

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 385**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04775470 .0**
96 Fecha de presentación: **24.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1734989**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **Nuevo uso de la proteína factor antisecretor**

30 Prioridad:
26.09.2003 GB 0322645

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.07.2012

73 Titular/es:
AS-FAKTOR AB
BOX 30192
104 25 STOCKHOLM, SE

72 Inventor/es:
HANSSON, Hans-Arne;
JENNISCHE, Eva;
LANGE, Stefan;
LÖNNROTH, Ivar;
ERIKSSON, Peter y
PERSSON, Anders

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 385 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo uso de la proteína factor antisecretor

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de péptidos, polipéptidos y proteínas, que comprenden ciertos elementos de una proteína denominada factor antisecretor (FA) en la fabricación de un medicamento para tratar y/o prevenir la pérdida de tejidos neurales en un estado que se caracteriza por, o que está asociado a, una pérdida patológica de células en el sistema nervioso periférico (SNP), el sistema nervioso autónomo (SNA) y/o el sistema nervioso central (SNC) o por la hiperproducción o tasa de degradación anómala de las proteínas expresadas en las células, tal como la degeneración patológica o pérdida del control de la reparación, recuperación y/o regeneración de células y/o tejidos diferenciados, incluyendo células madre o células progenitoras o estados médicos caracterizados por, o asociados a, dichos estados incluyendo daño en el cerebro y otras partes del sistema nervioso por trauma, asfixia, toxinas, hipoxia, isquemia, infecciones o lesiones degenerativas o metabólicas, que dan como resultado estructuras y funciones defectuosas, dificultadas o de otro modo anómalas. Se refiere especialmente al nuevo uso una proteína denominada factor antisecretor o uno de sus oligo- o poli-péptidos o derivados, al nuevo uso de un alimento que induce una proteína factor antisecretor (Ref. 15) y al nuevo uso de yema de huevo con un alto contenido de la proteína factor antisecretor.

Además la presente invención se refiere a un método *in vitro* para la propagación, inducción, reducción y/o mantenimiento de la génesis de una célula madre aislada.

Fundamento de la invención

20 Las lesiones degenerativas o metabólicas, por traumas, asfixia, hipoxia, isquemia, tóxicos o agentes infecciosos, del sistema nervioso central (SNC), el sistema nervioso periférico (SNP) o el sistema nervioso autónomo (SNA) frecuentemente dan como resultado daños en diferentes tipos de células. Ejemplos de un estado degenerativo del SNC son las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, cualquiera de las cuales causa frecuentemente la pérdida de poblaciones específicas de células. La primera de ellas está en particular asociada con la pérdida específica de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra*. Similarmente, la esclerosis múltiple está asociada a la pérdida de axones, así como a la pérdida de mielina y oligodendrocitos. Otra ilustración de un trastorno degenerativo causado por una pérdida de neuronas es la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, hay muchos casos en los cuales las lesiones o enfermedades de los SNC, SNP y SNA están asociadas a daños de oligodendroglías, astrocitos, células satélites, células de Schwann, microglíocitos, células vasculares y neuronas

30 En general, el reemplazamiento de neuronas y neuroglíocitos diferenciadas después de su degeneración o daño no es una característica del cerebro humano adulto. Por tanto, la pérdida neuronal se considera por lo general permanente. Sin embargo, debe insistirse en que la recuperación en enfermedades, tumores cerebrales y neurotraumas es debido principalmente a la reparación y reconstrucción de las células supervivientes. Sin embargo, la neurogénesis postnatal persiste bien en la edad adulta en todas las especies de mamíferos, incluyendo los seres humanos, en la zona sub-ventricular (SVZ) en los ventrículos laterales del cerebro, así como en la zona sub-granular (SGZ) en la circunvolución dentada del hipocampo (Ref. 2, 3, 4). Adicionalmente, hay una formación menos extensa de células progenitoras neurales en la médula espinal y en el SNA. Ha de insistirse en que las células vasculares, los microglíocitos y los macrófagos, así como las células del tejido conjuntivo pueden ser reconstruidas y reformadas en las lesiones y enfermedades de los tejidos nerviosos.

40 En el cerebro existe una población de células omnipotentes, denominadas células progenitoras, al igual que en otros tejidos del cuerpo de mamíferos adultos, incluyendo los seres humanos. Las células progenitoras neuronales son células madre y residen en la zona sub-ventricular (ZSV) en los ventrículos laterales del cerebro y en la zona sub-granular (ZSG) de la circunvolución dentada del hipocampo, en donde dichas células proliferan continuamente, y migran a las estructuras cerebrales adyacentes, y finalmente se degeneran o sobreviven y se diferencian. Las neuronas de los recién nacidos preferentemente de, por ejemplo, la SGZ migran a la capa de células granulares del hipocampo y finalmente expresan marcadores de neuronas diferenciadas y tienen características morfológicas correspondientes a células granulares diferenciadas, establecen procesos axonales en la vía de la fibra musgosa y forman conexiones sinápticas con sus dianas en el hipocampo (Ref. 5). Debe insistirse en que una proporción considerable de tales células recientemente formadas pueden degenerarse si no son estimuladas adecuadamente, mientras que otras adquieren características de neuroglíocitos (Ref. 3, 4, 5).

55 La neurogénesis en la circunvolución dentada es por sí misma especialmente intrigante puesto que el hipocampo está íntimamente asociado con el aprendizaje espacial y la memoria (Ref. 6). La neurogénesis en la SVZ es vía la corriente migratoria rostral que suministra al lóbulo olfativo nuevas células nerviosas, pero, por ejemplo, en ictus y neurotraumas las células progenitoras neuronales primitivas migrantes pueden desviarse al sitio lesionado o enfermo, si se encuentra situado en una proximidad razonable a las células precursoras migrantes.

60 La proliferación de células progenitoras en la SVZ y en la SGZ está influenciada, por ejemplo, por la administración de factores de crecimiento, interleuquinas, antagonistas del receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA) o por la extirpación de las glándulas suprarrenales, que más tarde da como resultado niveles reducidos de hormonas corticosteroides o la ausencia de dichas hormonas (Ref. 7, 8). Adicionalmente, la exposición a un ambiente enriquecido va acompañada por un mayor número de células granulares recientemente formadas supervivientes, así

como por un aumento del número total de neuronas supervivientes, por ejemplo, en la circunvolución dentada (Ref. 9). La formación de nuevas células nerviosas disminuye con la edad (Ref. 3).

Es beneficioso disminuir la reacción inflamatoria en un tejido nervioso después de una lesión o enfermedad y da como resultado un aumento del número de neuronas, formación mejorada y prolongada de sinapsis y astrocitosis reducida, simultáneamente con menos efectos dificultantes en los vasos sanguíneos y estructuras asociadas y por tanto en la circulación. Una inflamación débil a moderada es beneficiosa con respecto a la reparación y a los eventos de restauración, así como a la neurogénesis, mientras que una inflamación fuerte es perjudicial y puede dar como resultado una pérdida acentuada de células y tejidos, que de otro modo podrían haberse recuperado.

La proteína factor antiselector (FA) es una proteína natural del organismo. El conocimiento usual del factor antiselector está resumido por Lange & Lönnroth (Ref. 1.). Su estructura y algunos efectos ejercidos por el FA en el cuerpo de animales, incluyendo el hombre, están descritos en la solicitud de patente N° WO97/08202 (Ref. 10). La proteína FA humana es una proteína de 41 kD, cuando está aislada de la glándula pituitaria, comprendiendo 382 aminoácidos.

El sitio activo respecto a los efectos anti-inflamatorios y anti-secretores de los FA está aparentemente localizado en la proteína en una región próxima a las partes N-terminales del FA, localizada en los n° 1-163, o más preferiblemente 36-52 o 36-44, o sus modificaciones.

Estudios recientes realizados por los autores de la presente invención, han descrito que los FA son en cierto modo homólogos a la proteína S5a, también denominada Rpn 10, que constituye una subunidad de un constituyente que prevalece en todas las células, el proteosoma 26 S, más específicamente en el cap (sitio del DNA molde donde empieza la transcripción) 19 S/PA 700. Los proteasomas tienen una multitud de funciones relacionadas con la degradación de proteínas excedentes, así como de proteínas de vida corta, no deseadas, desnaturalizadas, anómalamente plegadas y de otro modo anómalas. Además, el FA/S5a/Rpn10 está implicado en la distribución y transporte de constituyentes celulares, más evidentemente proteínas.

Davidson y Hickey (Ref. 11, 12) explican en dos artículos publicados en 2004 en revistas científicas internacionales, que han generado un anticuerpo contra el FA, que modulaba las reacciones inflamatorias, confirmando dichas aseveraciones en una solicitud de patente y una patente previas (Ref. 10, 14).

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han encontrado ahora sorprendentemente que las proteínas FA y sus fragmentos son capaces de mejorar la reparación de tejidos nerviosos, así como mediar y/o reducir los efectos de traumas, inflamaciones y degeneraciones progresivas, como se determina por la pérdida reducida de tejido nervioso, e inhibir la formación de proteínas β -amiloides, o mejorar su descomposición, y de otros constituyentes de tejidos que se acumulan de otro modo, rescatando el tejido de esta manera. Se han documentado efectos beneficiosos, por ejemplo, los constituyentes vasculares. La proteína FA y sus fragmentos son más capaces de rescatar los constituyentes del tejido nervioso y mantener la proliferación de las células progenitoras que prevalecen en el SNC de adultos. Esto sugiere un modo de acción nuevo y excitante porque la proteína FA y sus fragmentos podrían mediar el rescate y supervivencia de las células afectadas, así como facilitar la proliferación y migración de células madre y progenitoras en las SVZ y SGZ.

En particular, los autores de la invención han reconocido que la proteína FA y algunos de sus fragmentos pueden modular la destrucción, reparación, regeneración de constituyentes de tejido nervioso, migración y diferenciación de células progenitoras y la formación de sinapsis entre células existentes y nuevas células, facilitando la formación de sinapsis y la recuperación funcional, así como disminuyendo la tasa y magnitud de la degeneración y destrucción de tejidos.

La presente invención proporciona, por tanto, medios nuevos y mejorados para tratar lesiones, disfunciones, enfermedades o trastornos de los SNC, SNP y/o SNA, entre otras cosas, y por tanto proporciona posibilidades para la influencia beneficiosa sobre la función del tejido.

El cerebro y la médula espinal en mamíferos adultos, incluyendo seres humanos, retienen la capacidad de generar neuronas durante toda la vida, aunque esto está en gran medida restringido a solamente ciertas regiones. Las nuevas neuronas, las neurogliocitos y provisionalmente también las células vasculares son generadas por la proliferación de células madre o progenitoras. Durante la investigación que condujo a la presente invención, llegó a ser obvio que ciertos fragmentos de la proteína FA rescatan el tejido nervioso, e inducían una mayor formación de células nuevas, incluyendo procesos y sinapsis entre células.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que es posible tratar la pérdida de tejido neural después de una lesión del SNC o durante el progreso de una enfermedad o trastorno neuronal por la administración de una cantidad eficaz de la proteína FA o ciertos fragmentos de FA. Por tanto es posible rescatar tejido nervioso, y afectar a la formación, migración y diferenciación de células y la formación de sinapsis después de la pérdida de células neuronales y gliales en los SNC, SNP o SNA o impedir el deterioro relacionado con la edad de dichas células en los SNC, SNP y SNA.

