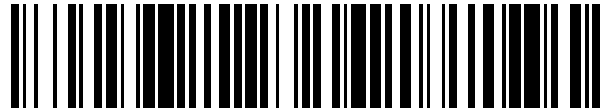


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 361 312**

21 Número de solicitud: 200901758

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22

Fecha de presentación: **07.08.2009**

43

Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2011**

Fecha de la concesión: **23.11.2011**

45

Fecha de anuncio de la concesión: **05.12.2011**

45

Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.12.2011

73

Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
OTRI-UNIVERSIDAD DE CÁDIZ C/ ANCHA 16
11001 CADIZ, ES**

72

Inventor/es:

**CASTRO GONZÁLEZ, CARMEN;
CARRASCO VIÑUELA, MANUEL;
MURILLO CARRETERO, MARÍA ISABEL;
ESTRADA CERQUERA, CARMEN;
LÓPEZ TOLEDANO, MIGUEL A. y
ROMERO GRIMALDI, CARMEN**

74

Agente: **No consta**

54

Título: **EMPLEO DE INHIBIDORES DE ADAM-17 EN REGENERACIÓN NEURONAL.**

57

Resumen:

La presente invención se refiere al uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento, o composición farmacéutica, para incrementar la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero, preferentemente humano, en necesidad de dicho tratamiento.

ES 2 361 312 B2

DESCRIPCIÓN

Empleo de inhibidores de ADAM-17 en regeneración neuronal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se enmarca en el campo de la biomedicina, y dentro de ésta en las áreas de neurología y neurocirugía. En concreto está dirigida al uso de herramientas farmacológicas o biotecnológicas para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso que requieran una regeneración neuronal a partir de células madre neurales. De forma específica, se describe el empleo de agentes inhibidores de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para incrementar la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.

15 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades neurológicas de mayor prevalencia y relevancia social están causadas por una pérdida irreversible de neuronas en distintas zonas del sistema nervioso central.

El sistema nervioso central (SNC) está compuesto por el encéfalo, protegido por los huesos del cráneo, y su continuación inferior, la médula espinal, ubicada en el conducto raquídeo. El tejido nervioso está formado por dos tipos de células neuronas y células gliales, incluyendo éstas últimas los astrocitos y oligodendrocitos. Los somas neuronales se encuentran agrupados en estructuras o núcleos y forman la llamada sustancia gris, mientras que las prolongaciones de las neuronas, o fibras nerviosas, a veces de gran longitud, constituyen la sustancia blanca. Como ejemplos de estructuras del sistema nervioso central relevantes para la descripción de esta invención se pueden citar la corteza cerebral, el hipocampo, la sustancia negra o la médula espinal.

Muchas enfermedades del sistema nervioso central, entre ellas algunas de las de mayor prevalencia, son de tipo neurodegenerativo, es decir se producen como consecuencia de la muerte neuronal. Entre ellas, las más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, con pérdida neuronal en el hipocampo y corteza cerebral fundamentalmente, la enfermedad de Parkinson, con muerte selectiva de neuronas en la sustancia negra, o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), con déficit de neuronas en la médula espinal. En otras entidades nosológicas de alta frecuencia, como los accidentes vasculares cerebrales, también se produce una destrucción neuronal, tanto durante el periodo de isquemia como durante el inicio de la reperusión. Por último, la pérdida neuronal también ocurre en traumatizados, tanto en el cerebro como en la médula espinal.

Ninguna de las alteraciones del sistema nervioso central que cursan con pérdida de neuronas tiene tratamiento eficaz actualmente, siendo la búsqueda de opciones terapéuticas uno de los campos de investigación más activos en la biomedicina. En este sentido, el descubrimiento del papel de las células madre tanto en la generación inicial como en la regeneración de diversos tejidos ha abierto un nuevo enfoque en las perspectivas terapéuticas para estas enfermedades.

45 *Reposición neuronal a partir de células madre en condiciones fisiológicas y patológicas*

Las células madre neurales son células indiferenciadas que cuando se dividen generan células iguales a sí mismas y células capaces de diferenciarse a cada uno de los tipos celulares propios del tejido nervioso: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Durante el desarrollo embrionario todo el tejido nervioso se genera a partir de células madre neurales. Recientemente se ha demostrado que durante la vida adulta existen células madre neurales en distintas zonas del cerebro, que permanecen quiescentes, pero que si se extraen y se ponen en el laboratorio en las condiciones adecuadas pueden dar lugar a nuevas neuronas y células gliales (Goldman, S. *Glia as neural progenitor cells. Trends in Neurosci.* 26:590-596, 2003; Magavi, S.S. *et al. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature* 405:951-955, 2000; Arsenijevic, Y. *et al. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. Exp. Neurol.* 170:48-62, 2001). En dos zonas concretas, el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular, estas células madre neurales están permanentemente activadas, se dividen y generan progenitores ya comprometidos con la estirpe neuronal, llamados neuroblastos, cuya posterior diferenciación da lugar a neuronas maduras (Gage, F. H. *Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. Biol Psychiatry*, 48:713-714, 2000; Alvarez-Buylla, A. and Garcia-Verdugo, J. M. *Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci.* 22:629-634, 2002). Este proceso se conoce con el nombre de neurogénesis. Para que haya neurogénesis son necesarios dos requisitos: 1) deben existir células madre capaces de generar neuroblastos y 2) esas células madre deben encontrarse en un entorno adecuado, que favorezca la diferenciación hacia la estirpe neuronal (Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A. *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron* 41:683-686, 2004). El conjunto de factores que determinan ese entorno se conoce con el nombre de microambiente o nicho neurogénico. Las zonas anteriormente mencionadas, el giro dentado del hipocampo en distintas especies y la zona subventricular, especialmente desarrollada en roedores, cumplen los dos requisitos y son una fuente de nuevas neuronas a lo largo de la vida adulta. Sin embargo, las células madre presentes en otras zonas, o las que eventualmente podrían ser transplantadas, no podrían generar neuronas a menos que se generara el entorno molecular necesario para ello. Por lo tanto, un objetivo de la investigación actual en este tema es establecer qué moléculas favorecen o impiden la neurogénesis para, mediante

la inserción de las primeras y/o la eliminación de las segundas, tratar de generar un nicho neurogénico donde sea necesario.

La neurogénesis en el cerebro adulto es un fenómeno dinámico, habiéndose demostrado que puede modificarse en función de ciertos factores ambientales. Así, el ejercicio físico o los entornos enriquecidos en estímulos favorecen la neurogénesis en el hipocampo (Kempermann, G. *et al.* *More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.* *Nature*, 386:493-495, 1997; Kempermann, G. and Gage, F. H. *Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal.* *Hippocampus* 9:321-332, 1999; Van Praag, H. *et al.* *Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus.* *Nat Neurosci*, 2:266-270, 1999), mientras que la estimulación olfativa la aumenta en la zona subventricular (Rochefort, C., *et al.* *Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory.* *J Neurosci*, 22:2679-2689, 2002). En distintos tipos de lesiones cerebrales experimentales (isquemia transitoria global o focal, epilepsia, entre otras) se ha descrito la aparición de nuevas neuronas en la zona lesionada, que se han podido generar *in situ* por activación de células madre locales, o ser el resultado de la migración de precursores desde las áreas neurogénicas. En este sentido se ha observado un aumento de la proliferación de precursores neurales en el giro dentado (Liu, J. *et al.* *Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils.* *J Neurosci* 18:7768-7778, 1998.; Jin, K. *et al.* *Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat.* *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4710-4715, 2001; Parent, J. M. *et al.* *Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus.* *J Neurosci*. 17:3727-3738, 1997) y en la zona subventricular (Fallon, J. *et al.* *In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain.* *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14,686-14,691, 2000), dando lugar a la producción de nuevos neuroblastos que, eventualmente, migran en dirección a la zona lesionada. Cualquiera que sea su origen, la capacidad de regeneración es muy escasa, habiéndose descrito una reposición neuronal entre 0,2 y 10%, según el área afectada y el tipo de lesión (Arvidsson, A. *et al.* *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke.* *Nat Med* 8:963-970, 2002; Nakatomi, H. *et al.* *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury, by recruitment of endogenous neural progenitors.* *Cell* 110:429-441, 2002; Teramoto, T. *et al.* *EGF amplifies the replacement of parvalbuminexpressing striatal interneurons after ischemia.* *J Clin Invest.* 111:1125-1132, 2003). El hecho de que haya una respuesta neurogénica a la lesión hace pensar que la formación de nuevas neuronas sea un mecanismo eficaz en la reparación de pequeñas lesiones, que permanecen silentes precisamente porque las neuronas que hacen apoptosis son reemplazadas, al menos en parte, por neuronas de nueva formación. Sin embargo, las lesiones graves o las experimentales con mayor pérdida neuronal no pueden ser resueltas, a menos que se establecieran medidas terapéuticas eficaces para incrementar de forma significativa el proceso neurogénico.

El trasplante de células madre neurales como perspectiva terapéutica

Una de las alternativas que podría contribuir a resolver, o al menos a paliar, los problemas clínicos que plantean las enfermedades que cursan con pérdida neuronal es el trasplante de células que pudieran dar lugar a neuronas una vez expuestas al microambiente del tejido nervioso. Varios laboratorios han intentado esta estrategia en modelos animales a los que se han transplantado células madre de origen embrionario (Cao *et al.* *Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage.* *Exp Neurol.* 167:48-58, 2001), células madre neurales de animales adultos (Pluchino, S. *et al.* *Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis.* *Nature* 422: 688-694, 2003), o bien células procedentes de células madre sometidas a diferentes grados de diferenciación *in vitro*. El fenómeno más generalmente observado es que, si bien las células madre que se implantan en las zonas neurogénicas del cerebro (por ejemplo, la zona subventricular o el bulbo olfativo en roedores) se diferencian a neuroblastos y se convierten en neuronas maduras, cuando el trasplante se produce en otras zonas, inician la ruta de diferenciación glial (Herrera, D. G. *et al.* *Adult-derived neural precursors transplanted into multiple regions in the adult brain.* *Ann Neurol.* 46:867-77, 1999; Mligiliche, N. L. *et al.* *Survival of neural progenitor cells from the subventricular zone of the adult rat after transplantation into the host spinal cord of the same strain of adult rat.* *Anat Sci Int.* 80:229-34, 2005).

Importancia de mimetizar un nicho neurogénico. Papel del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del enzima convertidor del factor de necrosis tumoral- α (ADAM-17)

El problema planteado actualmente es la incapacidad de generar nuevas neuronas en las zonas lesionadas del sistema nervioso central a partir de células madre neurales.

El hecho de que en las zonas lesionadas aparezcan células gliales nuevas pero no neuronas (Seidenfaden *et al.* *Glial conversion of SVZ-derived committed neuronal precursors after ectopic grafting into the adult brain.* *Mol Cell Neurosci.* 32:187-98, 2006) se puede explicar en función del nicho o microambiente en el que se encuentran las células madre. El conjunto de interacciones de citoquinas y de contactos celulares existente en una región neurogénica que permite la diferenciación neuronal, difiere notablemente de las condiciones generadas como consecuencia de una lesión tisular (expresión de nuevos factores de crecimiento y sus correspondientes receptores, etc) que favorecen la diferenciación glial y/o impiden la neuronal. Se trataría por tanto de modificar el nicho no-neurogénico de la zona

lesionada y convertirlo en un nicho neurogénico en el que tanto las células madre endógenas como las transplantadas pudieran dar lugar a neuronas maduras y funcionales.

Entre las moléculas cuya expresión se ha demostrado que aumenta en distintos tipos de lesiones cerebrales se encuentra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Planas, A. M. *et al.* *Epidermal growth factor receptor in proliferating reactive glia following transient focal ischemia in the rat brain.* *Glia* 23:120-129, 1998; Kawahara, N. *et al.* *The gene for heparinbinding epidermal growth factor-like growth factor is stress-inducible: its role in cerebral ischemia.* *J Cereb Blood Flow Metab.* 19:307-320, 1999; Tanaka, N. *et al.* *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor mRNA expression in neonatal rat brain with hypoxic/ischemic injury.* *Brain Res.* 827:130-138, 1999; Teramoto, T. *et al.* *EGF amplifies the replacement of parvalbuminexpressing striatal interneurons after ischemia.* *J Clin Invest.* 111:1125-1132, 2003), así como sus ligandos TGF- α y HB-EGF (Opanashuk, L.A. *et al.* *Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in hippocampus: modulation of expression by seizures and antiexcitotoxic action.* *J Neurosci.* 19:133-146, 1999; Kawahara, N., Mishima, K., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Tamura, A. and Kirino, T. *The gene for heparinbinding epidermal growth factor-like growth factor is stress-inducible: its role in cerebral ischemia.* *J Cereb Blood Flow Metab.* 19:307-320, 1999.; Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., *et al.* *Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury, by recruitment of endogenous neural progenitors.* *Cell* 110:429-441, 2002). La activación del EGFR favorece la proliferación de los precursores neurales tanto en cultivos de células madre neurales (Jori, F. P. *et al.* *Responsive Rat Neural Stem Cells: Molecular Follow-Up of Neuron and Astrocyte Differentiation In Vitro.* *J. Cell Physiol* 195:220-233, 2003) como *in vivo* en la zona subventricular (Kuhn, H.G. *et al.* *Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain.* *J Neurosci.* 17:5820-5829, 1997; Craig, C.G. *et al.* *In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain.* *J Neurosci.* 16:2649-2658, 1996; Doetsch, F. *et al.* *EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells.* *Neuron* 36:1021-1034, 2002; Gonzalez-Perez, O. *et al.* *EGF Induces the Progeny of Subventricular Zone Type B Cells to Migrate and Differentiate into Oligodendrocytes.* *Stem Cells*, 2009 (*e-pub*)), por lo que se podría pensar que el aumento de expresión de estas moléculas contribuiría a la regeneración del tejido. Sin embargo, cuando los precursores neurales permanecen expuestos a EGF en la fase de diferenciación, ésta se decanta hacia el linaje glial a expensas del neuronal (Jori, F.P. *et al.* *EGF-Responsive Rat Neural Stem Cells: Molecular Follow-Up of Neuron and Astrocyte Differentiation In Vitro.* *J. Cell Physiol* 195:220-233, 2003.; Gonzalez-Perez, O. *et al.* *EGF Induces the Progeny of Subventricular Zone Type B Cells to Migrate and Differentiate into Oligodendrocytes.* *Stem Cells*, 2009 (*e-pub*)). Estos datos sugieren que evitar la activación del EGFR en las lesiones del tejido nervioso puede contribuir a la neurogenicidad del microambiente.

