, abundantes lesiones, redondeadas u ovaladas, perivasculares, completamente repletas de células positivas a MHC-II, clasificadas todas ellas como de tipo activo (Figura 1A-B,D).

TABLA 2

Correlación entre la presencia de FGF-2 en tejido y en LCR

Paciente	Tipo de lesión			Inmunorreactividad para FGF-2		
	Activa	Crónica	Inactiva	Astroцитos	Periplaca	LCR
CO08	-	-	-	+		136,62 ± 15,60
CO41	-	-	-	-		97,83 ± 13,66
MS094	√	√	√	+	+	933,86 ± 20,15
MS115	-	-	-	+	-	560,02 ± 14,42
MS125	-	√	-	+	+	679,91 ± 23,08
MS149	√	√	√	+	+	227,02 ± 3,81
MS218	√	-	-	-	-	117,92 ± 14,52
MS230	√	-	-	-	-	142,83 ± 11,22

Los pacientes cuyos niveles de FGF-2 en el LCR fueron muy superiores a los presentes en el LCR de los pacientes control, presentaron siempre alguna lesión de tipo CRÓNICO o INACTIVO, sin perjuicio de encontrar de ambas o incluso alguna de tipo activo (Figura 1A-B,E). Estas lesiones se caracterizaron por presentar células MHC-II positivas alrededor de la lesión, siendo escasas en su interior (lesiones crónicas), o completamente vacías de células positivas a MHC-II (lesiones inactivas). Estas lesiones fueron siempre de gran tamaño y se presentaron en escaso número por bloque de tejido. Además, la presencia de un tipo u otro de lesión fue independiente de la edad del paciente ($r = 0,0357$; $p = 0,939$), del tiempo *post-mortem* transcurrido ($r = -0,321$; $p = 0,483$), así como del tipo de esclerosis múltiple que presentaron (ver Tablas 1 y 2).

Ejemplo 2

En este ejemplo, los inventores ponen de manifiesto cómo la medida del nivel de FGF-2 en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple es un buen bioindicador del ambiente molecular encontrado en las lesiones de desmielinización de la sustancia blanca.

Para comprobar esto, se analizó mediante el mareaje inmunohistoquímico para FGF-2, FGFR1 o Anosmina-1 y la tinción de mielina eriocromo cianina en la misma sección o en secciones adyacentes pertenecientes al mismo bloque de tejido. El protocolo empleado para la inmunotinción fue el mismo que para el Ejemplo 1, pero con las siguientes variaciones. Para la inmunodetección de FGF-2 o FGFR1 en tejido se emplearon sendos anticuerpos policlonales hechos en cabra (1:250 v/v), seguidos de un anticuerpo policlonal anti-cabra hecho en caballo, biotinilado (1:200) y el kit de detección ABC. Para la inmunotinción de Anosmina-1, el anticuerpo utilizado fue policlonal hecho en conejo (1:500), al que se unió posteriormente un anticuerpo policlonal hecho en cabra (1:200) biotinilado. El proceso de inmunomarcaje fue similar y se reveló con DAB y H_2O_2 .

La detección de FGF-2 en el LCR de los pacientes control y de esclerosis múltiple fue realizada de la misma manera que para el Ejemplo 1.

Los pacientes control no presentaron inmunomarcaje para ninguna de los anticuerpo utilizados. Los pacientes con niveles de FGF-2 similar al control, no presentaron inmunomarcaje para FGF-2, FGFR1 o Anosmina-1 en el interior o alrededor de sus lesiones ACTIVAS (Figura 2A-B). Sin embargo, aquellos pacientes en los que el nivel de FGF-2 en el LCR fue significativamente superior al detectado en los pacientes control, presentaron alrededor de sus lesiones CRÓNICAS y/o INACTIVAS un fuerte inmunomarcaje tanto para FGF-2 como para FGFR1 (Figura 2C-D). Además, rellenando por completo las grandes lesiones CRÓNICAS y/o INACTIVAS presentes en cada paciente, se observó un fuerte inmunomarcaje para Anosmina-1 (Figura 2E,F). Las lesiones de tipo activo que se encontraron en el tejido de algunos de los pacientes con un nivel de FGF-2 elevado en el LCR no mostraron ninguna diferencia respecto a las observadas en los pacientes de esclerosis múltiple con niveles de FGF-2 en su LCR similares a los de los individuos control, lo que indica que la presencia de FGF-2, FGFR1 y Anosmina-1 es específico del tipo de lesión crónica o inactiva y no de la edad del sujeto, del tipo de esclerosis múltiple que presentaron así como del tiempo *post mortem* que transcurrió desde la muerte hasta la recolección de las muestras.