En el texto siguiente los aminoácidos son nombrados de acuerdo con las abreviaturas generalmente usadas en bioquímica basadas en el uso de una sola letra para identificar cada aminoácido.

En un aspecto la presente invención se refiere al uso de una proteína factor antiselector de la SEQ ID NO: 2; o uno de sus oligo- o polipéptidos o derivados, que comprenden una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 (Fórmula I)

en donde:

5 X1 es I, los aminoácidos nº 1-35 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente

X2 es H, R o K

X3 es S o L

X4 es T o A

X5 es los aminoácidos nº 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente;

10 o de sus sales farmacéuticamente aceptables; en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de pérdida de tejido neural en un estado asociado a, o caracterizado por, el rescate o por una pérdida patológica de células en los SNP, SNA y/o SNC.

En una realización de la invención la Fórmula I tiene la secuencia elegida de una de:

15 a) los aminoácidos números 35-42 de la SEQ ID NO: 1,

b) los aminoácidos números 35-46 de la SEQ ID NO: 1,

c) los aminoácidos números 36-51 de la SEQ ID NO: 1,

d) los aminoácidos números 36-80 de la SEQ ID NO: 1,

e) los aminoácidos números 1-80 de la SEQ ID NO: 1 o

f) los aminoácidos números 1-163 de la SEQ ID NO: 1

20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido o proteína factor antiselector, tal y como es facilitada en el trabajo de Johanson, E. et al., (Ref. 13) o el de Lange, S. et al., (Ref. 10, 14)

25 En un segundo aspecto la presente invención se refiere al uso de un alimento que induce una proteína factor antiselector en la fabricación de un alimento o alimento médico para el tratamiento y/o prevención de la pérdida de un tejido neural en un estado asociado a, o caracterizado por, una pérdida patológica de células en los SNA, SNP y/o SNC.

30 En el tercer aspecto la presente invención se refiere al uso de yema de huevo con un alto nivel, preferiblemente al menos 1000 unidades FIL /ml, de proteína factor antiselector en la fabricación de un alimento o un alimento médico para el tratamiento y/o prevención de pérdida de tejido neural en un estado asociado al, o caracterizado por, el rescate o por una pérdida patológica de células en los SNP, SNA y/o SNC.

35 En una realización de la invención el estado se caracteriza por presentar una degeneración patológica, pérdida de capacidad y/o pérdida de control de la regeneración y/ pérdida de control de la regeneración de una célula diferenciada y/o tejido, una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, un célula progenitora y/o una célula derivada de una célula madre o célula progenitora. El estado está asociado a, o caracterizado por, una pérdida patológica de células en el sistema nervioso periférico, el sistema nervioso autónomo y/o el sistema nervioso central, y en todavía otra realización el estado está asociado a, o caracterizado por, el rescate o por una pérdida patológica de células madre neurales o células progenitoras neurales.

40 En una realización de la invención el estado está asociado a, o caracterizado por, una pérdida patológica de oligodendroglías, astrogliás, células de Schwann, y/o células neuronales y/o poblaciones de células, y en otra el estado está asociado a, o caracterizado por, una pérdida patológica de células neuronales no colinérgicas, células neuronales colinérgicas y/o neuroglíocitos y/o poblaciones de células.

En todavía otra realización de la invención el estado es causado por daño al sistema nervioso central o un defecto en el sistema nervioso central, y en incluso otra realización el estado es causado por un trastorno traumático, maligno, autoinmunitario o degenerativo.

45 En otra realización el estado es causado por daño axonal causado a su vez por conmoción, contusión, daño axonal causado por trauma en la cabeza, daño axonal causado por enfermedad de vasos pequeños en el SNC y/o daño en médula espinal después de enfermedad y/o trauma; en otra realización dicho estado se caracteriza por pérdida de memoria, y finalmente, en una última realización de los nuevos usos el estado es esclerosis múltiple, asfixia, lesión hipóxica, lesión isquémica, lesión traumática, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus o un trastorno desmielinizante.

En un cuarto aspecto la presente invención se refiere al uso de una yema de huevo con un alto nivel de la proteína factor antiselector de acuerdo con uno cualquiera de los nuevos usos que se han descrito antes.

En un quinto aspecto la presente invención se refiere al uso de un alimento que induce la formación de la proteína factor antiselector de acuerdo con uno cualquiera de los nuevos usos que se han descrito antes.

55 En una realización el medicamento se formula para infusión intravenosa, inyección intramuscular y/o inyección subcutánea; en otra realización el medicamento se formula de modo que la sustancia activa pase a los ventrículos

y/o otras cavidades del cerebro de un paciente cuando se administra a dicho paciente, y en incluso otra realización el medicamento se formula de modo que la sustancia activa pase al líquido cefalorraquídeo de un paciente cuando se administra a dicho paciente.

- 5 En un sexto aspecto la presente invención se refiere a un método *in vitro* de propagación, inducción, reducción y/o mantenimiento de la génesis de una célula madre aislada y/o progenie de células madres a partir de cualquier capa germinal *in vitro*, caracterizado por tratar la célula aislada con una proteína factor antiselector de la SEQ ID NO: 2; o uno de sus oligo- o polipéptidos o derivados, que comprende una secuencia de aminoácidos de la Fórmula I:

X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 (Fórmula I)

en donde:

- 10 X1 es I, los aminoácidos nº 1-35 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente
 X2 es H, R o K
 X3 es S o L
 X4 es T o A
 X5 es los aminoácidos nº 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente,
 15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En una realización del método descrito antes la Fórmula I tiene una secuencia elegida de uno de:

- 20 a) los aminoácidos números 35-42 de la SEQ ID NO: 2,
 b) los aminoácidos números 35-46 de la SEQ ID NO: 2,
 c) los aminoácidos números 36-51 de la SEQ ID NO: 2,
 d) los aminoácidos números 36-80 de la SEQ ID NO: 2,
 e) los aminoácidos números 1-80 de la SEQ ID NO: 2 o
 f) los aminoácidos números 1-163 de la SEQ ID NO: 2

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 25 En otra realización del método dicha célula aislada se elige del grupo que comprende células epiteliales, fibroblastos, células osteogénicas, macrófagos y microglíocitos, células vasculares, células óseas, condrocitos, células miocárdicas, células sanguíneas, neuronas, oligodendrocitos, células astrogiales, células progenitoras, células madre y/o células derivadas de células progenitoras o célula madre.

- 30 En otra realización la proteína factor antiselector, o uno de sus oligo- o polipéptidos o derivados se formula en un medicamento para infusión intravenosa, inyección intramuscular y/o inyección subcutánea; en incluso otra realización la proteína antiselectora o sus homólogos que tienen las mismas propiedades funcionales, o uno de sus oligo- o polipéptidos o derivados se formula en un medicamento de modo que la sustancia activa pase a los ventrículos y/o otras cavidades del cerebro de un paciente, cuando se administre a dicho paciente, y en una realización final la proteína factor antiselector o uno de sus oligo- o polipéptidos o derivados se formula en un medicamento de modo que la sustancia activa pase al líquido cefalorraquídeo de un paciente cuando se administre a dicho paciente.

- 35 En algunas realizaciones de la invención, los polipéptidos de Fórmula I pueden comprender adicionalmente grupos protectores. Ejemplos de grupos protectores N-terminales incluyen acetilo. Ejemplos de grupos protectores C-terminales incluyen amida.

- 40 Para cualquier persona experta en la técnica es obvio que otra realización de la invención consiste en hacer uso de proteínas FA producidas endógenamente. Dichas proteínas se producen utilizando la patente que describe el método de inducción de proteínas FA por la administración de alimentos que inducen la proteína FA (Ref. 15).

Otra realización de la invención utiliza la administración de yemas de huevo que contienen altos niveles de proteína FA, también como se ha descrito previamente en una patente (Ref. 16).

Descripción detallada de la invención

- 45 La expresión "pérdida patológica" de células se usa en el presente contexto para describir la característica técnica común de cierto número de estados y trastornos médicos. Los estados y trastornos se caracterizan por presentar degeneración patológica, pérdida de capacidad de regeneración y/o pérdida del control de regeneración de una célula diferenciada y/o tejido, una célula embrionaria, una célula madre adulta, una célula progenitora y/o una célula derivada de una célula madre o una célula progenitora. Adicionalmente, la expresión incluye además mejores supervivencia y rescate de células del tejido nervioso y efectos degenerativos secundarios reducidos o suprimidos.

- 50 El estado que se ha de tratar puede ser causado, entre otros, por uno o más de asfixia traumática, dolor neuropático, lesiones por hipoxia, por isquemia, por agentes tóxicos, por agentes infecciosos, degenerativas o metabólicas en el sistema nervioso central. Estos dan como resultado frecuentemente daños en varios tipos de células diferentes. Por tanto el daño al cerebro debido a cualquiera de las razones mencionadas, frecuentemente causa defectos neurológicos, cognitivos y síntomas psiquiátricos adicionales. En otros casos los estados pueden ser causados por un trastorno traumático, maligno, inflamatorio, autoinmunitario o degenerativo o por tratamiento con fármacos o rayos X.

En incluso otros casos, el estado puede ser causado por factores genéticos o la causa puede ser desconocida. En incluso otros casos, el estado puede ser causado por daño axonal causado por conmoción, daño axonal causado por trauma en la cabeza o cuerpo, daño axonal causado por enfermedad de vasos pequeños en el SNC y/o daños en la médula espinal después de una enfermedad y/o trauma.

- 5 El estado que ha de ser tratado es un estado que está asociado a, o caracterizado por, una pérdida patológica de células en el SNC así como en el SNP y/o SNA.

Las células que pueden ser afectadas por un polipéptido que comprende un fragmento de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 son, por ejemplo, células madre, células progenitoras y/o incluso células diferenciadas que ganan mejor supervivencia y que recuperan la función perdida transitoriamente. Estas células pueden pertenecer a cualquiera de las tres capas germinales. Una vez estimuladas las células se diferenciarán, ganarán funciones y formarán sinapsis para reemplazar el mal funcionamiento, la muerte, o las células o poblaciones celulares perdidas, tales como en los estados patológicos de los SNC, SNP y/o SNA, caracterizados por pérdida anómala de células, glías, y/o células o poblaciones celulares neuronales, tales como células neuronales, y/o neuroglíocitos y/o poblaciones celulares así como células vasculares e inflamatorias.