Los ligandos del EGFR se sintetizan en forma de proteínas precursoras que permanecen ancladas a la membrana celular hasta que son liberadas como proteínas solubles por acción de metaloproteasas de la familia ADAM (revisado en Blobel, C. P. *ADAMs: key components in EGFR signalling and development.* *Nat. Rev. Mol. Cell Bio* 6:32-43, 2005). Estas peptidasas, que están también insertadas en las membranas celulares, juegan un papel esencial en la regulación de la señalización por EGFR, ya que sólo los ligandos en su forma soluble pueden unirse al receptor y activarlo. Entre las metaloproteasas que liberan ligandos de EGFR, se ha demostrado que ADAM-17 es la principal converttasa implicada en la liberación de TGF- α , HB-EGF, epiregulina y anfiregulina, mientras que ADAM-10 libera preferentemente EGF y betacelulina (Sahin *et al.* *Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands.* *J Cell Biol.* 164:769-79, 2004).

ADAM-17 rompe y libera el ectodominio de numerosas proteínas que se encuentran insertadas en las membranas celulares. Algunas de las proteínas liberadas por ADAM-17 son importantes en tumorigénesis (Katakowski, M. *et al.* *Tumorigenicity of cortical astrocyte cell line induced by the protease ADAM17.* *Cancer Sci.* 1:1-8, 2009) o en inflamación (Moss, M. L. *et al.* *Drug Insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis.* *Nat Clin Pract Rheum* 4:300-309, 2008), por lo que hoy se considera a ADAM-17 un agente relevante en la patogenia de estos procesos y una emergente diana terapéutica. Actualmente están en distintas fases de desarrollo varios inhibidores de ADAM-17, fármacos potenciales para el tratamiento de tumores o de procesos inflamatorios como la artritis reumatoide (Ott, G.R. *et al.* *Potent, exceptionally selective, orally bioavailable inhibitors of TNF- α Converting Enzyme (TACE): Novel 2-substituted-1H-benzod[imidazol-1-yl)methyl)benzamide P10 substituents.* *Bioorg Med Chem Lett* 18:1577-1582, 2008; Lu, Z. *et al.* *Potent, selective, orally bioavailable inhibitors of tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE): Discovery of Indole, benzofuran, imidazopyridine and pyrazolopyridine P10 substituents.* *Bioorg Med Chem Lett* 18:1958-1962, 2008).

Pero a pesar de las investigaciones en este campo, hasta ahora no se ha conseguido en el estado de la técnica mimetizar un nicho neurogénico que permita la regeneración de neuronas en regiones lesionadas del sistema nervioso central.

Debido a la ausencia en el estado de la técnica de un tratamiento efectivo para favorecer, en tejidos nerviosos lesionados, la generación de nuevas neuronas, bien a partir de precursores neurales endógenos, o de trasplantes de células madre neurales, los autores de la presente invención han llevado a cabo un importante trabajo de investigación sobre los mecanismos que controlan la generación de neuronas y de células gliales a partir de células madre neurales.

Así, utilizando cultivos de células madre neurales, han demostrado que cuando estas células se diferencian *in vitro* predomina la diferenciación glial sobre la neuronal y que esto se debe a la activación espontánea del EGFR.

También han demostrado que tanto la inhibición de la actividad de metaloproteasas por el compuesto GM6001 como el bloqueo selectivo de la expresión de la metaloproteasa ADAM-17 mediante el uso de ARN de interferencia dan lugar a un aumento significativo del porcentaje de neuronas y a una disminución significativa del de astrocitos en estos cultivos.

5

Los resultados de sus investigaciones han demostrado que ADAM-17 es la molécula clave que controla la liberación de ligandos de EGFR en el entorno de los precursores neurales. Por otra parte, han demostrado que cuando se produce una lesión cerebral existe un aumento localizado de ADAM-17 y de su sustrato TGF- α en la zona adyacente; la presencia de estas dos moléculas y la consiguiente activación del EGFR es una de las causas que dificultan la neurogénesis reparativa en las lesiones cerebrales, tanto a partir de los precursores endógenos como de los transplantados.

10

Por tanto, estos estudios han demostrado que los inhibidores de ADAM-17 son útiles en el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central, favoreciendo la regeneración neuronal.

15

Descripción de las figuras

Figura 1. Diferenciación glial de precursores neurales transplantados a una zona de lesión cerebral. A. Corte coronal del cerebro en que se muestra la localización de la lesión cortical. B. Células transplantadas en la zona de la lesión e identificadas por la fluorescencia verde que les confiere la GFP. C. El mismo campo que en B, mostrando la tinción de la proteína GFAP (en rojo), marcadora de astrocitos. Ce, cuerpo calloso; CPu, caudado putamen; LV, ventrículo lateral.

20

Figura 2. Imágenes de microscopía confocal que muestran cortes coronales de cerebro de ratón adulto que incluyen la zona en que se ha producido una lesión como la presentada en la figura 1A. A-B. Tinción simultánea con anticuerpos específicos para nestina (verde) y EGFR (rojo). C-E. Tinción simultánea con iodo de propidio (PI, rojo) y con anticuerpos específicos para nestina (azul) y ADAM-17 (verde). Las líneas de puntos delimitan la zona con pérdida de sustancia producida por la lesión.

25

30

Figura 3. Efecto de la activación del EGFR sobre la diferenciación de precursores neurales *in vitro*. Imágenes obtenidas en cultivos control (A) y tratados con EGF (B) o con AG1478 (C). En la parte inferior aparecen los resultados de las cuantificaciones: D, porcentaje de células gliales (células GFAP⁺); E, porcentaje de neuronas (células BIII-tub⁺); F, número total de células en el cultivo. *, $p < 0,05$ al comparar con el control. #, $p < 0,05$ al comparar con EGF. Los datos corresponden a las medias \pm ES del número de experimentos pareados que parece entre paréntesis.

35

Figura 4. Efecto del inhibidor de metaloproteasas GM6001 sobre la diferenciación de precursores neurales *in vitro*. Imágenes obtenidas en cultivos controles (A) y tratados con GM6001. (B). En la parte inferior aparecen los resultados de las cuantificaciones: C, porcentaje de células gliales; D, porcentaje de neuronas; E, número total de células en el cultivo, F y G, porcentaje de células gliales en cultivos expuestos a las combinaciones indicadas. *, $p < 0,05$ al comparar con el control. #, $p < 0,05$ al comparar con noggin. +, $p < 0,05$ al comparar con GM6001. Los datos corresponden a las medias \pm ES del número de experimentos pareados que parece entre paréntesis.

40

Figura 5. Metaloproteasas y ligandos de EGFR presentes en los cultivos de precursores neurales. A. Detección por RT-PCR de los ARNm de varios ligandos de EGFR y varias metaloproteasas de interés en cultivos de neuroesferas (NF) y de células diferenciadas (Ad). B, núcleos teñidos con DAPI. C. Tinción inmunocitoquímica para ADAM-17. D. Tinción inmunocitoquímica para TGF- α . E. Suma de las tres imágenes anteriores.

45

Figura 6. Efecto de la disminución selectiva de ADAM-17 o ADAM-10 mediante el uso de “pequeños” ARN interferentes (siRNA) sobre la diferenciación de los precursores neurales. A-B. Efecto de la transfección con siRNA de ADAM-17 o ADAM-10 sobre los niveles de los respectivos ARNm. C. Porcentaje de células gliales en cultivos controles y en cultivos transfectados con siRNA para ADAM-17 o ADAM-10, o tratados con GM6001. D. Porcentaje de células neuronales en cultivos en las condiciones indicadas. *, $p < 0,05$ al comparar con el control. Se presentan las medias \pm ES de los resultados obtenidos en tres experimentos pareados.

50

55

Figura 7. Expresión de ADAM-17, ADAM-10 y TGF- α en la zona adyacente a una lesión mecánica de la corteza cerebral. A. lado de la lesión (Ipsil); hemisferio contralateral (Contral) y cerebro de ratón no operado (Naive)). B. Imágenes de microscopía confocal de cortes coronales de cerebro de ratón en la zona de la lesión (I) y en la zona equivalente del hemisferio contralateral (C), teñidos para la detección inmunohistoquímica de TGF- α (B-C) o ADAM-17 (D-E). Las líneas de puntos delimitan la zona con pérdida de sustancia producida por la lesión; (u.a.: unidades arbitrarias).

60

Figura 8. Localización celular de ADAM-17 y TGF- α en la zona de lesión cerebral. A-C. Inmunotinción simultánea para nestina (A), ADAM-17 (B) y suma de ambas imágenes (C). D-F. Inmunotinción simultánea para nestina (D), TGF- α (E) y suma de ambas imágenes (F). H. Inmunotinción simultánea para GFAP y TGF- α . La zona indicada por el recuadro aparece a mayor aumento en I-K, con inmunotinción para TGF- α (I), GFAP (J) y la suma de ambas

65

imágenes (K). La línea de puntos indica el límite de la zona con pérdida de sustancia en la corteza lesionada (I), o el límite superior del corte en la corteza contralateral (C).

5 Objeto de la invención

En primer lugar, es objeto de la invención el uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.

Con el fin de aplicar un enfoque terapéutico genético para liberar el agente inhibidor de ADAM-17 en la región lesionada, es también objeto de la invención el uso de un vector que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.

Es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende el agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17, tal y como aparece definido en la invención, para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central.

Es finalmente objeto de la invención un método de *screening* para la identificación de moléculas que favorecen la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central.

Descripción de la invención

Debido a la ausencia en el estado de la técnica de un tratamiento efectivo para favorecer, en tejidos nerviosos lesionados del SNC, la generación de nuevas neuronas, los autores de la presente invención han llevado a cabo un importante trabajo de experimentación que les ha permitido demostrar que la inhibición de la actividad y/o expresión de ADAM-17 proporciona un nicho neurogénico en el que tanto las células madre endógenas como las transplantadas pueden dar lugar a neuronas maduras y funcionales.

La presente invención, por consiguiente, se refiere, en un aspecto principal, al uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento, o composición farmacéutica, para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero, preferiblemente humano, en necesidad de dicho tratamiento.

El término “tratamiento” en el contexto de la presente invención, se refiere a cualquier efecto beneficioso sobre la progresión de la lesión nerviosa, incluyendo atenuación, reducción, mengua o disminución del desarrollo patológico después del comienzo de dicha lesión.

Por “*favorecer la regeneración neuronal*” se entiende incrementar la población neuronal o aumentar la velocidad de formación de nuevas neuronas, bien a partir de precursores neurales endógenos o células madre neurales transplantadas. También comprende disminuir la aparición de células gliales de nueva formación.

Por tanto, la generación de nuevas neuronas en los tejidos nerviosos lesionados puede producirse tanto a partir de precursores neurales endógenos como tras el trasplante de células madre neurales o precursores neurales en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento. En este último caso, el uso de inhibidores de ADAM-17 facilita el éxito de las técnicas de terapia celular en cerebro y médula espinal.

Las lesiones del sistema nervioso central pueden estar generadas, entre otras alteraciones, por traumas, isquemia cerebral o enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Parkinson o ELA.

En el contexto de la presente invención, por “*lesiones del sistema nervioso central generadas por trauma*” se entienden aquellas lesiones del tejido neural ocasionadas por cualquier tipo de lesión traumática que de lugar a una lesión con interrupción de la función neuronal.

En la presente invención, por compuesto/agente inhibidor de ADAM-17 se entiende cualquier herramienta farmacológica y/o molecular (ácidos nucleicos, polinucleótidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, compuestos químicos, anticuerpos, antagonistas, etc) capaz de interactuar con dicha proteína ADAM-17 o con fragmentos de la misma, disminuyendo o eliminando la intensidad o la duración de la actividad o función biológica de la enzima. En esta definición se incluyen, además, todos aquellos compuestos o moléculas que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína ADAM-17, es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del ARN, la traducción del ARNm, las modificaciones postraduccionales o su inserción en membrana.

El agente puede ser, por tanto, un inhibidor de la actividad catalítica de ADAM-17, seleccionado entre péptidos o proteínas o cualquier otra molécula con capacidad de inhibir la actividad de la proteína ADAM-17, bien por unirse como antagonista a su sitio activo, bien por bloquear su actividad mediante otros mecanismos.

En una realización particular de la invención, el agente empleado es una molécula inhibidora de la actividad general de las metaloproteasas, como por ejemplo la molécula GM6001.

En otra realización particular, el agente empleado es un inhibidor específico de la actividad de ADAM-17. Dicho inhibidor específico puede ser cualquier sustancia de naturaleza química, nucleotídica, peptídica o proteica que bloquee o disminuya la actividad de la proteína ADAM-17.

En el estado de la técnica han sido descritos diferentes tipos de moléculas, pertenecientes a diferentes clases químicas, que inhiben de forma altamente selectiva la actividad biológica de ADAM-17 (*Shirshendu DasGupta. et al* "Current perspective of TACE inhibitors: A review" *Biorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 444-459).

En una realización preferida, el agente inhibidor comprende una molécula de ADN que codifica para un péptido o una proteína que interfiere bloqueando o disminuyendo la actividad de la proteína ADAM-17, bien porque se une al sitio activo de ADAM-17, bien porque induce un cambio conformacional en la molécula de ADAM-17 o una modificación postraduccional que afecte a su actividad, etc.

