

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 082**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02738042 .7**
96 Fecha de presentación: **08.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1389130**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.02.2004**

54 Título: **Uso de OSTEOPONTINA para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas**

30 Prioridad:
17.05.2001 EP 01111296

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.09.2012

73 Titular/es:
**MERCK SERONO SA
CENTRE INDUSTRIEL
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:
**BOSCHERT, Ursula;
FEGER, Georg;
SELVARAJU, Raghuram;
PAPOIAN, Ruben y
BERNASCONI, Lilia**

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 387 082 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

Uso de osteopontina para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas

Campo de la invención

5 La presente invención en general está en el campo de las enfermedades y trastornos neurológicos. Se refiere a la neuroprotección, mielinización del nervio y generación o regeneración de las células que producen mielina. En particular, se refiere a enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas, neuropatías, lesión del nervio traumático, accidente cerebrovascular y enfermedades neurológicas causadas por trastornos metabólicos congénitos. En forma más específica, la presente invención se refiere al uso de osteopontina, o de un agonista de la actividad de la osteopontina, para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

15 La mielinización del nervio es un proceso esencial en la formación y la función de los compartimientos del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). La vaina de mielina alrededor de los axones es necesaria para la conducción adecuada de impulsos eléctricos a lo largo de los nervios. La pérdida de mielina se produce en un número de enfermedades entre las cuales se encuentran la esclerosis múltiple (EM) que afecta el SNC, el síndrome de Guillain-Barré, PDIC y otras (véase Abramsky and Ovadia, 1997; Trojaborg, 1998, Hartung et al, 1998) Al igual que varias etiologías, tales como patógenos infecciosos o ataques autoinmunes, las enfermedades desmielinizantes causan pérdida de la función neurológica y pueden conducir a la parálisis y muerte. Mientras que los actuales agentes terapéuticos reducen los ataques inflamatorios en la EM y retardan el avance de la enfermedad, existe la necesidad de desarrollar terapias que podrían conducir a la remielinización y el recupero de la función neurológica (Abramsky and Ovadia, 1997, Pohlau et al, 1998).

25 La lesión al SNC inducida por insultos agudos que incluyen traumatismo, hipoxia e isquemia pueden afectar tanto las neuronas como la sustancia blanca. Si bien se ha prestado mayor atención a los procesos que conducen a la muerte neuronal, la creciente evidencia sugiere que el daño a los oligodendrocitos, que forman la mielina en los axones, también es un componente específico de la lesión del SNC. De este modo, la patología del oligodendrocito se demostró en una fase muy temprana posterior a la apoplejía (3 horas) en ratas, sugiriendo que estas células son incluso más vulnerables a los eventos excitotóxicos que las células neuronales (Pantoni et al. 1996). Un candidato potencial que media la muerte celular es la marcada elevación de concentración de glutamato que acompaña a muchas lesiones agudas del SNC (Iipton et al., 1994). En verdad, además de las neuronas se halló que los oligodendrocitos además expresan los receptores de glutamato funcionales que pertenecen al subtipo AMPA/kainato. Además los oligodendrocitos muestran una elevada vulnerabilidad a la aplicación de glutamato (McDonald et al., 1998).

35 El traumatismo es una lesión o daño del nervio. Puede ser un traumatismo de la médula espinal, el cual es un daño a la médula espinal que afecta toda la función nerviosa que es controlada en y por debajo del nivel de la lesión, incluyendo el control y la sensación muscular, o el traumatismo cerebral, tal como el traumatismo causado por una lesión craneal cerrada.

La hipoxia cerebral es una falta de oxígeno específicamente a los hemisferios cerebrales, y más típicamente el término se usa para referirse a una falta de oxígeno a la totalidad del cerebro. Dependiendo de la severidad de la hipoxia, los síntomas pueden oscilar desde confusión hasta daño cerebral irreversible, coma y muerte.

40 La apoplejía usualmente se origina por la isquemia del cerebro. Además se denomina enfermedad o accidente cerebrovascular. Es un grupo de trastornos cerebrales que involucra la pérdida de función del cerebro que se producen cuando el suministro de sangre a cualquier parte del cerebro es interrumpido. El cerebro requiere aproximadamente 20% de la circulación de sangre en el cuerpo. El suministro de sangre primario al cerebro es a través de 2 arterias en el cuello (las arterias carótidas), las cuales posteriormente se ramifican dentro del cerebro a múltiples arterias que suministran cada una de ellas un área específica del cerebro. Incluso una breve interrupción al flujo sanguíneo puede ocasionar disminuciones en la función del cerebro (déficit neurológico). Los síntomas varían con el área del cerebro afectada y normalmente incluyen problemas tales como cambios en la visión, cambios en el discurso, movimientos disminuidos o sensación en una parte del cuerpo, o cambios en el nivel de conciencia. Si el flujo sanguíneo disminuye durante más que unos pocos segundos, las células del cerebro en el área se destruyen (se infartan) ocasionando un daño permanente a esa área del cerebro o incluso la muerte.

55 Un accidente cerebrovascular afecta aproximadamente 4 de cada 1000 personas. Es la tercera causa principal de muerte en la mayoría de los países desarrollados, incluyendo Estados Unidos de América. La incidencia del accidente cerebrovascular se eleva drásticamente con la edad, duplicándose el riesgo con cada década después de los 35 años. Aproximadamente el 5% de la población mayor de 65 años ha tenido al menos un accidente cerebrovascular. El trastorno se produce más en hombres que en mujeres.

Como se mencionó anteriormente, un accidente cerebrovascular involucra la pérdida de funciones cerebrales (déficit neurológicos) originada por una pérdida de circulación sanguínea a las áreas del cerebro. Los déficits neurológicos

específicos pueden variar dependiendo de la ubicación, la extensión del daño, y la causa del trastorno. Un accidente cerebrovascular puede originarse por un flujo sanguíneo reducido que da por resultado un suministro de sangre deficiente y la muerte de tejidos en esa área (infarto). Las causas de los accidentes isquémicos son coágulos sanguíneos que se forman en el cerebro (trombo) y coágulos sanguíneos o partes de la placa aterosclerótica u otro material que viaja hacia el cerebro desde otra ubicación (émbolo). El sangrado (hemorragia) dentro del cerebro puede causar síntomas que imitan el accidente cerebrovascular.

La causa más común de un accidente cerebrovascular es el accidente secundario a la aterosclerosis (trombosis cerebral). La aterosclerosis ("endurecimiento de las arterias") es una afección en la cual los depósitos grasos se producen sobre el revestimiento interno de las arterias, y se desarrolla la placa aterosclerótica (una masa que consiste de depósitos grasos y plaquetas sanguíneas). La oclusión de la arteria se desarrolla lentamente. La placa aterosclerótica no necesariamente causa un accidente cerebrovascular. Hay muchas pequeñas conexiones entre las diversas arterias del cerebro. Si el flujo sanguíneo disminuye gradualmente, estas pequeñas conexiones aumentarán en tamaño y "puentean" el área obstruida (circulación colateral). Si hay suficiente circulación colateral, incluso una arteria totalmente bloqueada puede no causar déficits neurológicos. Un segundo mecanismo de seguridad dentro del cerebro es que las arterias son lo suficientemente grandes como para que el 75% de los vasos sanguíneos puedan ocluirse, e incluso habrá un adecuado flujo sanguíneo a esa área del cerebro.

Un accidente cerebrovascular trombótico (apoplejía originada por trombosis) es más común en la gente mayor, y a menudo hay una enfermedad del corazón aterosclerótica subyacente o diabetes mellitus. Este tipo de accidente puede ocurrir en cualquier momento, inclusive durante el descanso. La persona puede o no perder la conciencia.

Los accidentes originados por embolia (coágulo de sangre en movimiento) son los accidentes más comunes secundarios a una embolia cardiogénica, coágulos que se desarrollan debido a trastornos cardíacos que posteriormente viajan hacia el cerebro. Una embolia además puede originarse en otras áreas, especialmente donde hay placa aterosclerótica. El émbolo viaja a través del torrente sanguíneo y se pega en una pequeña arteria en el cerebro. Este accidente se produce repentinamente con un déficit neurológico máximo inmediato. No está asociado con los niveles de actividad y puede producirse en cualquier momento. Las arritmias del corazón son vistas normalmente con este trastorno y a menudo son la causa del émbolo. El daño al cerebro a menudo es más severo que con un accidente originado por trombosis cerebral. Se puede o no perder la conciencia. El resultado probable empeora si los vasos sanguíneos dañados por el accidente se rompen y sangran (derrame cerebral)

La neuropatía periférica es un síndrome de pérdida sensorial, debilidad muscular y atrofia, disminución de los reflejos profundos, y síntomas vasomotores, solos o en cualquier combinación.

