



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 376 930**

②1 Número de solicitud: 200900331

⑤1 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **05.02.2009**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2012**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.03.2012

⑦1 Solicitante/s: **Universidad del País Vasco
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa, Bizkaia, ES
Fundación Investigación Biomédica Hospital
Universitario 12 de Octubre y
Centro de Investigación Biomédica en Red de
Enfermedades Neurodegenerativas**

⑦2 Inventor/es: **Orive Arroyo, Gorka;
Hernández Martín, Rosa María;
Spuch Calvar, Carlos;
Antequera Tienda, Desiree;
Bermejo-Pareja, Félix;
Carro Díaz, Eva y
Pedraz Muñoz, José Luis**

⑦4 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

⑤4 Título: **Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.**

⑤7 Resumen:

Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. La presente invención se relaciona, en general, con una composición o kit que comprende un factor angiogénico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína beta amiloide (1-42) o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares.

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona, en general, con el empleo de factores angiogénicos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, y en particular, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína beta-amiloide (1-42) y/o por la proteína tau hiperfosforilada.

10

Antecedentes de la invención

15 Las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) entre otras, constituyen un grave problema desde el punto de vista médico, asistencial, social y económico al que deben enfrentarse los países desarrollados.

En la actualidad existen varios medicamentos que proporcionan un tratamiento sintomático de estas enfermedades, pero ninguno que haya demostrado utilidad con relevancia clínica para frenar la progresión del proceso neurodegenerativo.

20

La enfermedad de Alzheimer, una típica enfermedad neurodegenerativa, es un desorden de naturaleza muy compleja que está relacionado con la edad y que clínicamente se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones cognitivas. Los signos patológicos de dicha enfermedad son la aparición de depósitos proteínicos en el cerebro, pérdida de neuronas, angiopatía cerebral amiloide y degeneración de vasos sanguíneos en algunas áreas del cerebro.

25

Los dos tipos de depósitos proteínicos que se describen en la EA son: los depósitos amiloides y los ovillos neurofibrilares. Los primeros están compuestos por la llamada "proteína beta amiloide" ($A\beta$), un péptido de 39-42 aminoácidos que procede de la digestión proteolítica de una proteína cerebral llamada "proteína precursora del amiloide β " (APP). Los ovillos neurofibrilares se forman a partir de la proteína asociada a los microtúbulos tau (MAP τ). Aunque los mecanismos que desencadenan la EA no son del todo conocidos, los estudios realizados sugieren que las alteraciones en el procesamiento de la APP provocan la acumulación de la proteína beta amiloide, principalmente en hipocampo y córtex, y que dicha proteína juega un papel muy destacado en la EA.

30

El procesamiento de la APP por parte de las enzimas secretasas (β y γ) da lugar a la formación de $A\beta$ de distinta longitud, las dos formas más importantes son $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$. En un individuo normal la mayor cantidad de $A\beta$ que se produce es la forma $A\beta_{40}$ (denominada forma soluble y que se acumula fundamentalmente a nivel de los vasos cerebrales) y solo de un 5 a un 15% es $A\beta_{42}$ (denominada forma insoluble y principal constituyente de las placas amiloides).

35

Niveles elevados de $A\beta_{42}$ se correlacionan con un riesgo elevado de padecer EA y estos niveles disminuyen con el paso del tiempo en pacientes con un diagnóstico reciente. Esta disminución de los niveles plasmáticos de $A\beta_{42}$, que se producen durante la progresión inicial de la enfermedad, concuerda con la teoría de que cuando la enfermedad progresa, el $A\beta_{42}$ se acumula en las placas amiloides. No obstante el diagnóstico de la enfermedad basado únicamente en niveles elevados de $A\beta_{42}$ no es adecuado, sin embargo durante los últimos años se ha visto que el ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ resulta mucho más útil para confirmar el diagnóstico de casos probables de la enfermedad. La reducción de dicho ratio se correlaciona bien con el riesgo, inicio y progresión de EA.

40

Tau es una proteína asociada a los microtúbulos que se encuentra de forma natural en las neuronas. Los cambios más importantes que se producen en la EA con respecto a esta proteína son la fosforilación y la agregación. Así los ovillos neurofibrilares están constituidos por fibras proteicas emparejadas helicoidalmente (PHF, paired helical filament) y estas fibras a su vez se componen de polímeros de proteína tau anormalmente hiperfosforilada. Recientemente se ha puesto de manifiesto que una posible vía de tratamiento de la EA sería prevenir la hiperfosforilación de dicha proteína tau mediante la inhibición de las cinasas relacionadas con tau como la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3). Además la inhibición de la GSK-3 β podría a su vez inhibir la producción de $A\beta$ y contribuir a la supervivencia celular (Takashima, AJ. 2006 J. Alzheimer Dis. 9: 309-317).

55

Durante los últimos años se han encontrado puntos de unión entre la angiogénesis y la neurogénesis lo cual ofrece nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (E. Stortkebaum *et al.* 2004 J. Clin. Invest. 113:14-18).

60

Los factores angiogénicos son factores de crecimiento que no solo estimulan la neovascularización y la angiogénesis (iniciada con la activación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos parentales) *in vivo*, sino que también son mitogénicos para las células endoteliales *in vitro*. Ejemplos de factores angiogénicos son, por ejemplo, HGF, VEGF, FGF y HIF. El VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) es el prototipo de los factores angiogénicos, cuyo papel a nivel de Sistema Nervioso Central (SNC) no está únicamente relacionado con el crecimiento de los vasos sanguíneos, como regulador fisiológico de la angiogénesis cerebral y de la integridad de la barrera hematoencefálica, sino que posee además un efecto directo sobre distintos tipos de células neuronales, incluyendo incluso a las

65

células madre neuronales (NSCs). Por otro lado, estudios realizados ponen de manifiesto que en enfermedades como EA o Huntington se producen deficiencias cerebrovasculares que preceden a la aparición de los síntomas clínicos, lo cual sugiere que dichas alteraciones podrían contribuir a la patogénesis de estas enfermedades (A. W. Deckel and J.D. Duffy 2000. *Brain Res.* 872: 258-261, R.N. Kalara. 2002 *Cerebrovascular Dis.* 13: 48-52). En un trabajo publicado por I. Mateo *et al* en 2007 (*Acta Neurologica Scandinavica.* 116: 56-58) encontraron que las concentraciones plasmáticas de VEGF en pacientes con AD eran un 30% inferiores a las de los controles. Se han propuesto distintos mecanismos para justificar esta reducción de las concentraciones de VEGF, así los efectos neurotóxicos del β -amiloide podrían ser la causa de la supresión de la síntesis del VEGF por parte de las células inmunes periféricas (S.B. Solerte, *et al.* 2005. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 19: 1-10).

Yang *et al* 2004 (*Neurobiol. Aging* vol. 25: 283-290) describen que, en un estudio realizado *in vitro*, el VEGF interactúa de forma específica y con alta afinidad con la proteína $A\beta$ y que además, en cerebros de pacientes de enfermedad de Alzheimer, se acumula en las placas amiloides, lo cual puede provocar que dicho factor no esté disponible para ejercer su efecto. Posteriormente, estos mismo autores (Yang *et al* 2005, *Journal of Neurochemistry* vol. 93: 118-127) describieron el mecanismo de interacción entre la proteína $A\beta$ y el VEGF, sugiriendo que el efecto neuroprotector del VEGF puede estar relacionado con la inhibición tanto de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por el $A\beta$ como de la agregación de dicha proteína.

La solicitud de patente US2008/0025962 describe un agente terapéutico (VEGF) que inhibe la acción de la proteína $A\beta(1-40)$ para suprimir la diferenciación de células endoteliales vasculares y/o la diferenciación de precursores endoteliales a partir de células madre. Por tanto, aunque esta solicitud de patente menciona el empleo de VEGF en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, dicho efecto terapéutico no está demostrado.

El estado de la técnica describe numerosos compuestos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o la reducción de la placa beta amiloide o la reducción de proteína tau hiperfosforilada:

- La solicitud de patente internacional WO2007/120912 describe un método para reducir o inhibir la producción del péptido β -amiloide y la formación de la placa amiloide asociada con la enfermedad de Alzheimer mediante la administración a un sujeto del polipéptido netrin-1.
- La solicitud de patente internacional WO93/11762 describe agentes que modulan o afectan el tráfico intracelular y procesado de proteínas en células de mamífero para su uso en el procesado de la proteína precursora amiloide, como por ejemplo, cloroquina y derivados (primaquina).
- La solicitud de patente US2005/0147613 describe un método para promover la disgregación de la placa beta-amiloide preformada mediante el uso de un anticuerpo biespecífico capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.
- Las solicitudes de patente internacional WO 2008118379 y WO 2008115552 describen la preparación de unos compuestos derivados de amino-5-[4-(difluorometoxi)fenil]-5-fenilimidazolona y de amino-5-[4-(difluorometoxi)fenil sustituidos]-5-fenilimidazolona, respectivamente, con capacidad para inhibir la enzima β secretasa y que pueden ser utilizados para tratar los depósitos de beta amiloide y los ovillos neurofibrilares.
- La solicitud de patente internacional WO 2007109851 describe la utilización del selenato y de sus sales farmacéuticas para mejorar la actividad de la fosfatasa PP2A, así como métodos que reducen la fosforilación de la proteína tau mediante la inhibición de la actividad de la glucógeno sintetasa cinasa 3 (GSK3) para tratar o prevenir enfermedades neurodegenerativas.
- La solicitud de patente internacional WO 2006002119 describe la utilización de inhibidores dependientes de ciclina para su utilización como inhibidores de cinasas y su posible utilización en las enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y, más en particular, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína beta amiloide que provoquen la disminución de los niveles de $A\beta_{42}$ y/o de la proteína tau hiperfosforilada.

Compendio de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una composición o kit que comprende:

- (a) un factor angiogénico,
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más factores angiogénicos distintos,
- (c) un vector que comprende una secuencia de nucleótidos como se define en (b),

- (d) una célula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define (b) y/o un vector como se define en (c),
- (e) una micropartícula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b), un vector como se define en (c) y/o una célula como se define en (d),
- (f) una nanopartícula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b) y/o un vector como se define en (c) o
- (g) una combinación de uno o más de (a), (b), (c), (d), (e) y/o (f), para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína beta amiloide (1-42) [A β 42] o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra: (A) una fotografía de las micropartículas que contienen fibroblastos modificados genéticamente para producir VEGF y (B) Producción de VEGF, *in vitro*, a partir de las células microencapsuladas.

La Figura 2 es una gráfica que muestra: (A) el efecto apoptótico del beta amiloide 1-42 (A β 42) en cultivos de neuronas corticales, determinado mediante el ensayo de MTT. La gráfica de la izquierda muestra el efecto a las 24 horas y la de la derecha a las 48 horas. (B) El efecto del VEGF sobre la señalización que produce el beta amiloide. (C) El efecto apoptótico del beta amiloide 1-40 y 1-42 en cultivos de células endoteliales de cerebro (BMVEC) a través del incremento en la expresión de caspasa 3 y como la administración de microcápsulas secretoras de VEGF revierte este efecto. C es el control y V la muestra a la que se le adicionó microcápsulas secretoras de VEGF.

La Figura 3 es una fotografía y una gráfica que muestran los resultados de la doble tinción BrdUrd-lectina de los nuevos vasos sanguíneos inducidos por la producción de VEGF a partir de las micropartículas implantadas en ratones APP/Ps1. Al grupo control se le administró micropartículas que contenían células que no producían VEGF.

La Figura 4 es una gráfica que muestra los resultados del ensayo de muerte celular (Ensayo del MTT) realizado en córtex de cerebros de ratones APP/Ps1, control y tratados con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF.

La Figura 5 es una fotografía y una gráfica que muestran el efecto antiapoptótico del tratamiento con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF, mediante la determinación de los niveles de caspasa 3 en la corteza cerebral de ratones APP/Ps1.

La Figura 6 es una fotografía y una gráfica que muestran el efecto antiapoptótico del tratamiento con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF, mediante la determinación de los niveles de caspasa 9 en la corteza cerebral de ratones APP/Ps1.

La Figura 7 es una fotografía y una gráfica que muestran los resultados de la tinción de las placas amiloides, utilizando el método de la diaminobencidina tanto en córtex (gráfica izquierda) como en hipocampo (gráfica derecha) de cerebros de ratones APP/Ps1, control y tratados con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos en Usados de corteza de cerebros de ratones APP/Ps1, control y tratados con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF de: (A) los niveles de proteína tau hiperfosforilada (Tau PHF). (B) la actividad de la enzima GSK3 β , (C) la tinción de proteína tau hiperfosforilada con diaminobencidina y (D) la tinción de ovillos neurofibrilares con tioflavina.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto que la administración de factores angiogénicos a ratones modelo de enfermedad de Alzheimer provoca, sorprendentemente, una reducción de los niveles de proteína beta amiloide a nivel de la corteza cerebral y el hipocampo, y una disminución de la cantidad de proteína tau hiperfosforilada, proporcionando una nueva ventana terapéutica al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y a la prevención de la formación de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas. Adicionalmente, los experimentos realizados también mostraron, de forma inesperada, que los factores angiogénicos pueden revertir el efecto pro-apoptótico producido por la proteína A β 42 y/o revertir el efecto tóxico causado por la proteína tau hiperfosforilada.

Por tanto, la invención se relaciona con un factor angiogénico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o para revertir el efecto tóxico producido por el péptido A β 42 o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares, aunque la invención también contempla la posibilidad de emplear más de un factor angiogénico distinto para el tratamiento de dichas enfermedades o para revertir el efecto tóxico producido por la proteína A β 42 o la proteína tau hiperfosforilada,

ES 2 376 930 A1

para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares. Asimismo, el experto en la materia entiende que el factor y/o factores angiogénicos distintos, pueden presentarse en múltiples formas, como por ejemplo, una secuencia de nucleótidos, una proteína, un vector, etc.

5 Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una composición o kit que comprende:

- a) un factor angiogénico,
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más factores angiogénicos distintos,
- 10 c) un vector que comprende una secuencia de nucleótidos como se define en (b),
- d) una célula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define (b) y/o un vector como se define en (c),
- 15 e) una micropartícula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b), un vector como se define en (c) y/o una célula como se define en (d),
- f) una nanopartícula que comprende un factor angiogénico como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b) y/o un vector como se define en (c) o
- 20 g) una combinación de uno o mas de (a), (b), (c), (d), (e) y/o (f),

para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína A β 42 o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares.