Más preferiblemente, la molécula de ADN codifica para una forma mutante dominante negativo de la proteína ADAM-17. Más preferiblemente aún, la molécula de ADN codifica para una forma mutante dominante negativo de la proteína ADAM-17 humana (NP_003174.3) (SEQ ID NO 1). Ejemplo de esta realización es la secuencia mostrada en SEQ ID NO 2, que presenta una delección de la región transmembrana de ADAM-17, en la que los nucleótidos que codifican para los aminoácidos 215-473 (segmento transmembrana) han sido deletados (*Itai, T. et al. "processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF-alpha-converting enzyme, but not its truncated soluble form". Eur. J. Biochem. 2001; 268(7):2074-82).*

Como se ha mencionado anteriormente, el agente inhibidor también se refiere a cualquier compuesto o molécula que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína ADAM-17.

En una realización particular, el agente inhibidor es una secuencia de nucleótidos que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína ADAM-17.

En una realización preferida, dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia antisentido específica de la secuencia del gen ADAM-17 o del ARNm que codifica para la proteína ADAM-17. De forma específica, la secuencia de nucleótidos antisentido está dirigida contra cualquier región del ARNm que codifica para la proteína ADAM-17.

Más preferiblemente, la secuencia de nucleótidos antisentido está dirigida contra el ARNm (NM_003183.4) que codifica para la proteína ADAM-17 humana. Ejemplos de esta realización es la secuencia 5'-CCTAGTCAGTGCTGTT ATCA-3' (mostrada en SEQ ID NO 3) (Isis Pharmaceuticals Carlsbad, CA, USA). Los residuos subrayados indican las modificaciones 2'-O-metoxietilo. Esta secuencia inhibe la expresión del ARNm de ADAM-17 en un 93%.

En otra realización preferida de la invención, dicha secuencia de nucleótidos es una ribozima específica del ARNm de la proteína ADAM-17.

En otra realización preferida de la invención, dicha secuencia es un aptámero específico del ARNm de la proteína ADAM-17.

Finalmente, en otra realización preferida, dicha secuencia es un ARN de interferencia (ARNi) específico del ARNm de la proteína ADAM-17.

A modo de ejemplo, el ARNi empleado puede ser una mezcla de "pequeños" ARN interferentes (siRNAs) (L-0048-00-0005, Dharmacon) compuesta por 4 tipos diferentes de nucleótidos con las siguientes secuencias dirigidas contra el ARNm (NM_009615.5) que codifica para la proteína Adam17 de ratón (NP_009615.5) (SEQ ID NO 4):

5'GGACGUAUUGAGCGAUUU3' (SEQ ID NO 5)

5'GGUAGCAGAUCAUCGAUUU3' (SEQ ID NO 6)

5'UAUGGGAACUCUUGGAUUA3' (SEQ ID NO 7)

5'UGACCGAGUUGAUGACAU3' (SEQ ID NO 8)

El medicamento o composición farmacéutica que comprende los inhibidores de ADAM-17, tal y como se han detallado previamente, son de utilidad en el tratamiento de un mamífero, preferentemente humano, afectado por una lesión del sistema nervioso central (del cerebro o de la médula espinal). El método de tratamiento consiste en la administración directa o sistémica de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso de diferenciación glial y

favorece la diferenciación neuronal durante el proceso de regeneración de lesiones del SNC a partir de células madre neurales propias del individuo (endógenas) o transplantadas.

5 El medicamento o composición farmacéutica contiene una cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor o inhibidores previamente descritos. Se entiende por “cantidad terapéuticamente efectiva” la cantidad del agente o compuesto inhibidor de ADAM-17 calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otros, por las características propias del compuesto y en el cálculo se atenderá a la edad, estado del paciente, severidad de la lesión y modo y frecuencia de administración.

10 En una realización particular de la invención, el medicamento puede comprender además al menos un vehículo y/o al menos un excipiente y/o al menos un aditivo y/o al menos otro ingrediente activo farmacéuticamente aceptables.

15 En el contexto de la presente invención, por “farmacéuticamente aceptable” se entiende que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el mamífero al que se administra.

De forma preferida, el medicamento comprende además un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de EGFR.

20 Por compuesto/agente inhibidor de la proteína receptora EGFR se entiende cualquier herramienta farmacológica y/o molecular (oligonucleótidos, péptidos, anticuerpos, antagonistas, etc) capaz de interactuar con dicha proteína o con fragmentos funcionales de la misma, disminuyendo o eliminando la intensidad o la duración de la actividad biológica de la proteína. En esta definición se incluyen además, todos aquellos compuestos o moléculas que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína EGFR. Es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del ARNm, la traducción del ARNm, las modificaciones postraduccionales, las interacciones entre proteínas EGFR para formar su estructura cuaternaria o su inserción en membrana. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimina el efecto y/o la función de la proteína receptora EGFR.

30 El agente inhibidor de EGFR se puede emplear simultánea, secuencial o separadamente con el agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17.

35 En realizaciones particulares de la invención, el medicamento se administra directa y localmente sobre la lesión cerebral. De forma preferida, la administración se lleva a cabo mediante sistemas de perfusión.

En otra realización particular, el medicamento puede ser administrado de forma indirecta, por ej. vía oral, inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

40 Por ejemplo, para el uso de aquellos inhibidores de ADAM-17 que tengan la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica, en la elaboración del medicamento o fórmula farmacéutica, la presente invención contempla su administración sistémica. Para el uso directo de los inhibidores de la actividad ADAM-17, la presente invención contempla su introducción en la zona de la lesión, donde se requiere el efecto inhibitorio.

45 La introducción directa de los inhibidores en la zona de la lesión, en el caso de que estos sean polinucleótidos, puede llevarse a cabo mediante su introducción en células específicas que lo producen. Para su introducción se utilizan sistemas específicos empleados habitualmente en el estado de la técnica. Estos nucleótidos mencionados, pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica, mediante cualquier técnica o procedimiento que permita la integración de los mismos en las células de un mamífero.

50 Este objetivo se puede conseguir mediante la administración a las células de una construcción génica que comprende uno de los nucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células, permitiendo su expresión en el interior de las mismas, de manera que se inhiba la expresión de la proteína ADAM-17. De forma preferida, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

60 Así, en otra realización principal de la invención se contempla el uso de un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central en un mamífero, preferiblemente humano, en necesidad de dicho tratamiento.

65 De forma preferida, el vector es un vector de expresión. En la presente invención, el término “vector de expresión” se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación y posterior expresión de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser plasmídicos y/o víricos, preferiblemente los vectores víricos pueden ser lentivirales o adenovirales, y su administración puede prepararse por un experto en este tipo de terapias en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Con la finalidad de tratar la lesión nerviosa (en cerebro o médula espinal), el vector de la invención puede ser inyectado directamente en el tejido lesionado, evitándose de este modo los problemas implicados con la administración sistémica de vectores de terapia génica, así como de efectos secundarios.

5 En otro aspecto principal de la invención se contempla una composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17, tal y como aparece definido anteriormente, para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central.

10 Finalmente, otro aspecto principal de la invención contempla un método de *screening* para identificar agentes (moléculas, compuestos, sustancias, etc) que favorezcan la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central basado en el empleo de ADAM-17 como diana terapéutica.

De forma particular, el método de screening comprende: a) poner en contacto el gen o proteína ADAM-17 con el agente a ensayar, y b) determinar si el agente inhibe la actividad y/o expresión de dicho gen o proteína.

15 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar pero no limitar la presente invención.

Ejemplos

20 Ejemplo 1

Materiales

25 En este estudio se utilizaron ratones CD1 adultos (2 a 3 meses de edad) y postnatales de siete días (P7) obtenidos de un suministrador autorizado (Servicios de Experimentación y Producción Animal, Universidad de Cádiz, España). Los animales se estabularon en jaulas con agua y pienso *ad libitum* en condiciones de temperatura controlada a $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/UE) y la legislación española (BOE 67/8509-12; BOE 1201/2005) sobre el uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité local de Ética y Atención a los Animales. Como anestesia se usó una combinación de ketamina (100 mg/Kg) y xylazina (20 mg/Kg) en los procedimientos quirúrgicos con recuperación y pentobarbital sódico (150 mg/Kg) previo a la perfusión; todos los anestésicos se administraron intraperitonealmente. Se estudiaron al menos tres animales o tres cultivos independientes por grupo experimental. Todos los valores de los datos se presentan como la media \pm E.S.

35

Reactivos

40 Se utilizaron los siguientes productos: AG 1478 (inhibidor del EGFR) y GM 6001 (inhibidor de amplio espectro de metaloproteinasas) de Calbiochem (San Diego, CA, USA); siRNAs obtenidos de Thermo Scientific Dharmacon (SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8) (Lafayette, CO, USA). Reactivos para "Western blot" (SDS, soluciones de acrilamida/bis-acrilamida, etc) y kits de cuantificación de proteínas de la marca Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Ácido tricloroacético (TCA), glicerol, sales inorgánicas, y ácidos bases y alcoholes concentrados de Merck (Darmstadt, Alemania). Todas las soluciones y reactivos empleados en los cultivos se obtuvieron de GIBCO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a no ser que se indique lo contrario. Otros productos no especificados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA).

45

Métodos

50

Lesiones de la corteza cerebral y procesamiento de las muestras cerebrales

Ratones adultos anestesiados con ketamina (100 mg/Kg) y xylazina (20 mg/Kg) i.p. se colocaron en un aparato estereotáxico. Se practicó una craneotomía 1,4 mm rostral y 1,5 mm lateral a Bregma. La corteza motora primaria se lesionó introduciendo una broca de 0,7 mm de diámetro hasta una profundidad de 1 mm. Se suturó la piel y los animales se trasladaron a jaulas individuales para su recuperación. Siete días después, los ratones se anestesiaron profundamente con pentobarbital y se perfundieron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Los cerebros se postfijaron y crioprotegieron con sacarosa al 30%. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de $30 \mu\text{m}$ de grosor con un criostato y se conservaron con crioprotección a -20°C para el posterior estudio inmunohistoquímico. El procedimiento y los anticuerpos utilizados se describen más abajo en el apartado de inmunocitoquímica. El análisis se realizó con un microscopio confocal Leica SP2. Los ratones utilizados para las determinaciones con PCR cuantitativa se sacrificaron por dislocación cervical siete días después de la lesión. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se obtuvo una sección coronal que comprendía la lesión y la zona equivalente del hemisferio contralateral. Se tomaron muestras de ambas zonas que se introdujeron inmediatamente en N2 líquido, para su posterior análisis.

65

Aislamiento y cultivo de células madre neurales (NSC) de la zona subventricular (SVZ) de cerebro de ratón

Las NSC de la SVZ de ratones postnatales de 7 días de edad fueron aisladas siguiendo el método previamente descrito por nosotros (Torroglosa *et al.* Nitric oxide decreases subventricular zone stem cell proliferation by inhibition of epidermal growth factor receptor and phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway. *Stem Cells*. 25: 88-97, 2007) y por otros laboratorios (Doetsch *et al.*, Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 97: 703-16, 1999). Tras el aislamiento, las NSC se pusieron en cultivo en un “medio completo”, formado por medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) y medio F12 a partes iguales (DF12) suplementado con L-glutamina 2 mM, gentamicina (5 µg/ml), suplemento B27, EGF y FGF2 (20 y 10 ng/ml respectivamente, ambos humanos recombinantes obtenidos de Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Los cultivos se mantuvieron en un incubador humidificado con atmósfera de 5% CO₂, a 37°C. Tras 1-2 días, comenzaron a formarse los agregados flotantes de NSC conocidos como neuroesferas. En cada subcultivo, las neuroesferas formadas tras 3-4 días *in vitro* (DIV) se centrifugaron, se disociaron mecánicamente hasta obtener suspensiones de células individuales y se sembraron en medio completo fresco y en nuevos frascos de cultivo, para obtener una amplificación de la población de neuroesferas. Los distintos experimentos se realizaron entre los subcultivos 3 y 10.

Adhesión de las células en cultivo, tratamientos y transfección

Las neuroesferas derivadas de SVZ se disociaron mecánicamente y se resuspendieron en medio completo sin factores de crecimiento (para favorecer la diferenciación neural). A continuación, las células se contaron usando una cámara de Neubauer y se sembraron sobre superficies cubiertas con un sustrato de poli-L-ornitina (PLO) para promover la adhesión, a una densidad de 20,000 células/cm². Se utilizaron diferentes superficies según el tipo de experimento: placas de 6 pocillos para “Western blotting”, placas de 12 pocillos para aislamiento de ARN total, y cubreobjetos redondos de cristal de 12 mm de diámetro para inmunocitoquímica. Los tratamientos con los distintos fármacos se añadieron 24 h después de la siembra, cuando la mayoría de las células se habían adherido perfectamente al sustrato. Las transfecciones con los “pequeños” ARN interferentes (siRNAs) específicos se realizaron 18 h después de la siembra; para ello, las células se cambiaron a un medio libre de antibióticos y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de ARN total y transcripción reversa

En el caso de las muestras de tejido, se disecaron las cortezas cerebrales (controles o lesionadas) y se homogeneizaron en un homogenizador de cristal-teflón en presencia del reactivo TRIzol (Total RNA Isolation Reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA). Cuando las muestras eran células, procedentes de cultivos de neuroesferas, se resuspendieron directamente en el reactivo TRIzol con ayuda de una pipeta. A continuación, en ambos casos, el ARN total se purificó siguiendo las especificaciones del mencionado reactivo de Invitrogen. La cantidad y calidad del ARN total aislado se determinó según la relación entre las densidades ópticas medidas a 260 y 280 nm, y la integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN fue entonces tratado con DNasa I (Invitrogen) para eliminar posibles trazas de DNA contaminante. La transcripción reversa (RT) del ARN aislado y obtención de la primera hebra de cDNA se llevó a cabo usando cebadores aleatorios (“random primers”) y el kit de la transcriptasa reversa SuperScript II, de Invitrogen. Una vez finalizada la reacción de RT, los cDNAs obtenidos se guardaron a -20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR a tiempo real

Las secuencias de los cebadores utilizados se obtuvieron bien de la literatura o bien mediante diseño propio utilizando el programa informático “Biology Workbench Software” (<http://workbench.sdsc.edu/>), según se describe en la Tabla I. Los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). Para cada reacción de amplificación del cDNA de partida, las reacciones de PCR se prepararon mezclando 50 ng de cDNA, cebadores (sentido y anti-sentido) a 0.5 µM cada uno, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, tampón para PCR sin Mg 1X, y Taq DNA polimerasa a 25 µU/ml (Invitrogen). El termociclador se programó para realizar típicamente 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, otro de hibridación a 55 - 60°C durante 30 segundos, y otro de elongación a 72°C durante 30 segundos. Los productos de PCR resultantes de la amplificación se visualizaron en un gel con agarosa al 2% y bromuro de etidio y se fotografiaron. No se detectó ningún producto de PCR en los controles negativos, que consistieron en las mismas muestras de ARN de partida, procesadas en paralelo pero en ausencia de la enzima transcriptasa reversa (muestras -RT).