15 La invención se refiere particularmente al tratamiento de estados asociados a, o caracterizados por, una pérdida de células madre, preferiblemente células madre neurales o estados caracterizados por, o asociados a, pérdida y/o ganancia de células progenitoras. Adicionalmente, la invención se refiere a la mejor supervivencia de células madre o progenitoras trasplantadas al tejido nervioso.

20 La invención se refiere también particularmente al tratamiento de estados asociados a pérdida de células diferenciadas. En una realización preferida las células diferenciadas son oligodendroglías, astroglías, células neuronales. Preferiblemente, las células diferenciadas son células neuronales, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann u otras células gliales.

25 La invención proporciona también el uso de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I en la fabricación de un medicamento para rescatar y normalizar las células en el tejido nervioso, así como modular el desarrollo de células madre/células progenitoras y/o sinapsis entre células en los SNC, SNP y/o SNA.

Otra realización de la invención proporciona un método de modular el desarrollo de células madre y la sinapsis entre células en el SNC que comprende poner en contacto las células madre *ex vivo* con una cantidad de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I.

30 Los usos de la invención son adecuados preferiblemente para el tratamiento de estados anómalos y/o médicos que afectan a la pérdida o ganancia patológica de células progenitoras y sinapsis entre células neurales y/o células derivadas de células madre neuronales. La invención se puede usar por tanto para la prevención, tratamiento o mejora de daños, enfermedades o déficits de los SNC, SNP y/o el SNA. La sustancia farmacéutica activa usada de acuerdo con la invención es especialmente adecuada para el tratamiento de estados que afectan a las células de Schwann, células satélite, oligodendroglías, astroglías y/o células neuronales. Dichos estados pueden, por ejemplo, ser debidos a daños o déficits en el SNC, pérdida de células neuronales o pérdida de memoria. Dichos estados pueden, por ejemplo, ser causados por cierto número de factores o enfermedades diferentes, tales como trastornos traumáticos, malignos, autoinmunitarios o degenerativos, tales como esclerosis múltiple, lesión por hipoxia, lesión por isquemia, lesión traumática, enfermedad Alzheimer y enfermedad de Parkinson y trastorno desmielinizante. El efecto de la sustancia farmacéuticamente activa usada en esta realización preferida de la invención es debido a su capacidad de mejorar la supervivencia celular, inducir la formación de células, generación de sinapsis o la descomposición de placas neuronales y/o los compuestos β -APP, β -amiloide y otros acumulados en las células citadas.

45 Sin embargo, y como se ha indicado antes, la presente invención no está restringida a los usos para tratar enfermedades y estados neuronales, sino que dichos usos pueden ser empleados para tratar una gran variedad de estados de mamíferos que se caracterizan por pérdida patológica de células, tales como enfermedad de Parkinson y de Alzheimer, esclerosis múltiple, ictus o asfisia.

La composición farmacéutica o medicamento de la invención puede comprender adicionalmente uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacológicamente aceptables, tal como es conocido en la técnica.

50 Las composiciones o medicamentos pueden estar en la forma de, por ejemplo, composiciones fluidas, semi-fluidas, semi-sólidas o sólidas, tales como, aunque sin limitación, líquidos para transfusión disueltos, tales como solución salina estéril, diversas soluciones salinas, soluciones de glucosa, solución salina tamponada con fosfato, sangre, plasma o agua, polvos, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, espráis, aerosoles, dispositivos para inhalación, soluciones, dispersiones, suspensiones, emulsiones y sus mezclas.

55 Las composiciones pueden ser formuladas de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, teniendo en consideración la estabilidad y reactividad del oligo- o polipéptidos o de la proteína.

Es obvio que las composiciones pueden incluir el alimento que induce la proteína FA (Ref. 15) o yemas de huevo, que contienen altos niveles de proteína FA. Los alimentos que inducen FA se administran preferiblemente por vía oral en composiciones adaptadas para tal fin. Las yemas de huevo con altos niveles de proteína FA se administran preferiblemente por vía oral. La proteína FA y sus derivados pueden ser administrados por inyecciones y con ayuda

de un aerosol o por deposición superficial.

Las composiciones o medicamentos pueden ser formulados de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional, véase, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" 20th ed. Mack Publishing, Easton PA, 2000 ISBN 0-912734-04-3 y "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", editado por Swarbrick, J. & J. C. Boylan, Marcel Dekker, Inc., New York, 1988 ISBN 0-8247-2800-9.

La elección de excipientes farmacéuticamente aceptables en una composición o medicamento para uso de acuerdo con la invención y su concentración óptima pueden determinarse fácilmente por experimentación. Asimismo si un excipiente farmacéuticamente aceptable es adecuado para uso en una composición farmacéutica generalmente es dependiente de la forma farmacéutica que se elija. Sin embargo, una persona experta en la técnica de la formulación farmacéutica puede encontrar asesoramiento, por ejemplo, en el texto de Remington: *The Science and practice of pharmacy*" 20th ed. Mack Publishing, Easton PA, 2000 ISBN 0-912734-04-3.

Un excipiente farmacéuticamente aceptable es una sustancia, que es sustancialmente inocua para el individuo al que se administra la composición. Dicho excipiente satisface normalmente los requisitos prescritos por las agencias nacionales de medicamentos. Las farmacopeas oficiales, tal como la Farmacopea de los Estados Unidos de América y la Farmacopea Europea establecen normas para los excipientes farmacéuticamente aceptables estándares muy conocidos.

Lo siguiente es una revisión de las composiciones farmacéuticas relevantes para uso de acuerdo con la invención. La revisión está basada en la vía particular de administración. Sin embargo, se aprecia que en aquellos casos en donde puede emplearse un excipiente farmacéuticamente aceptable en diferentes formas o composiciones farmacéuticas la aplicación de un excipiente farmacéuticamente aceptable particular no está limitada a una forma farmacéutica particular o a una función particular del excipiente.

Composiciones parenterales:

Para aplicación sistémica las composiciones de acuerdo con la invención pueden contener vehículos y excipientes convencionales no tóxicos y farmacéuticamente aceptables, incluyendo microesferas y liposomas.

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden incluir toda clase de composiciones sólidas, semi-sólidas y fluidas. Las composiciones de particular relevancia son, por ejemplo, soluciones, suspensiones y emulsiones.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir disolventes, agentes tampón, conservantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, agentes de puesta en suspensión y/o diluyentes. A continuación se facilitan ejemplos de los diferentes agentes.

Ejemplos de diversos agentes

Los ejemplos de disolventes incluyen, aunque sin limitación, agua, alcoholes, sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido ascítico y líquido linfático.

Los ejemplos de agentes tampón incluyen, aunque sin limitación, ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, ácido láctico, ácido hidrogeno-fosfórico, bicarbonatos, fosfatos, dietilamina, etc.

Los ejemplos de agentes quelantes incluyen, aunque sin limitación, la sal sódica de EDTA y ácido cítrico.

Los ejemplos de antioxidantes incluyen, aunque sin limitación, hidroxianisol butilado (BHA), ácido ascórbico y sus derivados, tocoferol y sus derivados, cisteína y sus mezclas.

Los ejemplos de diluyentes y agentes disgregantes incluyen, aunque sin limitación, lactosa, sacarosa, emdex, fosfatos de calcio, carbonato de calcio, sulfato de calcio, manitol, almidones y celulosa microcristalina.

Los ejemplos de agentes aglutinantes incluyen, aunque sin limitación, sacarosa, sorbitol, goma arábiga, alginato de sodio, gelatina, almidones, celulosa, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona y polietilenglicol.

La composición farmacéutica o la sustancia usada de acuerdo con la invención se administra preferiblemente por vía intravenosa, infusión periférica o vía intramuscular o inyección subcutánea al paciente o vía bucal o vías pulmonar, nasal u oral. Además, también es posible administrar la composición farmacéutica o la sustancia farmacéuticamente activa a través de un *shunt* insertado quirúrgicamente en un ventrículo cerebral del paciente.

En una realización de la presente invención, dicha composición farmacéutica se fórmula de modo que la sustancia activa pase a los ventrículos del cerebro de un paciente.

En una realización de la presente invención, dicha composición farmacéutica se formula de modo que la sustancia activa pase a los ventrículos del cerebro de un paciente o al líquido cefalorraquídeo de dicho paciente, cuando se administra a dicho paciente. Esto se puede realizar, por ejemplo, por medio de dispositivos mecánicos, vectores, liposomas, lipoesferas o vehículos biológicos o sintéticos.

Preferiblemente, el intervalo de dosis administrada es aproximadamente 0,001-100 mg de un polipéptido que

comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I por 100 g de peso corporal, comprendiendo un intervalo de 0,001-100 mg/1 g, 0,001-100 mg/10 g y 0,001-100 mg/50 g de peso corporal. Preferiblemente, el intervalo de dosis administrada es aproximadamente 0,001-100 mg de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I por cada kg de peso corporal.

- 5 Cuando se usan alimentos que inducen los FA, la dosis administrada corresponde a 0,2-5 g de cereales malteados por kg de peso corporal. Cuando se administran yemas de huevo con altos niveles, es decir al menos 1000 unidades FIL/ml, de FA, se usa una dosis de 0,05-0,5 g por kg de peso corporal. Se debe controlar la respuesta del individuo.

La invención se puede usar para tratar seres humanos o mamíferos no humanos.

- 10 Los términos "tratamiento" o "tratar" como se usan en la presente memoria se refieren tanto al tratamiento terapéutico con el fin de curar o aliviar una enfermedad o un estado médico, caracterizado por una pérdida anómala de células, como al tratamiento profiláctico con el fin de impedir el desarrollo de una enfermedad o estado médico, caracterizado por la pérdida patológica de células y constituyentes celulares, por ejemplo, sinapsis. Así pues, tanto el tratamiento profiláctico como el terapéutico están incluidos en el alcance de la presente invención. Los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren también al efecto de la génesis celular a partir de células madre o células
- 15 progenitoras que inducen la génesis de células diferenciadas, tales como por ejemplo, neuronas y/o neuroglíocitos después de la pérdida de células neuronales, oligodendrogliales o neuroglíocíticas en el SNC, SNP o SNA, o para impedir el deterioro normal relacionado con la edad del SNC, SNP o SNA u otras estructuras del organismo. El tratamiento se puede aplicar de modo agudo o crónico.

- 20 Las células madre y/o progenitoras expandidas por el FA se pueden propagar y pre-diferenciar antes del injerto o permitir que se diferencien como resultado de las interacciones entre las células trasplantadas y el hospedante.

- De acuerdo con otra realización preferida de la invención, es posible usar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I para propagar las células progenitoras o células madre u otras células en un cultivo tisular o un cultivo celular. Dichas células se pueden usar por consiguiente para el trasplante celular en un paciente que sufre, por ejemplo, una pérdida de células neuronales o un estado debido a la falta de células
- 25 endógenas de otro tipo. Las células utilizadas para comenzar el cultivo pueden provenir del paciente o de otro donante humano o animal y se pueden usar en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades y trastornos que comprenden enfermedades cardíacas, tales como infarto, diabetes o en una variedad de enfermedades o trastornos neurológicos, tales como las citados anteriormente.