Ejemplo 3

En este ejemplo, los inventores ponen de manifiesto que la medida del nivel de FGF-2 en el LCR se correlaciona con alteraciones en la sustancia gris de los pacientes de esclerosis múltiple, independientemente de la presencia o no de lesiones desmielinizantes.

Se llevaron a cabo, además de la inmunotinción para FGF-2 y FGFR1 y la tinción de mielina eriocromo cianina, de manera similar a lo descrito en los Ejemplos 1 y 2, una doble inmunohistoquímica contra FGF-2 y la proteína presente en las zónulas ocluyentes que forman parte de la barrera hematoencefálica (ZO-1) o la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), marcador típico de astrocitos. La detección de GFAP se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal hecho en conejo al que posteriormente se unió un anticuerpo secundario policlonal contra conejo, hecho en burro, y que tenía unida una molécula fluorescente. Para la inmunodetección de FGF-2 y FGFR1 se siguió el mismo protocolo descrito en los Ejemplos 1 y 2, pero sin utilizar el revelado con DAB y H₂O₂, ampliando la señal mediante la técnica de la tiramida y, posteriormente, se añadió una molécula de estreptavidina unida a una molécula fluorescente de una longitud de onda de emisión diferente y alejada de la fluorescencia emitida para el caso de la GFAP. Esto permitió detectar células que emitían fluorescencia de uno o de ambos colores.

En el caso de la doble inmunohistoquímica contra FGF-2 y ZO-1, previo a la realización del protocolo descrito en el párrafo anterior, se realizó una preincubación (a 37°C, durante una hora) con 1 mg/ml (p/v) de proteinasa K y, posteriormente, en acetona (durante 30 minutos, a -18°C). Para la detección de ZO-1 se utilizó un anticuerpo policlonal hecho en conejo (1:100, v/v), al que se le unió al día siguiente un anticuerpo secundario similar al descrito para la GFAP.

La medición de FGF-2 en el LCR se realizó de la misma manera que para los dos ejemplos anteriores.