Los niveles de expresión de ARNm específicos en corteza cerebral control y lesionada fueron semi-cuantificados utilizando la técnica de PCR a tiempo real, para lo que se utilizó el sistema “iQ SYBR Green Supermix” de BioRad (Hercules, CA, USA). Las reacciones se prepararon para un volumen final de 20 µl mezclando 50 ng de cDNA de partida (obtenido del ARN total como se indicó anteriormente), SYBR Green Supermix 1X, y cebadores (sentido y anti-sentido) a 0.5 µM cada uno. Los niveles del ARNm de GAPDH en cada muestra se usaron para normalizar los valores de otros ARNm objeto de estudio. Cada determinación se hizo de forma independiente en un mínimo de 3 animales por condición, y cada muestra se analizó por duplicado. La amplificación se realizó con un paso inicial de 2 min a 50°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/polimerización a 56-60°C

(dependiendo de los cebadores) durante 1 min. Finalmente, la especificidad de la amplificación se confirmó mediante un análisis de “melting-curve” de los productos de PCR. La PCR a tiempo real se llevó a cabo en la termocicladora MiniOpticon de BioRad (Hercules, CA, USA). La expresión relativa de cada ARNm se calculó como $2^{-\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = Ct$ (ARNm diana) - Ct (GAPDH), y los valores obtenidos para las lesiones se normalizaron respecto a los obtenidos en corteza cerebral control.

TABLA 1

Secuencias de los cebadores utilizados para PCR y/o PCR a tiempo real

10

Proteína	Secuencia de los cebadores (5' - 3')	Pb	Fuente de obtención de la secuencia
EGF	Fw: ATAGTTATCCAGGATGCCCAT (SEQ ID NO 9)	121	Marjou et al. (2000)
	Rw: CGATCCCCAGAATAGCCAAT (SEQ ID NO 10)		
TGF α	Fw: CCAGATTCCCACACTCAGT (SEQ ID NO 11)	121	Marjou et al. (2000)
	Rw: GGAGGTCTGCATGCTCACA (SEQ ID NO 12)		
HB-EGF	Fw: TGCAGATACCTGCAGGAGTT (SEQ ID NO 13)	154	Marjou et al. (2000)
	Rw: ACGACACTACTGCAGCCACCA (SEQ ID NO 14)		
Anfiregulina	Fw: TCATGGCGAATGCAGATACA (SEQ ID NO 15)	144	Marjou et al. (2000)
	Rw: GCTACTACTGCAATCTTGGA (SEQ ID NO 16)		
TBP	Fw: CCACGGACAACCTGCGTTGAT (SEQ ID NO 17)	236	Marjou et al. (2000)
	Rw: GGCTCATAGCTACTGAACTG (SEQ ID NO 18)		
GAPDH	Fw: TGACGTGCCGCTGGAGAAA (SEQ ID NO 19)	98	http://workbench.sdsc.edu

50

55

60

65

	ID NO 19)		
	Rw: AGTGTAGCCCAAGATGCCCTT (SEQ		
5	ID NO 20)		
	Fw: CACAAAGGAAGCTGACCTGGTT		
	(SEQ ID NO 21)		
10	ADAM-17 Rw: TTCATCCACCCTGGAGTTGCCA	271	Paulissen et al. (2006), modificado para ratón
	(SEQ ID NO 22)		
	Fw: TTTGGATCTCCACATGATTCTG (SEQ		
15	ADAM-10 ID NO 23)	209	Paulissen et al. (2006), modificado para ratón
	Rw: GGCTGGCCAGATTCAACAAAAC		
	(SEQ ID NO 24)		
20	Fw: AGATGGATATGTACAGGATGGGGT		
	(SEQ ID NO 25)		
	ADAM-21 Rw: TCACAGTGGACTTTCCCACA (SEQ	240	http://workbench.sdsc.edu
	ID NO 26)		
25	Fw: GGAATTGTCATGGACCATTTCAG		
	(SEQ ID NO 27)		
30	ADAM-12 Rw: TTCCTGCTGCAACTGCTGAACA	190	Paulissen et al. (2006)
	(SEQ ID NO 28)		

Immunocitoquímica y análisis de marcadores celulares

35 Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min, se permeabilizaron y se bloquearon las uniones inespecíficas con PBS + 0.2% de Tritón X-100 + 2.5% de albúmina sérica bovina (BSA) durante 30 min, y a continuación se incubaron en la misma solución de bloqueo con los anticuerpos primarios, toda la noche a 4°C. Tras hacer 3 lavados de 5 min con PBS, las células se incubaron durante 90 min con anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos, diluidos entre 1:1000 y 1:5000 en la misma solución de bloqueo. Después de 3 lavados más con PBS, los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Los cubres con las células inmunoteñidas se montaron sobre portas usando la solución de montaje protectora de fluorescencia de Biomeda (Foster City, CA, USA). Para cuantificar el número de células que expresaban un marcador específico, se utilizó un microscopio de epifluorescencia BX60 de Olympus, y se expresaron los resultados como porcentaje del número total de células presentes en los mismos campos visuales, detectables por el mareaje nuclear con DAPI. Los experimentos se repitieron un mínimo de 3 veces, usando cubres triplicados para cada condición experimental, y se analizaron entre 5 y 8 campos visuales por cubre. Para los análisis de doble mareaje y colocalización, se usó un microscopio confocal Leica SP2. Como control negativo de las inmunotinciones se usaron muestras procesadas paralelamente pero en ausencia de los anticuerpos primarios, y en estas condiciones no se observó ninguna señal detectable. Anticuerpos primarios utilizados: Anti-nestina policlonal hecho en cabra (R-20, 1:500), anti-TGFalfa monoclonal hecho en ratón (1:50) y anti-TGFalpha policlonal hecho en conejo (1:50), todos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP, 1:5000) policlonal hecho en conejo y anti-bromodeoxiuridina (BrdU; 1:50) monoclonal hecho en ratón de Dako (High Wycombe, UK); anti-β-tubulin isotype III monoclonal (1:400) de StemCell Technologies (Vancouver, BC, Cañada); anti-Ki67 policlonal hecho en conejo (1:1000) de Vector (Burlingame, CA, USA); anti-ADAM-17 policlonal hecho en conejo (1:200) de Chemicon (Temecula, CA, USA); y anti-ADAM-10 policlonal hecho en conejo (1:500) de Abcam (Cambridge, MA, USA). Anticuerpos secundarios utilizados: Todos eran específicos de especie, testados para no dar reacciones cruzadas con otras especies. Anti-IgG (H+L) de ratón hecho en cabra o anti-IgG (H+L) de conejo hecho en cabra marcados con los fluorescentes Alexa Fluor 568 (1:5000) o Alexa Fluor 488 (1:1000), y anti-IgG (H+L) de cabra hecho en burro marcado con Alexa Fluor 647 (1:1000) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen, OR, USA); anti-IgG (H+L) de ratón hecho en burro y conjugado con Cy3 se obtuvo de Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA).

Resultados

65 Diferenciación glial de precursores neurales transplantados a una zona de lesión cerebral

Se efectuaron lesiones mecánicas en la corteza cerebral motora de ratones adultos, como se describe en el apartado de métodos. En la figura 1A se muestra el corte coronal del cerebro en que se muestra la localización de la lesión

cortical (los núcleos de las células se tiñeron con yodo de propicio (PI)). Simultáneamente se depositaron en la zona lesionada precursores neurales aislados de la zona subventricular de ratones singénicos postnatales P7, que habían sido mantenidos en cultivos de neuroesferas e infectados con un lentivirus que indujo la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las células (figura 1B). Siete días después, los animales se perfundieron con paraformaldehído y el cerebro se procesó para la detección inmunohistoquímica de marcadores de distintos fenotipos celulares.

Al cabo de siete días, se observó que las células transplantadas expresaban la proteína GFAP, específica de astrocitos (Figura 1C). No se cumplió por tanto el objetivo buscado al hacer el trasplante.

Expresión de novo de nestina, EGFR y ADAM-17 en la zona de lesión cortical

En el mismo modelo de lesión cerebral, se llevó a cabo una tinción simultánea con anticuerpos específicos para nestina (verde) y EGFR (rojo) (figura 2A-B). Se observó la aparición en la zona de la lesión de células positivas para nestina, que también expresaban el receptor. Por otra parte, se llevó a cabo una tinción simultánea con yodo de propicio (PI, rojo) y con anticuerpos específicos para nestina (azul) y ADAM-17 (verde) (figura 2C-E). Así, se pudo observar que, siete días después de la intervención, se producía expresión *de novo* de EGFR y de ADAM-17 en la zona que rodeaba la lesión, mayoritariamente en células que también expresaba nestina, que es un marcador de precursores neurales.

La activación del EGFR inhibe la generación de neuroblastos a partir de células madre neurales y facilita la generación de glía

Precursores derivados de células madre neurales se cultivaron en condiciones de diferenciación durante 24 horas. Posteriormente se añadieron EGF, agonista del EGFR, AG1478, inhibidor del EGFR, o ambos, y se mantuvieron las células en esas condiciones durante 72 horas. Posteriormente se fijaron las células y mediante inmunocitoquímica se identificaron las neuronas mediante el marcador específico de neuronas beta III tubulina (rojo) y la glía mediante el marcador específico de células gliales GFAP (verde), y se cuantificaron las células.

El análisis de estos cultivos de precursores neurales demostró que, al cabo de cuatro días en cultivo, se producía una población mixta compuesta de aproximadamente un 30% de células gliales que contenían GFAP, y un 12% de neuroblastos, que expresaban beta III tubulina (Figura 3A, D, E), además de otras células que no expresaban ninguno de estos marcadores. En estas condiciones, la proliferación era prácticamente nula, como se pudo comprobar tras la incubación de las células con el análogo de timidina bromodeoxiuridina (BrdU) durante las últimas 24 horas de cultivo. Además sólo el $1.6 \pm 0.2\%$ ($n=4$) de las células incorporaron BrdU y sólo el 8% de las células eran positivas para el marcador de ciclo celular Ki67. La adición al cultivo del factor de crecimiento EGF aumentó significativamente el número de células (Figura 3B, F) porque incrementó la proliferación celular ($30.7 \pm 2.1\%$ células Ki67+, $n=3$) al mismo tiempo que aumentaba el porcentaje de células gliales y disminuía el porcentaje de precursores neuronales (Figura 3B, D, E). Todos estos efectos del EGF podían prevenirse con el inhibidor del receptor de EGF AG1478. Curiosamente, en ausencia de EGF, este inhibidor seguía teniendo efecto sobre la diferenciación: disminuía aún más el porcentaje de células gliales y aumentaba aún más el número de neuroblastos (Figura 3C, D, E), lo que sugiere que en el cultivo se estaban liberando de forma espontánea ligandos endógenos capaces de mantener activado al EGFR.

La inhibición de la actividad metaloproteasa mimetiza los efectos del EGF

Los ligandos del receptor de EGF pueden ser liberados por la acción de metaloproteasas de la familia ADAM. Con el fin de determinar si las metaloproteasas desempeñaban algún papel en la diferenciación glial y neuronal, se disminuyó su actividad con el inhibidor de amplio espectro GM6001, en los cultivos anteriormente citados. Los resultados que se presentan en la figura 4 muestran cómo la adición de GM6001 a los cultivos disminuía la diferenciación glial y aumentaba la neuronal (Figura 4A-E).

Los efectos del inhibidor del EGFR AG1478 y del inhibidor GM6001 no eran aditivos (Figura 4F), lo que sugiere que ambos comparten un mismo mecanismo de acción, y que algún ligando del EGFR está siendo liberado por la metaloproteasa. En cambio, el efecto de la adición de noggin, una molécula que inhibe la diferenciación glial por otros mecanismos que no implican al receptor de EGF, sí era aditivo al efecto del GM6001 (Figura 4G).

Las células madre neurales de la zona subventricular del cerebro de ratón postnatal expresan varias proteasas de la familia ADAM y ligandos de EGFR tanto en condiciones de proliferación como en condiciones de diferenciación

Se llevó a cabo una transcripción inversa (RT-PCR) para la detección de los ARNm de varios ligandos de EGFR y varias metaloproteasas de interés en cultivos de neuroesferas (NF) y de células diferenciadas (Ad). Los controles negativos empleados fueron las mismas muestras procesadas en ausencia de transcriptasa reversa (RT-). TBP se usó como control interno.