En la presente invención, se entiende por factor angiogénico aquella molécula (ácido nucleico, proteína o compuesto químico) que estimula el proceso fisiológico de la angiogénesis, es decir, la formación de vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Ejemplos de factores angiogénicos son, y sin limitarse a, angiopoyetinas (Ang), tales como Ang-1, Ang-2, Ang-3 o Ang-4; factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF2), como por ejemplo, el factor de crecimiento de fibroblastos 20 (FGF20); factor de crecimiento transformador beta (TGF β), factor de crecimiento transformador alfa (TGF α), factor de crecimiento de placenta (PIGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor); factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), como VEGF-A, VEGF-B o VEGF-C; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, Platelet-derived growth factor), como PDGF-A y PDGF-B; el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), cardiotrofinas, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, bone morphogenetic protein), sonic hedgehog (SHH), etc.

Por tanto, en una realización particular de la invención, el factor angiogénico se selecciona entre angiopoyetinas (Ang); factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF/FGF2); factor de crecimiento transformador beta (TGF β), factor de crecimiento transformador alfa (TGF α), factor de crecimiento de placenta (PIGF); factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), cardiotrofinas, proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, bone morphogenetic protein) y sonic hedgehog (SHH), o una variante funcionalmente equivalente de los mismos.

Un experto en la materia reconocerá que la presente invención no sólo se refiere a un factor angiogénico, es decir, a la secuencia de aminoácidos específica de un factor angiogénico, sino también a variantes de las mismas, tales como fragmentos, análogos y/o derivados. Así, una variante de una secuencia de aminoácidos específicos es aquella secuencia que conserva, preferentemente, al menos una función o actividad biológica de la secuencia de aminoácidos específica de un factor angiogénico que, en el contexto de la presente invención, es la capacidad para inducir/estimular el proceso fisiológico de la angiogénesis.

En la presente invención, el término “variante funcionalmente equivalente” hace referencia a cualquier polipéptido cuya secuencia de aminoácidos puede obtenerse por inserción, sustitución o eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia original de la proteína [la orientación referente a qué cambios de aminoácidos son probables que sean fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie, J. U., y *col.*, (Science 1990, vol. 247:1306-1310)] y que conserva al menos parcialmente la capacidad para inducir/estimular el proceso fisiológico de la angiogénesis determinada, por ejemplo, mediante un ensayo de determinación de vasos sanguíneos (ver Ejemplo 2 de la presente solicitud de patente), un ensayo de formación en tubo de capilares (capillary-like tube formation assay) sobre matrigel empleando células HUVEC [Errico, M. *et al.* 2004. The Journal of Biological Chemistry, 279(42): 43929-43939] o cualquier otro ensayo que permita determinar la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*, como por ejemplo, el ensayo de neovascularización corneal, el de la membrana corioalantoidea de pollo o los cultivos de fragmentos de aorta entre otros. Brevemente, el ensayo de formación en tubo de capilares consiste en sembrar células HUVEC (células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano) en una serie de pocillos cubiertos con Matrigel en presencia del compuesto de interés. Tras el período de incubación se observa la formación de tubos similares a capilares con un microscopio de fase invertida. La formación de una red de similar a los capilares es indicativa de que el compuesto de interés tiene actividad angiogénica.

ES 2 376 930 A1

Una variante funcionalmente equivalente puede ser: (i) una en la que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) una en la que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) una en la que aminoácidos adicionales se fusionan a la secuencia de aminoácidos del factor angiogénico, etc. Tales fragmentos, derivados y análogos se consideran que están dentro del alcance de variantes equivalentes para los fines de la presente invención.

Los fragmentos según la presente invención pueden ser aquellos que comprenden la secuencia de aminoácidos de un factor angiogénico, pero carecen de una serie continua de residuos (es decir, una región, parte o porción continua) que incluye el extremo amino, o una serie continua de residuos que incluye el extremo carboxilo o, como en mutantes de doble truncamiento, delección de dos series continuas de residuos, una que incluye el extremo amino y una que incluye el extremo carboxilo. De nuevo, estos mutantes de truncamiento conservan preferentemente al menos una actividad biológica del polipéptido completo. Los fragmentos o porciones de la secuencia de aminoácidos de un factor angiogénico pueden emplearse para producir el polipéptido correspondiente de longitud completa mediante síntesis de péptidos; por tanto, los fragmentos pueden emplearse como productos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa.

Las variantes según la invención tienen preferentemente una identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos del factor angiogénico de, al menos, el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y el factor angiogénico se determina usando algoritmos y procedimientos informáticos que son ampliamente conocidos para los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferentemente usando el algoritmo BLASTP [BLAST Manual, Altschul, S., y *col.*, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y *col.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)].

Los expertos en la materia entienden que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un factor angiogénico que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan su estructura global o su funcionalidad.

De forma opcional, el factor angiogénico de la presente invención puede estar unido a otra molécula, por ejemplo, un péptido o un polipéptido que le confiera al factor angiogénico alguna propiedad o ventaja respecto al factor angiogénico nativo, para dar lugar a una proteína de fusión. En la presente invención, el término "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido que tiene al menos dos porciones covalentemente unidas juntas en el que cada una de las porciones se deriva de diferentes proteínas, siendo una de las porciones un factor angiogénico o una variante de éste. Como entiende el experto en la materia, la proteína de fusión aquí descrita posee la capacidad para inducir/estimular el proceso fisiológico de la angiogénesis.

Moléculas o polipéptidos que pueden fusionarse al factor angiogénico son, por ejemplo, moléculas que facilitan la extracción y purificación de la proteína de fusión, tales como marcas (tags) de polihistidina (His-tags) (por ejemplo H6 y H10, etc.) u otras marcas para uso en sistemas IMAC, por ejemplo, columnas de afinidad de Ni²⁺, etc., fusiones de GST, fusiones de MBP, marcas de estreptavidina, la secuencia diana de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BIRA y epítomos marca dirigidos por anticuerpos (por ejemplo marcas c-myc, marcas FLAG, entre otras). Como observará un experto en la materia, dicho péptido marca puede usarse para purificación, inspección, selección y/o visualización de la proteína de fusión de la invención. Además, también son marcas adecuadas restos fluorescentes, radiactivos o enzimáticos, además de la molécula que potencia la estabilidad en condiciones de ensayo tales como la unión de ADN o dominios de activación transcripcional del gen GAL4 y similares.

El factor angiogénico puede conectarse a otros compuestos mediante procedimientos muy conocidos que incluyen espaciadores (linkers) bifuncionales, formación de un polipéptido de fusión y formación de complejos de biotina/estreptavidina o biotina/avidina mediante unión de o biotina o estreptavidina/avidina a la molécula complementaria. Dependiendo de la naturaleza de los grupos reactivos en el factor angiogénico y en los otros compuestos, un espaciador puede formarse permitiendo simultáneamente o secuencialmente que los grupos reactivos reaccionen entre sí. Por ejemplo, el agente seleccionado como diana puede prepararse con un grupo sulfhidrilo en, por ejemplo, el extremo carboxilo, que entonces se acopla a un agente de derivatización para formar una molécula portadora. A continuación, la molécula portadora se une mediante su grupo sulfhidrilo al péptido. Por otra parte, el enlace puede formarse permitiendo que los grupos reactivos del factor angiogénico y la/s molécula/s que van a formar la proteína de fusión formen un enlace, preferentemente covalente, usando químicas de acoplamiento conocidas para aquellos expertos en la materia. Pueden usarse numerosos procedimientos reconocidos en la técnica para formar un enlace covalente. Véase, por ejemplo, March, J., *Advanced Organic Chemistry*, 4ª ed., Nueva York, N.Y., Wiley and Sons, 1985, pág. 326-1120. Los expertos en la materia conocen muchos otros espaciadores posibles.

Por otro lado, las moléculas o porciones que forman parte de la proteína de fusión pueden conectarse directamente mediante enlace peptídico sencillo o mediante un espaciador peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácidos. Generalmente, las porciones y el espaciador estarán en el marco de lectura el uno con el otro y se producen usando técnicas recombinantes. Ejemplos ilustrativos no limitantes de posibles de espaciadores flexibles/secuencias espaciadoras incluyen SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 1), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 2), GGSGGAP

ES 2 376 930 A1

(SEQ ID NO: 3) (Muller, K. M., Arndt, K. M. y Alber, T., Meth. Enzymology, 2000, 328:261-281), GGGVEGGG (SEQ ID NO: 4) o GSGGS (SEQ ID NO:5). Ejemplos preferidos de péptidos espaciadores o conectores incluyen aquellos que se han usado para conectar proteínas sin perjudicar sustancialmente la función de las proteínas conectadas o al menos sin perjudicar sustancialmente la función de una de las proteínas conectadas.

5 Preferentemente, el espaciador es de naturaleza polipeptídica. El péptido espaciador comprende preferentemente al menos dos aminoácidos, tales como al menos tres aminoácidos, por ejemplo al menos cinco aminoácidos, tales como al menos diez aminoácidos, por ejemplo al menos 15 aminoácidos, tales como al menos 20 aminoácidos, por ejemplo al menos 30 aminoácidos, tales como al menos 40 aminoácidos, por ejemplo al menos 50 aminoácidos, tales como al menos 60 aminoácidos, por ejemplo al menos 70 aminoácidos, tales como al menos 80 aminoácidos, tales como al menos 90 aminoácidos, tales como aproximadamente 100 aminoácidos.

15 Si se desea, es posible incluir un sitio de escisión proteolítico entre las porciones de la proteína de fusión para permitir la separación de secuencias de proteínas de fusión. En el caso de que la proteína de fusión presente actividad reducida, el espaciador entre los agentes puede seleccionarse para que sea suficientemente lábil (por ejemplo, para la escisión enzimática mediante una enzima presente en el tejido diana) de manera que se escinda fácilmente, liberándose así las moléculas.

20 Por otro lado, la composición o kit de la invención también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más factores angiogénicos distintos, o variantes equivalentes de los mismos. La secuencia de nucleótidos de la invención puede contener secuencias reguladoras de la expresión precediendo a la secuencia de nucleótidos que codifica el factor angiogénico y que están operativamente unidas a dicha secuencia de nucleótidos, es decir, la secuencia de nucleótidos que codifica el factor angiogénico está dentro del marco de lectura correcto para su expresión bajo el control de dichas secuencias reguladoras.

25 Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras y/u otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de nucleótidos. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante de la secuencia de nucleótidos, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos muy conocidos incluyen los derivados de los genomas de virus eucariotas tales como el virus del poliovirus, adenovirus, SV40, CMV, virus del sarcoma aviar, virus de la hepatitis B, el promotor del gen de la metalotioneína, el promotor del gen de la timidina 30 kinaasa del virus del herpes simplex, regiones LTR de los retrovirus, el promotor del gen de la inmunoglobulina, el promotor del gen de la actina, el promotor del gen EF-1alfa así como promotores inducibles en los que la expresión de la proteína depende de la adición de una molécula o de una señal exógena exógena, tales como el sistema tetraciclina, el sistema NFkappaB/luz UV, el sistema Cre/Lox y el promotor de los genes de choque térmico. Varios otros ejemplos de promotores constitutivos son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para implementar la invención.

40 Si se desea la expresión controlada de la secuencia de nucleótidos, entonces debe usarse un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible puede ser "silencioso". "Silencioso" se entiende que significa que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia de nucleótidos; sin embargo, en presencia de un inductor se produce la expresión de la secuencia de nucleótidos. El nivel de expresión puede controlarse frecuentemente variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo, variando la concentración del inductor de forma que un promotor inducible se estimule más fuertemente o débilmente, puede afectarse la concentración del producto transcrito de la secuencia de nucleótidos. En el caso de que la secuencia de nucleótidos 45 codifique un gen, la cantidad de proteína sintetizada puede controlarse. Por tanto, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles muy conocidos son: un promotor sensible a andrógeno o estrógeno, un promotor sensible a doxiciclina, un promotor de metalotioneína o un promotor que responde a ecdisona. Otros diversos ejemplos son muy conocidos en la técnica y pueden usarse para implementar la invención. Además de promotores constitutivos e inducibles (que normalmente trabajan en una gran variedad de tipos de células o tejidos) 50 pueden usarse promotores específicos de tejido para conseguir la expresión específica de la secuencia de nucleótidos en células o tejidos concretos. Ejemplos muy conocidos de promotores específicos para tejido nervioso incluyen el promotor del gen de la sinapsina, el promotor GFAP (promotor específico de astrocitos), promotores de genes de la mielina, como por ejemplo, PLP (mielín proteolípido), MBP (Myelín basic proteína), Olig2, etc.

55 Como se ha indicado anteriormente, la composición o kit de la invención también puede comprender un vector que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se ha definido previamente, es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más factores angiogénicos distintos o variantes equivalentes del mismo y que, opcionalmente, puede estar precedida por secuencias reguladoras de la expresión.

60 Vectores adecuados para alojar la secuencia de nucleótidos que codifica uno o más factores angiogénicos distintos o variantes equivalentes del mismo incluyen un plásmido o un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra o no se integra en el genoma de dicha célula. Dicho vector puede obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia y pueden encontrarse en, por ejemplo, Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, 2001.

65 Sin embargo, en el ámbito de la presente invención, el vector es preferentemente un vector viral o no viral adecuado para uso en terapia; a modo de una ilustración no limitante, dichos vectores pueden ser vectores virales basados en retrovirus, adenovirus, alfavirus, etc., o en el caso de vectores no virales los vectores pueden ser complejos de

ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, dendrímeros, etc. [véase “Nonviral Vectors for Gene Therapy”, editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)]. Dichos vectores virales y no virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un factor angiogénico según la invención pueden administrarse directamente al cuerpo humano o animal mediante procedimientos convencionales. Los vectores virales pueden ser, por ejemplo, un alfavirus, tal como virus de Semliki Forest, Sindbis y encefalitis equina venezolana (EEV); un adenovirus de alta capacidad; un adenovirus condicionalmente replicativo o un virus adenoasociado.