- 30 Por tanto la invención proporciona también un método *in vitro* de propagación, inducción, reducción y/o mantenimiento de la génesis de una célula madre y/o progeñie de células madre aislada *in vitro*, caracterizado por tratar la célula aislada con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I. Preferiblemente, la célula aislada se selecciona del grupo que comprende células epiteliales, fibroblastos, células osteogénicas, macrófagos y microglíocitos, condrocitos, células miocárdicas, células sanguíneas, neuronas, oligodendrocitos, células astrogliales, células progenitoras, células madre y/o células derivadas de dichas células. En
- 35 general, la célula aislada se tratará en condiciones apropiadas y durante un tiempo, que sea suficiente para conseguir la propagación, inducción, reducción y/o mantenimiento deseados.

- 40 Cuando se han de extraer células de un paciente para una propagación *in vitro*, puede ser ventajoso en primer lugar aumentar en el paciente el número de células progenitoras. Esto facilitará el aislamiento posterior de dichas células del paciente. El número de células progenitoras se aumenta utilizando el método o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

- Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I, se puede usar solo o junto con otros medicamentos, interleuquinas o por ejemplo factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) o factor de crecimiento insulinoide (IGF), diseñados para inducir la génesis o
- 45 proliferación celular, por ejemplo en el SNC, SNP o SNA. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I, solo o junto con otros medicamentos, péptidos, factores de crecimiento, esteroides, lípidos, proteínas o péptidos glicosilados, usados simultáneamente o en secuencia, se pueden utilizar *in vivo* o *in vitro* con el fin de facilitar la génesis celular o la generación de tipos específicos de células. También se puede usar para inducir a células inmaduras o multipotentes que activen programas de desarrollo específicos, así como genes
- 50 específicos en las células antes citadas.

Por la expresión "génesis celular" antes mencionada se entiende la generación de nuevas células, tales como neuronas, oligodendrocitos, células de Schwann, células satélite y células astrogliales a partir de células multipotentes, células progenitoras o células madre en los órganos del SNC o SNP de adultos u otros órganos del organismo, *in situ* o aislados.

- 55 Puesto que el FA mantiene la génesis de nuevas células y especialmente neuronas en el hipocampo, que es una estructura asociada íntimamente al aprendizaje y a la memoria, se puede usar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula I con el fin de facilitar el aprendizaje y la memoria por la génesis de dichas células.

Aunque en la presente memoria se ha hecho referencia principalmente al uso de polipéptidos que comprenden una

secuencia de aminoácidos de Fórmula I, la invención se refiere también, *mutatis mutandis*, a polipéptidos que consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos de Fórmula I, y a polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos de Fórmula I.

5 Los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de Fórmula I se pueden producir por medios estándares, incluyendo vías recombinantes y sintéticas.

La invención se comprenderá más fácilmente con la lectura de los siguientes Ejemplos, que solo sirven para ilustrar, aunque sin limitación, el alcance de la invención.

Descripción de los dibujos

10 Figura 1. Micrografías confocales por inmunofluorescencia de circunvoluciones dentadas de un cerebro de control tratado de modo simulado (A) y después de convulsiones inducidas por inyección intrabdominal de ácido kaínico (10 mg/ml) en solución salina tamponada (B - 7 d; C - 28 d), que describe la distribución de agrupaciones de células proliferantes. Las células recién formadas están teñidas de oscuro. El número de células positivas a la ribonucleótido-reductasa (RNR), es decir, mitóticas, en la ZSG es significativamente mayor a los 7 días (B) y a los 28 días (C) de las convulsiones. La inserción en B procedente de otro corte del mismo cerebro está teñida con el mismo método propuesto, ilustrando dos agrupaciones de células mitóticas = positivas. GCL = capa celular granular, Hil = hilio. Barra de escala = 200 μ m (A, B, C), 20 μ m (inserción en B).

20 Figura 2. Fotografía de cerebros de ratas 2 días después de que les fuera aplicada una sonda de congelación durante 40 segundos en la parte exterior del hueso craneal. Los dos cerebros de la fila superior habían tenido acceso libre a pellas estándares y a agua del grifo antes y después de la lesión cerebral. Obsérvense las hemorragias y el tejido cerebral decolorado. Los dos cerebros de la fila inferior habían tenido acceso ilimitado a alimentos y soluciones de bebida de calidad SPC (del inglés *Statistical Process Control*, Control estadístico del proceso) durante 12 días antes de la exposición de la parte exterior del hueso craneal a una sonda de congelación y luego durante los dos días siguientes, antes del sacrificio. Obsérvense la ausencia de hemorragia macroscópica y la menor extensión de la lesión cerebral. Los altos niveles de FA en las ratas alimentadas con alimentos de calidad SPC redujeron la lesión cerebral, como se confirmó por microscopía óptica de los cortes teñidos.

30 Figura 3. Fotografía de cerebros de ratas 6 días después de que les fuera aplicada una sonda de congelación durante 40 segundos en la parte exterior del hueso craneal. Los tres cerebros de la fila superior son de ratas adultas que habían tenido acceso libre a pellas estándares y a agua del grifo antes y después de la lesión cerebral. Obsérvense las hemorragias leves y el defecto poco profundo en el tejido cerebral. Los tres cerebros de la fila inferior habían tenido acceso ilimitado a alimentos y soluciones de bebida de calidad SPC durante 5 días antes de la exposición de la parte exterior del hueso craneal a una sonda de congelación y luego durante los seis días siguientes, antes del sacrificio. Obsérvense la menor extensión de la lesión cerebral, en comparación con los cerebros de rata del panel superior. Los niveles de FA en las ratas alimentadas con alimentos con SPC durante 5 días antes de la lesión por congelación redujeron la lesión cerebral, como se confirmó por microscopía óptica de los cortes teñidos.

Ejemplos

Ejemplo 1: La inducción de la formación elevada de FA aumentó la neurogénesis

40 Se realizó el siguiente experimento para determinar si la administración de FA influyó sobre la neurogénesis en el cerebro de un mamífero adulto normal, la rata.

45 Se compraron ratas (peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos), machos y hembras, a B & K AB, Estocolmo, Suecia. Los animales se mantuvieron en jaulas de tipo y tamaño aprobados y se les tuvo con luz desde las 06:00 a las 18:00. El comité ético regional de experimentación con animales garantizó el permiso de los experimentos. Se tomaron las medidas necesarias para reducir las molestias y el sufrimiento de los animales.

50 Las ratas de ensayo se alimentaron con pellas de alimentos de calidad SPC y bebieron un extracto de calidad SPC durante al menos 10 días antes del sacrificio. Los animales no fueron sometidos a cirugía ni manipulados de otro modo. Las ratas se anestesiaron con una inyección intrabdominal de una sobredosis de pentobarbital sódico en solución salina o por inhalación de isofluorano. Se les abrió la cavidad torácica, se les introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón y se infundió una solución salina tamponada equilibrada y templada, con adición de heparina, para lavar de sangre el sistema vascular. A continuación, se infundió una solución de formaldehído tamponada en solución salina para fijar el tejido. Finalmente, se disecaron el cerebro, la médula espinal, la retina y otras partes de los tejidos nerviosos y se fijaron durante una noche en formalina tamponada en frío. Al día siguiente, se disecaron el prosencéfalo y el hipocampo, se lavaron y sumergieron en solución salina tamponada con 20% de sacarosa añadida antes de cortarlos en un microtomo de criostato. Los cortes delgados, 5 - 25 μ m de grosor, fueron tratados a continuación para la demostración inmunohistoquímica de la distribución y prevalencia de la subunidad R1 de ribonucleótido-reductasa (RNR) (Fig. 1 a), una enzima de importancia clave para la síntesis del DNA, que describe la formación celular por mitosis (Zhu, H., et al., Ref. 14). En paralelo, muestras adicionales de tejido del prosencéfalo y del hipocampo se incrustaron en parafina y se trataron como se ha descrito antes.

La microscopía óptica de cortes tratados para la demostración inmunohistoquímica de RNR mostró que el tratamiento de ratas adultas normales durante al menos 10 días con alimentos de calidad SPC aumentó la presencia de células madre y células progenitoras proliferantes en la ZSG del hipocampo, en comparación con animales a los que se les suministró pellas estándar para roedores. Se pudo revelar una elevada frecuencia de células en división tanto en la ZSV como en el prosencéfalo. La identidad de las células recién formadas fue descrita inmunohistoquímicamente con ayuda de anticuerpos anti-doblecortina (expresada por células nerviosas inmaduras migrantes), NeuN (expresada por células nerviosas maduras) y GFAP (expresada por astrocitos).

Se llegó a la conclusión que suministrando a mamíferos adultos alimentos de calidad SPC durante al menos 10 días parecía que se promovía notablemente la proliferación de células madre y progenitoras en el cerebro de animales adultos.

Ejemplo 2: Modelo de lesión cerebral por aplicación de una sonda congelada

Se realizó el siguiente experimento para determinar la lesión causada en el cerebro de un roedor por aplicación de una sonda muy fría en la parte exterior del hueso craneal.

Se compraron ratas (peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos), machos y hembras, a B & K AB, Estocolmo, Suecia. Los animales se mantuvieron en jaulas de tipo y tamaño aprobados y se les tuvo con luz desde las 06:00 a las 18:00. El comité ético regional de experimentación con animales garantizó el permiso de los experimentos. Se tomaron las medidas necesarias para reducir las molestias y el sufrimiento de los animales.

Se anestesiaron las ratas por inhalación de isoflurano y se les afeitó la cabeza. Se abrió la piel por el plano sagital medio del cráneo. Se expuso el lado izquierdo de la bóveda craneal entre el punto bregma y el punto lambda. Se desprendió el periostio del hueso y luego se lavó. A continuación, se tuvo mucho cuidado de eliminar la sangre y cualquier líquido de la bóveda craneal para no perjudicar el proceso subsiguiente. Una sonda de latón, con un extremo cilíndrico de 4 mm de longitud y un diámetro de 3 mm, se enfrió por inmersión de forma normalizada en nitrógeno líquido. Se aplicó a continuación la sonda enfriada durante 40 segundos a la bóveda craneal entre el punto lambda y el punto bregma, a 4 mm de distancia lateral de la línea sagital media. A continuación se retiró la sonda y se suturó la piel. La aplicación de la sonda de congelación dio como resultado transitorio que se congelara el tejido cerebral subyacente al sitio de exposición. Se debe insistir que el cráneo no se abrió ni se indujo ninguna fractura u otros signos de lesiones importantes. Después de haberse recuperado de la anestesia los animales se movieron sin problemas evidentes, se comportaron normalmente e ingirieron alimentos y bebidas como los animales no tratados.