Los resultados mostraron que los pacientes control no presentaban inmunomarcaje para FGF-2 en su sustancia gris (Figura 3A), ni alteraciones en la barrera hematoencefálica marcada con el anticuerpo anti-ZO-1 (Figura 3G-I). Los pacientes de esclerosis múltiple cuyos niveles de FGF-2 en el LCR fueron similares a los de los sujetos control, tampoco mostraron alteraciones en el patrón de expresión de ninguno de los dos marcadores. Por el contrario, los pacientes de esclerosis múltiple con niveles de FGF-2 en su LCR mucho más altos que los de los sujetos control, presentaron células positivas a FGF-2 y a FGFR1 alrededor de los vasos de la sustancia gris (Figura 3B-C), que fueron identificadas como astrocitos perivasculares mediante la doble inmunohistoquímica contra GFAP (Figura 3D-F). Es más, estas nuevas células también estaban presentes en aquellos bloques de tejido en los que no existían placas de desmielinización, la llamada sustancia blanca aparentemente normal. El análisis del patrón de expresión de la proteína de la barrera hematoencefálica ZO-1 mostró que la sustancia gris de estos pacientes, incluso la de los bloques donde no había placas de desmielinización, presentaban un patrón discontinuo, viéndose en este caso de manera intermitente y no homogénea, lo que denota la alteración de la barrera hematoencefálica de la sustancia gris (Figura 3K). Además, las mayores alteraciones encontradas en la expresión de ZO-1 coincidían espacialmente con los lugares de aparición de los astrocitos positivos para FGF-2, lo que indica una regulación al alza de esta molécula con el fin de lograr el mantenimiento de dicha barrera. Por tanto, la medida del nivel de FGF-2 en el LCR es un buen bioindicador del estado de afectación de la barrera hematoencefálica de la sustancia gris, incluso en regiones donde la desmielinización no ha ocurrido, lo que puede servir de prueba pronóstica para evitar futuras neurodegeneraciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de la proteína FGF-2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central mediante la detección de la cantidad de dicha proteína en una muestra de fluido biológico aislado.
- 10 2. Uso de la proteína FGF-2 según la reivindicación 1 donde la muestra de fluido biológico aislado se selecciona de la lista que comprende: líquido cefalorraquídeo, sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.
- 15 3. Uso de la proteína FGF-2 según la reivindicación 2 donde la muestra de fluido biológico aislado es líquido cefalorraquídeo.
- 20 4. Uso de la proteína FGF-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central se selecciona de la lista que comprende: esclerosis múltiple, neuromielitis óptica de Devic, encefalitis diseminada aguda, mielitis transversa aguda, leucoencefalitis hemorrágica aguda o subaguda, desmielinización diseminada aguda, esclerosis difusa, desmielinización central del cuerpo caloso, mielínolisis central pontica, mielitis necrotizante subaguda, esclerosis concéntrica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, enfermedad de Krabbe o síndrome de Zellweger.
- 25 5. Uso de la proteína FGF-2 según la reivindicación 4 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central es esclerosis múltiple.
- 30 6. Uso de la proteína FGF-2 según la reivindicación 5 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central es esclerosis múltiple primaria progresiva o esclerosis múltiple secundaria progresiva.
- 35 7. Método para obtener datos útiles para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central que comprende los siguientes pasos:
- a) obtener una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto,
 - b) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en la muestra biológica del paso (a), y
 - c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 40 8. Método para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central que comprende los pasos (a)-(c) según el método descrito en la reivindicación 7, y que además comprende un paso:
- d) predecir la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o de la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris en el sujeto.
- 45 9. Método para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente según la reivindicación 8, donde en el paso (d) una cantidad de la proteína FGF-2 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o de la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la cantidad de referencia del paso (d) es 200 pg/ml.
- 55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 donde la muestra de fluido biológico aislado del paso (a) se selecciona de la lista que comprende: líquido cefalorraquídeo, sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.
- 60 12. Método según la reivindicación 11 donde la muestra de fluido biológico aislado del paso (a) es líquido cefalorraquídeo.
- 65 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central se selecciona de la lista que comprende: esclerosis múltiple, neuromielitis óptica de Devic, encefalitis diseminada aguda, mielitis transversa aguda, leucoencefalitis hemorrágica aguda o subaguda, desmielinización diseminada aguda, esclerosis difusa, desmielinización central del cuerpo caloso, mielínolisis central pontica, mielitis necrotizante subaguda, esclerosis concéntrica, adrenoleucodistrofia, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, enfermedad de Krabbe o síndrome de Zellweger.
14. Método según la reivindicación 13 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central es esclerosis múltiple.

ES 2 356 540 A1

15. Método según la reivindicación 14 donde la enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central es esclerosis múltiple primaria progresiva o esclerosis múltiple secundaria progresiva.

5 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 donde la detección de la cantidad de la proteína FGF-2 se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.

17. Método según la reivindicación 16 donde el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

10 18. Kit para obtener datos útiles para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central que comprende los elementos necesarios para:

a) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto, y

15 b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

19. Kit para predecir la histopatología de las lesiones de un paciente con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central que comprende los elementos necesarios para:

20 a) detectar la cantidad de la proteína FGF-2 en una muestra de fluido biológico aislado de un sujeto,

b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia, e

25 c) predecir la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o de la existencia de alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris en el sujeto.