Mediante la RT-PCR se pudo comprobar la expresión de ADAM 17 y ADAM 10 tanto en neuroesferas como en células adheridas (Figura 5A). ADAM-12 también se expresaba en neuroesferas pero disminuía tras la diferenciación. ADAM21 estaba ausente en los cultivos de neuroesferas, pero sin embargo se expresaba ligeramente en células adheridas. No se detectó en estos cultivos expresión del factor de crecimiento EGF mientras que TGF- α HB-EGF y anfirregulina sí se expresaban en neuroesferas. Tras la adhesión la expresión de TGF- α se mantenía mientras que la de HB-EGF disminuía, al mismo tiempo que desaparecía la de anfirregulina (Figura 5A).

Mediante inmunocitoquímica se comprobó que las proteínas TGF- α y ADAM-17 se expresaban prácticamente en la totalidad de las células presentes en los cultivos (Figura 5B-E).

La metaloproteasa ADAM-17 participa en la determinación del destino neuronal o glial de los precursores neurales

Se cultivaron precursores derivados de células madre neurales en condiciones de diferenciación durante 18 horas. La transfección con los siRNA específicos se hizo utilizando lipofectamina.

Para determinar qué enzima de la familia ADAM participaba específicamente en la diferenciación de los precursores neurales, se añadieron a los cultivos ARN interferentes que inhibieron específicamente la expresión de ADAM-10 o de ADAM-17 (Figura 6A, B). La inhibición de ADAM 17 disminuyó la diferenciación glial (Figura 6C) y produjo un aumento importante del número de neuroblastos generados (Figura 6D), siendo el efecto encontrado similar al ejercido por el GM6001. En cambio, la inhibición de ADAM-10 no afectó a la diferenciación glial o neuronal (Figura 6C, D).

La expresión de ADAM 17 y TGF- α está inducida en lesiones corticales de ratón

Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se analizó la expresión de ADAM-10 y ADAM-17 en el tejido cortical adyacente a lesiones inducidas 7 días antes en la corteza frontoparietal de ratones adultos. En la zona adyacente a la lesión (Ipsil) se podía observar un aumento de ARNm de ADAM-17, aunque no de ADAM-10, en comparación con la región equivalente de la corteza cerebral contralateral (Contral) o con la corteza cerebral de ratones intactos no lesionados (Naive). Del mismo modo, la expresión de TGF- α estaba también aumentada en la proximidad de la zona lesionada (Figura 7A). Estos resultados han sido corroborados mediante estudios de inmunofluorescencia que han demostrado que, en la zona adyacente a la lesión, existe un aumento de la proteína TGF- α , en comparación con el hemisferio contralateral (Figura 7B, C), así como una expresión *de novo* de la proteína ADAM-17, ausente en la corteza cerebral del ratón adulto normal (Figura 7D, E).

Las células que expresan nestina y que se acumulan en el tejido lesionado tienen la maquinaria molecular necesaria para la liberación de ligandos de EGFR y la activación del receptor

Estudios de inmunofluorescencia han permitido demostrar que una semana después de inducir la lesión mecánica en la corteza cerebral, tal como se ha descrito, la expresión de GFAP, el marcador glial, aumentaba en el área cercana a la lesión y en menor medida en todo el hemisferio cerebral donde se encontraba la zona lesionada. Asimismo, aparecieron numerosas células marcadas con nestina, característica propia de precursores neurales, muchas de las cuales también eran positivas para el marcador glial. ADAM-17 se localizaba de forma casi exclusiva en las células que tenían nestina (Figura 8A-C), pero sólo ocasionalmente en células con GFAP. TGF- α se localizó tanto en células positivas para nestina (Figura 8D-F) como para GFAP (Figura 8H-K). Son por tanto las células que expresan nestina, posiblemente precursores neurales multipotenciales, las que tienen en su membrana la triada de proteínas ADAM-17, TGF- α , EGFR, necesarias y suficientes para que se activen las rutas de señalización celular iniciadas por el EGFR y que conducen a la proliferación y a la diferenciación glial.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.
2. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde la regeneración neuronal se produce a partir de precursores neurales endógenos.
- 10 3. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde la regeneración neuronal se produce a partir de trasplantes de células madre neurales o precursores neurales.
4. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde dicho agente es un inhibidor de la actividad general de las metaloproteasas.
- 15 5. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 4, donde dicho agente es la molécula GM6001.
6. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde dicho agente es un inhibidor específico de la actividad de la proteína ADAM-17.
- 20 7. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 6, seleccionado entre una sustancia de naturaleza química, nucleotídica, peptídica o proteica que bloquea o disminuye la actividad de la proteína ADAM-17.
- 25 8. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 7, donde el agente inhibidor comprende una molécula de ADN que codifica para un péptido o proteína que bloquea o disminuye la actividad de la proteína ADAM-17.
9. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 8, donde la molécula de ADN codifica para una forma mutante dominante negativo de la proteína ADAM-17.
- 30 10. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde el inhibidor es una secuencia de nucleótidos que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína ADAM-17.
11. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 10, donde el inhibidor es una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen ADAM-17 o del ARNm que codifica para la proteína ADAM-17.
- 35 12. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 11, donde la secuencia de nucleótidos antisentido está dirigida contra cualquier región del ARNm que codifica para la proteína ADAM-17.
- 40 13. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 10, donde el inhibidor es una ribozima específica del ARNm de la proteína ADAM-17.
14. Uso de un agente inhibidor según la reivindicación 10, donde el inhibidor es un aptámero específico del ARNm de la proteína ADAM-17.
- 45 15. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 10, donde el inhibidor es un ARN de interferencia (ARNi) específico del ARNm de la proteína ADAM-17.
- 50 16. Uso de un agente inhibidor, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento comprende además al menos un vehículo y/o al menos un excipiente y/o al menos un aditivo y/o al menos otro ingrediente activo farmacéuticamente aceptables.
17. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 16, donde el medicamento comprende además un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de EGFR.
- 55 18. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 17, donde el agente inhibidor de EGFR se usa simultánea, secuencial o separadamente con el agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17.
19. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde el medicamento se administra directa y localmente sobre la lesión cerebral.
- 60 20. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 19, donde la administración se lleva a cabo mediante sistemas de perfusión.
- 65 21. Uso de un agente inhibidor, según la reivindicación 1, donde el medicamento se administra de forma indirecta por vía oral, inyección intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

22. Uso de un agente inhibidor, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las lesiones del sistema nervioso central están causadas por trauma, isquemia cerebral o enfermedades neurodegenerativas.

5 23. Uso de un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17, tal y como aparece definido en cualquiera de las reivindicaciones 8-15, en la preparación de un medicamento para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero en necesidad de dicho tratamiento.

10 24. Uso de un vector, según la reivindicación 23, donde dicho vector es un vector de expresión.

25. Uso de un vector, según la reivindicación 24, donde el vector es plasmídico y/o vírico.

26. Uso de un vector, según la reivindicación 25, donde el vector es lentiviral o adenoviral.

15 27. Composición farmacéutica que comprende un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17, tal y como aparece definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-26, para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central.

20 28. Método de screening para identificar agentes que favorezcan la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central que comprende:

a. poner en contacto el gen o proteína ADAM-17 con el agente a ensayar, y

25 b. determinar si el agente inhibe la actividad y/o expresión de dicho gen o proteína.