La enfermedad puede afectar un solo nervio (mononeuropatía), dos o más nervios en áreas separadas (múltiple mononeuropatía), o muchos nervios en forma simultánea (polineuropatía). El axón puede verse afectado esencialmente (por ej., la diabetes mellitus, borreliosis de Lyme, o uremia o con agentes tóxicos) o la vaina de mielina o las células Schwann (por ej., en polineuropatía inflamatoria aguda o crónica, leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré). El daño a las pequeñas fibras mielinizadas o desmielinizadas da por resultado esencialmente la pérdida de temperatura y sensación de dolor; el daño a las grandes fibras mielinizadas da por resultado defectos motores o propioceptivos. Algunas neuropatías (por ej., debido a la toxicidad del plomo, el uso de dapsona, fiebre americana, Porfirio, o síndrome de Guillain-Barré) afectan esencialmente las fibras motoras; otros (por ej., debido a la ganglionitis espinal del cáncer, lepra, SIDA, diabetes mellitus, o intoxicación con piridoxina crónica) afectan esencialmente los ganglios espinales o las fibras sensoriales, produciendo síntomas sensoriales. Ocasionalmente, los nervios craneales también están involucrados (por ej., en el síndrome de Guillain-Barré, borreliosis de Lyme, diabetes mellitus, y difteria). La identificación de las modalidades involucradas ayuda a determinar la causa.

El traumatismo es la causa más común de una lesión localizada a un nervio simple. La actividad muscular violenta o la sobre extensión forzosa de una articulación puede producir una neuropatía focal, como pueden los traumatismos pequeños repetidos (por ej., el fuerte agarre de pequeñas herramientas, excesiva vibración de los martillos pilón). La parálisis por compresión o compresiva usualmente afecta los nervios superficiales (cubital, radial, peroneo) en las prominencias óseas (por ej., durante el sueño profundo o durante una anestesia en personas delgadas o caquéticas y a menudo en alcohólicos) o en canales angostos (por ej., en el síndrome del túnel carpiano). La parálisis por compresión además puede surgir de tumores, hiperostosis ósea, yesos, muletas, o posturas acalambradas prolongadas (por ej., en jardinería). La hemorragia dentro de un nervio y la exposición al frío o radiación pueden causar neuropatía. La mononeuropatía puede surgir de la invasión directa del tumor.

La múltiple mononeuropatía es usualmente secundaria a los trastornos vasculares colágenos (por ej., poliarteritis nudosa, SLE, síndrome de Sjogren, RA), sacoidosis, enfermedades metabólicas (por ej., diabetes, amitooidosis), o enfermedades infecciosas (por ej., borreliosis de Lyme, infección por VIH). Los microorganismos pueden causar mononeuropatía múltiple por invasión directa del nervio (por ej., en la lepra).

La polineuropatía debido a enfermedades febriles agudas puede surgir de una toxina (por ej., en la difteria) o una reacción autoinmune (por ej., en el síndrome de Guillain-Barré); la polineuropatía que algunas veces sigue a las inmunizaciones es probablemente también autoinmune.

Los agentes tóxicos en general causan polineuropatía pero algunas veces mononeuropatía. Incluyen emetina, hexobarbital, barbital, clorobutanol, sulfonamidas, fenitoína, nitrofurantoína, los vinca alcaloides, metales pesados, monóxido de carbono, fosfato de triortocresilo, ortodinitrofeniol, muchos solventes, otros venenos industriales y ciertos fármacos para SIDA (por ej., zalcitabina, didanosina).

- 5 Las deficiencias nutricionales y los trastornos metabólicos pueden dar por resultado polineuropatía. La deficiencia de vitaminas a menudo es la causa (por ej. en el alcoholismo, beriberi, anemia perniciosa, deficiencia de piridoxina inducida por isoniazid, síndromes de mala absorción, y hiperemesis gravidarum). La polineuropatía además se produce en el hipotiroidismo, porfiria, sarcoidosis, amiloidosis, y uremia. La diabetes mellitus puede ocasionar polineuropatía distal sensoriomotora (más común), múltiple mononeuropatía, y mononeuropatía focal (por ej., de los nervios craneales oculomotor o abducens).

La malignidad puede ocasionar polineuropatía a través de la gamopatía monoclonal (mieloma múltiple, linfoma), invasión amiloide, o deficiencias nutricionales o como un síndrome paraneoplásico.

- 15 Mononeuropatías específicas: Las mononeuropatías simples y múltiples se caracterizan por dolor, debilidad, y parestesias en la distribución del nervio afectado. La mononeuropatía múltiple es asimétrica; los nervios pueden estar involucrados todos de inmediato o en forma progresiva. La participación extensa de muchos nervios puede simular una polineuropatía.

- 20 La parálisis del nervio cubital menudo se origina por un traumatismo al nervio en la ranura cubital del codo por el apoyo repetido sobre el codo o por el desarrollo óseo asimétrico después de una fractura en la niñez (parálisis cubital tardía). El nervio cubital además puede estar comprimido en el túnel cubital. Se producen parestesias y un déficit sensorial en el quinto y la mitad medial de los cuartos dedos; el aductor pulgar, el abductor del quinto dedo, y los músculos interossei son débiles y se atrofian. La parálisis del nervio cubital crónica severa produce una deformidad de mano de garra. Los estudios de conducción nerviosa pueden identificar el sitio de la lesión. El tratamiento conservador debe intentarse antes de intentar la reparación quirúrgica.

- 25 El síndrome del túnel carpiano surge de la compresión del nervio mediano en el aspecto volar de la muñeca entre el ligamento carnal superficial transversal y los tendones longitudinales de los músculos del antebrazo que flexionan la mano. Puede ser unilateral o bilateral. La compresión produce parestesias en el aspecto radial-palmar de la mano y dolor en la muñeca y la palma; algunas veces se produce dolor en forma proximal al sitio de compresión en el antebrazo y el hombro. El dolor puede ser más severo a la noche. Un déficit sensorial en el aspecto palmar de los primeros tres dedos puede seguir; los músculos que controlan la abducción del pulgar y la oposición puede tornarse débil y atrofiada. Este síndrome debe distinguirse de la compresión radicular C-6 debido a la radiculopatía cervical.

- 35 La parálisis del nervio peroneo usualmente se origina por compresión del nervio contra el aspecto lateral del cuello fibular. Es más común en los pacientes escualidos postrados en cama y en las personas que habitualmente cruzan sus piernas. Se produce la debilidad de la dorsiflexión del pie y la eversión (pie caído) Ocasionalmente, se produce un déficit sensorial sobre el aspecto antero lateral de la pierna inferior y el dorso del pie o en el espacio de banda entre el primero y el segundo metatarsiano. El tratamiento usualmente es conservador para las neuropatías compresivas (por ej., evitar el cruce de piernas). Las neuropatías incompletes usualmente son seguidas clínicamente y usualmente mejoran en forma espontánea. Si no se produce la recuperación, se puede indicar la exploración quirúrgica.

- 40 La parálisis del nervio radial (parálisis de la noche del sábado) se origina por la compresión del nervio contra el húmero, por ej., a medida que el brazo es tendido sobre la espalda de una silla durante intoxicación o sueño profundo. Los síntomas incluyen debilidad de la muñeca y los extensores del dedo (muñeca caída) y, ocasionalmente, pérdida sensorial sobre el aspecto dorsal del primer músculo interóseo dorsal. El tratamiento es similar al de la neuropatía peroneal compresiva.

- 45 Las polineuropatías son relativamente simétricas, que a menudo afectan las fibras sensoriales, motoras y vasomotoras en forma simultánea. Pueden afectar el cilindro del axón o la vaina de la mielina y, en cualquier forma, pueden ser agudas (por ej., síndrome de Guillain-Barré) o crónicas (por ej. insuficiencia renal).

- 50 La polineuropatía debido a trastornos metabólicos (por ej., diabetes mellitus) o a insuficiencia renal se desarrolla lentamente, a menudo durante meses o años. Comienza frecuentemente con anomalías sensoriales en las extremidades inferiores que a menudo son más severas en forma distal que proximal. A menudo se destacan el hormigueo periférico, la obnubilación, el dolor ardiente, o las deficiencias en la propiocepción de la articulación y la sensación vibratoria. El dolor a menudo es peor a la noche y puede agravarse tocando el área afectada o por cambios de temperatura. En casos severos, hay signos objetivos de pérdida sensorial, con distribución típica en guante y calcetín. Los reflejos aquileos y otros reflejos profundos disminuyen o están ausentes. Las úlceras dolorosas sobre los dedos o las articulaciones de Charcot pueden desarrollarse cuando la pérdida sensorial es profunda. Los déficits sensoriales o propioceptivos pueden conducir a anomalías en el modo de andar. La implicancia motora da por resultado debilidad muscular distal y atrofia. El sistema nervioso autónomo puede estar involucrado además o en forma selectiva, conduciendo a diarrea nocturna, incontinencia urinaria y fecal,

impotencia, o hipotensión postural. Los síntomas vasomotores varían. La piel puede ser más pálida y más seca que lo normal, algunas veces con decoloración oscura; la transpiración puede ser excesiva. Los cambios con afinidad trófica (piel suave y brillante, uñas picadas o en cresta, osteoporosis) son comunes en los casos severos prolongados.