A los 2 días de la lesión por congelación, la corteza cerebral izquierda mostró decoloración y hemorragias en una zona de 3-5 mm de diámetro, inmediatamente debajo de la parte del hueso craneal expuesto al enfriamiento (Fig. 2). Una depresión poco profunda indicó que había pérdida de tejido nervioso. Hubo un edema en la zona penumbra, es decir, la sustancia cerebral que bordea la zona central del tejido nervioso gravemente lesionado. Una inspección más próxima podría revelar que el edema se extendía hasta la sustancia blanca, más evidente en el mismo lado que la lesión. Un examen microscópico óptico de cortes delgados teñidos describió tejido necrótico en el centro de la corteza cerebral lesionada, con edema que probablemente se añade al tejido secundario y a la lesión celular de la zona penumbra. La lesión primaria es la que tenía lugar durante los primeros segundos después de la aplicación de la sonda congelada. La lesión cerebral secundaria comprendía los cambios que tenían lugar después de un minuto o más, definiéndose el tiempo exacto según el tipo de lesión. Los cambios secundarios podían ir evolucionando con el tiempo a más graves, especialmente si existía un edema cerebral, que tendía a ser perjudicial. Hubo una reacción anti-inflamatoria que comenzó a los pocos minutos, más evidentemente en la zona penumbra y que se caracterizó por la aparición de un número creciente de astrocitos activados y microglíocitos. Los vasos sanguíneos también estaban dañados pero se reconstruyeron rápidamente. Sin embargo, la parte central necrótica del tejido lesionado no se revascularizó hasta pasados algunos días o incluso semanas.

Cualquier lesión en el cerebro que induzca inflamación provoca una elevación transitoria de la proliferación de células madre y progenitoras en la ZSG y en la ZSV, si estas zonas no están gravemente dañadas. Además, la nuevas células madre y progenitoras deben ser estimuladas para sobrevivir, migrar y diferenciarse; de lo contrario la proliferación celular puede dar como resultado una pérdida neta de células neuronales.

Simultáneamente, hay una acumulación de proteínas precursoras beta-amiloideas (β -APP) y beta-amiloide ($A\beta$), formadas como resultado de la lesión cerebral acumulándose en los cuerpos y procesos de las células nerviosas. β -APP y $A\beta$ son ambas tóxicas para las células nerviosas y comienzan a acumularse a las pocas horas de un neurotraumatismo. Sin embargo, si estas dos proteínas se disuelven y por tanto desaparecen, se debe considerar muy beneficiosa la posibilidad de que las células nerviosas afectadas sobrevivan, se recuperen y se reintegren estructural y funcionalmente. Además, los constituyentes citoesqueléticos, tales como neurofilamentos y microtúbulos, son los que sufren en un neurotraumatismo y se acumulan, formando agregados y ovillos, que empeoran la lesión primaria e incluso la hacen perjudicial. Axones y dendritas aparecen como bolitas irregulares, hinchadas y distorsionadas debido a la acumulación focal de los constituyentes citoesqueléticos, orgánulos celulares y amiloideas. Debido a la desorganización de las células nerviosas después de un traumatismo, tal como por congelación, la organización normal muy precisa y regular de la maquinaria celular se pierde en parte y los constituyentes celulares normales se pueden acumular o aparecer en concentraciones anómalas, tal como la ubiquitina. Las células nerviosas no se dividen normalmente, con la excepción de las que se encuentran en las ZSG

y ZSV, pero después de un neurotraumatismo pueden comenzar a formar proteínas y otros compuestos en cantidades anormalmente altas, tales como ciclinas y constituyentes relacionados, existentes normalmente sólo en células en división.

5 Los neuroglíocitos, los astrocitos y los microglíocitos, proliferaron y se volvieron hipertróficos. Se produjo además una reconstrucción de los vasos sanguíneos y la angiogénesis del tejido lesionado.

El edema que aparece después de un neurotraumatismo agrava la lesión del tejido (lesión secundaria).

10 Seis días después de la lesión por congelación (Fig. 2) se observa una cavidad poco profunda en el centro de la corteza lesionada debido a la pérdida de tejido cerebral. Se pueden reconocer residuos mínimos de la hemorragia, pero se había eliminado la mayor parte de la sangre extravasada. La necrosis en el centro de la lesión estaba en parte limpia de residuos y por consiguiente parecía una depresión casi perfectamente delimitada. La zona penumbra, que encierra la necrosis central, es rica en neuroglíocitos y astrocitos proliferantes hipertróficos. En la zona penumbra se observan células nerviosas lesionadas y secas, así como otras supervivientes. La mayoría de las células nerviosas muestran acumulación de neurofilamentos, β -APP y A β . Se ~~llega~~ ^{llegó} a la conclusión que la congelación del cerebro a través del hueso craneal intacto dio como resultado de manera reproducible una lesión en el cerebro.

15 Ejemplo 3: Los FA rescatan tejido cerebral lesionado por congelación, investigado 2 días después.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si la mayor presencia de FA en un cuerpo afectaba, ejerciendo neuroprotección, a la magnitud y gravedad de una lesión cerebral causada en el cerebro de un roedor por la aplicación de una sonda congelada en el exterior del hueso craneal.

20 Durante al menos 10 días, antes de la lesión cerebral, se administró a ratas machos y hembras (de un peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos) alimento de calidad SPC y líquido de bebida. El día de la lesión, las ratas fueron anestesiadas y preparadas como se describe en el experimento 2. La sonda congelada se aplicó una vez durante 40 segundos. Después de suturar la herida de la piel en cráneo y cuando las ratas se recuperaron de la anestesia, se permitió que se movieran libremente y tuvieran acceso a alimento de calidad SPC y líquido de bebida.

25 Las ratas se sacrificaron dos días después de la lesión por congelación y se fijaron por perfusión como se ha descrito. Cuando se les abrió el hueso craneal, resultó obvio que había una lesión cerebral de menor magnitud en comparación con las de los animales que habían ingerido pellas de alimentos comerciales estándares y agua del grifo (Fig. 2). Se produjeron hemorragias lo suficientemente pequeñas para ser detectadas. Además no fue obvia la depresión poco profunda de las partes centrales de la zona lesionada. La penumbra parecía estar afectada por menos edema, que el observado en animales alimentados con pellas de alimento estándar y líquido de bebida. La investigación con el microscopio óptico de cortes delgados teñidos a través del tejido cerebral lesionado reveló la presencia en menor número de células dañadas y solamente extravasaciones minoritarias de elementos sanguíneos. Los hinchamientos y bolitas distribuidos irregularmente fueron escasos. Fue menos marcada la acumulación de otro modo prominente de, por ejemplo, proteína amiloide y neurofilamentos. La gliosis fue menos prominente que en los animales de referencia, a los que se suministró alimento estándar y agua del grifo. Sin embargo, hubo una cierta variación en la magnitud de la neuroprotección ejercida por el alimento de calidad SPC y líquido de bebida después de dos días.

35 Se llegó a la conclusión de que la inducción experimental de mayor formación de FA en el cuerpo daba como resultado neuroprotección, como se puso de manifiesto por un daño reducido del tejido cerebral después de la lesión local, investigada 2 días después.

40 Ejemplo 4: Los FA rescatan tejido cerebral lesionado por congelación, investigado 6 días después.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si la mayor presencia de FA en un cuerpo afectaba, ejerciendo neuroprotección, a la magnitud y gravedad de una lesión cerebral causada en el cerebro de un roedor por la aplicación de una sonda congelada en el exterior del hueso craneal.

45 Durante al menos 10 días, antes de la lesión cerebral, se administró a ratas machos y hembras (de un peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos) alimento de calidad SPC y líquido de bebida. El día de la lesión, las ratas fueron anestesiadas y preparadas como se describe en el experimento 2. La sonda congelada se aplicó una vez durante 40 segundos. Después de suturar la herida de la piel en el cráneo y cuando las ratas se recuperaron de la anestesia, se permitió que se movieran libremente y tuvieran acceso a alimento de calidad SPC y líquido de bebida.

50 Seis días después de la lesión por congelación, se sacrificaron las ratas y se fijaron por perfusión como se ha descrito. Cuando se les abrió el hueso craneal, resultó obvio que había una lesión cerebral de menor magnitud en comparación con las de los animales que habían ingerido pellas de alimentos comerciales estándares y agua del grifo (Fig. 3). no se produjeron hemorragias pequeñas que pudieran ser detectadas. Además no fue marcada la depresión poco profunda de las partes centrales de la zona lesionada y en algún caso fue difícil identificarla con certeza. La penumbra parecía estar afectada por menos edema, que el observado en animales alimentados con pellas de alimento estándar y líquido de bebida. La investigación con el microscopio óptico de cortes delgados teñidos a través del tejido cerebral lesionado reveló la presencia en menor magnitud de células dañadas y raramente extravasación residente de la sangre. Los hinchamientos y bolitas distribuidos irregularmente fueron escasos. Hubo

una astrogliosis definida en la región penumbra, pero no tan grande y extendida como en los cerebros correspondientes de las ratas a las que se suministró pellas de alimento estándar y agua del grifo. Sin embargo, hubo una cierta variación en la magnitud de la neuroprotección ejercida por el alimento de calidad SPC y líquido de bebida.

5 Cuando se investigó el hipocampo hubo un marcado aumento en la proliferación de células madre neurales y progenitoras en la ZSG. Lo mismo sucedió para la ZSV, pero fue menos evidente.

Se llegó a la conclusión de que la inducción experimental de la mayor formación de FA en un cuerpo da como resultado neuroprotección como se aprecia por daño reducido del tejido cerebral después de una lesión focal, menos gliosis prominente y mayor formación de nuevos nervios a partir de células madre y progenitoras en, más evidentemente, la ZSG, investigado 6 días después.

Ejemplo 5: Inyecciones intravenosas diarias de un derivado de FA (un péptido de 16 aminoácidos) rescatan tejido cerebral lesionado por congelación, investigado 6 días después.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si la mayor presencia de FA en un cuerpo afectaba, ejerciendo neuroprotección, a la magnitud y gravedad de una lesión cerebral causada en el cerebro de un roedor por la aplicación de una sonda congelada en el exterior del hueso craneal.

Se administró a ratas machos y hembras (de un peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos) antes y después de la lesión cerebral pellas de alimento estándar y agua del grifo. El día de la lesión, las ratas fueron anestesiadas y preparadas como se describe en el experimento 2. La sonda congelada se aplicó una vez durante 40 segundos. Después de suturar la herida de la piel en el hueso craneal y cuando las ratas se recuperaron de la anestesia se les permitió que se movieran libremente.

Todas las ratas recibieron dos veces al día, durante 5 días, empezando el día de la cirugía, una inyección intravenosa de 1-10 µg por kg de peso corporal de un péptido sintético, que era un fragmento de FA, que comprendía los aminoácidos 36 - 51, es decir, estaba constituido por 16 aminoácidos. Dicho fragmento se disolvió en solución salina y se preparó inmediatamente antes de cada inyección. En el día del sacrificio, que fue el día 6, no hubo inyección intravenosa del péptido. En ninguno de los animales se pudo observar efectos secundarios con relación a la actividad motora, comportamiento de exploración, ingesta de alimentos o hábitos de bebida.