30

35

40

45

50

55

60

65

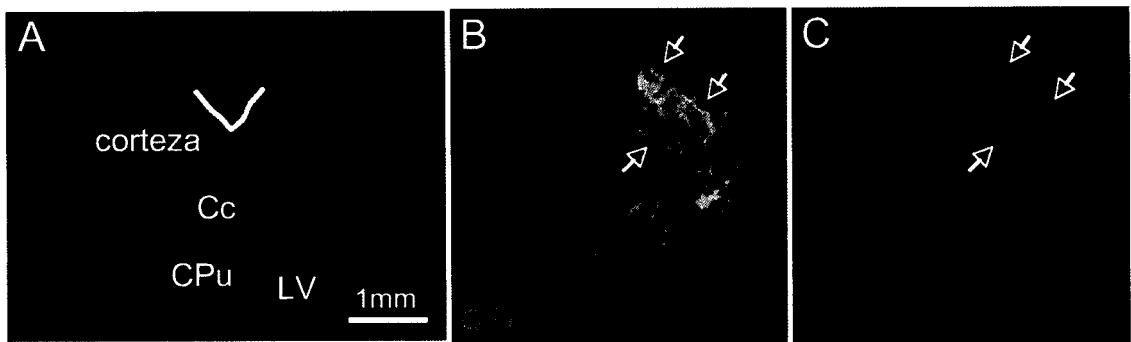


FIGURA 1

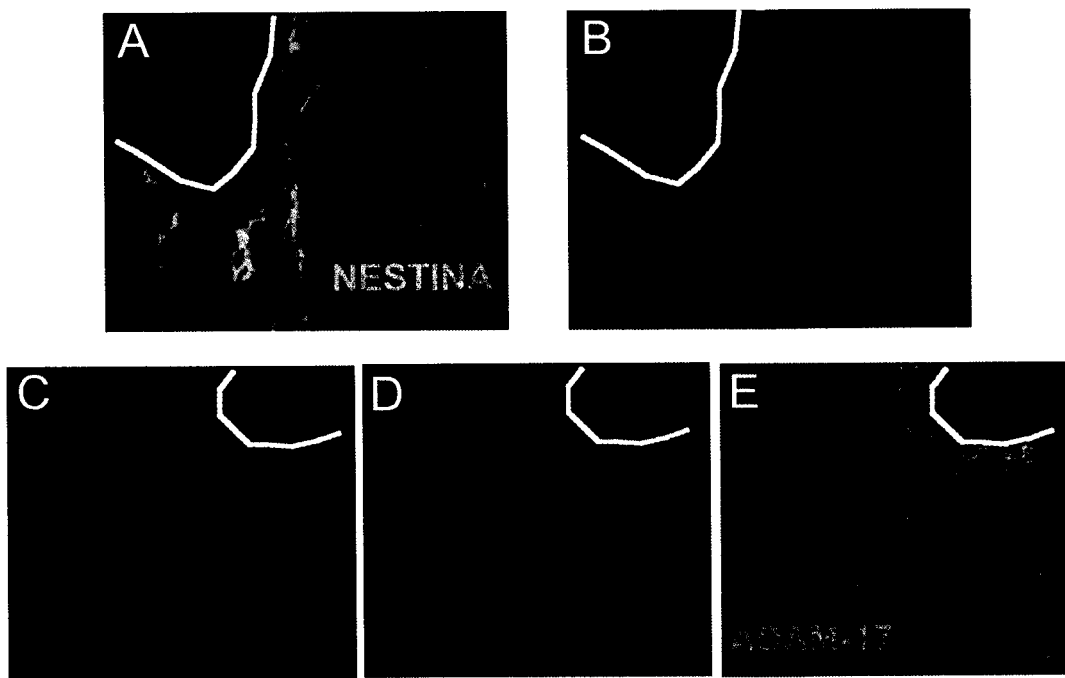


FIGURA 2

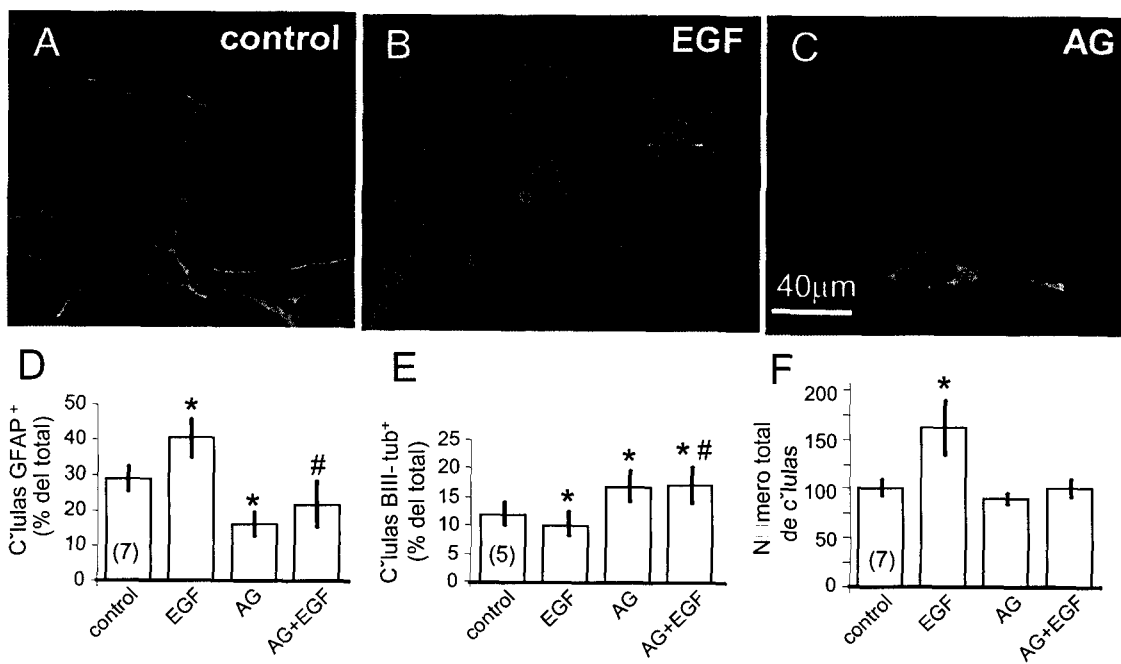


FIGURA 3

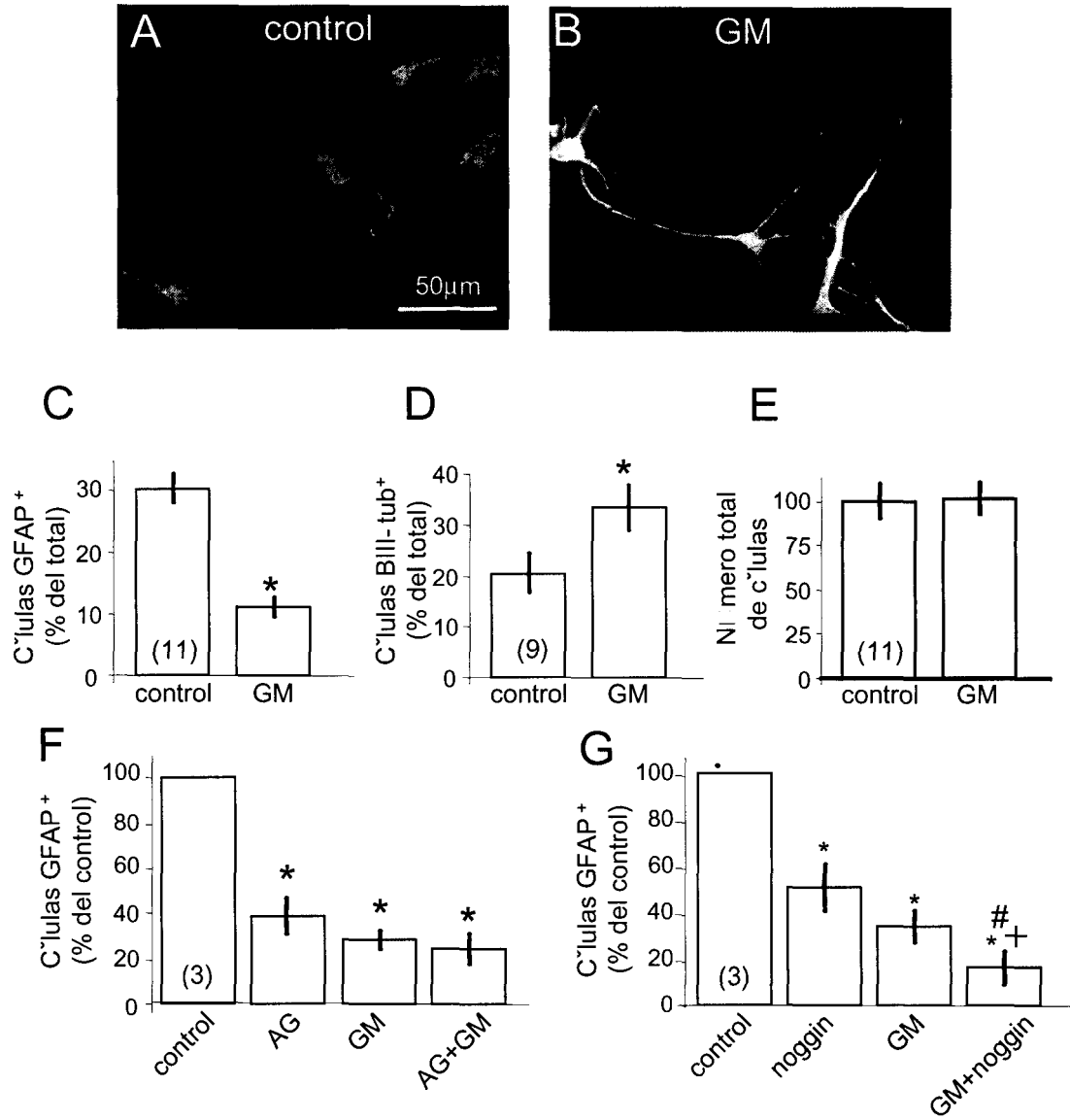


FIGURA 4

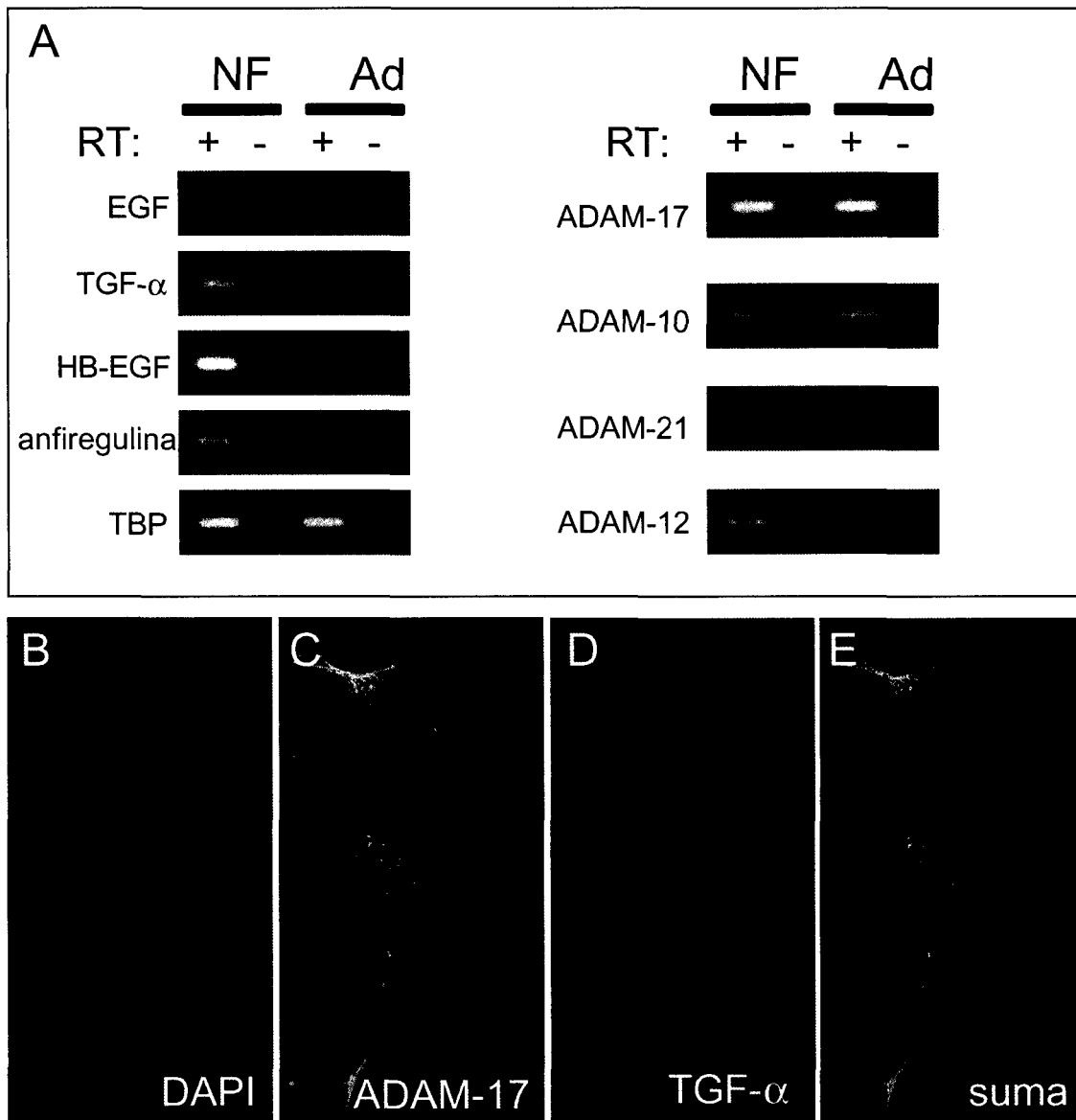


FIGURA 5

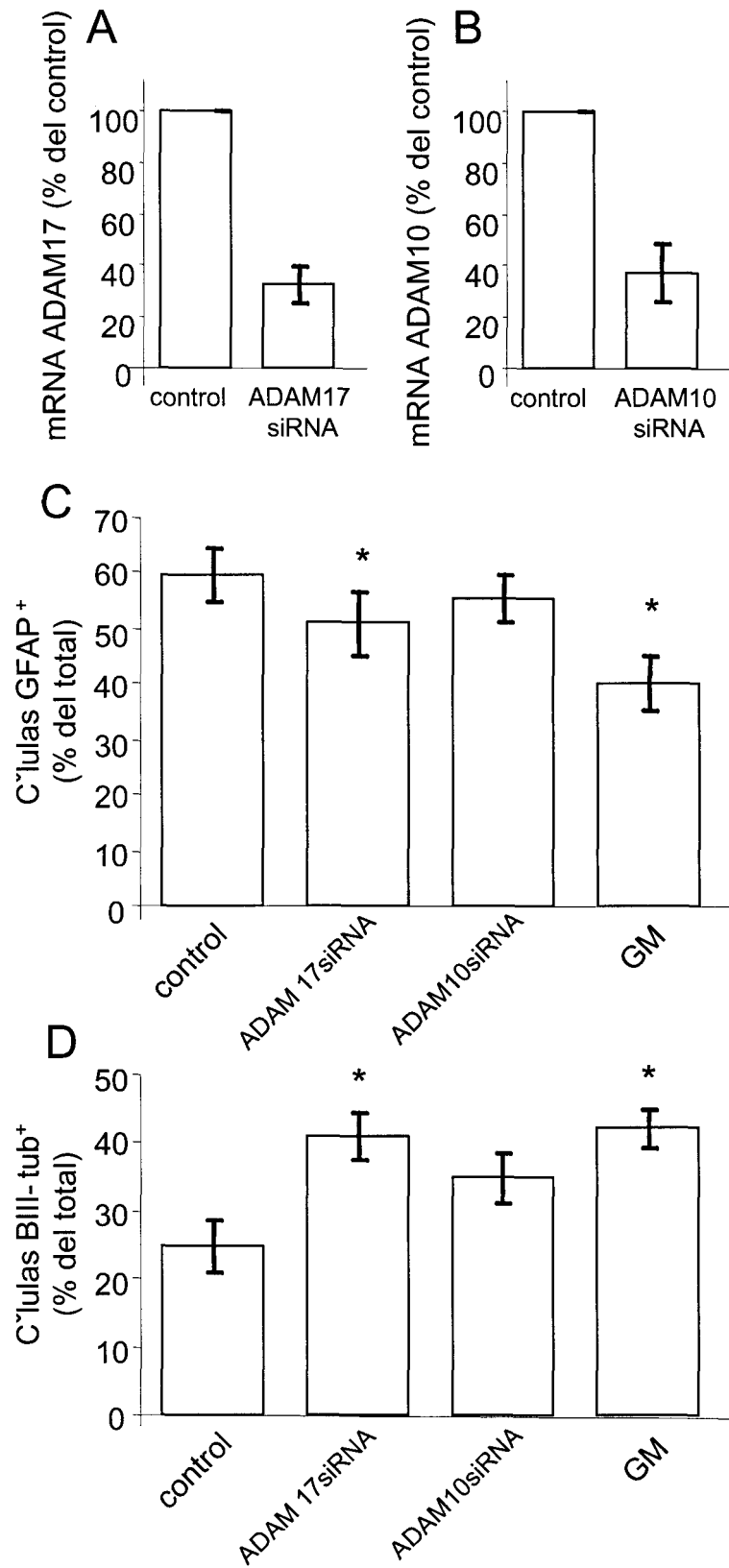


FIGURA 6

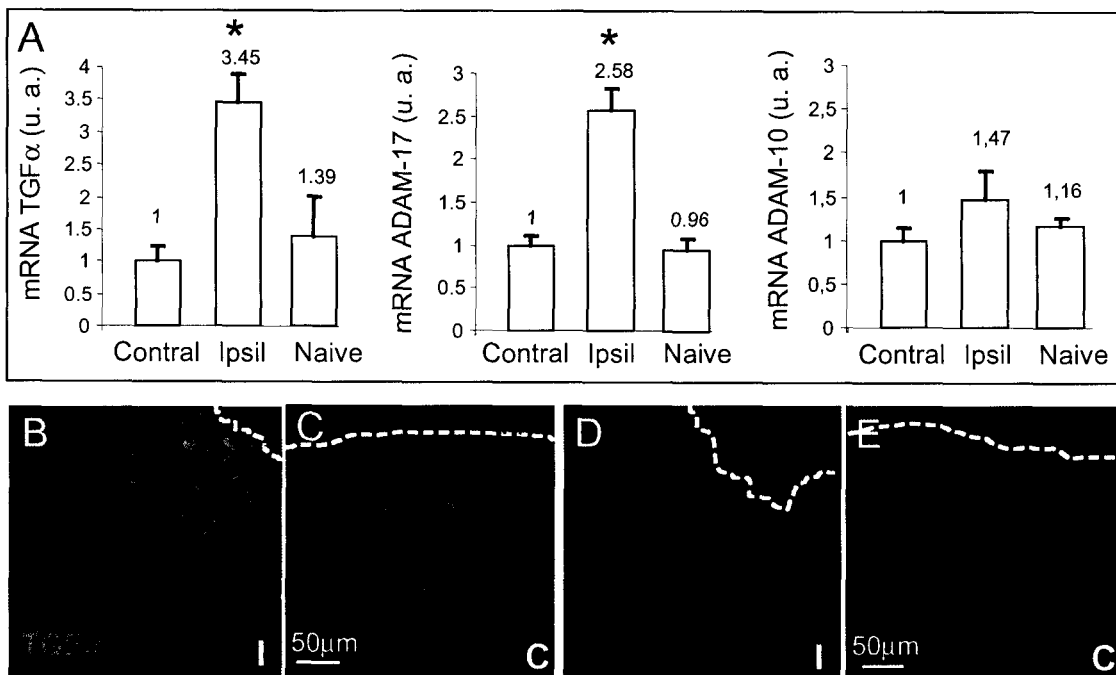


FIGURA 7

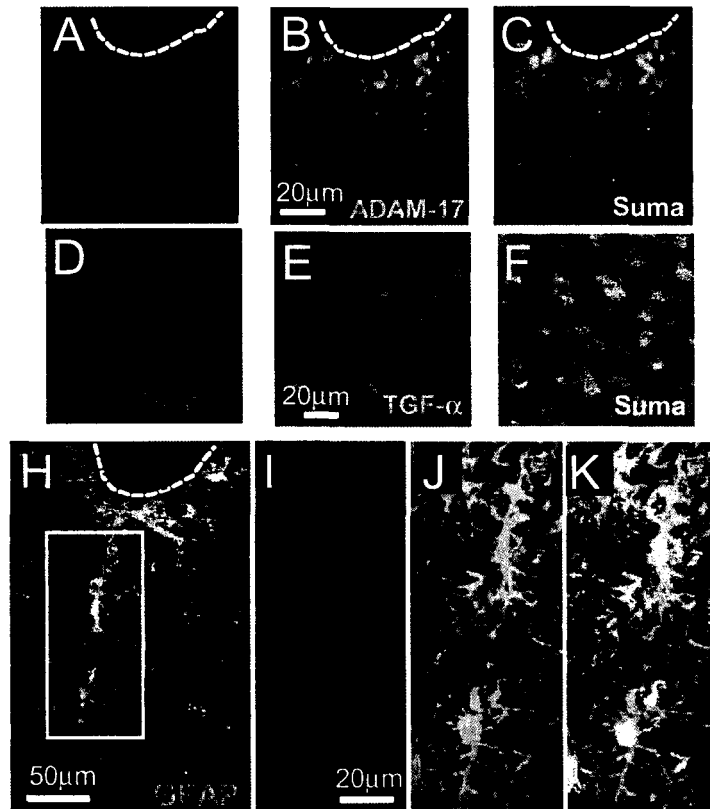


FIGURA 8

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Cádiz

5 <120> EMPLEO DE INHIBIDORES DE ADAM-17 EN REGENERACIÓN NEURONAL

<130> ---

10 <160> 28

<170> PatentIn version 3.3

15 <210> 1

<211> 824

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> ADAM-17

25 <400> 1

Met Arg Gln Ser Leu Leu Phe Leu Thr Ser Val Val Pro Phe Val Leu
1 5 10 15

30 Ala Pro Arg Pro Pro Asp Asp Pro Gly Phe Gly Pro His Gln Arg Leu
20 25 30

35 Glu Lys Leu Asp Ser Leu Leu Ser Asp Tyr Asp Ile Leu Ser Leu Ser
35 40 45

40 Asn Ile Gln Gln His Ser Val Arg Lys Arg Asp Leu Gln Thr Ser Thr
50 55 60

His Val Glu Thr Leu Leu Thr Phe Ser Ala Leu Lys Arg His Phe Lys
65 70 75 80

45 Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Thr Glu Arg Phe Ser Gln Asn Phe Lys Val
85 90 95

50 Val Val Val Asp Gly Lys Asn Glu Ser Glu Tyr Thr Val Lys Trp Gln
100 105 110

Asp Phe Phe Thr Gly His Val Val Gly Glu Pro Asp Ser Arg Val Leu
115 120 125

55 Ala His Ile Arg Asp Asp Asp Val Ile Ile Arg Ile Asn Thr Asp Gly
130 135 140

60 Ala Glu Tyr Asn Ile Glu Pro Leu Trp Arg Phe Val Asn Asp Thr Lys
145 150 155 160

Asp Lys Arg Met Leu Val Tyr Lys Ser Glu Asp Ile Lys Asn Val Ser
165 170 175

65 Arg Leu Gln Ser Pro Lys Val Cys Gly Tyr Leu Lys Val Asp Asn Glu
180 185 190

ES 2 361 312 B2

Glu Leu Leu Pro Lys Gly Leu Val Asp Arg Glu Pro Pro Glu Glu Leu
 195 200 205
 5 Val His Arg Val Lys Arg Arg Ala Asp Pro Asp Pro Met Lys Asn Thr
 210 215 220
 10 Cys Lys Leu Leu Val Val Ala Asp His Arg Phe Tyr Arg Tyr Met Gly
 225 230 235 240
 15 Arg Gly Glu Glu Ser Thr Thr Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Leu Ile Asp
 245 250 255
 20 Arg Val Asp Asp Ile Tyr Arg Asn Thr Ser Trp Asp Asn Ala Gly Phe
 260 265 270
 25 Lys Gly Tyr Gly Ile Gln Ile Glu Gln Ile Arg Ile Leu Lys Ser Pro
 275 280 285
 30 Gln Glu Val Lys Pro Gly Glu Lys His Tyr Asn Met Ala Lys Ser Tyr
 290 295 300
 35 Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Trp Asp Val Lys Met Leu Leu Glu Gln
 305 310 315 320
 Phe Ser Phe Asp Ile Ala Glu Glu Ala Ser Lys Val Cys Leu Ala His
 325 330 335
 40 Leu Phe Thr Tyr Gln Asp Phe Asp Met Gly Thr Leu Gly Leu Ala Tyr
 340 345 350
 45 Val Gly Ser Pro Arg Ala Asn Ser His Gly Gly Val Cys Pro Lys Ala
 355 360 365
 Tyr Tyr Ser Pro Val Gly Lys Lys Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Gly Leu
 370 375 380
 50 Thr Ser Thr Lys Asn Tyr Gly Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu Ala Asp
 385 390 395 400
 55 Leu Val Thr Thr His Glu Leu Gly His Asn Phe Gly Ala Glu His Asp
 405 410 415
 60 Pro Asp Gly Leu Ala Glu Cys Ala Pro Asn Glu Asp Gln Gly Gly Lys
 420 425 430
 Tyr Val Met Tyr Pro Ile Ala Val Ser Gly Asp His Glu Asn Asn Lys
 435 440 445
 65 Met Phe Ser Asn Cys Ser Lys Gln Ser Ile Tyr Lys Thr Ile Glu Ser
 450 455 460

ES 2 361 312 B2

Lys Ala Gln Glu Cys Phe Gln Glu Arg Ser Asn Lys Val Cys Gly Asn
 465 470 475 480
 5 Ser Arg Val Asp Glu Gly Glu Glu Cys Asp Pro Gly Ile Met Tyr Leu
 485 490
 10 Asn Asn Asp Thr Cys Cys Asn Ser Asp Cys Thr Leu Lys Glu Gly Val
 500 505 510
 15 Gln Cys Ser Asp Arg Asn Ser Pro Cys Cys Lys Asn Cys Gln Phe Glu
 515 520 525
 Thr Ala Gln Lys Lys Cys Gln Glu Ala Ile Asn Ala Thr Cys Lys Gly
 530 535 540
 20 Val Ser Tyr Cys Thr Gly Asn Ser Ser Glu Cys Pro Pro Pro Gly Asn
 545 550 555 560
 25 Ala Glu Asp Asp Thr Val Cys Leu Asp Leu Gly Lys Cys Lys Asp Gly
 565 570 575
 30 Lys Cys Ile Pro Phe Cys Glu Arg Glu Gln Gln Leu Glu Ser Cys Ala
 580 585 590
 35 Cys Asn Glu Thr Asp Asn Ser Cys Lys Val Cys Cys Arg Asp Leu Ser
 595 600 605