5 La polineuropatía nutricional es común entre los alcohólicos y los desnutridos. Una axonopatía primaria puede conducir a desmielinización secundaria y destrucción axonal en los nervios más largos y más grandes. No queda claro si la causa es deficiencia de tiamina u otra vitamina (por ej., piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico). La neuropatía debido a la deficiencia de piridoxina usualmente se produce sólo en personas que toman isoniazid para TB; los niños que son deficientes o dependientes de la piridoxina pueden tener convulsiones. La atrofia y la debilidad
10 simétrica de las extremidades distales son usualmente insidiosas pero puede avanzar rápidamente, algunas veces acompañado de pérdida sensorial, parestesias, y dolor. Dolor, calambres, frialdad, quemazón, y obnubilación en las pantorrillas y los pies puede empeorar al tacto. Se pueden dar múltiples vitaminas cuando la etiología es oscura, pero no tienen un beneficio probado.

15 Con relativa frecuencia, una polineuropatía exclusivamente sensorial comienza con dolores periféricos y parestesias y avances centrales hacia una pérdida de todas las formas de sensación. Se produce como un efecto remoto del carcinoma (especialmente broncogénico), después de una ingestión excesiva de piridoxina (> 0,5 g/día), y en la amiloidosis, el hipotiroidismo, mieloma, y uremia. La neuropatía inducida por piridoxina se resuelve cuando se discontinúa la piridoxina.

20 Las neuropatías hereditarias se clasifican como neuropatías sensomotoras o neuropatías sensoriales. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es la neuropatía sensomotora hereditaria más común. Las neuropatías sensomotoras menos comunes comienzan al nacer y dan por resultado una discapacidad mayor. En las neuropatías sensoriales, que son raras, la pérdida del dolor distal y la sensación de temperatura son más prominentes que la pérdida del sentido vibratorio y de la posición. El principal problema es la mutilación pedal debido a la insensibilidad al dolor, con infecciones frecuentes y osteomielitis.

25 Los tipos de neuropatía motor y sensorial hereditaria I y II (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, atrofia muscular perineal) es un trastorno relativamente común, usualmente autosómico dominante caracterizado por debilidad y atrofia, esencialmente en los músculos de la pierna distal y peroneal. Los pacientes además pueden tener otras enfermedades degenerativas (por ej., ataxia de Friedreich) o una historia familiar propia. Los pacientes con tipo 1
30 presentan en la mitad de la niñez pie caído y atrofia muscular distal lentamente progresiva, produciendo "piernas de cigüeña". La atrofia muscular intrínseca en las manos comienza más tarde. La vibración, el dolor y la sensación de temperatura disminuyen en un patrón de guante y calcetín. Los reflejos profundos están ausentes. Los arcos de pedal altos o los dedos de los pies martillo pueden ser las únicas señales en miembros de la familia menos afectados que portan la enfermedad. Las velocidades de conducción nerviosa son lentas, y las latencias distales prolongadas. Se producen la desmielinización segmental y la remielinización. Se pueden palpar los
35 nervios periféricos alargados. La enfermedad avanza lentamente y no afecta el período de vida. La enfermedad tipo II evoluciona más lentamente, desarrollándose la debilidad usualmente más tarde en la vida. Los pacientes tienen velocidades de conducción nerviosa relativamente normales pero potenciales de evocación de amplitud lentos. Las biopsias muestran degeneración valeriana.

40 La neuropatía motora y sensorial hereditaria tipo III (neuropatía hipertrófica intersticial, enfermedad de Dejerine-Sottas) un trastorno recesivo autosómico raro, comienza en la niñez con debilidad progresiva y pérdida sensorial y reflejos profundos ausentes. Inicialmente, se asemeja a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, pero la debilidad motora avanza a una velocidad más rápida. Se producen la desmielinización y la remielinización, produciendo nervios periféricos alargados y bulbos de cebolla que se ven sobre la biopsia del nervio.

45 La distribución característica de la debilidad motora, las deformidades del pie, la historia familiar, y las anomalías electrofisiológicas confirman el diagnóstico. Se dispone del análisis genético pero no de tratamiento específico. El asesoramiento profesional para preparar jóvenes pacientes para el avance de la enfermedad puede ser útil. El soporte ayuda a corregir el pie caído; la cirugía ortopédica puede ayudar a estabilizar el pie.

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden, entre otras, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

50 La enfermedad de Alzheimer es un trastorno que involucra el deterioro de las funciones mentales que surgen de los cambios en el tejido cerebral. Esto incluye el encogimiento de los tejidos del cerebro, no originado por trastornos de los vasos sanguíneos, demencia degenerativa primaria y atrofia cerebral difusa. La enfermedad de Alzheimer además se denomina demencia senil/del tipo Alzheimer (SDAT). Es la causa más común de la declinación intelectual con el envejecimiento. La incidencia es aproximadamente 9 de cada 10.000 personas. Este
55 trastorno afecta levemente más a las mujeres que a los hombres y se produce esencialmente en individuales mayores.

La causa se desconoce. Los factores neuroquímicos que pueden participar en la generación de la enfermedad incluyen falta de las sustancias usadas por las células nerviosas para transmitir impulsos nerviosos

(neurotransmisores), incluyendo acetilcolina, somatostatina, sustancia P, y norepinefrina. Los factores ambientales incluyen exposición al aluminio, manganeso, y otras sustancias. Los factores infecciosos incluyen infecciones priónicas (organismos del tipo virus) que afectan el cerebro y la médula espinal (sistema nervioso central). En algunas familias (que representan del 5 al 10% de los casos) hay una predisposición hereditaria al desarrollo del trastorno, pero esto no sigue patrones estrictos de herencia (Mendelian). El diagnóstico usualmente se hace descartando otras causas de demencia.

Los investigadores han hallado que en familias que tienen múltiples miembros con Alzheimer, hay una variante génica particular que es común a todos aquéllos con la enfermedad. El gen, que produce una sustancia denominada apolipoproteína E4, no se dice que causa la enfermedad, su presencia simplemente aumenta las posibilidades de que la enfermedad puede producirse eventualmente. Hay muchas personas que tienen el gen E4 y nunca se vieron afectadas con Alzheimer.

El inicio se caracteriza por disminución de la memoria, con pérdida progresiva de la función intelectual. Puede haber cambios de conducta cambios en la capacidad de lenguaje, cambios en el modo de andar y otros cambios a medida que avanza el trastorno. Hay una disminución en el tamaño (atrofia) de los tejidos del cerebro, alargamiento de los ventrículos (los espacios dentro del cerebro), y los depósitos dentro de los tejidos del cerebro.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del cerebro caracterizado por temblores y la dificultad para caminar, moverse y coordinar. La enfermedad está asociada con el daño a una parte del cerebro que controla el movimiento muscular. Además se denomina parálisis agitante o parálisis con temblor

La enfermedad afecta aproximadamente 2 de cada 1.000 personas, y a menudo se desarrolla después de los 50 años. Afecta tanto a hombres como a mujeres y es uno de los trastornos neurológicos más comunes de la vejez. El término "parkinsonismo" se refiere a cualquier afección que involucra una combinación de los tipos de cambios en el movimiento observado en la enfermedad de Parkinson, la cual viene a ser la afección más común que origina este grupo de síntomas. El parkinsonismo puede ser causado por otros trastornos o por factores externos (parkinsonismo secundario).

La enfermedad de Parkinson es origina por el deterioro progresivo de las células nerviosas de la parte del cerebro que controla el movimiento muscular (los ganglios basales y el área extrapiramidal). La dopamina, que es una de las sustancias usadas por las células para transmitir impulsos (transmisores) es producida normalmente en esta área. El deterioro de este área del cerebro reduce la cantidad de dopamina disponible en el cuerpo. Insuficiente dopamina perturba el equilibrio entre la dopamina y otros transmisores, tal como acetilcolina. Sin dopamina, las células nerviosas no pueden transmitir adecuadamente mensajes, y esto da por resultado la pérdida de la función muscular. Se desconoce la razón exacta por la que las células del cerebro se deterioran. El trastorno puede afectar uno o ambos lados del cuerpo, con grados variables de pérdida de la función.