Seis días después de la lesión por congelación, las ratas se sacrificaron y se fijaron por perfusión como se ha descrito. Cuando se les abrió el hueso craneal, resultó obvio que había una lesión cerebral de menor magnitud en comparación con las de los animales que habían ingerido pellas de alimentos comerciales estándares y agua del grifo. No se produjeron hemorragias en el cerebro. Además no fue marcada la depresión poco profunda de las partes centrales de la zona lesionada y en algunos casos fue difícil identificarla con certeza. La penumbra parecía estar afectada por un edema minoritario. La investigación con el microscopio óptico de cortes delgados teñidos a través del tejido cerebral lesionado reveló la presencia en menor número de células dañadas y raramente extravasación residente de la sangre que en los cerebros de las ratas tratadas e investigadas en el experimento 2. Los hinchamientos y bolitas distribuidos irregularmente fueron escasos. Hubo una astrogliosis definida en la región penumbra, pero no tan grande y extendida como en los cerebros correspondientes de las ratas a las que se suministró pellas de alimento estándar y agua del grifo. Sin embargo, hubo una cierta variación en la magnitud de la neuroprotección ejercida por el péptido inyectado.

Cuando se investigó el hipocampo hubo un marcado aumento en la proliferación de células madre neurales y progenitoras en la ZSG. Lo mismo sucedió para la ZSV, pero fue menos evidente.

Se llegó a la conclusión de que las inyecciones intravenosas diarias de un fragmento de FA durante los primeros 5 días después de una lesión por congelación da como resultado neuroprotección como se aprecia por daño reducido del tejido cerebral después de una lesión focal, menos gliosis prominente y elevada formación de nuevos nervios a partir de células madre y progenitoras en, más evidentemente, la ZSG, investigado 6 días después.

Ejemplo 6: El FA rescata el tejido cerebral lesionado por la droga excitotóxica ácido kaínico, investigado 6 días después.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si la mayor presencia de FA en un cuerpo afectaba, ejerciendo neuroprotección, a la magnitud y gravedad de una lesión cerebral, causada en el cerebro de un roedor por inyección intraperitoneal del compuesto excitotóxico ácido kaínico.

Se administró a ratas machos y hembras (de un peso corporal 180 - 350 g al comienzo de los experimentos) pellas de alimento SPC y líquido de bebida durante al menos 10 días de la lesión cerebral. En paralelo, y para comparación, se alimentaron el mismo número de ratas con pellas de alimento estándar.

En el día de la lesión, se les inyectó una vez en el abdomen ácido kaínico en una cantidad de 10 mg/kg de peso corporal (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA), disuelto en solución salina tamponada. Después, se dejó que las ratas se movieran libremente y tuvieran acceso a alimento de calidad SPC y líquido de bebida. Pasados 45 - 60 minutos, las ratas comenzaron a comportarse de un modo estereotípico, realizando repetidamente uno o dos movimientos. Después sufrieron convulsiones unilaterales y generalizadas. Las ratas fueron monitorizadas con precisión y se registró la magnitud de la afección. 3 horas después del tratamiento con kainita, se les inyectó

diazepam para detener las convulsiones. Solamente se incluyeron en el presente estudio las ratas que tenían un tipo y magnitud de convulsiones estandarizados.

Seis días después de las convulsiones, las ratas se sacrificaron y se fijaron por perfusión como se ha descrito. Cuando se abrió el hueso del cráneo, no pudieron describirse signos de daño cerebral. No hubo diferencias entre las ratas que habían ingerido alimento de calidad SPC y las alimentadas con pellas estándares y agua del grifo. En ningún caso fue demostrable macroscópicamente edema.

La investigación con microscopio óptico de cortes delgados teñidos a través del hipocampo de los cerebros puso de manifiesto diferencias en la magnitud del daño entre los dos grupos de animales. Los tratados con alimentos de calidad SPC mostraron menos amplitud de la degeneración de las células nerviosas en las regiones CA1 y CA3/4 en comparación con las más gravemente lesionadas que habían ingerido las pellas estándares y agua del grifo. La misma diferencia pudo apreciarse para los brotes de fibras musgosas. Los hinchamientos y bolitas distribuidos irregularmente fueron escasos. Asimismo hubo una astrogliosis menos prominente en la región del hilio y en el *stratum lacunosum* y el *stratum* molecular, así como en el hilio de ratas que habían ingerido alimentos de calidad SPC en comparación con las que había comido pellas estándares. Hubo una variación considerable en la magnitud de la neuroprotección ejercida por el alimento de calidad SPC y el líquido de bebida.

Cuando se investigó el hipocampo, fue evidente que hubo una mayor proliferación de células neuronales madre y progenitoras en la ZSG (Fig. 1). Lo mismo sucedió, aunque menos prominente, para la ZSV. Hubo una tasa mayor de supervivencia de las células positivas a RNR recientemente formadas en la ZSG después de alimentar con alimento de calidad SPC y solución de bebida.

Se llegó a la conclusión de que la inducción experimental de mayor formación de FA en un cuerpo dio como resultado neuroprotección, como se apreció por la magnitud reducida del daño en el tejido cerebral en el hipocampo a los 6 días después de las convulsiones, y gliosis simultáneamente menos prominentes y mayor formación de nuevas células nerviosas a partir de células madre y células progenitoras más evidentemente en la ZSG.

Ejemplo 7: Efectos del FA y fragmentos del FA en el rescate del tejido cerebral, después de un daño cerebral difuso, más claramente por lesión axonal difusa.

Se ha de realizar el siguiente experimento para determinar si una mayor presencia de FA o fragmentos de FA en un cuerpo afectaba a la magnitud y gravedad de una lesión cerebral difusa, causada por trauma por aceleración rotacional a cabezas de conejos.

La lesión cerebral más común en la denominada conmoción cerebral. Afecta a 80.000 - 90.000 suecos anualmente y de ellos alrededor uno de cada cuatro tuvo que permanecer hospitalizado durante al menos un día para examen y observación. Las cifras correspondientes de los que padecen conmoción cerebral para los EE.UU. es aproximadamente 2 millones de individuos y de ellos aproximadamente medio millón son hospitalizados un día o más. Un gran número de los afectados son examinados por rayos X y/o por imágenes de resonancia magnética (IRM).

Tras una conmoción cerebral hay un riesgo creciente de que dichos individuos padezcan durante grandes periodos de tiempo secuelas neuropsiquiátricas y dolor. Además, tienen mayor riesgo de desarrollar subsiguientemente demencia, más claramente enfermedad de Alzheimer.

Se usarán conejos jóvenes y adultos. Los conejos anestesiados tendrán su cráneo liberado de tejido blanco. Se les pegará al cráneo un casco hecho de plástico reforzado con fibra de vidrio. El casco se conectará a un equipo de exposición, que transmite un trauma de aceleración rotacional a la cabeza, ya sea anterior-posterior o la inversa. Los conejos se tratarán por administración de FA o péptidos sintéticos correspondientes a secuencias seleccionadas de FA. Otros conejos serán alimentados con alimentos y solución de bebida de calidad SPC o alternativamente con composiciones basadas en yema de huevo. Los parámetros de la exposición serán monitorizados con precisión mediante un sistema de registro por ordenador.

A periodos de tiempo predeterminados después del trauma por aceleración rotacional, se extirparán los cerebros de los conejos sacrificados y se investigarán cuidadosamente los supuestos efectos neuroprotectores debidos al FA y sus derivados, así como a la yema de huevo. La ventaja de los experimentos planificados es que la lesión cerebral está normalizada y corresponde a la que es más frecuente en los seres humanos, una conmoción cerebral. La formación de edema cerebral se monitorizá con precisión por implantación intracerebral de sensores de fibra óptica conectados a un ordenador. Por tanto, los efectos del FA y sus derivados sobre la formación de edema y anomalías histopatológicas serán vigilados y documentados continuamente. Asimismo se realizarán estudios a largo plazo.

Se concluye que la inducción experimental de una lesión cerebral difusa, que se trata con FA o sus derivados, es de importancia clave para la evaluación de efectos neuroprotectores a largo plazo en el estado simulado, que está siendo en la práctica médica la causa dominante de lesión cerebral en seres humanos.

Referencias

1. Lange, S. & Lánnroth, I. *Int. Review of Cytology* 210 39-75 (2001)
2. Eriksson, P. S. et al.: *Nature Med.* 11: 1313-1317 (1998)
3. Kuhn, H. et al.: *J. Neurosci.* 16: 2027-2033 (1996)
- 5 4. Zhu, H., Wang, Z.-Y. & Hansson, H.-A.: *Brain Res.* 977:180-189 (2003)
5. Gage, F. H.: *Science* 287: 1433-1438 (2000)
6. McNamara, R. K. et al.: *Brain Res. Rev.* 18: 33-49 (1993)
7. Cameron, H. A. et al.: *Neuroscience* 61: 203-209 (1994)
8. Cameron, H. A. et al.: *Neuroscience* 82: 349-354 (1998)
- 10 9. Kempermann, G. et al.: *Nature* 386: 493-495 (1997)
10. Lange, S et al: WO97/08202
11. Davidson, J., & Hickey, W. F.: *Lab. Investigation* 84: 307-319 (2004)
12. Davidson, J., & Hickey, W. F.: *J. Leukocyt Biol* 74: 907-919 (2004)
13. Johansson, E et al.,: *J. Biol. Chem.* 270: 20615-20620 (1995)
- 15 14. Lange, S et al.,: Patente de EE.UU. Nº 6.344.440.
15. Lange, S et al.,: PCT/SE97/0191816.
16. Lange, S et al.,: PCT/SE 99/02340

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AS-Faktor AB
 <120> Nuevo uso
 <130> 21016008
 5 <150> GB 0322645.3 <151> 2003-09-26
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 10 <211> 1323
 <212> ADN
 <213> humano
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (63)..(1208)
 <223>
 <220>
 <221> señal_polyA
 <222> (1289)..(1295)
 <223>
 20 <400> 1

```

aattgagga gttgttgta ggccgtcccg gagaccggt cgggaggag gaaggtggca      60
ag atg gtg ttg gaa agc act atg gtg tgt gtg gac aac agt gag tat      107
  Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr
  1           5           10           15
atg cgg aat gga gac ttc tta ccc acc agg ctg cag gcc cag cag gat      155
  