30

35

40

45

50

55

60

65

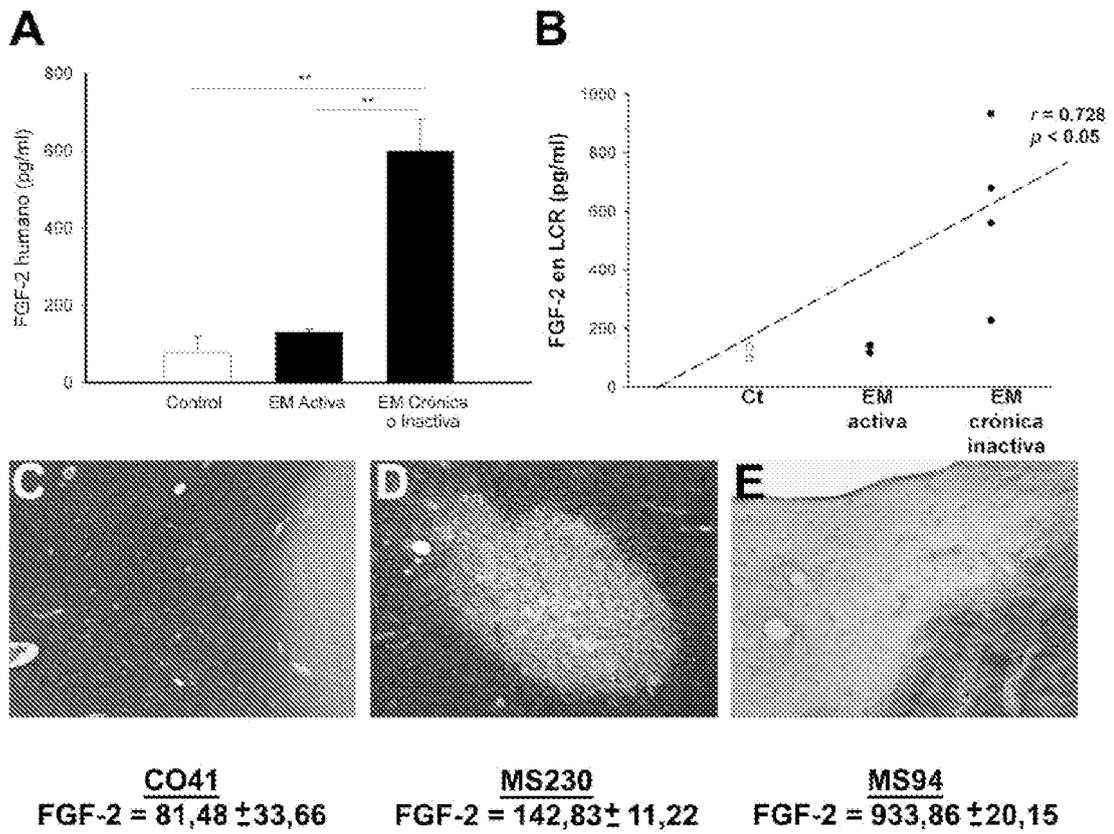


FIGURA 1