Además de la pérdida del control muscular, algunas personas con enfermedad de Parkinson se tornan severamente depresivas. Si bien no es común la pérdida temprana de las capacidades mentales, con Parkinson severo la persona puede exhibir un deterioro mental general (incluyendo demencia, alucinaciones, etc.). La demencia además puede ser un efecto colateral de algunos de los medicamentos usado para tratar el trastorno.

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurológica dominante autosómica heredada. Es poco común, afectando aproximadamente 1 en 10000 individuos (Brighton and Hayden 1981). La enfermedad no se torna clínicamente evidente usualmente hasta la quinta década de vida, y da por resultado perturbaciones psiquiátricas, trastorno del movimiento involuntario, y declinación cognitiva asociada con el avance inexorable hacia la muerte, típicamente 17 años después del inicio.

El gen responsable de la enfermedad de Huntington se denomina huntingtina. Se localiza en el cromosoma 4p, presentando un medio efectivo de diagnóstico preclínico y prenatal. La anomalía genética consiste en un número excesivo de secuencias nucleotídicas CAG repetidas en tandem.

El aumento en el tamaño de la repetición CAG en las personas con la enfermedad de Huntington muestra una correlación muy significativa con la edad del inicio de los rasgos clínicos. Esta asociación es particularmente asombrosa para las personas con la enfermedad de Huntington de inicio juvenil quienes tienen una expansión muy significativa, usualmente más allá de 50 repeticiones. La longitud de la repetición CAG en las familias de la enfermedad de Huntington no exhibe alguna inestabilidad que se marca particularmente cuando los niños heredan el gen huntingtina de padres afectados.

En EH, no se conoce cómo este gen ampliamente expresado, da por resultado una muerte neuronal selectiva. Además, el análisis de secuencia no reveló una homología obvia para otros genes conocidos y ningún motivo estructural o dominio funcional se identificó que proporcione claramente comprensión dentro de su función. En particular, la pregunta de cómo estos genes ampliamente expresados causan muerte neuronal selectiva queda sin respuesta.

La esclerosis lateral amiotrófica, ELA, es un trastorno que causa pérdida progresiva del control nervioso de los músculos voluntarios debido a la destrucción de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La

5 esclerosis lateral amitrófica, también denominada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno que involucra la pérdida del uso y control de los músculos. Los nervios que controlan estos músculos se encogen y desaparecen, lo cual da por resultado la pérdida del tejido muscular debido a la falta de estimulación nerviosa. La fortaleza y la coordinación muscular disminuyen, comenzando con los músculos voluntarios (estos bajo control consciente, tal como los músculos de los brazos y las piernas). La extensión de la pérdida del control muscular continúa avanzando, y más y más grupos musculares se involucran. Puede haber una pérdida de estimulación nerviosa a los músculos semivoluntarios, tales como los músculos que controlan la respiración y la deglución. No hay efecto sobre la capacidad de pensar o razonar. La causa se desconoce.

10 La ELA afecta aproximadamente 1 de cada 100.000 personas. En algunos casos, parece afectar en familias. El trastorno afecta a menudo más hombres que mujeres. Los síntomas usualmente no se desarrollan hasta la adultez, a menudo no hasta después de los 50 años.

15 La lesión del nervio traumática puede interesar al SNC o al SNP. La lesión cerebral traumática (LCT), además denominada simplemente lesión craneal o lesión craneal cerrada (LCC) se refiere a una lesión donde hay daño al cerebro debido a un golpe externo a la cabeza. Mayormente sucede durante accidentes de auto o bicicletas, pero además puede ocurrir como resultado de casi un ahogo, ataque al corazón, accidente cerebrovascular e infecciones. Este tipo de lesión cerebral traumática usualmente se debería a la falta de oxígeno o suministro de sangre al cerebro, y por lo tanto puede denominarse "lesión anóxica".

20 La lesión cerebral o lesión craneal cerrada se produce cuando hay un golpe en la cabeza como en un accidente de autos o una caída. En este caso, el cráneo golpea un objeto estacionario y el cerebro, que está dentro del cráneo, vuelve y se retuerce sobre su eje (el tronco del encéfalo), causando un daño localizado o generalizado. Además, el cerebro, una suave masa rodeada por fluido que le permite "flotar", puede rebotar contra el cráneo dando por resultado un mayor daño.

25 Puede haber un período de inconciencia inmediatamente después del traumatismo, lo que puede durar minutos, semanas o meses. Debido a la torsión y al rebote, el paciente con el cerebro traumáticamente lesionado usualmente recibe daños o hematomas a muchas partes del cerebro. Esto se denomina daño difuso, o "lesión de no misil" al cerebro. Los tipos de daños cerebrales que se producen en las lesiones no misiles pueden clasificarse o bien como primarios o secundarios.

30 El daño cerebral primario se produce en el momento de la lesión, principalmente en los sitios de impacto, en particular cuando una fracción del cráneo está presente. Se pueden asociar grandes contusiones con una hemorragia intracerebral, o acompañada de laceraciones corticales. Las lesiones axonales difusas se producen como resultado de rotura y deformación por tracción de los procesos neuronales producidos por los movimientos rotativos del cerebro dentro del cráneo. Puede haber pequeñas lesiones hemorrágicas o daño difuso a los axones, lo que sólo puede ser detectado por microscopio.

35 El daño cerebral secundario se produce como resultado de complicaciones que se desarrollan después del momento de la lesión. Éstas incluyen hemorragia intracraneal, daño traumático a las arterias extracerebrales, hernia intracraneal, daño cerebral hipóxico o meningitis.

Una lesión craneal abierta es un asalto visible a la cabeza y puede surgir de una herida por un disparo, un accidente o un objeto que va a través del cráneo dentro del cerebro ("lesión de misil al cerebro"). Este tipo de lesión craneal probablemente dañe un área específica del cerebro.

40 De modo que la denominada lesión cerebral suave puede suceder sin pérdida de conciencia y posiblemente sólo un sentimiento de aturdimiento o un estado de confusión que dura un corto tiempo. Si bien el cuidado médico administrado puede ser mínimo, las personas con lesión cerebral sin coma pueden experimentar síntomas y deficiencias similares a los que sufren los supervivientes de una lesión por coma.

45 En respuesta al traumatismo, se producen cambios en el cerebro que requieren monitoreo para evitar un daño mayor. El tamaño del cerebro frecuentemente aumenta después de una lesión craneal severa. Esto se denomina tumefacción cerebral y se produce cuando hay un aumento en la cantidad de sangre al cerebro. Más tarde en la enfermedad se puede reunir agua en el cerebro lo que se denomina edema cerebral. Tanto la tumefacción cerebral como el edema cerebral dan por resultado una presión excesiva en el cerebro denominada presión intracraneal ("PIC").

50 Las lesiones de la médula espinal justifican la mayoría de las admisiones hospitalarias por paraplegia y tetraplegia. Más del 80% se producen como resultado de accidentes de tránsito. Dos grupos principales de lesiones se reconocen clínicamente: lesiones abiertas y lesiones cerradas.

55 Las lesiones abiertas causan traumatismo directo de la médula espinal y las raíces nerviosas. Las lesiones perforantes pueden causar ruptura extensa y hemorragia. Las lesiones cerradas justifican la mayoría de las lesiones espinales y están asociadas usualmente con una fractura/dislocación de la columna vertebral, lo cual se demuestra usualmente en forma radiológica. El daño a la médula depende de la extensión de las lesiones óseas y se puede considerar en dos etapas principales: Daño primario, que son las contusiones, las transecciones de fibras nerviosas

y la necrosis hemorrágica, y daño secundario, que son los hematomas extradurales, el infarto, la infección y el edema.

5 Los efectos tardíos del daño de la médula incluyen: Ascenso y descenso de la degeneración anterógrada de las fibras nerviosas dañadas, siringomelia postraumática, y efectos sistémicos de paraplegia, tales como infecciones del tracto urinario y del pecho, escaras y atrofia muscular.

10 Los trastornos neurológicos además pueden deberse a los trastornos metabólicos congénitos. Las vainas de mielina, que cubren muchas fibras nerviosas, están compuestas de capas de lipoproteína formadas en edad temprana. La mielina formada por la oligodendroglia en el SNC difiere química e inmunológicamente de la formada por las células Schwann periféricamente, pero ambos tipos tienen la misma función: promover la transmisión de un impulso neural a lo largo de un axón.

Muchos trastornos metabólicos congénitos (por ej., fenilcetonuria y otras aminoacidurias; enfermedades de Tay-Sachs, Niemann-Pick y Gaucher; síndrome de Hurler; enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias) afectan la vaina de mielina en desarrollo, principalmente en el SNC. A menos que el defecto bioquímico pueda ser corregido o compensado, a menudo da por resultado déficits neurológicos permanentes, generalizado.