Los vectores de la invención pueden usarse alternativamente para transformar, transfectar o infectar células, preferentemente células de mamífero que incluyen células humanas, por ejemplo, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas al cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado. Para su administración al sujeto, dichas células se formularán en un medio adecuado que no afecta adversamente su viabilidad. Asimismo, dicho vector puede contener, entre otros, sitios de clonación múltiple, secuencias reguladoras de la expresión, orígenes de replicación adecuados para la célula huésped en la que va a introducirse el vector, marcadores de selección, etc.

Por tanto, el experto en la materia entiende que la composición o kit de la invención puede comprender una célula que comprende un factor angiogénico, una secuencia de nucleótidos o un vector como se definen, respectivamente, en los apartados (a), (b) y (c) del primer aspecto de la invención. Las características del factor angiogénico, la secuencia de nucleótidos y del vector se han explicado previamente.

Células adecuadas para alojar el factor angiogénico, la secuencia de nucleótidos y el vector según la presente invención pueden ser una célula eucariota o procariota. En la presente invención puede usarse prácticamente cualquier célula huésped que pueda ser transformada por un polinucleótido de la invención, o que puede ser transformada, transfectada o infectada por un vector de la invención, por ejemplo células animales (por ejemplo células de mamífero, células de pájaro, células de insecto, etc.), células vegetales, levaduras, etc.

En la presente invención, se puede utilizar cualquier célula eucariota que haya sido modificada genéticamente para expresar, un factor angiogénico, la secuencia de nucleótidos y/o el vector según la presente invención, pero las células de ratón, rata, primate y humanas son las preferidas. Así células adecuadas para llevar a cabo la invención son cardiomiocitos, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos (células B y T), mastocitos, eosinófilos, células de la intima vascular, cultivos primarios de células aisladas de distintos órganos, preferentemente de células de aisladas de los islotes de Langerhans, hepatocitos, leucocitos, incluyendo leucocitos mononucleares, células madre de origen embrionario, mesenquimales, de cordón umbilical o adultas (de piel, pulmón, riñón e hígado), osteoclastos, condrocitos y otras células del tejido conectivo. También son adecuadas células de líneas establecidas tales como células T de Jurkat, células NIH-3T3, CHO, Cos, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, mioblastos C2C12 y células W138. Las células de la invención pueden obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia [Sambrook y *col.*, 2001, mencionado anteriormente].

Como entiende el experto en la materia, en el tratamiento de determinadas enfermedades, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas, es deseable disponer de vehículos de administración del producto terapéutico que permitan controlar tanto la velocidad de administración como la cantidad del producto administrado. En el estado de la técnica, existen numerosos vehículos de administración que cumplen con estos requisitos, como por ejemplo, la utilización de fibras huecas o cápsulas. En el contexto de la presente invención, el vehículo de administración preferido son las micropartículas o las nanopartículas.

Por tanto, la composición o kit del primer aspecto de la invención además de lo citado anteriormente, también puede comprender una micropartícula que contiene un factor angiogénico, una secuencia de nucleótidos, un vector y/o una célula como se definen, respectivamente, en los apartados (a), (b), (c) y (d) del primer aspecto de la invención, o una nanopartícula que contiene un factor angiogénico, una secuencia de nucleótidos y/o un vector como se definen, respectivamente, en los apartados (a), (b) y (c) del primer aspecto de la invención. Las características del factor angiogénico, de la secuencia de nucleótidos, del vector y de la célula ya han sido descritas previamente.

En la presente invención, se entiende por “nanopartícula” a aquella partícula que presenta, al menos, una dimensión inferior a 1μ , preferentemente entre $0,01 \mu$ y $0,8 \mu$, y aún más preferentemente entre $0,05 \mu$ y $0,5 \mu$.

En la presente invención, se entiende por “micropartícula” a aquella partícula que presenta un diámetro igual o superior a 1μ ($0,001 \text{ mm}$), preferentemente, entre 1 y $0,9$, entre $0,9$ y $0,8$, entre $0,8$ y $0,7$, entre $0,7$ y $0,6$, entre $0,6$ y $0,5$, entre $0,5$ y $0,4$, entre $0,4$ y $0,3$, entre $0,3$ y $0,2$, entre $0,2$ y $0,1$ o menos de $0,1 \text{ mm}$ de diámetro. En una realización particular, la micropartícula de la invención posee un diámetro entre $0,380$ y $0,404 \text{ mm}$, preferentemente, $0,392 \text{ mm}$.

Asimismo, en el contexto de la presente invención y debido a la capacidad de la micropartícula de producir de forma continua productos terapéuticos, dicha micropartícula puede denominarse micro-biosistema farmacéutico. No obstante, como entiende el experto en la materia, el tamaño medio de la micropartícula de la invención se ve influenciado por diferentes factores tecnológicos del procedimiento de producción de dicha micropartícula, tales como la concentración de los distintos componentes de la micropartícula, velocidad de agitación, etc.

ES 2 376 930 A1

La micropartícula que forma parte de la composición o kit de la invención es una partícula esférica o no, dentro de la que se incluyen (i) microcápsulas, que se definen como sistemas vesiculares en los que las células modificadas genéticamente están confinadas en una cavidad rodeada de una única membrana (habitualmente polimérica); y (ii) microsferas, que son sistemas matriciales en los que las células están dispersas por toda la partícula.

La micropartícula de la invención puede estar formada por cualquier material polimérico biocompatible que permita la secreción continua de los productos terapéuticos y que, si se desea, pueda actuar como soporte de las células modificadas genéticamente. Así, dicho material polimérico biocompatible puede ser, por ejemplo, los polímeros termoplásticos o los polímeros hidrogeles.

Entre los polímeros termoplásticos se encuentran ácido acrílico, acrilamida, 2-aminoetil metacrilato, poli(tetrafluoroetileno-cohexafluorpropileno), ácido metacrílico-(7-cumaroxi)etil éster, N-isopropil acrilamida, ácido poliacrílico, poliacrilamida, poliamidoamía, poli(amino)-p-xilileno, poli(cloroetilvonileter), policaprolactona, poli(caprolactona-co-trimethylene carboanto), poli(carbonato urea) uretano, poli(carbonato) uretano, polietileno, copolímero de polietileno y archilamida, polietilenglicol, polietilenglicol metacrilato, poli(etilene tereftalato), poli(4-hidroxibutil acrilato), poli(hidroxietil metacrilato), poli(N-2-hidroxipropil metacrilato), poli(ácido láctico-ácido glicólico), poli(ácido L láctico), poli(gamma-metil, L-glutamato), poli(metilmacrilato), polipropileno fumarato), poli(propileno óxido), polipirrol, poliestirene, poli(tetrafluoro etileno), poliuretano, polivinil alcohol, polietileno de peso molecular ultraalto, 6-(p-vinilbenzamido)-ácido hexanoico y N-p-vinilbenzil-D-maltonamida y copolímeros que contienen más de uno de dichos polímeros.

Entre los polímeros del tipo hidrogel se encuentran materiales naturales del tipo alginato, agarosa, colágeno, almidón, ácido hialurónico, albúmina de suero bovina, celulosa y sus derivados, pectina, condroitin sulfato, fibrina y fibroína, así como hidrogeles sintéticos como sefarosa y sefadex.

En el caso de que la micropartícula vaya a contener células como las definidas en el apartado (d) del primer aspecto inventivo de la invención, el polímero que forma parte de la micropartícula puede encontrarse ligado a, o funcionalizado con, un ligando para un receptor de superficie celular. En la presente invención, se entiende por "ligando específico para un receptor de superficie celular" a la molécula o péptido que es capaz de reconocer un receptor de la superficie celular y unirse a él de forma específica. De este modo, dicho ligando permite la interacción específica entre el polímero de la micropartícula y las células contenidas dentro de la misma.

En principio, cualquier molécula o péptido que posea sitios de unión específicos que puedan ser reconocidos por receptores de superficie de las células puede ser usado en la presente invención como un ligando específico para un receptor de superficie celular. Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede proceder de moléculas de adhesión celular que interactúan con la matriz extracelular como la fibronectina, los distintos miembros de las familias de las selectinas, las caderinas, las lectinas, las integrinas, las inmunoglobulinas, las colectinas y las galectinas.

Así, el ligando específico para un receptor de superficie celular empleado en la presente invención puede ser un péptido derivado de una región seleccionada de las regiones de la fibronectina que intervienen en la unión con las integrinas que se encuentran en la membrana celular. Por ejemplo, y sin limitar la invención, dichos péptidos derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que contiene el péptido RGD, de la región de la decimocuarta repetición tipo III de la fibronectina que contiene el péptido IDAPS (SEQ ID NO: 6), de la región CSI de fibronectina que contiene el péptido LDV y la región CS5 de la fibronectina que contiene el péptido REDV (SEQ ID NO: 7). Estos péptidos pueden consistir en fragmentos de las regiones correspondientes que conservan su capacidad adhesiva, como, por ejemplo, el péptido QAGDV (SEQ ID NO: 8) del fibrinógeno, el péptido LDV de la fibronectina y el péptido IDSP (SEQ ID NO: 9) de VCAM-I.

La presente invención también contempla el uso de péptidos de unión a integrinas como un ligando específico para un receptor de superficie celular, que derivan de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina que comprende la secuencia RGD, como, por ejemplo, un péptido seleccionado del grupo de RGD, RGDS (SEQ ID NO: 10), GRGD (SEQ ID NO: 11), RGDV (SEQ ID NO: 12), RGDT (SEQ ID NO: 13), GRGDG (SEQ ID NO: 14), GRGDS (SEQ ID NO: 15), GRGDY (SEQ ID NO: 16), GRGDF (SEQ ID NO: 17), YRGDS (SEQ ID NO: 18), YRGDDG (SEQ ID NO: 19), GRGDSP (SEQ ID NO: 20), GRGDSPG (SEQ ID NO: 21), GRGDSY (SEQ ID NO: 22), GRGDVY (SEQ ID NO: 23), GRGDSPK (SEQ ID NO: 24), CGRGDSPK (SEQ ID NO: 25), CGRGDSPK (SEQ ID NO: 26), CGRGDSY (SEQ ID NO: 27), ciclo(RGDfK) (SEQ ID NO: 28), YAVTGRGD (SEQ ID NO: 29), AcCGNGEPRGDYRAY-NH₂ (SEQ ID NO: 30), AcGCGYGRGDSPG (SEQ ID NO: 31) y RGDPASSKP (SEQ ID NO: 32), variantes cíclicas de dichos péptidos, variantes multivalentes tanto lineales como ramificadas (ver por ejemplo Dettin *et al.* 2002, J. Biomed. Mater. Res. 60:466-471; Monaghan *et al.* 2001, Arkivoc, 2: U42-49; Thumshirn *et al.* 2003, Chemistry 9: 2717-2725; Scott *et al.* 2001, J. Gene Med. 3: 125-134, Orive *et al.*, 2009, J. Contr. Rel.) así como combinaciones de dos o más de dichos péptidos.

El péptido que comprende la secuencia RGD puede estar unido al polímero de la micropartícula a través del extremo N-terminal o del extremo C-terminal e, independientemente del punto de anclaje, puede estar unido directamente al polímero o, alternativamente, puede estar unido a través de un elemento espaciador. Prácticamente, cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado. A modo ilustrativo, dicho péptido flexible puede contener repeticiones de restos de aminoácidos, tales como (Gly)₄ (SEQ ID NO: 33), Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 34), (Gly)₁₃ (SEQ ID

NO: 35) (Beer, J.H. *et al.*, 1992, Blood, 79, 117-128), SGGTSGSTSGTGST (SEQ ID NO: 36), AGSSTGSSTGPGSTT (SEQ ID NO: 37), GGSGGAP (SEQ ID NO: 38), GGGVEGGG (SEQ ID NO: 39) o cualquier otra repetición de restos de aminoácidos adecuada, o bien la región bisagra de un anticuerpo.

5 Asimismo, el ligando específico para un receptor de superficie celular puede estar ligado al polímero con distintos grados de sustitución, de forma que las concentraciones de ambos componentes pueden variar y de este modo controlar el número de ligandos específicos para un receptor de superficie celular que están ligados al polímero de la micropartícula. Así, la invención contempla polímeros que contienen entre 1 y 100, entre 100 y 200, entre 200 y 300, entre 300 y 400, entre 400 y 500, entre 500 y 600, entre 600 y 700, entre 700 y 800, entre 800 y 900 y entre 900 y 1000 moléculas de dicho ligando específico por cada molécula de polímero.

10 Tal como se ha indicado anteriormente, la micropartícula de la invención puede estar formada por cualquier material polimérico biocompatible que permita la secreción continua de los productos terapéuticos y que, además, en caso necesario, actúe como soporte de las células modificadas genéticamente. No obstante, de forma preferida, el polímero de la micropartícula de la invención es alginato. En el Ejemplo 1 de la presente solicitud de patente se describe uno de los distintos procedimientos que existen en el estado de la técnica para producir micropartículas que comprenden alginato como material biopolimérico.

15 En principio, cualquier tipo de alginato capaz de formar un hidrogel es adecuado para ser usado en la micropartícula de la invención. Así, la micropartícula puede contener alginato formado mayoritariamente por regiones de ácido manurónico (bloques MM), por regiones de ácido gulurónico (bloques GG) y por regiones de secuencia mixta (bloques MG). El porcentaje y distribución de los ácidos uránicos difieren según el origen del alginato y contribuyen a las propiedades del alginato. El experto en la materia conoce los porcentajes de cada uno de los distintos bloques que aparecen en las distintas fuentes biológicas de los alginatos. Así, la invención contempla el uso de alginatos procedentes de *Laminaria hyperborea*, *Letonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Durvillaea antarctica*, *Laminaria digitata*, *Eclonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y/o *Laminaria japonica* así como mezclas de alginatos de distintas especies hasta conseguir el contenido deseado en bloques GG, MM o GM. Los bloques GG contribuyen a la rigidez del hidrogel, mientras que los monómeros MM mantienen una gran resistencia a la fractura, de forma que mediante el uso de una combinación adecuada de polímeros de alginato, se puede obtener una mezcla cuyo módulo de elasticidad presenta un valor adecuado mientras que la viscosidad de la solución pre-gel se mantiene a niveles suficientemente bajos como para permitir una adecuada manipulación e inmovilización celular. Así, los alginatos que pueden usarse en la presente invención incluyen alginatos GG, alginatos MM o combinaciones de ambos en una relación de 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 o 10:90.