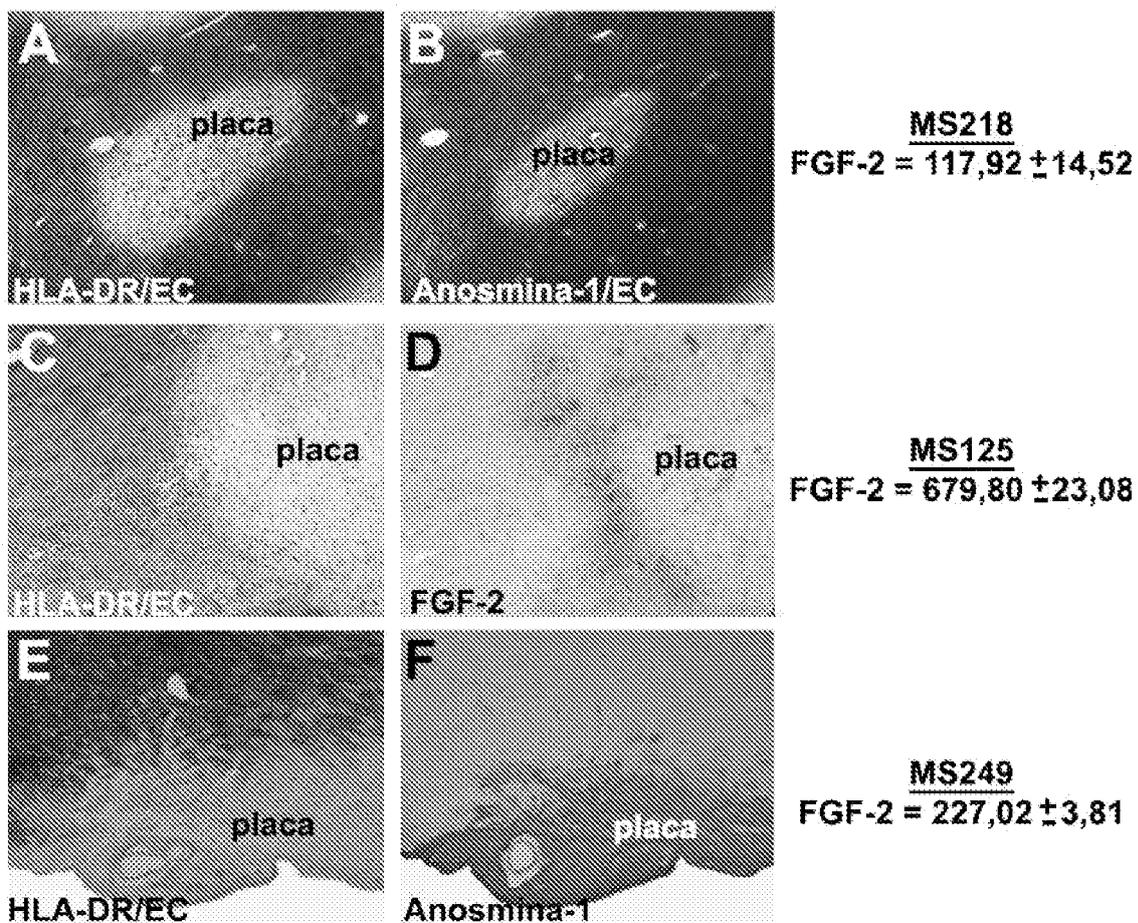
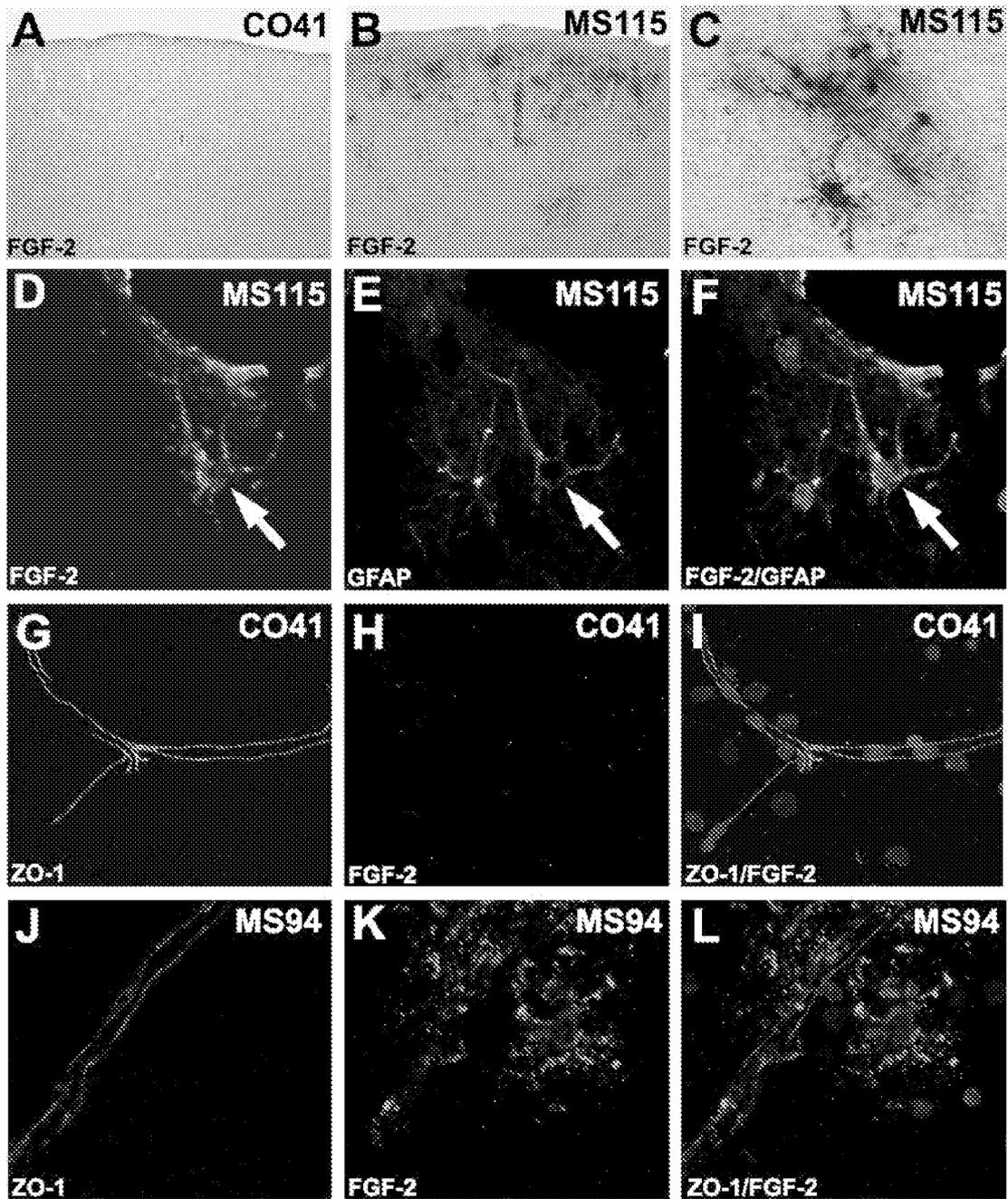