```

ES 2 384 385 T3

Met	Arg	Asn	Gly	Asp	Phe	Leu	Pro	Thr	Arg	Leu	Gln	Ala	Gln	Gln	Asp	
				20					25					30		
gct	gtc	aac	ata	gtt	tgt	cat	tca	aag	acc	cgc	agc	aac	cct	gag	aac	203
Ala	Val	Asn	Ile	Val	Cys	His	Ser	Lys	Thr	Arg	Ser	Asn	Pro	Glu	Asn	
			35					40					45			
aac	gtg	ggc	ctt	atc	aca	ctg	gct	aat	gac	tgt	gaa	gtg	ctg	acc	aca	251
Asn	Val	Gly	Leu	Ile	Thr	Leu	Ala	Asn	Asp	Cys	Glu	Val	Leu	Thr	Thr	
		50					55					60				
ctc	acc	cca	gac	act	ggc	cgt	atc	ctg	tcc	aag	cta	cat	act	gtc	caa	299
Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Gly	Arg	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	His	Thr	Val	Gln	
	65					70					75					
ccc	aag	ggc	aag	atc	acc	ttc	tgc	acg	ggc	atc	cgc	gtg	gcc	cat	ctg	347
Pro	Lys	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe	Cys	Thr	Gly	Ile	Arg	Val	Ala	His	Leu	
				85					90						95	
gct	ctg	aag	cac	cga	caa	ggc	aag	aat	cac	aag	atg	cgc	atc	att	gcc	395
Ala	Leu	Lys	His	Gln	Gly	Lys	Asn	His	Lys	Met	Arg	Ile	Ile	Ile	Ala	
				100				105						110		
ttt	gtg	gga	agc	cca	gtg	gag	gac	aat	gag	aag	gat	ctg	gtg	aaa	ctg	443
Phe	Val	Gly	Ser	Pro	Val	Glu	Asp	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Val	Lys	Leu	
			115					120					125			
gct	aaa	cgc	ctc	aag	aag	gag	aaa	gta	aat	ggt	gac	att	atc	aat	ttt	491
Ala	Lys	Arg	Leu	Lys	Lys	Glu	Lys	Val	Asn	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	
		130					135					140				
ggg	gaa	gag	gag	gtg	aac	aca	gaa	aag	ctg	aca	gcc	ttt	gta	aac	acg	539
Gly	Glu	Glu	Glu	Val	Asn	Thr	Glu	Lys	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Asn	Thr	
	145					150					155					
ttg	aat	ggc	aaa	gat	gga	acc	ggt	tct	cat	ctg	gtg	aca	gtg	cct	cct	587
Leu	Asn	Gly	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	His	Leu	Val	Thr	Val	Pro	Pro	
				165						170					175	
ggg	ccc	agt	ttg	gct	gat	gct	ctc	atc	agt	tct	ccg	att	ttg	gct	ggt	635
Gly	Pro	Ser	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Ser	Pro	Ile	Leu	Ala	Gly	
				180					185					190		
gaa	ggt	ggt	gcc	atg	ctg	ggt	ctt	ggt	gcc	agt	gac	ttt	gaa	ttt	gga	683
Glu	Gly	Gly	Ala	Met	Leu	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser	Asp	Phe	Glu	Phe	Gly	
			195					200					205			
gta	gat	ccc	agt	gct	gat	cct	gag	ctg	gcc	ttg	gcc	ctt	cgt	gta	tct	731
Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Val	Ser	
		210					215					220				
atg	gaa	gag	cag	cgg	cac	gca	gga	gga	gga	gcg	cgg	cgg	gca	gct	cga	779
Met	Glu	Glu	Gln	Arg	His	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Arg	
	225					230					235					
gct	tct	gct	gct	gag	gcc	ggg	att	gct	acg	act	ggg	act	gaa	gac	tca	827
Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	Thr	Thr	Gly	Thr	Glu	Asp	Ser	
				245						250					255	
gac	gat	gcc	ctg	ctg	aag	atg	acc	atc	agc	cag	caa	gag	ttt	ggc	cgc	875
Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Met	Thr	Ile	Ser	Gln	Gln	Glu	Phe	Gly	Arg	
				260					265					270		
act	ggg	ctt	cct	gac	cta	agc	agt	agt	act	gag	gaa	gag	gag	att	gct	923
Thr	Gly	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Glu	Glu	Glu	Glu	Ile	Ala	
			275					280					285			
tat	gcc	atg	cag	atg	tcc	ctg	cag	gga	gca	gag	ttt	ggc	cag	gcg	gaa	971

ES 2 384 385 T3

Tyr Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu
 290 295 300
 tca gca gac att gat gcc agc tca gct atg gac aca tct gag cca gcc 1019
 Ser Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala
 305 310 315
 aag gag gag gat gat tac gac gtg atg cag gac ccc gag ttc ctt cag 1067
 Lys Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln
 320 325 330 335
 agt gtc cta gag aac ctc cca ggt gtg gat ccc aac aat gaa gcc att 1115
 Ser Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile
 340 345 350
 cga aat gct atg ggc tcc ctg cct ccc agg cca cca agg acg gca aga 1163
 Arg Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg
 355 360 365
 agg aca aga agg agg aag aca aga agt gag act gga ggg aaa ggg 1208
 Arg Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly
 370 375 380
 tagctgagtc tgcttagggg actgggaagc acggaatata gggtagatg tggttatctg 1268
 taaccattac agcctaaata aagcttgcca acttttataaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1323

<210> 2
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> humano

5

<400> 2

Met Val Leu Glu Ser Thr Met Val Cys Val Asp Asn Ser Glu Tyr Met
 1 5 10 15
 Arg Asn Gly Asp Phe Leu Pro Thr Arg Leu Gln Ala Gln Gln Asp Ala
 20 25 30
 Val Asn Ile Val Cys His Ser Lys Thr Arg Ser Asn Pro Glu Asn Asn
 35 40 45
 Val Gly Leu Ile Thr Leu Ala Asn Asp Cys Glu Val Leu Thr Thr Leu
 50 55 60
 Thr Pro Asp Thr Gly Arg Ile Leu Ser Lys Leu His Thr Val Gln Pro
 65 70 75 80
 Lys Gly Lys Ile Thr Phe Cys Thr Gly Ile Arg Val Ala His Leu Ala
 85 90 95
 Leu Lys His Arg Gln Gly Lys Asn His Lys Met Arg Ile Ile Ala Phe
 100 105 110

ES 2 384 385 T3

Val Gly Ser Pro Val Glu Asp Asn Glu Lys Asp Leu Val Lys Leu Ala
 115 120 125
 Lys Arg Leu Lys Lys Glu Lys Val Asn Val Asp Ile Ile Asn Phe Gly
 130 135 140
 Glu Glu Glu Val Asn Thr Glu Lys Leu Thr Ala Phe Val Asn Thr Leu
 145 150 155 160
 Asn Gly Lys Asp Gly Thr Gly Ser His Leu Val Thr Val Pro Pro Gly
 165 170 175
 Pro Ser Leu Ala Asp Ala Leu Ile Ser Ser Pro Ile Leu Ala Gly Glu
 180 185 190
 Gly Gly Ala Met Leu Gly Leu Gly Ala Ser Asp Phe Glu Phe Gly Val
 195 200 205
 Asp Pro Ser Ala Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Met
 210 215 220
 Glu Glu Gln Arg His Ala Gly Gly Gly Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
 225 230 235 240
 Ser Ala Ala Glu Ala Gly Ile Ala Thr Thr Gly Thr Glu Asp Ser Asp
 245 250 255
 Asp Ala Leu Leu Lys Met Thr Ile Ser Gln Gln Glu Phe Gly Arg Thr
 260 265 270
 Gly Leu Pro Asp Leu Ser Ser Ser Thr Glu Glu Glu Glu Ile Ala Tyr
 275 280 285
 Ala Met Gln Met Ser Leu Gln Gly Ala Glu Phe Gly Gln Ala Glu Ser
 290 295 300
 Ala Asp Ile Asp Ala Ser Ser Ala Met Asp Thr Ser Glu Pro Ala Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Asp Asp Tyr Asp Val Met Gln Asp Pro Glu Phe Leu Gln Ser
 325 330 335
 Val Leu Glu Asn Leu Pro Gly Val Asp Pro Asn Asn Glu Ala Ile Arg
 340 345 350
 Asn Ala Met Gly Ser Leu Pro Pro Arg Pro Pro Arg Thr Ala Arg Arg
 355 360 365
 Thr Arg Arg Arg Lys Thr Arg Ser Glu Thr Gly Gly Lys Gly
 370 375 380

REIVINDICACIONES

1. Uso de una proteína factor antiselector (SEQ ID NO: 2); o uno de sus oligo- o poli-péptidos o derivados, que comprende una secuencia de aminoácidos de Fórmula I:

5 X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 (Fórmula I)

en donde

X1 es I, los aminoácidos nº 1-35 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente

X2 es H, R o K

10 X3 es S o L

X4 es T o A

X5 es los aminoácidos nº 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente,

15 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de pérdida de tejido neural en un estado que está asociado a, o **caracterizado por**, una pérdida patológica de células en el sistema nervioso periférico, el sistema nervioso autónomo y/o el sistema nervioso central.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el estado se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, asfixia, lesión por hipoxia, lesión por isquemia, lesión traumática, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, ictus y trastornos desmielinizante.

20 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la causa del estado se selecciona del grupo que consiste en daño al sistema nervioso central, un defecto en el sistema nervioso central, un trastorno traumático, maligno, auto-inmunitario o degenerativo, daño causado por conmoción, contusión, daño axonal causado por trauma en la cabeza, daño axonal causado por enfermedad de vasos pequeños en el SNC, y daño en la médula espinal después de una enfermedad.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la Fórmula I tiene la secuencia elegida de una de:

- 25 a) los aminoácidos números 35-42 de la SEQ ID NO: 2,
 b) los aminoácidos números 35-46 de la SEQ ID NO: 2,
 c) los aminoácidos números 36-51 de la SEQ ID NO: 2,
 d) los aminoácidos números 36-80 de la SEQ ID NO: 2,
 e) los aminoácidos números 1-80 de la SEQ ID NO: 2, o
 30 f) los aminoácidos números 1-163 de la SEQ ID NO: 2, o

una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. Uso de un alimento que induce una proteína factor antiselector en la fabricación de un alimento o alimento médico para el tratamiento y/o la prevención de pérdida de tejido neural en un estado que está asociado a, o **caracterizado por**, una pérdida patológica de células en el sistema nervioso periférico, el sistema nervioso autónomo y/o el sistema nervioso central.

35 6. Uso de una yema de huevo con al menos 1000 unidades FIL /ml de proteína factor antiselector, en la fabricación de un medicamento, un alimento o un alimento médico para el tratamiento y/o prevención de pérdida de tejido neural en un estado que está asociado a, o **caracterizado por**, una pérdida patológica de células en el sistema nervioso periférico, el sistema nervioso autónomo y/o el sistema nervioso central.

40 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el estado se **caracteriza por** presentar una degeneración patológica, pérdida de capacidad y/o pérdida de control de regeneración y/o pérdida de control de regeneración de una célula diferenciada y/o tejido, una célula madre embrionaria, una célula madre adulta, una célula progenitora y/o una célula derivada de una célula madre o una célula madre progenitora.

45 8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el estado está asociado a, **caracterizado por** una pérdida patológica de células madre neurales o células progenitoras neurales.

9. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el estado está asociado a, o **caracterizado por** una pérdida patológica de oligodendroglías, astrogliás, células de Schwann y/o células neuronales y/o poblaciones celulares.

50 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el estado está asociado a, o **caracterizado por** una pérdida patológica de células neuronales no colinérgicas, células neuronales colinérgicas y/o neurogliocitos, y/o poblaciones celulares.

11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el estado es causado por daño en el sistema nervioso central o un defecto en el sistema nervioso central.

55 12. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el estado es causado por un trastorno traumático, auto-inmunitario o degenerativo.

13. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde dicho estado se **caracteriza por**

pérdida de memoria.

14. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-13, en donde el medicamento se formula para infusión intravenosa, inyección intramuscular y/o inyección subcutánea.
- 5 15. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-13, en donde el medicamento se formula de modo que la sustancia activa pase a los ventrículos y/o otras cavidades del cerebro de un paciente cuando se administre a dicho paciente.
16. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 7-13, en donde el medicamento se formula que la sustancia activa pase al líquido cefalorraquídeo de un paciente cuando se administre a dicho paciente.
- 10 17. Un método *in vitro* para la propagación, inducción, reducción y/o el mantenimiento de la génesis de una célula madre aislada y/o la progenie de cualquier capa germinal, **caracterizado por** tratar la célula aislada con una proteína factor antisecretor (SEQ ID NO: 2); o uno de sus oligo- o poli-péptidos, o derivados que comprende una secuencia de aminoácidos Fórmula I:

$$X1-V-C-X2-X3-K-X4-R-X5 \quad (\text{Fórmula I})$$

en donde

- 15 X1 es I, los aminoácidos nº 1-35 de la SEQ ID NO: 2, o está ausente
 X2 es H, R o K
 X3 es S o L
 X4 es T o A
 X5 es los aminoácidos nº 43-46, 43-51, 43-80 o 43-163 de la SEQ ID NO:2, o está ausente,
- 20 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

18. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la Fórmula I tiene una secuencia elegida de una de:
- 25 a) los aminoácidos números 35-42 de la SEQ ID NO: 2,
 b) los aminoácidos números 35-46 de la SEQ ID NO: 2,
 c) los aminoácidos números 36-51 de la SEQ ID NO: 2,
 d) los aminoácidos números 36-80 de la SEQ ID NO: 2,
 e) los aminoácidos números 1-80 de la SEQ ID NO: 2, o
 f) los aminoácidos números 1-163 de la SEQ ID NO: 2,

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

- 30 19. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde dicha célula aislada se elige del grupo que comprende células epiteliales, fibroblastos, células osteogénicas, macrófagos y microglíocitos, células vasculares, células óseas, condrocitos, células del miocardio, células sanguíneas, neuronas, oligodendrocitos, células astrogiales, células progenitoras, células madre y/o células derivadas de células progenitoras o células madre.

35

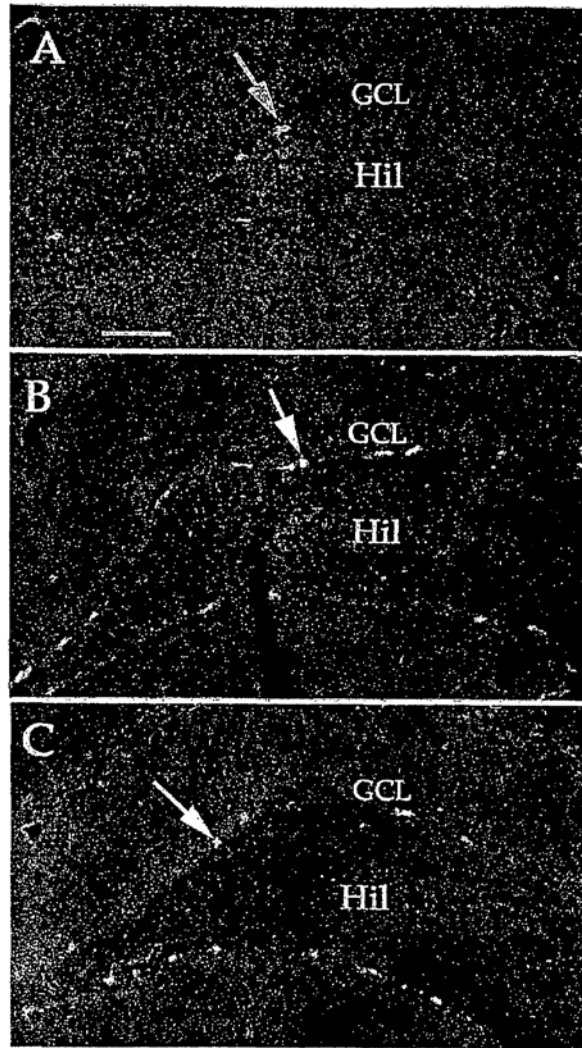


FIGURA 1

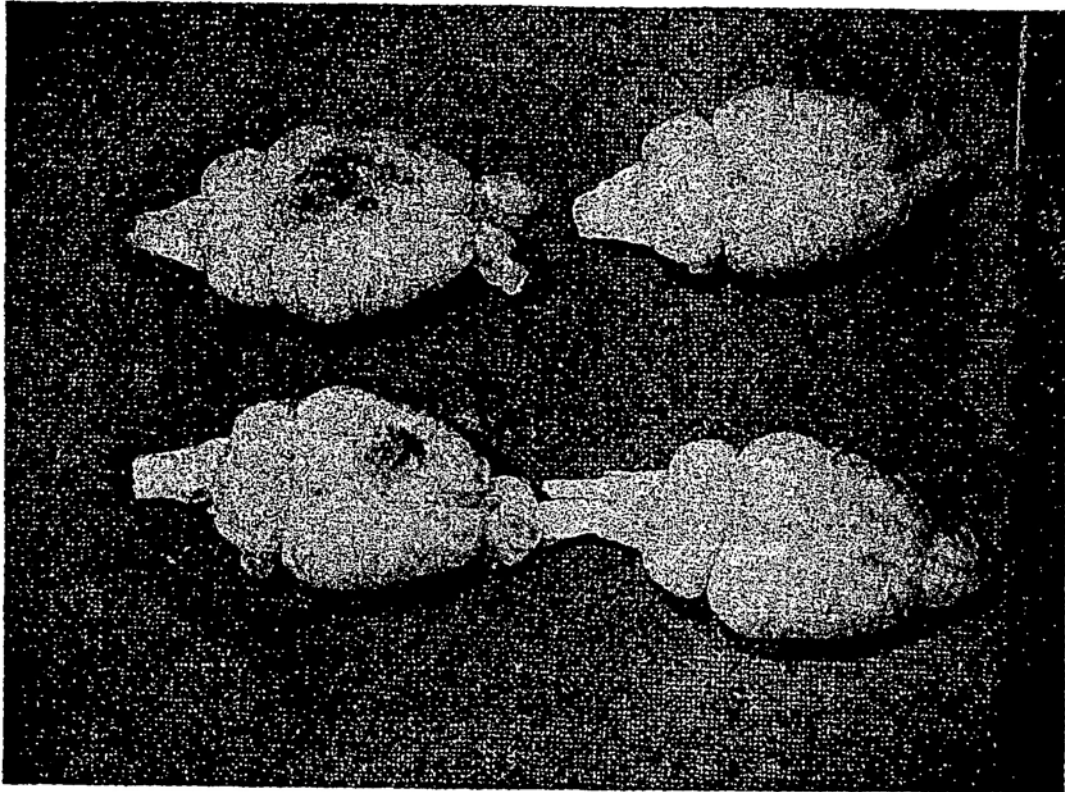


FIGURA 2

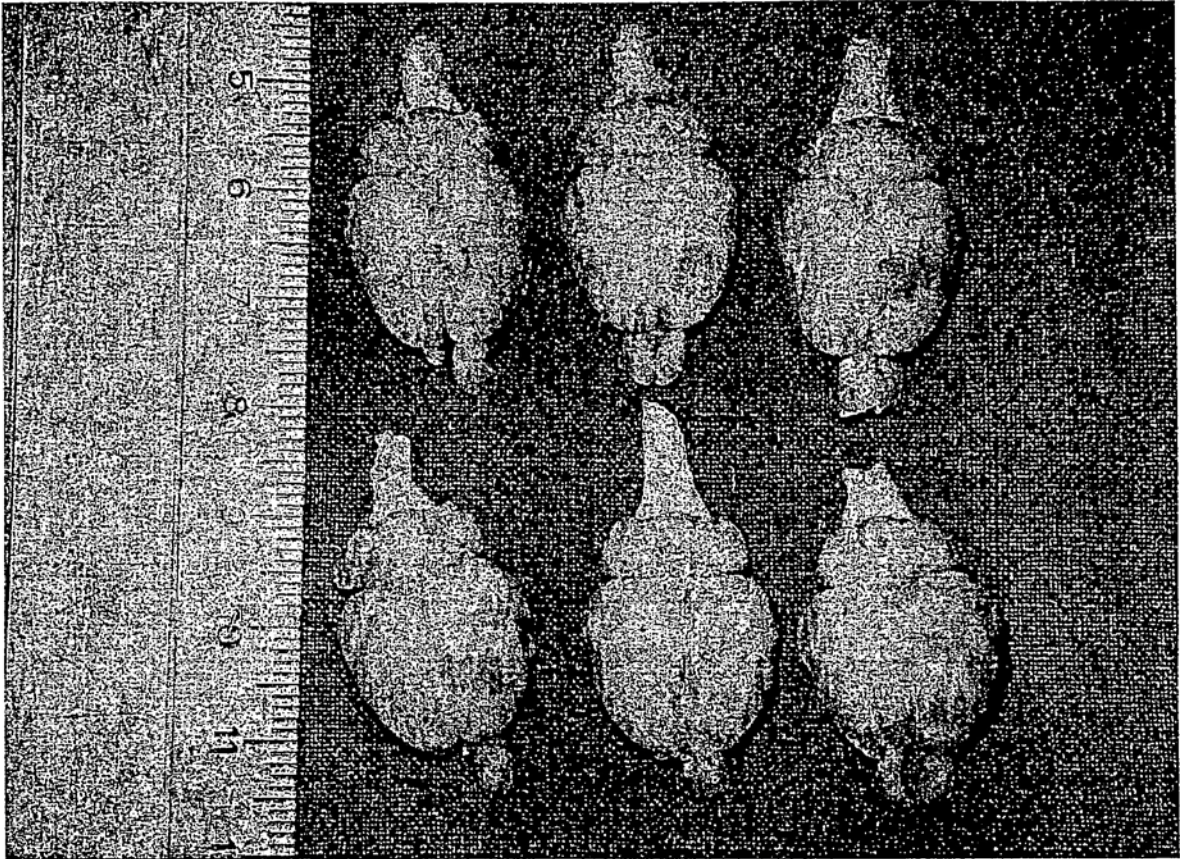


FIGURA 3