20 Adicionalmente, la invención también contempla el uso de alginatos derivados del tratamiento de alginatos naturales con enzimas que son capaces de modificar los bloques integrantes para dar lugar a alginatos con propiedades mejoradas. Así, alginatos resultantes del tratar alginatos con C5-epimerasas, que convierten bloques M en bloques G, así como con la enzima AlgE4 de la bacteria *Azotobacter vinelandii* que es capaz de convertir los bloques M relativamente rígidos en bloques MG. Alternativamente, la invención contempla el uso de alginatos que han sido modificados por distintos tratamientos físicos, en particular, rayos gamma, irradiación con ultrasonidos o con luz ultravioleta según ha sido descrito por Wasikiewicz, J.M. *et al.* (Radiation Physics and Chemistry, 2005,73:287-295).

25 La micropartícula de la invención que comprende alginato como material polimérico biocompatible puede usarse tal cual. Sin embargo, como es conocido del estado de la técnica, el alginato es un polímero poco estable que tiende a perder calcio y por tanto, a perder su carácter de gel. Además, las partículas de alginato son relativamente porosas lo que resulta en que los anticuerpos pueden acceder a su interior y dañar las células. Por estos motivos, opcionalmente, la micropartícula de la invención puede estar rodeada de una membrana semipermeable que confiera estabilidad a las partículas y que forme una barrera impermeable a los anticuerpos.

30 Por membrana semipermeable se entiende una membrana que permite la entrada de todos aquellos solutos necesarios para la viabilidad celular y que permitan la salida de los compuestos terapéuticos producidos por las células contenidas dentro de la micropartícula, pero que es sustancialmente impermeable a los anticuerpos, de forma que las células quedan protegidas de la respuesta inmune producida por el organismo que alberga la micropartícula.

35 Materiales adecuados para formar la membrana semipermeable son materiales insolubles en fluidos biológicos, preferentemente poliamino ácidos, como por ejemplo poli-L-lisina, poli-L-oraitina, poli-L-arginina, poli-L-asparagina, poli-L-aspartato, poli benzil-L-aspartate, poli-S-benzil-L-cisteína, poli-gamma-bencil-L-glutamato, poli-S-CBZ-L-cisteína, poli-ε-CBZ-D-lisina, poli-δ-CBZ-DL-orntina, poli-O-CBZ-L-serina, poli-O-CBZ-D-tirosine, poli(γ-etil-L-glutamato), poli-D-glutámico, poliglicine, poli-γ-N-hexil L-glutamato, poli-L-histidina, poli(α,β-[N-(2-hidroxyetil)-DL-aspartamida]), poli-L-hidroxiprolina, poli(α,β-[N-(3-hidroxiopropil)-DL-aspartamide]), poli-L-isoleucina, poli-L-leucina, poli-D-lisina, poli-L-fenilalanina, poli-L-prolina, poli-L-serina, poli-L-threonina, poli-DL-triptófano, poli-D-tirosine, quitosano, oligoquitosanos o una combinación de los mismos.

40 La membrana que recubre la micropartícula es habitualmente de un material policatiónico, que da lugar a la formación de un complejo polianión-policatión que contribuye a la estabilización del alginato y a reducir la porosidad de la micropartícula y a formar una barrera inmunológica impermeable a los anticuerpos. Sin embargo, la carga positiva de dicha membrana favorece la adhesión celular a la superficie de la micropartícula lo que resulta en una menor biocompatibilidad de la misma. Por ello, si se desea, la membrana de poli-L-Lisina que rodea la micropartícula está

ES 2 376 930 A1

rodeada, a su vez, de una segunda membrana formada mayoritariamente por un material que inhibe la adhesión celular, preferiblemente, alginato.

Por otro lado, en principio, el número de células que deben formar parte de la micropartícula no es esencial para la invención siempre que exista un número de células suficiente para que se contribuya a la formación de la redícula. Así, la cantidad de células por cada mL de solución de polímero es entre 1 y 10×10^6 , preferiblemente entre 2 y 9×10^6 , más preferiblemente entre 3 y 8×10^6 , todavía más preferiblemente entre 4 y 7×10^6 y todavía más preferiblemente entre 5 y 6×10^6 . Preferiblemente, el número de células en la mezcla inicial es de 5; 3,75; 2,5 ó $1,25 \times 10^6$ por cada mL de solución de polímero.

Adicionalmente, la composición o kit de la invención puede comprender una combinación de uno o más de un factor angiogénico, una secuencia de nucleótidos, un vector, una célula, una micropartícula y/o una nanopartícula como se definen, respectivamente, en los apartados (a), (b), (c), (d), (e) y (f) del primer aspecto de la invención. Así, la composición o kit de la invención también contempla la posibilidad de comprender:

- al menos, dos factores angiogénicos distintos, solos o en combinación con secuencias de nucleótidos y vectores como las definidas, respectivamente, en los apartados (b) y (c) del primer aspecto de la invención;
- al menos, dos secuencias de nucleótidos cada una de ellas codificando un factor angiogénico distinto, solas o en combinación con factores angiogénicos o vectores como los definidos, respectivamente, en los apartados (a) y (c) del primer aspecto inventivo de la invención;
- al menos, dos vectores, cada uno de ellos comprendiendo una o varias secuencias de nucleótidos como los definidos en (b) que codifican distintos factores angiogénicos, solos o en combinación con factores angiogénicos como los definidos en el apartado (a) del primer aspecto inventivo de la invención;
- al menos, dos células que comprenden factores angiogénicos, secuencias de nucleótidos o vectores distintos, como los definidos, respectivamente, en los apartados (a)-(c) del primer aspecto inventivo de la invención;
- al menos, dos micropartículas que contienen factores angiogénicos, secuencias de nucleótidos, vectores o células distintos, como los definidos, respectivamente, en los apartados (a)-(d) del primer aspecto inventivo de la invención;
- al menos, una micropartícula que contiene factores angiogénicos, secuencias de nucleótidos, vectores o células distintos, como los definidos, respectivamente, en los apartados (a)-(d) del primer aspecto inventivo de la invención, y una nanopartícula que contiene factores angiogénicos, secuencias de nucleótidos, vectores distintos como los definidos en los apartados (a)-(c) del primer aspecto inventivo de la invención, etc.

Como se ha citado al comienzo de la presente descripción, la administración de factores angiogénicos a ratones modelo de enfermedad de Alzheimer provoca, sorprendentemente, una reducción de los niveles de proteína beta amiloide a nivel de la corteza cerebral y el hipocampo, y una disminución de la cantidad de proteína tau hiperfosforilada, proporcionando una nueva ventana terapéutica al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y a la prevención de la formación de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas. El experto en la materia entiende que, para que un factor angiogénico, o cualquier otro compuesto, pueda emplearse con fines terapéuticos, éste debe formularse de manera adecuada para su administración.

Por lo tanto, en una realización particular, la composición o kit de la invención comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, si se desea, otro agente terapéutico bien dirigido al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas u otras enfermedades que puedan manifestarse.

Así, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición según la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención que comprenden dos o más componentes pueden formularse para su uso separado simultáneo o sucesivo.

Para uso en medicina, los factores angiogénicos pueden estar en forma de un profármaco, sal, solvato o clatrato, bien en forma aislada o en combinación con agentes activos adicionales y pueden formularse junto con un excipiente que es aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Excipientes preferidos para su uso en la presente invención incluyen azúcares, almidones, celulosas, gomas y proteínas.

La composición farmacéutica de la invención puede formularse en una forma de dosificación farmacéutica sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, comprimidos recubiertos de azúcar, gránulos, supositorios, sólidos estériles cristalinos o amorfos que pueden reconstituirse para proporcionar formas líquidas, etc.), líquida (por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, lociones, ungüentos, etc.) o semisólida (geles, pomadas, cremas y similares). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son conocidos en el estado de la técnica e incluyen

ES 2 376 930 A1

soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diferentes tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden dichos vehículos pueden formularse mediante procedimientos convencionales conocidos en el estado de la técnica.

5 En la presente invención, una “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende como la cantidad de factor angiogénico que es suficiente para que éstos puedan revertir el efecto tóxico producido por la proteína A β 42 o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o retrasar, reducir o eliminar los síntomas asociados a una enfermedad neurodegenerativa o la severidad de la misma.

10 La pauta de dosificación será determinada por el médico y los factores clínicos. Como es muy conocido en medicina, las dosificaciones dependen de muchos factores que incluyen las características físicas del paciente (edad, estatura, sexo), el procedimiento de administración usado, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular usado y las propiedades farmacocinéticas del individuo.

15 Dependiendo de la naturaleza de los componentes de la composición o kit de la invención, es decir, si éstos son proteínas, secuencias de nucleótidos, vectores, células, micropartículas o nanopartículas según se han definido previamente, la cantidad de los mismos en la composición o kit puede variar. Por ejemplo, si la composición comprende un vector viral, la cantidad de vector en la composición o kit de la invención puede variar entre 10⁵ y 10¹³ partículas virales por dosis dependiendo del vector viral usado. Por otra parte, si el vector es un vector no viral, por ejemplo, un plásmido, la cantidad del vector en la composición o kit de la invención puede variar entre 100 ng y 5 mg por dosis.

20 La composición o kit de la invención puede contener, además de proteínas, secuencias de nucleótidos, vectores, células, micropartículas o nanopartículas según se han definido en los apartados (a)-(f) del primer aspecto inventivo de la invención, una cantidad de agentes terapéuticos que puede variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces.

Ejemplos de agentes terapéuticos empleados en la enfermedad de Alzheimer, una típica enfermedad neurodegenerativa, son, sin limitarse a, compuestos inhibidores de colinesterasa, como Razadyne[®] (anteriormente conocida como Reminyl[®]) (galantamina), Exelon[®] (rivastigmina), Aricept[®] (donepezilo) etc.; compuestos antagonistas de los receptores del N-metil D-aspartato (NMDA), como el Namenda[®], etc. Ejemplos de agentes terapéuticos para su utilización en la enfermedad de Parkinson son, Sinemet[®] (Levodopa y Carbidopa), agonistas dopaminérgicos como el Parlodel[®] (Bromocriptina), inhibidores de la enzima mono-amina-oxidasa Plurimen[®] (Selegilina), amantidina, agentes anticolinérgicos como el Akineton[®] (Biperideno). Los bloqueadores de la dopamina, como haloperidol o fenotiacina, pueden reducir los comportamientos y movimientos anormales para la enfermedad de Huntington. Para la esclerosis lateral amiotrófica el agente bloqueante del Glutamato Rilutek[®] (Riluzole).

30 En la presente invención, un “kit” se entiende como un producto que contiene los diferentes principios activos o compuestos de la invención, es decir, proteínas, secuencias de nucleótidos, vectores, células, micropartículas o nanopartículas según se han definido en los apartados (a)-(f) del primer aspecto inventivo de la invención y/o los agentes terapéuticos adicionales que forman la composición envasada de manera que permite su transporte, almacenamiento y su administración simultánea o sucesiva. Por tanto, los kits de la invención pueden contener una o más suspensiones, comprimidos, cápsulas, inhaladores, jeringuillas, parches y similares que contienen los principios activos de la invención y que pueden prepararse en una dosis única o como dosis múltiples. El kit puede contener adicionalmente un vehículo adecuado para resuspender las composiciones de la invención tales como medios acuosos tales como solución salina, disolución de Ringer, disolución de Ringer lactada, dextrosa y cloruro sódico, medios solubles en agua tales como alcohol, polietilenglicol, propiltilenglicol y vehículos insolubles en agua tales como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo. Otro componente que puede estar presente en el kit es un envase que permite mantener las formulaciones de la invención dentro de límites determinados. Materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares.

45 El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o separada de las diferentes formulaciones farmacéuticas presentes en el kit. Por tanto, el kit de la invención puede comprender, además, instrucciones para la administración simultánea, sucesiva o separada de los diferentes componentes. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico que puede almacenar las instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tal como medios de almacenamiento electrónico (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener adicionalmente o alternativamente páginas web de internet que proporcionan dichas instrucciones.

50 Como se ha indicado previamente, los hallazgos descritos en la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En la presente invención, se entiende por “enfermedad neurodegenerativa” a aquella enfermedad que se distingue por ser el resultado de una muerte progresiva de neuronas en el sistema nervioso, fundamentalmente en el cerebro, dando lugar al empeoramiento de las actividades corporales, como el equilibrio, el movimiento, el habla, la respiración, la función cardíaca, etc. Ejemplos de enfermedades neurodegenerativas son, sin limitarse a, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson, atrofia muscular lateral, etc.

ES 2 376 930 A1

En una realización particular de la invención, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson, atrofia muscular lateral.

5 Por otro lado, la composición de la invención o los componentes del kit de la invención pueden administrarse mediante diferentes procedimientos, por ejemplo intravenosamente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intramuscularmente, tópicamente, intradérmicamente, oralmente, intranasalmente o intrabronquialmente, y pueden administrarse localmente o sistémicamente o directamente al sitio diana. Una revisión de los diferentes procedimientos de administración de principios activos, de los excipientes que van a usarse y de los procedimientos para prepararlos puede encontrarse en Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993 y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, EE.UU. (2000). El factor angiogénico de la invención puede administrarse por vía sistémica, dicha vía sistémica o localizada comprende vía intraperitoneal, intravenosa, oral, intratumoral o intrahepática.

15 En la presente invención, una "vía localizada" se entiende como la administración local de la composición de la invención o los componentes del kit de la invención a un sitio específico del cuerpo humano o animal.

En el contexto de la presente invención, la administración de la composición de la invención o los componentes del kit de la invención se realiza a nivel del córtex cerebral, permitiendo la difusión de los factores neurotróficos o angiogénicos a otras áreas del cerebro, aunque también puede realizarse a nivel del estriado o a nivel intracerebroventricular.

20 Por administración "a nivel del córtex cerebral" se entiende, un método en el que la administración se lleva mediante perforación del cráneo y una o varias meninges pero sin dañar el córtex cerebral.

25 En el contexto de la presente invención, el método de administración preferido es mediante una craneotomía.

En la presente invención, se entiende por "craneotomía" a la cirugía del cerebro que consiste en la abertura del cráneo para exponer las meninges, permitiendo la administración de la composición de la invención o los componentes del kit de la invención de forma subdural o subaracnoidea.