15 Por ejemplo, la enfermedad de Krabbe o la leucodistrofia de células globoides es un trastorno que involucra la sustancia blanca de los sistemas nerviosos periférico y central. Las mutaciones en el gen para la enzima lisosomal galactocerebrosidasa (GALC) da por resultado una baja actividad enzimática y una capacidad disminuida para degradar los galactolípidos hallados casi exclusivamente en la mielina. La mielinización y/o remielinización continua en pacientes requiere oligodendrocitos endógenos funcionales o trasplante de oligodendrocitos normales o células
20 madres que puedan diferenciarse en oligodendrocitos, a fin de proporcionar suficiente expresión GALC (Wenger et al., 2000).

La neurofibromatosis 1 (NF1) es un trastorno autosómico común con una amplio rango de manifestaciones neurológicas.

25 La atrofia del sistema múltiple es una enfermedad neurodegenerativa de inicio adulto esporádica de etiología desconocida. La afección puede ser única entre las enfermedades neurodegenerativas por el rol prominente, sino primario, ejercido por la célula oligodendroglial en el proceso patogénico. La principal diferencia con la enfermedad de Parkinson es que los pacientes con ASM no responden al tratamiento de L-dopa.

30 La desmielinización en una edad avanzada es un rasgo de muchos trastornos neurológicos; puede surgir del daño a los nervios o a la mielina debido a una lesión local, isquemia, agentes tóxicos, o trastornos metabólicos. Además es evidente que la desmielinización puede contribuir a la esquizofrenia. La pérdida de mielina exhaustiva esencialmente es seguida de la degeneración axonal y a menudo por la degeneración del cuerpo celular, ambas pueden ser irreversibles. Sin embargo, la remielinización se produce en muchos casos, y la reparación, regeneración, y la recuperación completa de la función neural puede ser rápida. La desmielinización central (es decir, de la médula espinal, el cerebro o los nervios ópticos) es el hallazgo predominante en las enfermedades
35 desmielinizantes primarias, cuya etiología se desconoce. La más conocida es la EM:

40 La encefalomiелitis diseminada, encefalomiелitis posinfecciosa se caracteriza por la desmielinización del SNC perivasculare, que puede ocurrir en forma espontánea pero usualmente viene de una infección viral o vacunación viral (o, muy raramente, de vacunación bacteriana), sugiriendo una causa inmunológica. Las neuropatías periféricas inflamatorias agudas que siguen a una vacunación viral o el síndrome Guillain-Barré son trastornos desmielinizantes similares a la misma inmunopatogénesis supuesta, pero afectan sólo las estructuras periféricas.

45 La leucodistrofia metacromática es otra enfermedad desmielinizante. La adrenoleucodistrofia y la adrenomiелoneuropatía son trastornos metabólicos recesivos X-enlazados raros caracterizados por la disfunción de la glándula suprarrenal y la desmielinización generalizada del sistema nervioso. La adrenoleucodistrofia se produce en jóvenes varones; la adrenomiелoneuropatía, en adolescentes. Puede producir deterioro mental, espasticidad, y ceguera. La adrenoleucodistrofia es invariablemente fatal. Los tratamientos dietarios e inmunomoduladores están en estudio.

50 La atrofia óptica hereditaria de Leber y los trastornos mitocondriales relacionados se caracterizan esencialmente por la pérdida bilateral de la visión central, usualmente afectando a hombres jóvenes en sus dieciocho o diecinueve años o en los veinte o veintiuno. La atrofia óptica hereditaria de Leber puede asemejarse a la neuritis óptica en la EM. Las mutaciones en el ADN mitocondrial heredado de la madre ha sido identificado.

La mielopatía asociada al HTLV, una enfermedad de la médula espinal lentamente progresiva asociada con la infección por el virus linfotrófico de células T humanas, se caracteriza por la debilidad espástica de ambas piernas.

Otros trastornos neurológicos comprenden neuropatías con mielinización anormal, un panorama de los cuales se brinda a continuación.

55 *Inmune*: Agudo, Guillain-Barré, crónica, polineuropatía desmielinizante inmune crónica (PDIC), PDIC multifocal,

neuropatía motora multifocal (NMM), síndrome anti-MAG, síndrome GALOP, síndrome del anticuerpo anti-sulfatida (con proteína M serosa), síndrome del anticuerpo anti-GM2, síndrome POEMS, polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía o edema, proteína M, cambios cutáneos, perineuritis, síndrome del anticuerpo anti-GD1b de IgM (ocasional).

5 *Toxinas:* Difteria, Espino amarillo, Hexaclorofeno, cianato de sodio, telurio.

Fármacos: Predominantemente desmielinizantes: Cloroquina, FK506 (Tacrolimus), perhexilina, procainamida, zimdeldina; mezcla de desmielinizante y axonal: Amiodarona, síndrome de eosinofilia-mialgia, Oro, Suramin, Taxol.

10 *Hereditario:* Glicoproteína deficiente de carbohidratos, cataratas y dismorfismo facial, síndrome de Cockayne, hipomielinización congénita, distrofia muscular congénita: deficiente en merosina, enfermedad de Farber (lipogranulomatosis), HMSN & CMT, Dominante: IA, IB, III, HNPP, EGR2, termosensible, Recesivo: III (Dejerine-Sottas); 4A; 4B; 4B2; 4C; 4D (LOM); 4E; 4F; HMSN-R; SNC, X-enlazado: IX, Krabbe, Marinesco-Sjögren, Leucodistrofia Metacromática, Niemann-Pick, Pelizaeus-Merzbacher (PIP), Refsum, proteína Prión (PrP27-30): mutación de Glu200Lys, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, Modelo ratón:
15 Sobreexpresión de prión, enfermedad de Salla, SOX10, Tenascin-XA, empaque desigual de vainas de mielina periférica, fenotipo de Ehlers-Danlos.

Metabólico (inusual): Diabetes (debido a PDIC concurrente), hipotiroidismo, trastornos hepáticos.

Mitocondrial: síndrome de MNGIE, Miopatía & oftalmoplegia externa, neuropatía, encefalopatía gastrointestinal, síndrome de NARP, neuropatía, ataxia, retinitis, pigmentosa.

20 *Infecciones:* Enfermedad de Creutzfeld-Jakob, difteria, VIH: PDIC asociada, lepra: Lepromatoso: mezcla de axonal-desmielinizante: células Schwann colonizadas, variante de enfermedad de Creutzfeld-Jakob.

Más detalles se pueden obtener del siguiente sitio en la Internet:
<http://www.neuromustl.edu/neuromuscular/nother/rnyelin.html>.

25 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que toma un curso recurrente-remite o un curso progresivo. La EM no es la única enfermedad desmielinizante. Su contrapartida en el sistema nervioso periférico (SNP) es la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria (PDIC). Además, hay trastornos monofásicos agudos, tales como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria denominada síndrome de Guillain-Barré (SGB) en el SNP, y la encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA) en el SNC. Tanto la EM como la SGB son síndromes heterogéneos. En la EM diferentes asaltos exógenos
30 junto con factores genéticos pueden dar por resultado un curso de la enfermedad que finalmente cumple con los criterios de diagnóstico. En ambas enfermedades, el daño axonal puede adicionar a una lesión esencialmente desmielinizante y causar déficits neurológicos permanentes.

35 La EM es la más común de las enfermedades desmielinizantes anteriores. Está caracterizada como un trastorno autoinmune, en el cual los leucocitos del sistema inmune lanzan un ataque sobre la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC). La sustancia gris también puede estar involucrada. Si bien la etiología precisa de la EM no se conoce, los factores contribuyentes pueden incluir infección genética, bacteriana y viral. En su manifestación clásica (85% de todos los casos), está caracterizada por alterna las fases de recurrencia/remisión las cuales corresponden a episodios de disfunción neurológica que dura varias semanas seguido de recuperación sustancial o completa (Noseworthy, 1999). Los períodos de remisión son más cortos en el tiempo. Muchos pacientes
40 posteriormente entran en una fase final de la enfermedad que se caracteriza por la pérdida gradual de la función neurológica con recuperación parcial o sin recuperación alguna. Esto se denomina EM progresiva secundaria. Una pequeña proporción (~15% de todos los pacientes con EM) sufre una declinación gradual e ininterrumpida en la función neurológica que sigue al inicio de la enfermedad (EM progresiva primaria). Normalmente no hay un claro tratamiento curativo para las formas más severas de EM, las cuales en general son fatales.