 40 Gly Arg Cys Val Pro Tyr Val Asp Ala Glu Gln Lys Asn Leu Phe Leu
 610 615 620
 45 Arg Lys Gly Lys Pro Cys Thr Val Gly Phe Cys Asp Met Asn Gly Lys
 625 630 635 640
 50 Cys Glu Lys Arg Val Gln Asp Val Ile Glu Arg Phe Trp Asp Phe Ile
 645 650 655
 55 Asp Gln Leu Ser Ile Asn Thr Phe Gly Lys Phe Leu Ala Asp Asn Ile
 660 665 670
 Val Gly Ser Val Leu Val Phe Ser Leu Ile Phe Trp Ile Pro Phe Ser
 675 680 685
 60 Ile Leu Val His Cys Val Asp Lys Lys Leu Asp Lys Gln Tyr Glu Ser
 690 695 700
 65 Leu Ser Leu Phe His Pro Ser Asn Val Glu Met Leu Ser Ser Met Asp
 705 710 715 720
 Ser Ala Ser Val Arg Ile Ile Lys Pro Phe Pro Ala Pro Gln Thr Pro
 725 730 735

ES 2 361 312 B2

Gly Arg Leu Gln Pro Ala Pro Val Ile Pro Ser Ala Pro Ala Ala Pro
 740 745 750
 5 Lys Leu Asp His Gln Arg Met Asp Thr Ile Gln Glu Asp Pro Ser Thr
 755 760 765
 10 Asp Ser His Met Asp Glu Asp Gly Phe Glu Lys Asp Pro Phe Pro Asn
 770 775 780
 15 Ser Ser Thr Ala Ala Lys Ser Phe Glu Asp Leu Thr Asp His Pro Val
 785 790 795 800
 20 Thr Arg Ser Glu Lys Ala Ala Ser Phe Lys Leu Gln Arg Gln Asn Arg
 805 810 815
 25 Val Asp Ser Lys Glu Thr Glu Cys
 820

<210> 2

25 <211> 1698

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

30 <220>

<223> Secuencia Mutante ADAM17 delección TM 215-473

<400> 2

35 atgaggcagt ctctcctatt cctgaccagc gtggttcctt tcgtgctggc gccgcgacct 60
 ccggatgacc cgggcttcgg ccccaccag agactcgaga agcttgattc tttgctctca 120
 40 gactacgata ttctctcttt atctaatac cagcagcatt cggtaaagaa aagagatcta 180
 cagacttcaa cacatgtaga aacactacta actttttcag ctttgaaaag gcatttttaa 240
 ttatacctga catcaagtac tgaacgtttt tcacaaaatt tcaaggctcg ggtggtggat 300
 45 ggtaaaaacg aaagcgagta cactgtaaaa tggcaggact tcttactgg acacgtggtt 360
 ggtgagcctg actctagggt tctagcccac ataagagatg atgatgttat aatcagaatc 420
 aacacagatg gggccgaata taacatagag ccactttgga gatttgttaa tgataccaaa 480
 50 gacaaaagaa tgtagttta taaatctgaa gatatcaaga atgtttcacg tttgcagtct 540
 ccaaaagtgt gtggttattt aaaagtggat aatgaagagt tgctcccaaa agggttagta 600
 55 gacagagaac cacctgaaga gcttgttcat cgagtgaaaa gaagcaataa agtttgtggg 660
 aactcgaggg tggatgaagg agaagagtgt gatcctggca tcatgtatct gaacaacgac 720
 acctgctgca acagcgactg cacgttgaag gaaggtgtcc agtgcagtga caggaacagt 780
 60 ccttgctgta aaaactgtca gtttgagact gcccagaaga agtgccagga ggcgattaat 840
 gctacttgca aaggcgtgtc ctactgcaca ggtaatagca gtgagtgcc gcctccagga 900
 65 aatgctgaag atgacactgt ttgcttggat cttggcaagt gtaaggatgg gaaatgcatc 960
 cctttctgcg agaggggaaca gcagctggag tcctgtgcat gtaatgaac tgacaactcc 1020

ES 2 361 312 B2

5 tgcaaggtgt gctgcagga ctttctggc cgctgtgtgc cctatgtcga tgctgaacaa 1080
 aagaacttat ttttgaggaa aggaaagccc tgtacagtag gattttgtga catgaatggc 1140
 10 aaatgtgaga aacgagtaca ggatgtaatt gaacgatttt gggatttcat tgaccagctg 1200
 agcatcaata cttttggaaa gtttttagca gacaacatcg ttgggtctgt cctggttttc 1260
 tccttgatat tttggattcc tttcagcatt cttgtccatt gtgtggataa gaaattggat 1320
 15 aaacagtatg aatctctgtc tctgtttcac cccagtaacg tcgaaatgct gagcagcatg 1380
 gattctgcat cggttcgcac tatcaaacc tttcctgctc cccagactcc aggccgcctg 1440
 cagcctgccc ctgtgatccc ttcggcgcca gcagctccaa aactggacca ccagagaatg 1500
 20 gacaccatcc aggaagacc cagcacagac tcacatatgg acgaggatgg gtttgagaag 1560
 gacccttcc caaatagcag cacagctgcc aagtcatttg aggatctcac ggaccatccg 1620
 25 gtcaccagaa gtgaaaaggc tgcctccttt aaactgcagc gtcagaatcg tgttgacagc 1680
 aaagaaacag agtgctaa 1698

25 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia antisentido dirigida contra el mRNA de ADAM-17 humana

35 <400> 3
 cctagtcagt gctgttatca 20

40 <210> 4
 <211> 827
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

45 <220>
 <223> Adam-17

50 <400> 4
 Met Arg Arg Arg Leu Leu Ile Leu Thr Thr Leu Val Pro Phe Val Leu
 1 5 10 15
 55 Ala Pro Arg Pro Pro Glu Glu Ala Gly Ser Gly Ser His Pro Arg Leu
 20 25 30
 60 Glu Lys Leu Asp Ser Leu Leu Ser Asp Tyr Asp Ile Leu Ser Leu Ala
 35 40 45
 65 Asn Ile Gln Gln His Ser Ile Arg Lys Arg Asp Leu Gln Ser Ala Thr
 50 55 60
 His Leu Glu Thr Leu Leu Thr Phe Ser Ala Leu Lys Arg His Phe Lys
 65 70 75 80