30 En una realización particular de la invención, la administración a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo de forma subdural o subaracnoidea. El procedimiento para administrar las micropartículas está descrito en el Ejemplo 2 que acompaña a la presente descripción.

35 En la presente invención se entiende por "córtex cerebral" o "corteza cerebral" al manto de tejido nervioso que cubre la superficie de los hemisferios cerebrales.

40 En una realización particular, la administración de la composición de la invención o los componentes del kit de la invención a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo mediante craneotomía bilateral.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, preferentemente enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica que comprende la administración de la composición o kit de la invención junto con, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un agente terapéutico.

45 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

50 Ejemplo 1

Elaboración y caracterización de las micropartículas

55 *Cultivo de las células productoras de VEGF*

Las células BHK (fibroblastos procedentes de riñón de hámster) modificadas genéticamente para producir VEGF se hicieron crecer en medio DMEM con un 2% de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de antibiótico/antimicótico. Se realizaron pases de las células cada 2 o 3 días, manteniéndose en el incubador a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Todos los componentes de los medios de cultivo utilizados fueron de la casa Gibco BRL (Invitrogen S.A., España).

65 *Encapsulación de las células en las micropartículas*

El procedimiento de encapsulación comprendió varias etapas. En primer lugar, se suspendieron las células modificadas genéticamente para que secreten el producto terapéutico en una solución de alginato. Posteriormente, se hizo pasar la suspensión celular a través de la punta del goteador electrostático mediante una bomba de flujo, cayendo las

ES 2 376 930 A1

gotículas formadas en la solución gelificante de cloruro cálcico. Además, mediante la aplicación de una diferencia de potencial electrostático entre la punta del goteador y la solución de cloruro cálcico, se consiguió la formación y gelificación de pequeñas gotículas a partir de la suspensión celular. Una vez formados, los núcleos sólidos de alginato se recubrieron, aplicándose un primer recubrimiento con una solución de poli-L-lisina al 0,05% durante 5 minutos y un segundo recubrimiento con una solución de alginato al 0,1% durante 5 minutos.

Caracterización de las micropartículas

El tamaño y las características superficiales de las micropartículas se determinaron utilizando un microscopio óptico invertido (NikonTSM) equipado con una cámara (Sony CCD-Iris). Las micropartículas obtenidas fueron de forma esférica y superficie lisa y uniforme, el tamaño medio fue de $405 \pm 11 \mu\text{m}$ (Figura 1).

Funcionalidad de los fibroblastos productores de VEGF en las micropartículas

Para caracterizar la funcionalidad de los fibroblastos en el interior las micropartículas, se estudió la liberación de VEGF *in vitro* durante un período de tres semanas. La determinación de la producción de VEGF se realizó mediante una técnica de ELISA (Amersham Biosciences, USA). Tras 21 días en cultivo, la secreción de VEGF a partir de las micropartículas cargadas con 10^6 células por mililitro de alginato fue de aproximadamente $5,49 \pm 0,619 \text{ ng de VEGF/100 microcápsulas en 24 horas}$. Estos resultados sugieren que las células se adaptaron satisfactoriamente al nuevo microambiente.

Ensayo de apoptosis en cultivos de neuronas

Para preparar el cultivo de las neuronas se diseccionó el cerebro de ratas E18, separando la corteza. Los fragmentos se lavaron en PBS frío y se digirieron mecánicamente en Neurobasal. Se centrifugó a 990 rpm 5 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. A continuación, se añadió el medio de cultivo Neurobasal (Gibco), suplemento B27 (Gibco), Glutamina $200 \mu\text{M}$ (Sigma) y antibiótico antimicótico 1% (Gibco) y se incubaron a 37°C durante 7 días hasta realizar el experimento.

A los cultivos de neuronas se les adicionó proteína A β 40 ($5 \mu\text{g/mL}$) o A β 42 ($5 \mu\text{g/mL}$) o A β 40 ($5 \mu\text{g/mL}$) y micropartículas que contenían células productoras de VEGF (30 micropartículas por pocillo) o, por último, A β 42 ($5 \mu\text{g/mL}$) y micropartículas que contenían células productoras de VEGF (30 micropartículas por pocillo). Los cultivos se incubaron durante 24 horas o 48 horas.

Para determinar el efecto apoptótico del A β 42 se utilizó el ensayo de muerte celular (Ensayo del MTT). Las muestras de neuronas corticales se prepararon y procesaron siguiendo las indicaciones del kit "Cell Death Detection ELISA plus" (Roche). La muerte celular se evaluó con un lector de ELISA. Se realizó la determinación tras un período de incubación de 24 horas o 48 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2A. Tal y como puede observarse en dicha Figura, la administración de las microcápsulas que contienen las células productoras de VEGF, al liberar dicho factor, revierten el efecto tóxico producido por el péptido β -Amiloide lo cual puede ser asociado con un efecto neuroprotector.

Los cultivos de neuronas corticales tras 48 horas de incubación se usaron con tampón de lisis más inhibidores de proteasas. Se dejó migrar en un gel de poliacrilamida y se determinó la expresión de caspasa-3, caspasa-9, Bcl2 (proteína antiapoptótica) y pErk. La Figura 2B muestra la señalización que produce el β -Amiloide y como las microcápsulas secretoras de VEGF lo revierten a nivel del control. El A β 1-40 induce fosforilación de Erk y la activación de la caspasa 3, mientras que el Ab 1-42 además de incrementar los niveles de caspasa 3 también sube los de caspasa 9. El tratamiento con microcápsulas secretoras de VEGF revierte la fosforilación de Erk y disminuye los niveles de las caspasas 3 y 9, además incrementa notablemente los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Ensayo de apoptosis en cultivos de células endoteliales de cerebro

Para este ensayo usamos una línea celular de células endoteliales de cerebro, las BMVEC. Estas células se mantienen en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal (FBS) y 1% de antibiótico. A partir del stock de células mantenidas en un frasco se siembran en placas multipocillo donde se realiza en ensayo de muerte celular, siguiendo las especificaciones del Kit "Cell Death Detection ELISA plus" (Roche).

Tal y como se observa en la Figura 2C tanto el beta amiloide 1-40 como el 1-42 muestran un efecto apoptótico en cultivos de células endoteliales de cerebro (BMVEC) ya que incrementan los niveles de la caspasa 3. La administración de microcápsulas secretoras de VEGF revierten el efecto del β -Amiloide ejerciendo un papel protector de la barrera hematoencefálica a nivel de los vasos cerebrales.

Ejemplo 2

Tratamiento de animales transgénicos enfermos de Alzheimer con micropartículas en las que se han encapsulado células modificadas genéticamente para producir VEGF

5

Los ratones doble transgénicos: Amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) resultante del cruce entre el ratón Tg2576 (sobrexprea la proteína APP695 humana) y el ratón mutante (ratón M146L) para la presenilina-1 (Ps1), son un modelo de amiloidosis para la enfermedad de Alzheimer.

10

A los ratones anestesiados mediante isoflurano inhalado se les realizó una craneotomía bilateral en las coordenadas posterior 0,6 mm y lateral 1,1 mm al punto bregma (Paxinos y Watson, 1982). Una vez realizada la craneotomía se les administró en la superficie del cerebro a nivel subdural, a un grupo de ratones, micropartículas productoras de VEGF y a otro grupo de ratones, micropartículas con fibroblastos no transfectados (a este grupo de ratones se les denominó control). A cada ratón (6 por grupo) se le administró entre 20-30 micropartículas por orificio. Una vez terminada la intervención quirúrgica se cerraron los orificios con membranas de nitrocelulosa impregnadas en una solución de Yodo diluida (Betadine), lo cual impide la salida de las micropartículas de los orificios y aísla el cerebro de una posible infección.

15

20

Ensayo de determinación de vasos sanguíneos

Se realizó una doble tinción con BrdUrd y lectina con el objetivo de distinguir los nuevos vasos formados tras la liberación de VEGF de los vasos pre-existentes, observándose un incremento de dichos vasos en los ratones tratados con las micropartículas que liberan VEGF con respecto al control (Figura 3).

25

Ensayo de muerte celular (Ensayo del MTT)

30

Los cerebros se diseccionan en las diferentes regiones de estudio: hipocampo y corteza. Las muestras se prepararon y procesaron siguiendo las indicaciones del kit "Cell Death Detection ELISA plus" (Roche). La muerte celular se evaluó con un lector de ELISA.

35

Tal y como se muestra en la Figura 4, el ensayo del MTT puso de manifiesto que la administración de VEGF provoca un incremento de viabilidad celular a nivel de córtex cerebral.

Determinación de caspasa-9 y caspasa-3 en córtex

40

Los cerebros se diseccionan en las diferentes regiones de estudio: hipocampo y corteza. Cada muestra de tejido se lisó con tampón de lisis (PIK) con inhibidores de proteasas. En cada una de las muestras, se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford. Las muestras (20 microgramos) se dejaron migrar en un gel SDS-PAGE 100 V durante 2-3 horas, y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (250 mA, 60 minutos). Las membranas se incubaron con anticuerpos anti caspasa-3 (cell signaling) y anti caspasa-9 (cell signaling) durante la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se revelaron con HRP-Peroxidasa.

45

En el gel se hicieron migrar muestras correspondientes a 7 ratones control y a 7 ratones tratados con VEGF. Se cuantificaron las bandas correspondientes a la caspasa 3 y 9, y mediante el programa Image J (NIH) se realizó el estudio densitométrico.

50

Los resultados obtenidos se recogen en las Figuras 5 y 6. Tal y como puede observarse en dichas Figuras, la administración a ratones APP/Ps1 del factor angiogénico VEGF liberado a partir de las microcápsulas provocó una disminución de la activación de las caspasas 3 y 9 a nivel de córtex, lo cual indica una menor apoptosis neuronal.

55

Determinación de placas amiloides

Determinación inmunohistoquímica de placas amiloides utilizando el método de diaminobencidina

60

Los cortes de cerebro de 50 µm fueron procesadas por el método del complejo avidina-biotina (ABC). Los cortes se incubaron 20 minutos con ácido fórmico 88% y posteriormente se lavaron con PBS. Después de la incubación con el primer anticuerpo específico anti-beta amiloide durante 24 horas, las secciones se incubaron 40 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado, seguido de 1 hora de incubación con el complejo ABC. Finalmente la inmunoreactividad se visualizó tras 6 minutos de incubación con diaminobencidina, seguido de deshidratación de los cortes por inmersión sucesiva en etanol y xileno.

65

La administración de VEGF originó una disminución en la densidad de placas tanto en el córtex como en el hipocampo de los ratones transgénicos (Figura 7).

En la tabla I se representa el porcentaje de proteína beta amiloide en la forma soluble ($A\beta_{40}$) y la proteína beta amiloide en la forma insoluble ($A\beta_{42}$) en la corteza y en el hipocampo de los ratones tratados con las micropartículas que liberan VEGF con respecto al control (100%).

TABLA I

	$A\beta_{1-40}$ (% control)	$A\beta_{1-42}$ (% control)
corteza	28,44 ± 5,47**	44,07 ± 10,7**
hipocampo	52,59 ± 5,88*	78,18 ± 15,92

Datos expresados como media ± s.e.m. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

La determinación de niveles de proteína $A\beta$ en la corteza y en el hipocampo de los ratones transgénicos enfermos de Alzheimer, puso de manifiesto que el tratamiento con las micropartículas que secretan VEGF provoca, en la corteza, una reducción del 71,66% en los niveles de proteína $A\beta_{40}$ y del 45,93% en los niveles de proteína $A\beta_{42}$ frente a los controles (microcápsulas con células no transfectadas) y en el hipocampo, con VEGF, la reducción del nivel de proteína $A\beta_{40}$ es del 47,41% y del 21,82% en el caso de la proteína $A\beta_{42}$ (Tabla I).

Determinación de la cantidad de tau hiperfosforilado

Para llevar a cabo esta determinación los cerebros de los ratones se diseccionaron y se extrajo un fragmento de la corteza. Posteriormente cada muestra de tejido se lisó con tampón de lisis (PIK) en que se incluyeron inhibidores de proteasas. En cada una de las muestras, se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford. Las muestras (20 microgramos) se dejaron migrar en un gel SDS-PAGE 100 V durante 2-3 horas, y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (250 mA, 60 minutos). Las membranas se incubaron con anticuerpos AT-8 (innogenetics) que detecta específicamente Tau hiperfosforilado, y anti actina (Sigma) como marcador de carga durante la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se revelaron con HRP-Peroxidasa.

En el gel se hicieron migrar muestras correspondientes a 7 ratones control y a 7 ratones tratados con VEGF. Se cuantificaron las bandas de correspondientes a PHF-Tau y actina (control de carga), y mediante el programa Image J (NIH) se realizó el estudio densitométrico.

Los resultados se recogen en la Figura 8A, el tratamiento con microcápsulas que contenían células productoras de VEGF provoca una reducción en la cantidad de Tau hiperfosforilado en Usados de cortezas de cerebros de ratones APP/Ps1. Esta reducción es importante ya que una de las características patológicas de la Enfermedad de Alzheimer es la aparición dentro de la neurona de ovillos neurofibrilares y estos ovillos están formados por la proteína Tau hiperfosforilada (Tau PHF).

Determinación de la actividad de la enzima glucogeno sintetasa kinasa 3β (GSK3β)

Los cerebros de los ratones APP/Ps1 se diseccionaron y se extrajo un fragmento de la corteza. Cada muestra de tejido se usó con tampón de lisis (PIK) en que se incluyeron inhibidores de proteasas. En cada una de las muestras, se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford. Las muestras (20 microgramos) se dejaron migrar en un gel SDS-PAGE 100 V durante 2-3 horas, y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (250 mA, 60 minutos). Las membranas se incubaron con anticuerpos GSK-3 beta fosfo-Serina (cell signaling) y GSK3beta total (santa cruz) como marcador de carga durante la noche a 4°C y en agitación. Al día siguiente se revelaron con HRP-Peroxidasa.

En el gel se dejaron migrar muestras correspondientes a 7 ratones control y a 7 ratones tratados con VEGF. Se cuantificaron las bandas correspondientes a P-Ser-GSK3beta y GSK3-beta total, y mediante el programa Image J (NIH) se realizó el estudio densitométrico.