45 El sello básico de la EM es la placa desmielinizada con formación de cicatriz de neuroglía reactiva, que se observa en los tractos de sustancia blanca del cerebro y la médula espinal. La desmielinización se enlaza a la reducción funcional o al bloqueo en la conducción del impulso neural. La transección axonal y la muerte también se observa en pacientes con EM (Bjarimar *et al.*, 1999). Estudios patológicos muestran la mayor implicancia limitada a los nervios ópticos, a la sustancia blanca periventricular, al tronco del encéfalo y a la médula espinal (Storch *et al.*,
50 1998). Los efectos de estas deficiencias del SNC incluyen los síntomas agudos de diplopía, obnubilación, y modo de andar inestable, como también síntomas crónicos tales como paraparesis espástica e incontinencia.

Los mecanismos moleculares que subyacen en la patogénesis de la EM parecen provenir de factores genéticos y ambientales, incluyendo infecciones virales y bacterianas. Estos mecanismos promueven la migración aumentada de linfocitos T y macrófagos a través de la barrera hematoencefálica y dentro del tejido del SNC.

55 La desmielinización es causada por ataques sobre la mielina por macrófagos activados y microglia, como también el daño a las células mielinizantes que provienen de la señalización del ligando Fas y citotoxicidad mediada por el

complemento o el anticuerpo. Por lo tanto, la desmielinización se produce a través de un ataque directo sobre las vainas de mielina como también de la eliminación de las células que producen y mantienen la mielina.

Los elementos genéticos y ambientales conducen a un influjo aumentado de células inflamatorias a través de la barrera hematoencefálica. Esto da por resultado la migración aumentada de los linfocitos T autoreactivos y macrófagos en el tejido del SNC. La secreción de citoquina por las células T activa las células que presentan antígenos (APCs). Cuando las células T autoreactivas en el contexto de las moléculas MHC clase II sobre las APCs encuentran "antígenos MS" putativos, a menudo los constituyentes de la proteína de la vaina de mielina, pueden tornarse activados. Varios mecanismos subsiguientes pueden actuar posteriormente para dañar los oligodendrocitos y la mielina. La citotoxicidad mediada por el complemento y el anticuerpo pueden causar la mayoría del daño en los pacientes en algunos pacientes, mientras la señalización del ligando Fas, y la liberación de las citoquinas proinflamatorias del tipo TNF- α por las células T CD4+ pueden atacar la sustancia blanca en otros. Los macrófagos activados además pueden cumplir un rol a través de la fagocitosis mejorada y la secreción del factor. Esto causa la desmielinización generalizada y la pérdida subsiguiente de la eficiencia de conducción entre los axones del SNC. Los subsiguientes mecanismos de reparación pueden, sin embargo, dar lugar a la remielinización una vez que el proceso inflamatorio está resuelto. Los axones remielinizados de pacientes con EM son reconocidos patológicamente por la apariencia delgada de las vainas alrededor de los axones remielinizados. Los canales de sodio adicionales a menudo se encuentran insertos dentro de la membrana axonal desmielinizada, compensando la pérdida de la eficiencia de conducción. Los precursores oligodendrogiales pueden mejorar la remielinización en las lesiones de EM.

El oligodendrocito realiza una multitud de funciones relacionadas con su producción y mantenimiento de la vaina de mielina. Esto proporciona aislamiento, soporte y mejora de conductancia para los axones de múltiples neuronas. Un solo oligodendrocito puede mielinizar hasta 50 diferentes axones. La mielinización está restringida sólo a ciertos axones de diámetro grande; los dendritos y otros procesos celulares, tales como los de los astrocitos, quedan sin mielinizar. Los axones parecen ejercer control sobre el número de oligodendrocitos mielinizantes, dado que la transacción axonal en el paradigma del nervio óptico de rata inhibe la renovación de la mielina y la producción del precursor oligodendrocito (revisado en Barres and Raff, 1999). La proliferación de oligodendrocitos y la migración pueden ser estimuladas por factores liberados a partir de los axones durante el desarrollo. De esta manera, los números de oligodendrocitos y axones se corresponden cuidadosamente dentro del SNC.

Los oligodendrocitos, las células de soporte perineuronal del SNC, mielinan los tractos axonales y sirven para mejorar la transducción del impulso. Cumplen roles en la supervivencia y función axonal. Obsérvese que, como se muestra en este diagrama, un oligodendrocito extiende sólo un proceso para axón que mieliniza.

La vaina de mielina multilamelar es un dominio especializado de la membrana plasmática de la célula glial, rica en lípidos y baja en proteínas. Sirve para soportar axones y mejorar la eficiencia de la conducción de la señal eléctrica en el SNC evitando que la carga sangre hacia dentro del tejido circundante. Los nodos de Ranvier son los sitios en la vaina a lo largo del axón donde se produce la conductancia saltatoria.

En el cerebro adulto, los oligodendrocitos se desarrollan a partir de células precursoras, como ya se describió en forma muy pobre, en la zona subventricular del cerebro y la médula espinal (Nait-Oumesmar *et al.*, 1999). Estos precursores son proliferativos y expresan los transcritos de mielina y las proteínas, primero emergiendo en la región ventral de la médula espinal embrionaria varias semanas antes de la mielinización (Hajihosseini *et al.*, 1996). El proceso de mielinización se produce en el cerebro posnatal. Durante el desarrollo posnatal, estos precursores migran hacia los tractos neuronales que se deben mielinizar.

Los oligodendrocitos maduran a partir de sus células precursoras de una manera específica y definida (revisado por ej., en Rogister *et al.*, 1999) El desarrollo de los oligodendrocitos sigue una vía definida en la cual cada etapa está demarcada por varios marcadores específicos de la célula: molécula de adhesión de la célula neural endotelial (E-NCAM), vimentina, A2B5, el factor de transcripción POU Tst-1/Oct6/SCIP, antígeno pre-oligodendroblasto (POA), galactocerebrosida (GalC), O1, O4, y las proteínas específicas de la mielina PLP, MBP, y MOG. Las células madres neurales dan lugar a las células pre-GD3⁺ bipolar, que se transforman en precursores O2A. Estas células pueden dar lugar a o bien oligodendrocitos o astrocitos tipo 2. El avance continua a través de las etapas pre-oligodendrogial y pre-GalC⁺, antes de la diferenciación real en oligodendrocitos. Las etapas finales del linaje oligodendrogial son definidas por la incapacidad de estas células para proliferar. Los oligodendrocitos maduros expresan los marcadores específicos de la célula GalC y sulfatada (SUL), además de expresar las proteínas específicas de la mielina.

Por lo tanto los oligodendrocitos se diferencian de las células precursoras migratorias mitóticamente activas. Una vez que estas células se han tornado pos-mitóticas, transcriben y traducen los genes que codifican las proteínas específicas de la mielina. La elaboración de la vaina de mielina que envuelve el axón es provocada por el contacto directo entre los procesos del oligodendrocito maduro y el axón mismo. El envainamiento del axón del SNC se completa por la compactación de la vaina de mielina, la cual en su forma final se asemeja a un cristal líquido que contiene macromoléculas en la formación compleja (Scherer, 1997). La promoción de la mielinización demanda la consideración de la relación estequiométrica precisa entre las proteínas estructurales individuales de la vaina de mielina, dado que el aumento o la disminución de la cantidad de un componente podrían dar por resultado la perturbación de la estructura de la vaina completa.

La incapacidad de los oligodendrocitos de sostener la reparación de los axones desmielinizados contribuye a la disfunción neurológica acumulativa que caracteriza a la EM. La promoción de la remielinización en pacientes con EM podría proteger la pérdida axonal y de este modo limitar el avance de la discapacidad asociada con la muerte de los axones en el SNC.

5 El fenotipo desmielinizante de la EM condujo a extensos estudios sobre la naturaleza de la lesión de la EM activa. Los axones desnudos y la ausencia de oligodendrocitos mielinizantes indicaron la ruptura de la mielina normal y las aberraciones en el proceso de remielinización asociado con la EM. Aproximadamente 40% de las lesiones de la EM se mostraron para exhibir la evidencia de la remielinización abortiva, especialmente en las fases tempranas de la enfermedad (Prineas et al., 1993). Esto presenta la posibilidad real que al
10 desarrollar estrategias para promover la reparación de la mielina se podría evitar el daño permanente al sistema nervioso. La probabilidad de éxito es particularmente alta en las lesiones del SNC más joven, donde ya se ha mostrado que tiene lugar la temprana remielinización. Sin embargo, el oligodendrocito mielinizante o remielinizante es una célula bajo tensión metabólica extrema, que bajo presión de incluso menores insultos adicionales puede ser irreversiblemente dañado (Scolding and Lassmann, 1996). Esto disminuye la probabilidad de reparación espontánea
15 en una lesión de la EM activa, donde la inflamación y otros detrimentos presentan obstáculos a la remielinización. De este modo las estrategias que promueven la reparación de la mielina pueden reunir más probabilidades a favor de la remielinización y la protección axonal en las lesiones de la EM activa.