ES 2 361 312 B2

Leu Tyr Leu Thr Ser Ser Thr Glu Arg Phe Ser Gln Asn Leu Arg Val
 85 90 95
 5 Val Val Val Asp Gly Lys Glu Glu Ser Glu Tyr Ser Val Lys Trp Gln
 100 105 110
 10 Asn Phe Phe Ser Gly His Val Val Gly Glu Pro Asp Ser Arg Val Leu
 115 120 125
 15 Ala His Ile Gly Asp Asp Asp Val Thr Val Arg Ile Asn Thr Asp Gly
 130 135 140
 20 Ala Glu Tyr Asn Val Glu Pro Leu Trp Arg Phe Val Asn Asp Thr Lys
 145 150 155 160
 25 Asp Lys Arg Met Leu Val Tyr Lys Ser Glu Asp Ile Lys Asp Phe Ser
 165 170 175
 30 Arg Leu Gln Ser Pro Lys Val Cys Gly Tyr Leu Asn Ala Asp Ser Glu
 180 185 190
 35 Glu Leu Leu Pro Lys Gly Leu Ile Asp Arg Glu Pro Ser Glu Glu Phe
 195 200 205
 40 Val Arg Arg Val Lys Arg Arg Ala Glu Pro Asn Pro Leu Lys Asn Thr
 210 215 220
 45 Cys Lys Leu Leu Val Val Ala Asp His Arg Phe Tyr Lys Tyr Met Gly
 225 230 235 240
 50 Arg Gly Glu Glu Ser Thr Thr Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Leu Ile Asp
 245 250 255
 55 Arg Val Asp Asp Ile Tyr Arg Asn Thr Ser Trp Asp Asn Ala Gly Phe
 260 265 270
 60 Lys Gly Tyr Gly Val Gln Ile Glu Gln Ile Arg Ile Leu Lys Ser Pro
 275 280 285
 65 Gln Glu Val Lys Pro Gly Glu Arg His Phe Asn Met Ala Lys Ser Phe
 290 295 300
 70 Pro Asn Glu Glu Lys Asp Ala Trp Asp Val Lys Met Leu Leu Glu Gln
 305 310 315 320
 75 Phe Ser Phe Asp Ile Ala Glu Glu Ala Ser Lys Val Cys Leu Ala His
 325 330 335
 80 Leu Phe Thr Tyr Gln Asp Phe Asp Met Gly Thr Leu Gly Leu Ala Tyr
 340 345 350

ES 2 361 312 B2

Val Gly Ser Pro Arg Ala Asn Ser His Gly Gly Val Cys Pro Lys Ala
 355 360 365
 5 Tyr Tyr Asn Pro Thr Val Lys Lys Asn Ile Tyr Leu Asn Ser Gly Leu
 370 375 380
 10 Thr Ser Thr Lys Asn Tyr Gly Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu Ala Asp
 385 390 395 400
 15 Leu Val Thr Thr His Glu Leu Gly His Asn Phe Gly Ala Glu His Asp
 405 410 415
 20 Pro Asp Gly Leu Ala Glu Cys Ala Pro Asn Glu Asp Gln Gly Gly Lys
 420 425 430
 25 Tyr Val Met Tyr Pro Ile Ala Val Ser Gly Asp His Glu Asn Asn Lys
 435 440 445
 30 Met Phe Ser Asn Cys Ser Lys Gln Ser Ile Tyr Lys Thr Ile Glu Ser
 450 455 460
 35 Lys Ala Gln Glu Cys Phe Gln Glu Arg Ser Asn Lys Val Cys Gly Asn
 465 470 475 480
 40 Ser Arg Val Asp Glu Gly Glu Glu Cys Asp Pro Gly Ile Met Tyr Leu
 485 490 495
 45 Asn Asn Asp Thr Cys Cys Asn Ser Asp Cys Thr Leu Lys Pro Gly Val
 500 505 510
 50 Gln Cys Ser Asp Arg Asn Ser Pro Cys Cys Lys Asn Cys Gln Phe Glu
 515 520 525
 55 Thr Ala Gln Lys Lys Cys Gln Glu Ala Ile Asn Ala Thr Cys Lys Gly
 530 535 540
 60 Val Ser Tyr Cys Thr Gly Asn Ser Ser Glu Cys Pro Pro Pro Gly Asp
 545 550 555 560
 65 Ala Glu Asp Asp Thr Val Cys Leu Asp Leu Gly Lys Cys Lys Ala Gly
 565 570 575
 70 Lys Cys Ile Pro Phe Cys Lys Arg Glu Gln Glu Leu Glu Ser Cys Ala
 580 585 590
 75 Cys Val Asp Thr Asp Asn Ser Cys Lys Val Cys Cys Arg Asn Leu Ser
 595 600 605
 80 Gly Pro Cys Val Pro Tyr Val Asp Ala Glu Gln Lys Asn Leu Phe Leu
 610 615 620

ES 2 361 312 B2

Arg Lys Gly Lys Pro Cys Thr Val Gly Phe Cys Asp Met Asn Gly Lys
 625 630 635 640
 5 Cys Glu Lys Arg Val Gln Asp Val Ile Glu Arg Phe Trp Asp Phe Ile
 645 650 655
 10 Asp Gln Leu Ser Ile Asn Thr Phe Gly Lys Phe Leu Ala Asp Asn Ile
 660 665 670
 15 Val Gly Ser Val Leu Val Phe Ser Leu Ile Phe Trp Ile Pro Phe Ser
 675 680 685
 20 Ile Leu Val His Cys Val Asp Lys Lys Leu Asp Lys Gln Tyr Glu Ser
 690 695 700
 25 Leu Ser Leu Phe His His Ser Asn Ile Glu Met Leu Ser Ser Met Asp
 705 710 715 720
 30 Ser Ala Ser Val Arg Ile Ile Lys Pro Phe Pro Ala Pro Gln Thr Pro
 725 730 735
 35 Gly Arg Leu Gln Ala Leu Gln Pro Ala Ala Met Met Pro Pro Val Pro
 740 745 750
 40 Ala Ala Pro Lys Leu Asp His Gln Arg Met Asp Thr Ile Gln Glu Asp
 755 760 765
 45 Pro Ser Thr Asp Ser His Ala Asp Asp Asp Gly Phe Glu Lys Asp Pro
 770 775 780
 50 Phe Pro Asn Ser Ser Thr Ala Ala Lys Ser Phe Glu Asp Leu Thr Asp
 785 790 795 800
 55 His Pro Val Thr Arg Ser Glu Lys Ala Ala Ser Phe Lys Leu Gln Arg
 805 810 815
 60 Gln Ser Arg Val Asp Ser Lys Glu Thr Glu Cys
 820

50 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 55 <213> artificial
 <220>
 <223> siRNA contra el mRNA de la proteína Adam17 de ratón
 60 <400> 5

ggacguaauu gagcgauuu

19

65
 <210> 6

	<211> 19	
	<212> RNA	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> siRNA contra el mRNA de Adam17 de ratón	
10	<400> 6	
	gguagcagau caucgauuu	19
15	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> RNA	
20	<213> artificial	
	<220>	
	<223> siRNA contra el mRNA de Adam17 de ratón	
25	<400> 7	
	uaugggaacu cuuggauua	19
30	<210> 8	
	<211> 19	
35	<212> RNA	
	<213> artificial	
	<220>	
40	<223> siRNA contra el mRNA de Adam17 de ratón	
	<400> 8	
45	ugaccgaguu gaugacaua	19
	<210> 9	
50	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
55	<220>	
	<223> cebador Fw de la proteína EGF de ratón	
	<400> 9	
60	atagttatcc aggatgccca t	21
65	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	

	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> cebador Rw de EGF de ratón	
	<400> 10	
10	cgatccccag aatagccaat	20
	<210> 11	
	<211> 19	
15	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> cebador Fw de TGF-alfa de ratón	
	<400> 11	
25	ccagattccc acactcagt	19
	<210> 12	
30	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> cebador Rw de TGF-alfa de ratón	
40	<400> 12	
	ggaggtctgc atgctcaca	19
45	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> cebador FW de HB-EGF de ratón	
55	<400> 13	
	tgcagatacc tgcaggagtt	20
60	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
65	<213> artificial	
	<220>	

	<223> cebador Rw de HB-EGF de ratón	
	<400> 14	
5	acgacactac tgcagccacc a	21
	<210> 15	
10	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> cebador Fw de anfiregulina de ratón	
20	<400> 15	
	tcatggcgaa tgcagataca	20
25	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador Rw de anfiregulina de ratón	
35	<400> 16	
	gctactactg caatcttggga	20
40	<210> 17	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
50	<223> cebador Fw de TBP de ratón	
	<400> 17	
55	ccacggacaa ctgcgttgat	20
	<210> 18	
60	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
65	<220>	
	<223> cebador Rw de TBP de ratón	

	<400> 18	
	ggctcatagc tactgaactg	20
5		
	<210> 19	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> cebador Fw de GAPDH de ratón	
	<400> 19	
20	tgacgtgccg cctggagaaa	20
	<210> 20	
25	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> cebador Rw de GAPDH de ratón	
	<400> 20	
35	agtgtagccc aagatgccct t	21
	<210> 21	
40	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> cebador Fw de Adam17 de ratón	
50	<400> 21	
	cacaaaggaa gctgacctgg tt	22
55	<210> 22	
	<211> 22	
	<212> DNA	
60	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador Rw de Adam17 de ratón	
65		

<400> 22

ttcatccacc ctggagttgc ca

22

5

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

10

<213> artificial

<220>

15

<223> cebador Fw de Adam10 de ratón

<400> 23

tttggatctc cacatgattc tg

22

20

<210> 24

<211> 22

25

<212> DNA

<213> artificial

<220>

30

<223> cebador Rw de Adam10 de ratón

<400> 24

35

ggctggccag attcaacaaa ac

22

<210> 25

40

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220>

45

<223> cebador Fw de Adam21 de ratón

<400> 25

50

agatggatat gtacaggatg gggt

24

55

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

60

<213> artificial

<220>

<223> cebador Rw de Adam21 de ratón

65

<400> 26

tcacagtgga ctttcccaca

20

5

<210> 27

<211> 22

10 <212> DNA

<213> artificial

<220>

15 <223> cebador Fw de Adam12 de ratón

<400> 27

ggaattgtca tggaccattc ag

22

20

<210> 28

25 <211> 22

<212> DNA

<213> artificial

30 <220>

<223> cebador Rw de Adam12 de ratón

<400> 28

35

ttcctgctgc aactgctgaa ca

22

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901758

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.08.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K38/55** (2006.01)
C12N9/99 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	V.WEE YONG "Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS" NATURE REVIEWS/NEUROSCIENCE. Vol. 6, Diciembre 2005, páginas 931-944. Página 934, columna izquierda, párrafo segundo.	1-28
A	THORSTEN MARETZKY et al. "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol 25 no. 20, 2005, páginas 9040-9053. Página 9040, columna izquierda, párrafo primero.	1-28
A	INA KALUS et al. "Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADM 17/TACE is involved in neurite outgrowth". JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol 98, 2006, páginas 78-88. Página 79, columna izquierda, párrafo segundo y página 84, columna izquierda, párrafo primero.	1-28

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 n.º:

Fecha de realización del informe
27.05.2011

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

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

A61K, C12N

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-28	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-28	SI
	Reivindicaciones	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	V.WEE YONG "Metalloproteinasas: mediators of pathology and regeneration in the CNS" NATURE REVIEWS/NEUROSCIENCE. Vol. 6, Diciembre 2005, páginas 931-944. Página 934, columna izquierda, párrafo segundo.	
D02	THORSTEN MARETZKY et al. "L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol 25 no. 20, 2005, páginas 9040-9053. Página 9040, columna izquierda, párrafo primero.	
D03	INA KALUS et al. "Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADM 17/TACE is involved in neurite outgrowth". JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol 98, 2006, páginas 78-88. Página 79, columna izquierda, párrafo segundo y página 84, columna izquierda, párrafo primero.	

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 de patente tal y como ha sido redactada hace referencia al uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central en un mamífero (reiv. 1). La regeneración neuronal se produce a partir de precursores neurales endógenos (reiv. 2) o de transplantados de células madre neurales o precursores neurales (reiv. 3). El agente inhibidor es desde una sustancia química, nucleotídica, peptídica o proteica que bloquea o disminuye la actividad de la proteína ADM-17 (reivs. 5-15). El medicamento comprende además un vehículo, excipiente, aditivo o ingrediente activo (reiv. 16) y puede comprender además un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de EGFR (reivs. 17-18). La administración de dicho medicamento se lleva a cabo según las reivindicaciones 19 a 21. Las lesiones del sistema nervioso a tratar están causadas por trauma, isquemia cerebral o enfermedades neurodegenerativas (reiv. 22). Trata de proteger también el uso del vector que comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica para el agente inhibidor para la preparación de un medicamento (reivs 23-26), la composición farmacéutica (reiv. 27) y el método de screening (reiv. 28).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA, ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia a que las enzimas metaloproteinasas de matriz y metaloproteinasas de desintegrina se encuentran implicadas en diversas enfermedades del sistema nervioso. Se refiere también a las funciones de las metaloproteinasas y sus mecanismos de actuación en la regulación de neurogénesis, formación de mielina y crecimiento axónico y como las metaloproteinasas son determinantes en la posibilidad de recuperación de daños del sistema nervioso. El hecho de que la patología de la enfermedad mejora con la utilización de inhibidores de metaloproteinasas (como GM6001) pone de manifiesto que la expresión de metaloproteinasas en daños del sistema nervioso central es perjudicial (véase página 934, columna izquierda, párrafo segundo).

El documento D02 describe como la molécula L1 (neural cell adhesion molecule L1: NCAM-L1) juega un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso adulto. Se demuestra que el corte de L1 depende de dos miembros diferentes de la familia de metaloproteasa y de desintegrina metaloproteinasas ADAM 10 y ADAM 17. Dicha molécula L1 se encuentra involucrada de manera crítica en el desarrollo del sistema nervioso estimulando la migración neuronal, supervivencia neuronal, crecimiento de neuritas y formación de mielina, así como en la orientación de axones, la fasciculación y regeneración (véase página 9040, columna izquierda, párrafo primero).

En el documento D03 se demuestra que la liberación de la molécula NCAM (neural cell adhesion molecule) se encuentra regulada por una metaloproteasa y por ATP y que la inhibición por medio de un inhibidor (GM6001) reduce el crecimiento de neuritas de las neuronas del hipocampo (véase página 79, columna izquierda, párrafo segundo y página 84, columna izquierda, párrafo primero).

Ninguno de los documentos considerados solos o en combinación revelan el uso de un agente inhibidor de la actividad y/o expresión de ADAM-17 en la preparación de un medicamento para favorecer la regeneración neuronal en lesiones del sistema nervioso central, además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-28 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP arts. 6 y 8.