El tratamiento con microcápsulas secretoras de VEGF provoca que la GSK3beta se fosforile en Serina inhibiéndose su actividad enzimática, esto hace que la proteína Tau se desfosforile y se recuperen los niveles normales de fosforilación de dicha proteína. Los resultados se recogen en la Figura 8B.

ES 2 376 930 A1

Determinación inmunohistoquímica de los depósitos intracelulares de proteína tau hiperfosforilada

Los cortes de cerebro de 50 μm fueron procesadas por el método del complejo avidina-biotina (ABC). Después de la incubación con el primer anticuerpo AT-8 durante 24 horas, las secciones se incubaron 40 minutos con un anticuerpo secundario biotinilado, seguido de 1 hora de incubación con el complejo ABC. Finalmente la inmunoreactividad se visualizó tras 6 minutos de incubación con diaminobencidina, seguido de deshidratación de los cortes por inmersión sucesiva en etanol y xileno.

En la Figura 8C se observa como los ratones control (tratados con microcápsulas con células que no liberaban VEGF) presentan acúmulos de Tau hiperfosforilado. Sin embargo, en los cerebros de los ratones APP/Ps1 tratados con microcápsulas que liberan VEGF los depósitos de PHF-Tau intracelulares prácticamente son indetectables.

Método de la tioflavina

Los cortes de cerebros de 50 micras se incubaron 8 minutos en una solución de Tioflavina 0,1% en una solución de etanol al 50%. Al finalizar se lavó con etanol, H₂O y PBS. Las muestras se examinaron en un microscopio de fluorescencia.

En la Figura 8 D se observa que la presencia de agregados tioflavina positivos (marcador histoquímico de ovillos neurofibrilares) es mucho menor en los ratones tratados con VEGF que en los ratones control, lo cual confirma la reducción de proteína tau hiperfosforilada que se produce en los cerebros de los ratones cuando se tratan con el VEGF.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición o kit que comprende:

- 5 a) el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), o
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica VEGF, o
- 10 c) un vector que comprende una secuencia de nucleótidos como se define en (b), o
- d) una célula que comprende VEGF como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define (b) y/o un vector como se define en (c), o
- 15 e) una micropartícula que comprende VEGF como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b), un vector como se define en (c) y/o una célula como se define en (d), o
- f) una nanopartícula que comprende VEGF como se define en (a), una secuencia de nucleótidos como se define en (b) y/o un vector como se define en (c), o
- 20 g) una combinación de uno o mas de (a), (b), (c), (d), (e) y/o (f),

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, para revertir el efecto tóxico producido por la proteína beta amiloide (1-42) o la proteína tau hiperfosforilada, para disminuir la cantidad de proteína tau hiperfosforilada y/o para prevenir la formación de ovillos neurofibrilares.

25

2. Uso de la composición según la reivindicación 1, que comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un compuesto terapéutico.

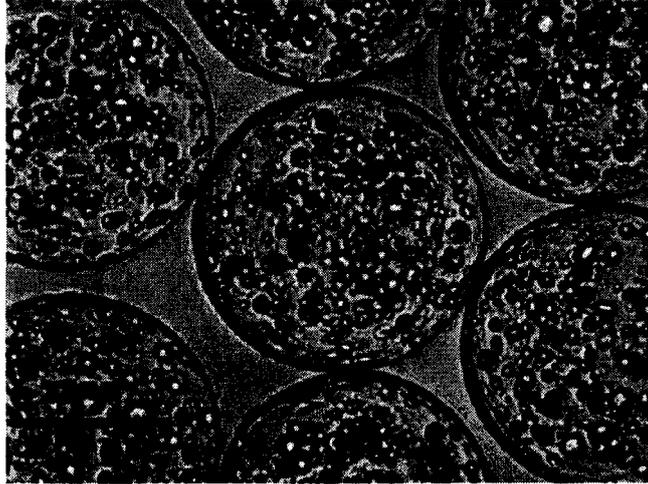
3. Uso de la composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson, atrofia muscular lateral.

4. Uso de la composición o kit según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la administración de la composición se realiza a nivel del córtex cerebral, a nivel del estriado o a nivel intracerebroventricular.

5. Uso de la composición o kit según la reivindicación 4, en donde la administración a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo de forma subdural o subaracnoidea.

6. Uso de la composición o kit según la reivindicación 5, en donde la administración a nivel del córtex cerebral se lleva a cabo mediante craneotomía bilateral.

A



B

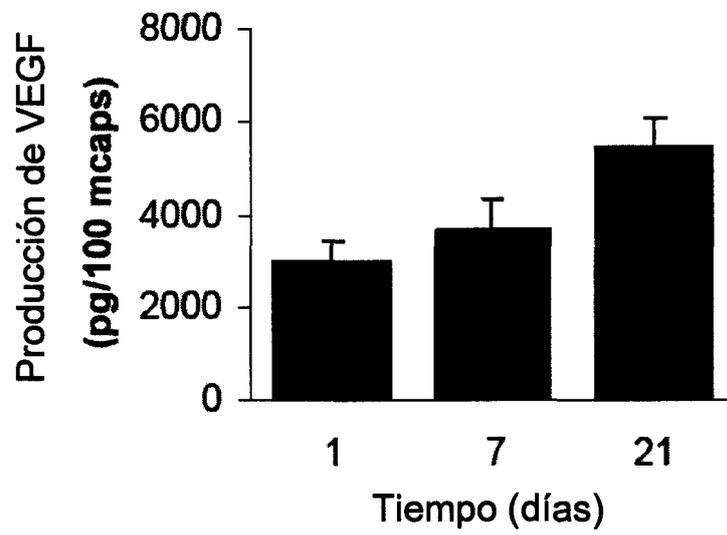


FIGURA 1

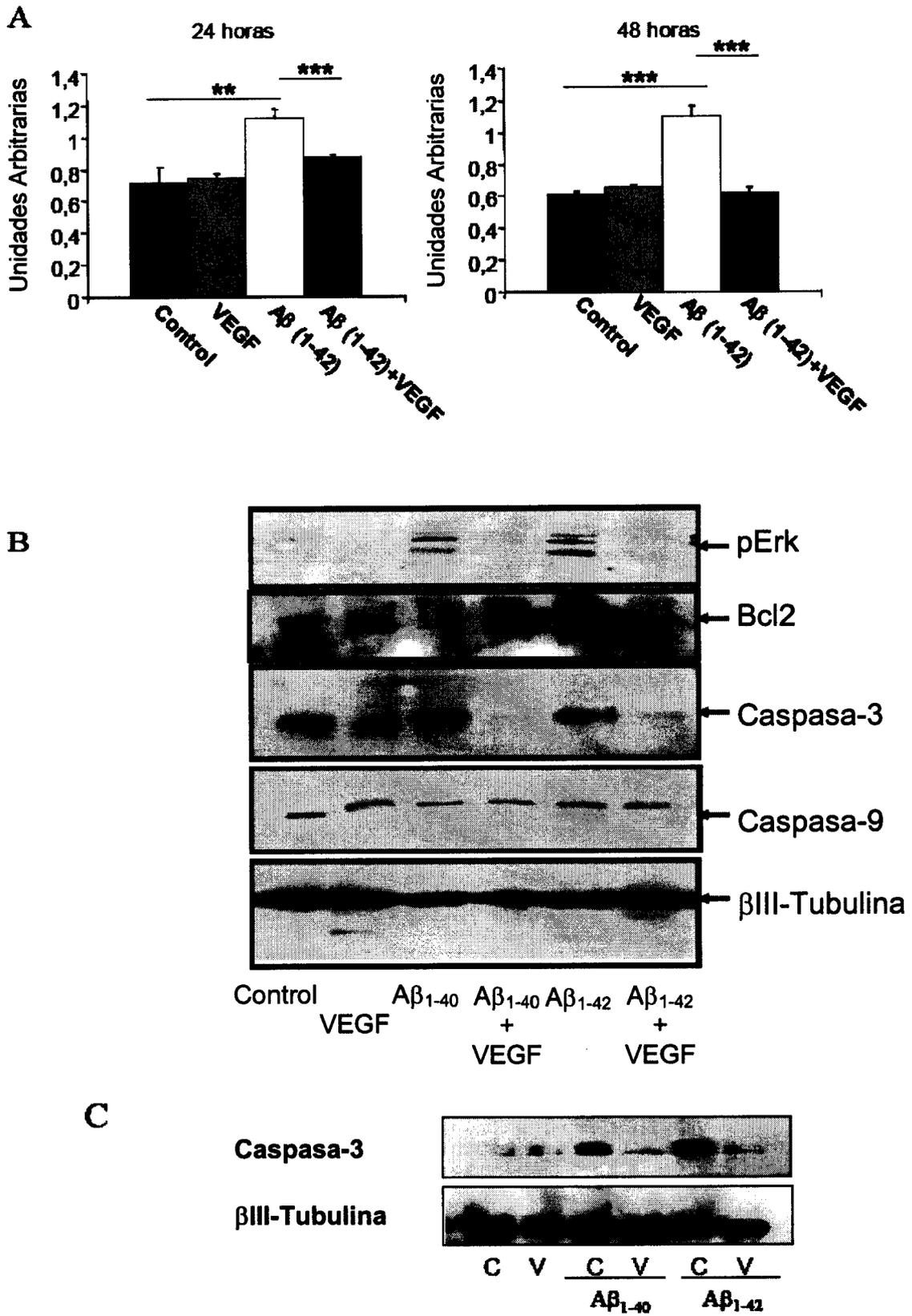


FIGURA 2

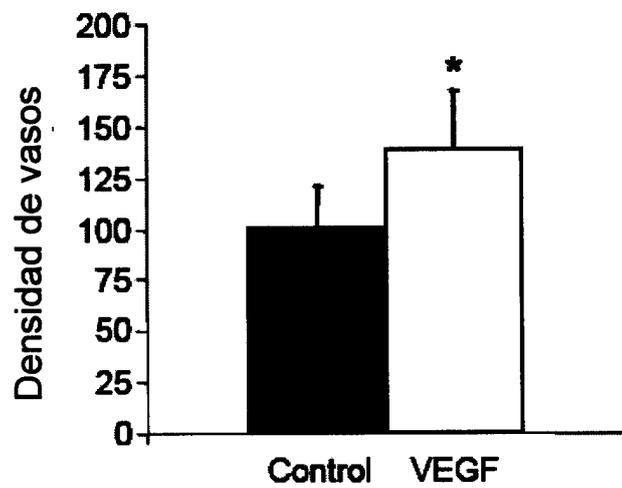
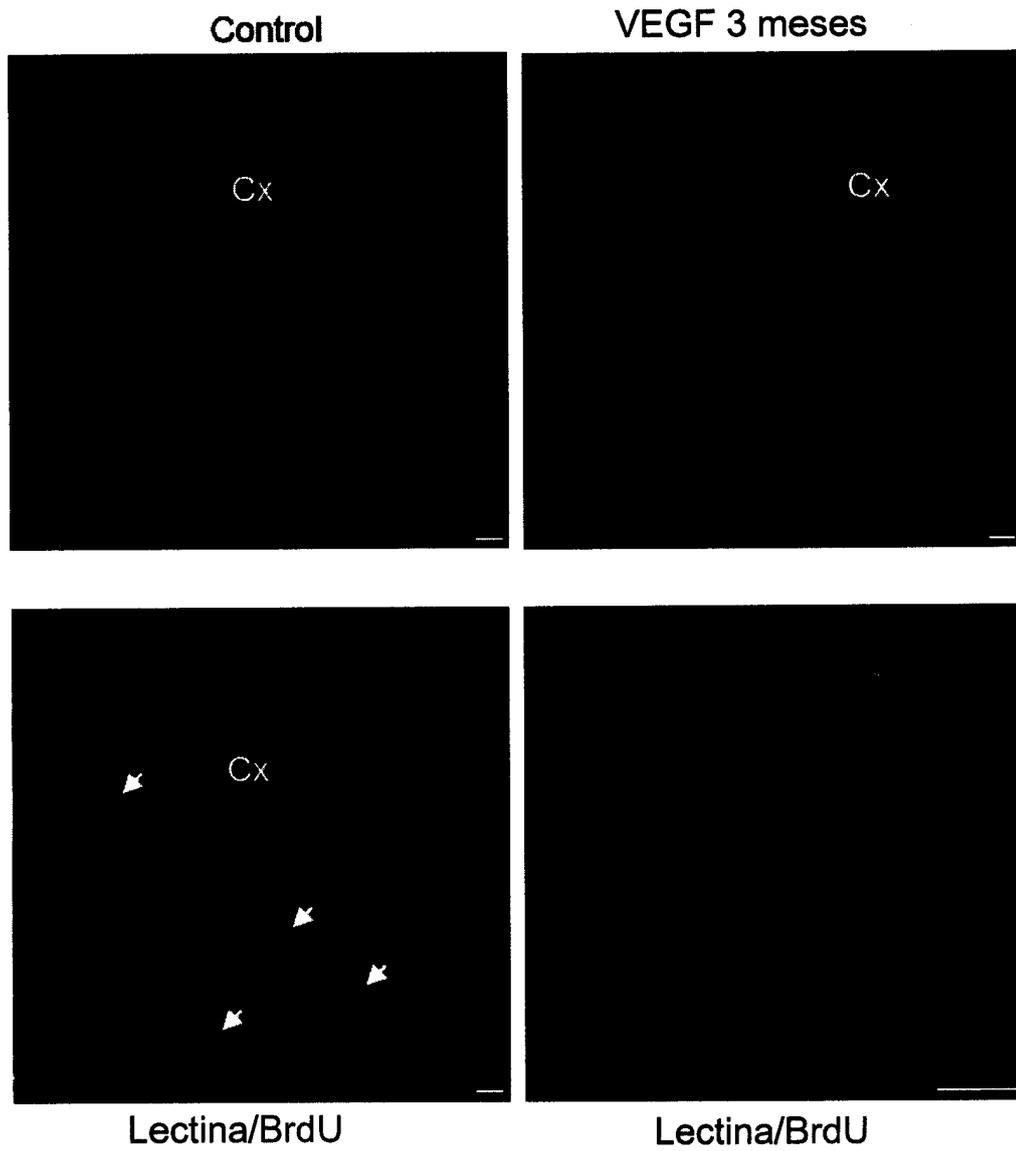