Se ha demostrado que el SNC humano adulto contiene células precursoras de los oligodendrocitos que son capaces de proliferar, y que podrían madurar en los oligodendrocitos mielinizantes. Además, parece que las poblaciones precursoras del oligodendrocito endógeno adyacentes a las lesiones de la EM se agotan durante las fases crónicas de la enfermedad, debido a la inhibición en la capacidad de estos precursores para proliferar y diferenciarse (Wolswijk, 1998). Estas células precursoras están en general inactivas en el ambiente de una EM crónica previniéndolas de la contribución activa a la remielinización. La situación en las lesiones de la EM crónica podría por
20 lo tanto involucrar factores que impiden la regeneración oligodendroglial o carecer de los factores necesarios para la estimulación de la población de células precursoras de oligodendrocitos (Wolswijk, 1998). Este concepto condujo a la hipótesis de que una terapia eficiente para la EM no debe estar limitada a la supresión de la inflamación sino que además debe favorecer la remielinización. Las células remielinizantes podrían originar desde una variedad de fuentes, que incluyen la supervivencia de los oligodendrocitos naturales a la lesión, células que derivan de estos sobrevivientes, o las células precursoras adyacentes. Se ha demostrado que los oligodendrocitos maduros pueden ser inducidos para diferenciarse y proliferar por factores tales como el factor de crecimiento fibroblasto básico (bFGF), sugiriendo un mecanismo para la regeneración del linaje oligodendroglial que sigue a la enfermedad desmielinizante (Grinspan et al., 1996; Grinspan et al., 1993).

La evidencia adicional para los efectos benéficos de la remielinización en los trastornos desmielinizantes tales como la EM se proporciona mediante estudios realizados con factores de crecimiento glial como los tratamientos en modelos animales de la enfermedad. El factor de crecimiento glial 2 (neuregulina/GGF-2), un factor de crecimiento del SNC conocido por promover la proliferación y la supervivencia del oligodendrocito, demostró retardar el inicio de la enfermedad, reducir la severidad clínica y disminuir la frecuencia de recaídas en el modelo murino EAE de la EM (Marchionni et al., 1999). Se demostró que la neuregulina tiene un efecto benéfico sobre la supervivencia del oligodendrocito maduro y es producida por los axones (Fernandez et al., 2000).

40 Otros factores de crecimiento, que incluyen el factor de crecimiento que deriva de las plaquetas (PDGF) y el IGF-1, han demostrado promover la remielinización y tienen efectos terapéuticos en los modelos EAE (revisado en Dubois-Dalcq and Murray, 2000). El éxito obtenido con la estimulación de la remielinización, a través de la inducción de las células de linaje del oligodendrocito para la proliferación y/o la diferenciación, indica que las posibilidades para la remielinización como estrategia terapéutica para la EM son favorables. Además sería importante identificar las moléculas que inhiben la síntesis de mielina, dado que estas podrían disminuir la efectividad de las estrategias de
45 reparación tal como el trasplante de la célula oligodendroglial en la EM.

El proceso de remielinización podría trabajar en concierto con las vías antiinflamatorias para reparar el daño y proteger los axones de la transacción y la muerte.

50 Los oligodendrocitos pueden ser inducidos para remielinizar los tractos axonales en el SNC, contribuyendo de este modo a aliviar la afección de la enfermedad. La mejora de la remielinización contrarrestaría la destrucción previa causada por la invasión de las células del sistema inmune en el tejido del SNC y su ataque sobre las vainas de la mielina.

Varios análisis de la diferenciación oligodendroglial y las lesiones de la esclerosis múltiple han sido realizados usando la visualización de micromatrices de la expresión génica diferencial (DGE, Scarlato et al., 2000; VWhitney et al. 1999). Estos han utilizado tecnologías de matrices significativamente diferentes para ensayar varios conjuntos de genes. El análisis de la expresión génica tanto en los oligodendrocitos de diferenciación como en las lesiones de la esclerosis múltiple ha indicado cambios significativos en la expresión los genes específicos de la mielina. Además, se han ubicado con exactitud otros genes como que están regulados en forma diferencial, muchos de los cuales se sabe que están involucrados en los procesos tales como el control del ciclo celular, la reorganización citoesquelética
60 y el tráfico de la membrana (Scarlato et al., 2000).

La osteopontina es una sialoproteína muy fosforilada que es un componente prominente de las matrices extracelulares mineralizadas de huesos y dientes. La OPN se caracteriza por la presencia de una secuencia de ácido poliaspártico y sitios de fosforilación Ser/Thr que media la unión de hidroxiapatita, y un motivo RGD muy conservado que media la unión/señalización de la célula. La expresión de osteopontina en una variedad de tejidos indica una multiplicidad de funciones que involucran uno o más de estos motivos conservados. Mientras que la falta de un fenotipo claro en ratones "knockout" de OPN no ha establecido un rol definitivo para la osteopontina en algún tejido, recientes estudios han suministrado algunos motivos novedosos e intrigantes dentro de la versatilidad de esta proteína en diversos eventos biológicos, incluyendo los procesos de desarrollo, la cicatrización de heridas, las respuestas inmunológicas, la tumorigénesis, la resorción ósea y la calcificación. La capacidad de la osteopontina de estimular la actividad celular a través de múltiples receptores unidos a varias vías de señalización interactivas pueden dar cuenta de gran parte de la diversidad funcional (Sodek et al.). La osteopontina ha estado involucrada en la formación de leucomalacia periventricular (PVL), una necrosis de la sustancia blanca profunda inducida por la hipoperfusión cerebral durante el período perinatal. En la PVL, la microglia se activa dentro de las 12 a 24 horas después del insulto isquémico con astrocitosis marginal, tumefacción axonal y acumulación de células espumosas que surge después de unos pocos días. Al utilizar anticuerpos anti-Iba1 (un marcador de microglia/macrófago) y anti-OPN sobre las muestras cerebrales autópticas, se detectó inmunoreactividad de la OPN en la lesión con células espumosas Iba1-positivas, en los axones hinchados y calcificados en el margen de la zona isquémica, la inmunoreactividad de la OPN se relacionó con la acumulación de las células espumosas Iba1-positivas pero no con la de la microglia activada. Estos hallazgos sugieren que la OPN está íntimamente asociada con la muerte de los axones hinchados en la periferia de la zona isquémica PVL (Tanaka et al., *Acta Neuropathol.* 2000 Jul; 100(1):69-74.)

Además se ha sugerido un rol positivo de la OPN en el accidente cerebrovascular focal. La microglia y los astrocitos se activan en la región peri-infarto después del accidente cerebrovascular focal, iniciando una respuesta de cicatrización de heridas que sirve para confinar el área lesionada y limitar la lesión secundaria. Los estudios espaciales y temporales sobre la expresión del ARNm de la OPN en modelos de rata del accidente cerebrovascular focal destacó la expresión de la OPN por los macrófagos activados y la microglia en la región peri-infarto después de 24 horas de la lesión. Dado que la microglia se transforma en macrófagos y la lesión se desarrolla en 5 días, la expresión de la OPN es significativamente regulada corriente arriba en los macrófagos en el núcleo del infarto y la proteína es secretada dentro de la matriz extracelular. A los 15 días, los astrocitos que expresan la integrina se localizan dentro de una región rica en OPN, sugiriendo que la OPN podría funcionar como un elemento de respuesta a la tensión capaz de inducir el reclutamiento de los macrófagos, la reparación de la matriz, la gliosis y los procesos de remodelación que se producen después de la isquemia focal (Ellison et al., *Stroke* 1998 Agosto;29(8):1698-706 Wang et al., *J. Neurosci.* 1998 Mar 15;18(6):2075-83 ; Ellison et al., *Ann N. Y. Acad. Sci.* 1999; 890:204-22).

La osteopontina además ha demostrado expresarse en las neuronas sensoriales primarias en la médula espinal de rata y los sistemas nerviosos trigéminos, ambos en los cuerpos celulares neuronales y en los axones (Ichikawa et al., 2000).

El ARNm de la osteopontina se expresa en el cerebro adulto como se muestra por la hibridación in situ. La expresión se halló en las neuronas del bulbo olfativo y el tronco del encéfalo, y en este último se halló en las áreas funcionalmente diversas que incluyen las áreas relacionadas con el motor, el sistema sensorial y la formación reticular (Shin et al., 1999).

Otro estudio investigó la expresión especial y temporal del ARNm de la osteopontina que sigue a la isquemia proencéfalo transitoria en ratas. La inducción transitoria del ARNm de la OPN después de la isquemia global ocurrida antes en el estriado que en el hipocampo. Se pronunció en el estriado dorso medial próximo al ventrículo lateral y en el subcampo CA1 y en el cubículo del hipocampo antes que las células microgliales se tornen más reactivas. Además podía detectarse en el dentate hilus, y a una extensión marginal en el CA3 (Lee MY, Shin SL, Choi YS, Kim EJ, Cha JH, Chun MH, Lee SB, Kim SY, *Neurosci Lett* 1999 Agosto 20 271:2 81-4).