FIGURA 2



<u>CO41</u>	<u>MS115</u>	<u>MS94</u>
FGF-2 = $81,48 \pm 33,66$	FGF-2 = $560,02 \pm 144,42$	FGF-2 = $933,86 \pm 20,15$

FIGURA 3

ES 2 356 540 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos para la Investigación y la Integración

5 <120> Método para predecir las características histopatológicas de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central

<130> ES2145.1

10 <160> 1

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
<211> 288
<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 Met Val Gly Val Gly Gly Gly Asp Val Glu Asp Val Thr Pro Arg Pro
1 5 10 15

30 Gly Gly Cys Gln Ile Ser Gly Arg Gly Ala Arg Gly Cys Asn Gly Ile
20 25 30

35 Pro Gly Ala Ala Ala Trp Glu Ala Ala Leu Pro Arg Arg Arg Pro Arg
35 40 45

40 Arg His Pro Ser Val Asn Pro Arg Ser Arg Ala Ala Gly Ser Pro Arg
50 55 60

45 Thr Arg Gly Arg Arg Thr Glu Glu Arg Pro Ser Gly Ser Arg Leu Gly
65 70 75 80

50 Asp Arg Gly Arg Gly Arg Ala Leu Pro Gly Gly Arg Leu Gly Gly Arg
85 90 95

55 Gly Arg Gly Arg Ala Pro Glu Arg Val Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg
100 105 110

60 Gly Thr Ala Ala Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Arg Gly Ser Arg Pro
115 120 125

65 Gly Pro Ala Gly Thr Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala
130 135 140

70 Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys
145 150 155 160

75 Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile
165 170 175

ES 2 356 540 A1

	His	Pro	Asp	Gly 180	Arg	Val	Asp	Gly	Val 185	Arg	Glu	Lys	Ser	Asp 190	Pro	His
5	Ile	Lys	Leu 195	Gln	Leu	Gln	Ala	Glu 200	Glu	Arg	Gly	Val	Val 205	Ser	Ile	Lys
10	Gly	Val 210	Cys	Ala	Asn	Arg	Tyr 215	Leu	Ala	Met	Lys	Glu 220	Asp	Gly	Arg	Leu
15	Leu 225	Ala	Ser	Lys	Cys	Val 230	Thr	Asp	Glu	Cys	Phe 235	Phe	Phe	Glu	Arg	Leu 240
20	Glu	Ser	Asn	Asn	Tyr 245	Asn	Thr	Tyr	Arg	Ser 250	Arg	Lys	Tyr	Thr	Ser 255	Trp
25	Tyr	Val	Ala	Leu 260	Lys	Arg	Thr	Gly	Gln 265	Tyr	Lys	Leu	Gly	Ser 270	Lys	Thr
30	Gly	Pro	Gly 275	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu 280	Phe	Leu	Pro	Met	Ser 285	Ala	Lys	Ser
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200930661

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K38/18**(2006.01)
G01N33/68(2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Hinks G. L. et al. "Distinctive patterns of PDGF-A, FGF-2, IGF-I, and TGF-beta1 gene expression during remyelination of experimentally-induced spinal cord demyelination." Molecular and cellular neurosciences. Aug 1999. Vol. 14. Nº. 2. Páginas 153 – 168. ISSN 1044-7431.	1-4,7,8,9
X	Tripathi Richa B. et al. "Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats". Journal of Comparative Neurology. SEP 10 2008. Vol. 510, Nº. 2, páginas 129-144. ISSN 0021-9967.	1-4,7,8,9
A	Albrecht P. J. et al. "CNTF regulates FGF-2 production and release from astrocytes: implications for remyelinating lesions". Society for Neuroscience Abstracts. 2000. Vol. 26. Nº. 1-2, páginas Abstract No.-606.14. ISSN 0190-5295.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 29.11.2010</p>	<p>Examinador J. Manso Tomico</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