FIGURA 3

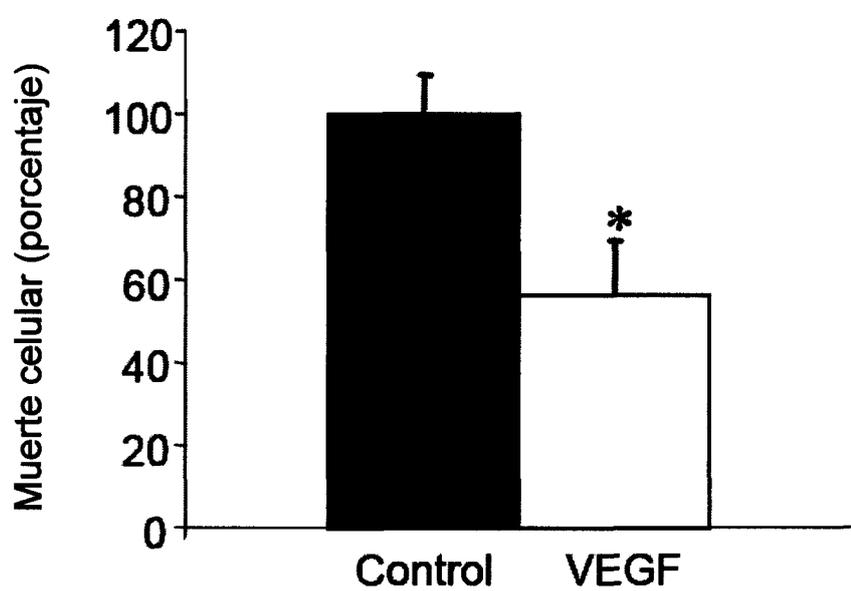


FIGURA 4

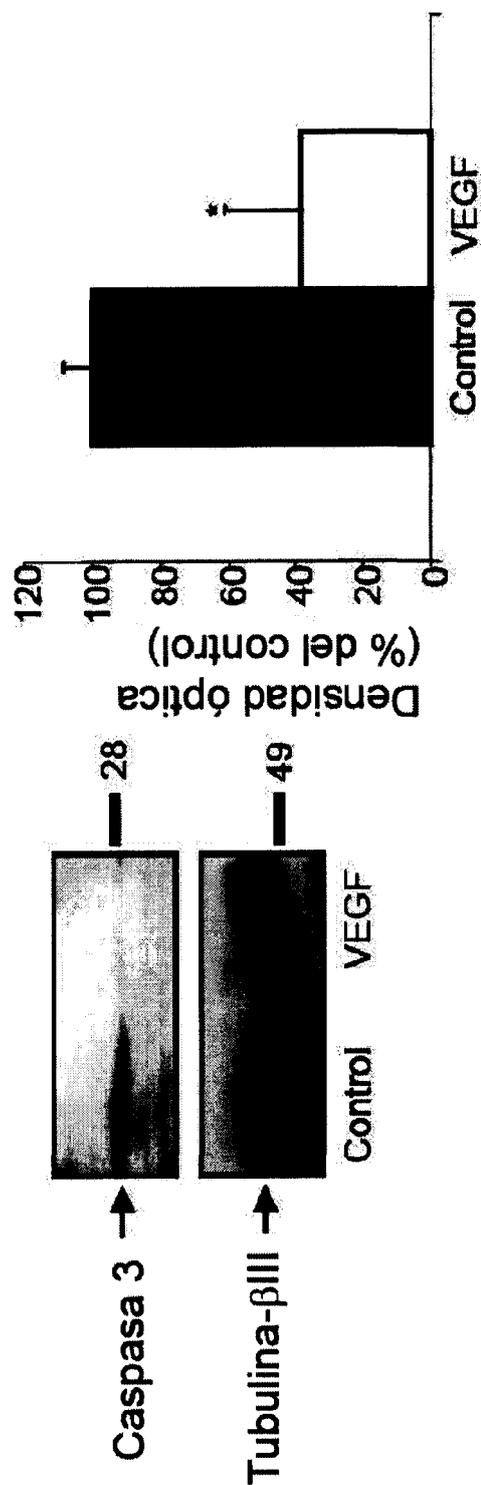


FIGURA 5

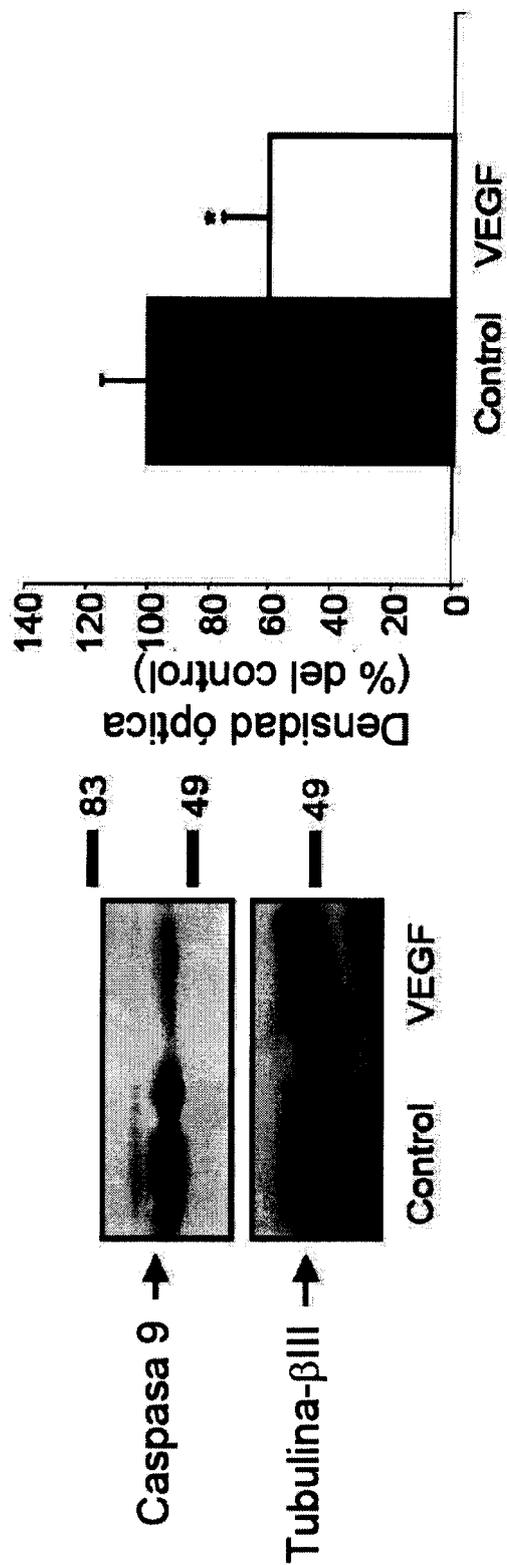


FIGURA 6

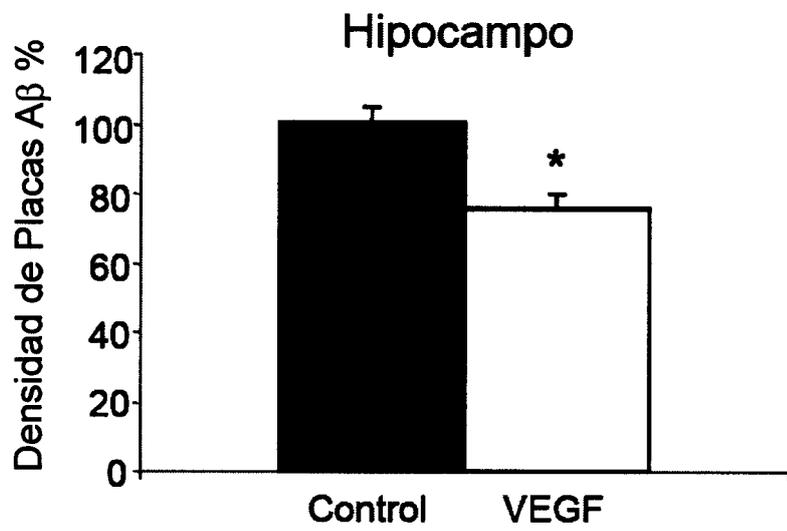
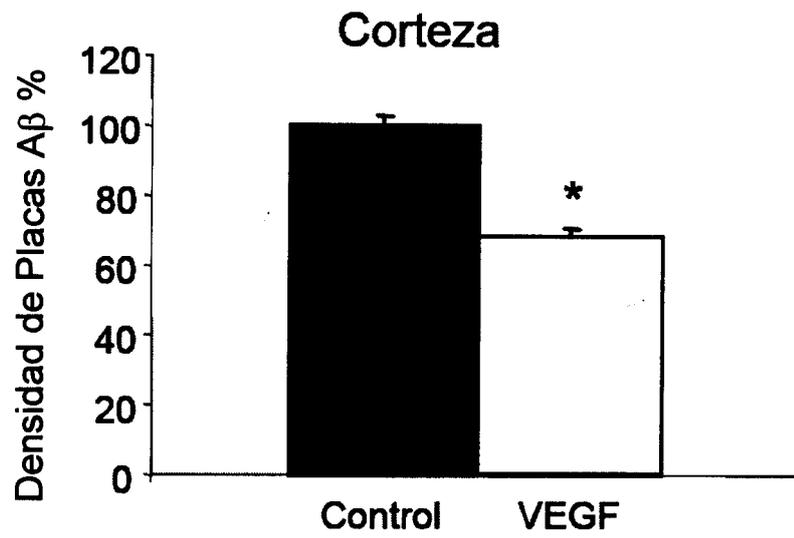
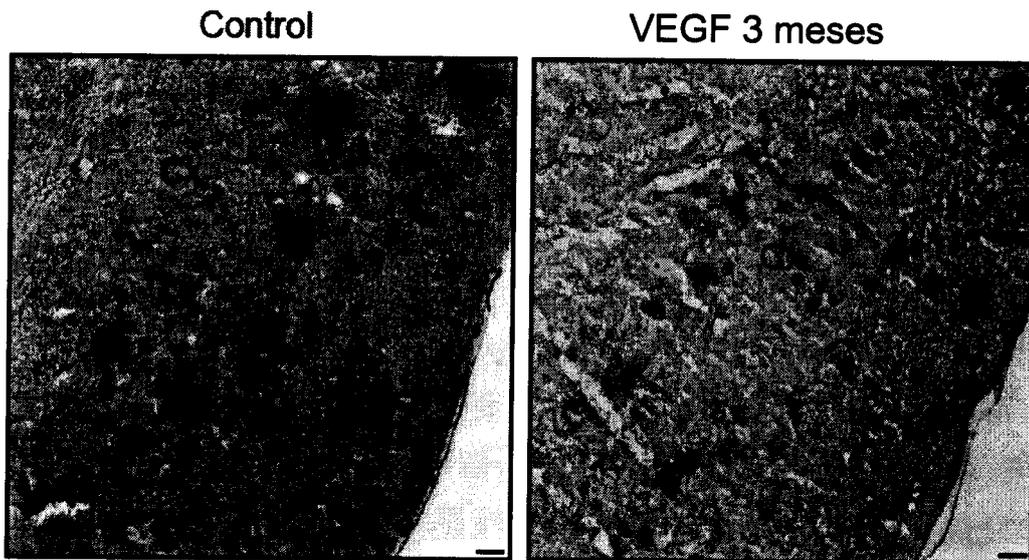


FIGURA 7

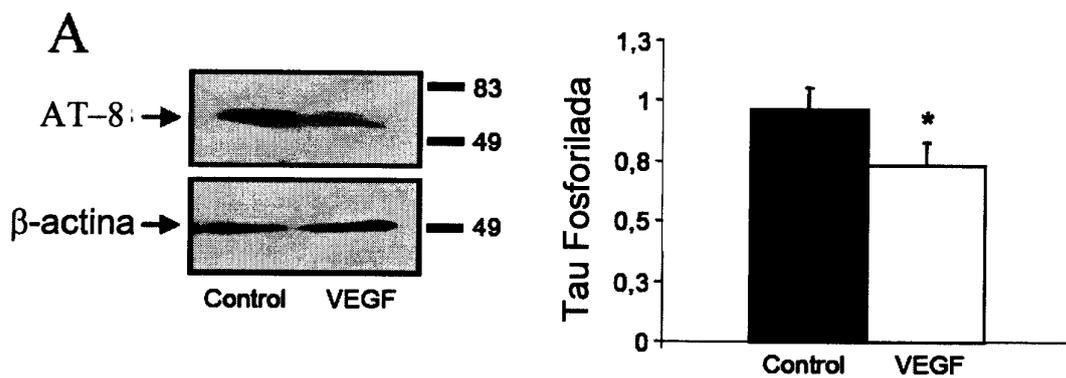


FIGURA 8A

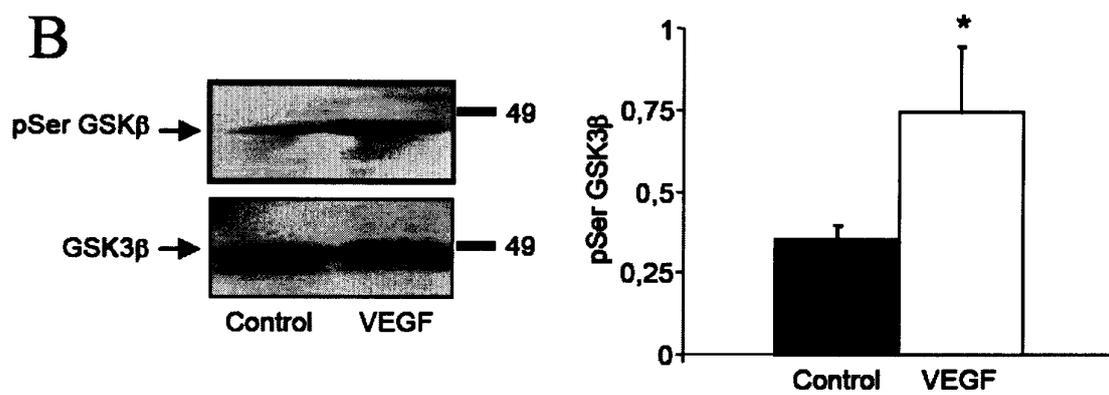


FIGURA 8B

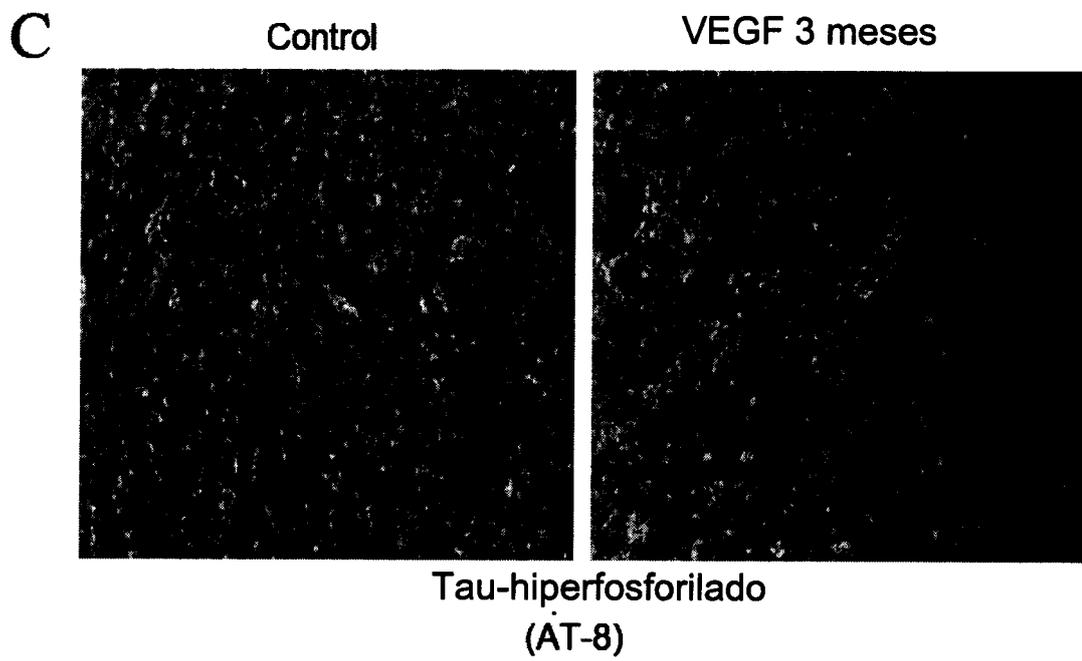


FIGURA 8C

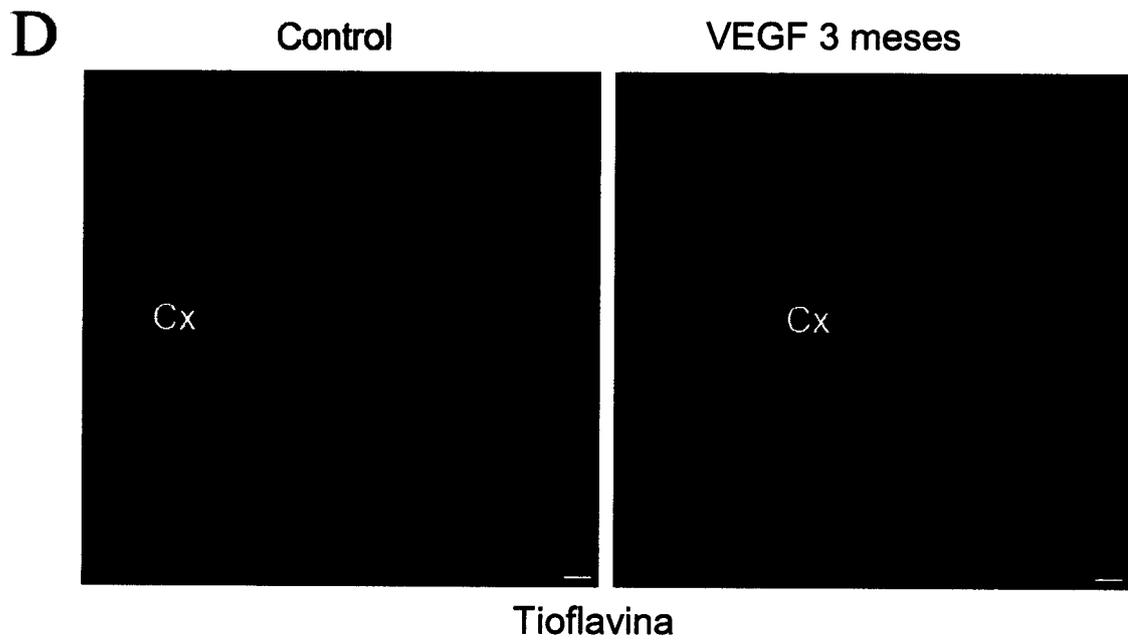


FIGURA 8D

ES 2 376 930 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidad País Vasco
Fundación Investigación Biomédica Hospital Universitario 12 de Octubre
5 Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Neurodegenerativas
- <120> Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas
- 10 <130> P3972ES00
- <160> 39
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 14
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> Péptido espaciador flexible.
- <400> 1
- 30 Ser Gly Gly Thr Ser Gly Ser Thr Ser Gly Thr Gly Ser Thr
1 5 10
- <210> 2
35 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Péptido espaciador flexible.
- 45 <400> 2
- Ala Gly Ser Ser Thr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Gly Ser Thr Thr
1 5 10 15
- 50 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido espaciador flexible
- 60 <400> 3
- 65 Gly Gly Ser Gly Gly Ala Pro
1 5

ES 2 376 930 A1

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido espaciador flexible.
10
<400> 4

15 Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly
1 5

<210> 5
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido espaciador flexible.

<400> 5
30
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

35 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décimocuarta repetición tipo III de fibronectina
45
<400> 6

50 Ile Asp Ala Pro Ser
1 5

<210> 7
<211> 4
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido derivado de la región CS5 de la fibronectina

<400> 7
65
Arg Glu Asp Val
1

ES 2 376 930 A1

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento del fibrinógeno con capacidad adhesiva
10
<400> 8

Gln Ala Gly Asp Val
15 1 5

<210> 9
<211> 4
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Fragmento del VCAM-I con capacidad adhesiva

<400> 9
30
Ile Asp Ser Pro
1

35 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
45 <400> 10

Arg Gly Asp Ser
50 1

<210> 11
<211> 4
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 11
65
Gly Arg Gly Asp
1

ES 2 376 930 A1

<210> 12
<211> 4
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
10
<400> 12

Arg Gly Asp Val
15 1

<210> 13
20 <211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 13
30

Arg Gly Asp Thr
1

35 <210> 14
<211> 5
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
45
<400> 14

Gly Arg Gly Asp Gly
50 1 5

<210> 15
55 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 15
65

Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

ES 2 376 930 A1

<210> 16
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
10
<400> 16

Gly Arg Gly Asp Tyr
15 1 5

<210> 17
20 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 17
30

Gly Arg Gly Asp Phe
1 5

35 <210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
45 <400> 18

Tyr Arg Gly Asp Ser
50 1 5

<210> 19
<211> 6
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 19
65

Tyr Arg Gly Asp Asp Gly
1 5

ES 2 376 930 A1

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
10
<400> 20

15 Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

<210> 21
20 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 21
30 Gly Arg Gly Asp Ser Gly
1 5

35 <210> 22
<211> 6
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
45 <400> 22

50 Gly Arg Gly Asp Ser Tyr
1 5

<210> 23
55 <211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 23
65 Gly Arg Gly Asp Val Tyr
1 5

ES 2 376 930 A1

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
10
<400> 24

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
15 1 5

<210> 25
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 25
30

Cys Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
1 5

35 <210> 26
<211> 8
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina
45
<400> 26

Cys Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
50 1 5

<210> 27
55 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 27
65

Cys Gly Arg Gly Asp Ser Tyr
1 5

ES 2 376 930 A1

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 28

15 Arg Gly Asp Phe Lys
1 5

<210> 29

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 29

30 Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp
1 5

35 <210> 30

<211> 14

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

45 <220>

<221> Acetylation

<222> (1)..(1)

50 <220>

<221> Amidation

<222> (14)..(14)

55 <400> 30

60 Cys Gly Gly Asn Gly Glu Pro Arg Gly Asp Tyr Arg Ala Tyr
1 5 10

<210> 31

65 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 376 930 A1

<220>
<223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

5 <220>
<221> Acetylation
<222> (1)..(1)

10 <400> 31

Gly Cys Gly Tyr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly
1 5 10

15 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Péptido derivado de la región de la décima repetición tipo III de fibronectina

<400> 32

30 Arg Gly Asp Pro Ala Ser Ser Lys Pro
1 5

35 <210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Péptido empleado como elemento espaciador

45 <400> 33

Gly Gly Gly Gly
1

50 <210> 34
<211> 4
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Péptido empleado como elemento espaciador

<400> 34

65 Gly Gly Gly Ser
1

ES 2 376 930 A1

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido empleado como elemento espaciador

<400> 39

15 Gly Gly Gly Val Glu Gly Gly Gly
1 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900331

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.02.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20070249539 A1 (CARMELIET et al.) 25.10.2007, párrafos [0003],[0006],[0013],[0014],[0027],[0028],[0029],[0047].	1-6
X	WO 2005030240 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, LICENTIA LTD, INSERM) 07.04.2005, página 27, líneas 18-29; página 28, líneas 1-24; página 31, línea 29 – página 32, línea 2; reivindicaciones 1-5,19,26,53,54,56.	1-6
X	US 20030203844 A1 (DEL FANI et al.) 30.10.2003, párrafos [0013],[0014],[0016],[0017],[0186]-[0197]; reivindicaciones 1,7,9,10-12.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.03.2012

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/18 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

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

A61K, A61P

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: 06.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-6	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	US 20070249539 A1 (CARMELIET et al.)	25.10.2007
D02	WO 2005030240 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, LICENTIA LTD, INSERM)	07.04.2005
D03	US 20030203844 A1 (DELFIANI et al.)	30.10.2003

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 una composición o kit que comprende el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), o una secuencia de nucleótidos que codifica dicho VEGF, o un vector que comprende dicha secuencia, o una célula que comprende VEGF, o una micropartícula que comprende dicho factor de crecimiento o una nanopartícula que comprende VEGF, o sus combinaciones, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (reivindicación 1). La composición puede comprender, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un compuesto terapéutico (reivindicación 2). La enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, demencia con cuerpos de Lewy, Parkinson y atrofia muscular lateral (reivindicación 3). La administración de la composición se realiza a nivel de córtex cerebral, a nivel del estriado o a nivel intracerebroventricular (reivindicación 4). La administración a nivel de córtex cerebral se lleva a cabo de forma subdural o subaracnoidea (reivindicación 5), y mediante craneotomía bilateral (reivindicación 6).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 se refiere al uso del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGH), derivados o fragmentos del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y de Huntington (véase párrafos [0003], [0006], [0013] y [0014]). La composición peptídica de VEGF puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable (véase párrafo [0027]) y ser administrada de manera intratecal (véase párrafo [0028]). Dicho VEGF además de administrarse como proteína, puede ser administrado como ácido nucleico que codifique para VEGF introducido en un vector de expresión apropiado (véase párrafo [0029]). Y por último, en los ejemplos, (véase párrafo [0047]), no se detectaron señales características del neuropatía isquémica, tales como depósitos amiloides, después del tratamiento.

El documento D02 describe el uso del producto del factor de crecimiento del endotelio vascular C (VEGH-C) o del producto del factor de crecimiento del endotelio vascular D (VEGH-D) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (véase página 28, líneas 1-24 y reivindicaciones 1-5). Además dichos productos pueden ser administrados junto con un factor de crecimiento neuronal, entre los que se puede incluir el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGH) (véase página 27, líneas 18-29). Se trata de un método para estimular la proliferación de células madre neuronales, que consiste en poner en contacto dichas células madre neuronales con la composición que comprende los productos de VEGH-C o VEGH-D (véase reivindicación 19). Dichas células se administran posteriormente al sujeto, en este caso un mamífero (véase reivindicación 26). Pueden ser implantadas o trasplantadas a un tejido, órgano, etc o inyectadas directamente al sistema nervioso central o periférico (véase página 31, línea 29-página 32, línea 2). Por otro lado, puede introducirse el polinucleótido que codifica para el producto VEGH-C en un vector (véase reivindicaciones 53-54). Y por último dicha composición puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable (véase reivindicación 56).

El documento D03 trata sobre un método para paliar los síntomas de enfermedades del sistema nervioso que comprende administrar PDGF, VEGH o una combinación de ellos para modular la actividad de células madre neuronales o células progenitoras neuronales (véase párrafos [0013], [0014] y reivindicación 1). La administración puede realizarse a nivel intracerebroventricular, intracranalmente, etc (véase reivindicación 7), además, dichos factores pueden ser administrados como péptidos, los cuales pueden ser insertados en vectores (véase párrafo [0197]) o mediante liberación por micelas (véase párrafo [0016] y reivindicación 9). Las enfermedades neurodegenerativas seleccionadas son, entre otras, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, demencia con cuerpos de Lewy (véase párrafo [0017] y reivindicaciones 10-12). Dicho documento describe también composiciones farmacéuticas que comprenden dichos factores de crecimiento del endotelio vascular junto con vehículos farmacéuticamente aceptables (véase párrafos [0186]-[0196]).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados anteriormente, dicha solicitud de patente carece de novedad y actividad inventiva, puesto que se ha encontrado en el estado de la técnica, el uso de composiciones que comprenden el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGH) para enfermedades neurodegenerativas. Además dichas composiciones pueden encontrarse como secuencias de nucleótidos que codifiquen VEGH, como vectores que contengan dichos nucleótidos; siendo evidentes también la utilización de micropartículas y nanopartículas para la liberación de dichos factores de crecimiento, ya que, en el estado de la técnica, estos tipos de liberación son ampliamente conocidos. Además, el hecho de que dicha composición revierta el efecto tóxico producido por la proteína beta amiloide o la proteína tau hiperfosforilada no parece ser sorprendente, puesto que este mismo tipo de composiciones han sido utilizadas para tratar enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer y Parkinson donde dichos efectos son característicos. Por todo ello, las reivindicaciones 1-6 de la presente solicitud de invención carecen de novedad y actividad inventiva según los arts 6 y 8 de la LP.