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

A61K, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 5,6,10-17	SI
	Reivindicaciones 1-4,7,8,9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5,6,10-17	SI
	Reivindicaciones 1-4,7,8,9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Hinks G. L. et al. "Distinctive patterns of PDGF-A, FGF-2, IGF-I, and TGF-beta1 gene expression during remyelination of experimentally-induced spinal cord demyelination." <i>Molecular and cellular neurosciences</i> . Aug 1999. Vol. 14. Nº. 2. Páginas 153 – 168. ISSN 1044-7431.	
D02	Tripathi Richa B. et al. "Chronically increased ciliary neurotrophic factor and fibroblast growth factor-2 expression after spinal contusion in rats". <i>Journal of Comparative Neurology</i> . SEP 10 2008. Vol. 510, Nº. 2, páginas 129-144. ISSN 0021-9967.	
D03	Albrecht P. J. et al. "CNTF regulates FGF-2 production and release from astrocytes: implications for remyelinating lesions". <i>Society for Neuroscience Abstracts</i> . 2000. Vol. 26. Nº. 1-2, páginas Abstract No.-606.14. ISSN 0190-5295.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga el uso de la proteína FGF- 2 para predecir la histopatología de las lesiones de un sujeto con una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central. Para ello se propone el establecimiento de un punto de corte donde la cantidad de 200pg/ml sirve para establecer la presencia de al menos una lesión crónica o inactiva en la sustancia blanca y/o la alteración en la barrera hematoencefálica de la sustancia gris.

D01 divulga un estudio donde se indica que algunos miembros de la familia de los factores de crecimiento , se expresan durante la remielinización o desmielinización de los axones de los oligodendrocitos de la espina dorsal. En concreto se divulga que los incrementos de FGF-2 and PDGF-A fueron menos elevados que aquellos correspondientes a IGF-I and TGF-1, pero que, sin embargo, permanecieron altos más tiempo en las muestras analizadas. La distribución y niveles de expresión de PDGF-A, IGF-I, CNTF, FGF-2, TGF-beta1, GGF-2, and NT-3 mRNAs se examinaron en los días 2, 5, 7, 10, 14, 21, y 28 posteriores a la inducción de la lesión, tanto en el mismo sitio de la lesión como en los axones que atravesaban la zona lesionada.

D02 describe como los factores CNTF y FGF-2 aumentan después de daños producidos en la espina dorsal en los que se acompañan los procesos de desmielinización y pérdida de oligodendrocitos. Este incremento se presenta en aquellas regiones que posteriormente al daño sufrido experimentan procesos de proliferación de células progenitoras de oligodendrocitos (OPC), y por tanto, jugarían un papel en la gliogénesis inducida por el daño sufrido.

D03 describe el papel que tiene el FGF-2 como mediador en los procesos de remielinización dado que induce la proliferación y la diferenciación de oligodendrocitos. Durante los procesos de remielinización la expresión de este factor alcanza valores significativamente elevados, por lo que puede ser utilizado como marcador para la identificación de tales procesos.

Dada la ambigüedad de las expresiones predicción de la histopatología de una lesión, o lesión crónica o inactiva, el objeto de tales reivindicaciones equivaldría a reivindicar el uso de FGF-2 para el diagnóstico, pronóstico o predicción/clasificación de una enfermedad desmielinizante del Sistema Nervioso Central mediante la detección de la cantidad de dicha proteína en un fluido biológico. Por tanto, a la luz del estado de la técnica las reivindicaciones 1-4,7,8, 9 carecen de novedad puesto que tanto D01 como, especialmente D02 relacionan el incremento de FGF-2 en procesos de desmielinización-remielinización secundarios a un daño en el sistema nervioso central y su implicación en la proliferación de ciertos tipos celulares.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica permite deducir de manera obvia el que una detección de la FGF-2 superior a 200pg/ml tenga un valor diagnóstico, pronóstico o predictivo/clasificadorio de la esclerosis múltiple, por lo que las reivindicaciones 5, 6,10-17 sí que serían nuevas e inventivas, según se menciona en los art. 6 y 8 de la LP.