La osteopontina además se denomina Eta-1. El documento WO 00/63241 se refiere a los procedimientos para modular respuestas inmunes, en particular procedimientos para modular las respuestas inmunes de tipo 1 usando moduladores de Eta-1 (activación-1 del linfocito T temprana)/osteopontina. Se dice que los moduladores de osteopontina son útiles para el tratamiento de infecciones, trastornos y enfermedades inmunes, trastornos autoinmunes, incluyendo la EM, varias inmunodeficiencias, y el cáncer. Todos los moduladores de osteopontina en el documento WO 00/63241, que se conciben como útiles en las enfermedades autoinmunes, incluyendo la EM, son inhibidores de osteopontina/Eta-1, como se explicó en detalle en la sección V. "Clinical Applications of the Modulatory Methods of the Invention", D "Autoimmune Diseases", en la página 51 a 53 del documento WO 00/63241.

Los interferones son una subclase de citoquinas que exhiben actividad antiinflamatoria, antiviral y antiproliferativa. Sobre la base de las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos que se producen en forma natural se agrupan en tres clases: interferón alfa (leucocito), interferón beta (fibroblasto) e interferón gamma (inmune). El alfa-interferón actualmente está aprobado en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de leucemia de células vellosas, papilomas venéreos, Sarcoma de Kaposi (un cáncer que normalmente aflige a

pacientes que sufren del Síndrome Inmune de Deficiencia Adquirida (SIDA), y hepatitis crónica no-A , no-B.

Además, los interferones (IFNs) son glicoproteínas producidas por el cuerpo en respuesta a una infección viral. Inhiben la multiplicación de virus en las células protegidas. Consistentes de una proteína de peso molecular inferior, los IFNs son remarcablemente no específicos en su acción, es decir el IFN inducido por un virus es efectivo contra un amplio intervalo de otros virus. Sin embargo son específicos de la especie, es decir el IFN producido por una especie sólo estimulará la actividad antiviral en las células de la misma especie o íntimamente relacionada. Los IFNs fueron el primer grupo de citoquinas a ser explotado por sus actividades potenciales antitumorales y antivirales.

Los tres IFNs principales se refieren a IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Estas clases principales de IFNs se clasificaron inicialmente de acuerdo con sus células de origen (leucocito, fibroblasto o célula T). Sin embargo, resultó claro que varios tipos se pueden producir mediante una célula. Por lo tanto el IFN de leucocito ahora denominado IFN- α , el IFN de fibroblasto es IFN- β y el IFN de célula T es IFN- γ . Hay además un cuarto tipo de IFN, IFN linfoblastoide, producido en la línea celular "Namalwa" (que deriva del linfoma de Burkitt), que parece producir una mezcla de ambos IFN leucocito y fibroblasto.

La unidad de interferón ha sido informada como una medición de la actividad del IFN definido (de algún modo arbitrariamente) como la cantidad necesaria para proteger el 50% de las células contra el daño viral.

Cada clase de IFN contiene varios tipos distintos. El IFN- β y el IFN- γ son cada uno de ellos el producto de un solo gen. Las diferencias entre los tipos individuales parecen ser principalmente debido a las variantes en las glicosilación.

Los IFN- α son el grupo más diverso, que contiene aproximadamente 15 tipos. Hay un agrupamiento de genes del IFN- α en el cromosoma 9, que contiene al menos 23 miembros, de los cuales 15 son activos y transcriptos. Los IFN- α maduros no se glicosilan.

Los IFN- α y IFN- β son todos de la misma longitud (165 o 166 aminoácidos) con actividades biológicas similares. Los IFN- γ son de una longitud de 146 aminoácidos, y se asemejan a las clases α y β menos íntimamente. Solo los IFN- γ pueden activar macrófagos o inducir la maduración de las células T asesinas. En efecto, estos tipos nuevos de agentes terapéuticos se pueden denominar modificadores de la respuesta biológica (BRMs), porque tienen un efecto sobre la respuesta del organismo al tumor, que afecta el reconocimiento a través de la inmunomodulación.

En particular, el interferón de fibroblasto humano (IFN- β) tiene actividad antiviral y puede estimular además las células asesinas naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por los virus y los ARNs bicatenarios. A partir de la secuencia nucleotídica del gen para el interferón de fibroblasto, clonado por la tecnología de ADN recombinante, Derynk et al (Derynk R. et al, 1980) dedujo la secuencia de aminoácidos completa de la proteína. Es de 166 aminoácidos de largo.

Shepard et al, (Shepard H. M. et al, 1981) describió una mutación en la base 842 (Cys \rightarrow Tyr en la posición 141) que abolió su actividad antiviral, y una variante hecha con una supresión de nucleótidos 1110-1121. Mark et al. (Mark D.F. et al, 1984) insertó una mutación artificial reemplazando

la base 469 (T) con (A) originando un cambio de aminoácido de Cys Ser en la posición 17. El IFN- β resultante se informó que es activo como el IFN- β "nativo" y estable durante el almacenamiento a largo plazo (-70°C).

Rebif® (interferón β humano recombinante) es el más reciente desarrollo en terapia de interferones para la esclerosis múltiple (EM) y representa un avance significativo en el tratamiento. Rebif® es interferón (IFN)-beta 1a, producido a partir de líneas celulares mamíferas virtualmente idénticas a la molécula humana que se produce en forma natural.

Los mecanismos por los cuales los IFNs ejercen sus efectos no se entienden completamente. Sin embargo, en la mayoría de los casos actúan afectando la inducción o la transcripción de ciertos genes, afectando de este modo el sistema inmune. Los estudios in Vitro han demostrado que los IFNs son capaces de inducir o suprimir aproximadamente 20 productos génicos.

El INF β puede actuar por tres vías principales en la EM:

- regulación de funciones tales como la activación, proliferación y funcionamiento de la células supresora;
- modulación de la producción de citoquinas. regulación por disminución de las citoquinas proinflamatorias y regulación por aumento de las citoquinas inhibitoras, antiinflamatorias.
- 50 • Regulación de la migración de la célula T y la infiltración en el SNC a través de la BHE (barrera hematoencefálica)

El estudio PRISMS ha establecido la eficacia del interferón beta-1a administrado por vía subcutánea tres veces por

semana en el tratamiento de recurrencia-remisión de la esclerosis múltiple (RR-EM). Este estudio mostró que el interferón beta-1a puede tener un efecto positivo sobre el curso a largo plazo de la EM reduciendo el número y la severidad de las recaídas y reduciendo el peso de la enfermedad y la actividad de la enfermedad según se mide por MRI. "Estudio aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo del interferón beta-1a en la recurrencia-remisión de la esclerosis múltiple", The Lancet 1998; 352 (7 de noviembre de 1998): 1498-1504.)

La mención de cualquier documento en la presente no se considera que se admite que ese documento es de la técnica anterior pertinente, o ni material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Toda declaración respecto al contenido o una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible para los solicitantes en el momento de la presentación y no constituye una admisión respecto a la exactitud de dicha declaración.

Resumen de la invención

Es el objetivo de la presente invención proporcionar un medio novedoso para el tratamiento y/o presencia de una enfermedad neurológica, según se define en las reivindicaciones.

La invención se basa en el hallazgo de que la proteína osteopontina promueve la proliferación y la diferenciación celular glial, promoviendo de este modo la mielinización y la regeneración de los nervios. De acuerdo con la presente invención, además se ha hallado que la osteopontina tiene un efecto benéfico en modelos de animales de esclerosis múltiple y neuropatías periféricas. De acuerdo con la presente invención, además se ha hallado que la osteopontina tiene un efecto benéfico en modelos animales de esclerosis múltiple y neuropatías periféricas.

De acuerdo con la presente invención, la osteopontina además puede ser usada en combinación con un interferón β para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas. El uso de moléculas de ácido nucleico, y los vectores de expresión que comprenden la osteopontina, y de células que expresan la osteopontina, para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica también está dentro de la presente invención. La invención además proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la osteopontina y un interferón β , opcionalmente junto con uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra un histograma que describe los niveles de expresión de la osteopontina después de diferentes tiempos de tratamiento con cuprizona, según se mide mediante el análisis Taqman®. 3/5 w. Cup = tres o cinco semanas de tratamiento con cuprizona, 5 w. cup + 1/3/6 w. = cinco semanas de tratamiento con cuprizona y después el retiro de cuprizona una/tres o seis semanas de recuperación.

La figura 1B muestra la regulación en veces del ARNm de osteopontina, MBP y PLP en comparación con los niveles C1 de control según se mide por Taqman® en diferentes etapas del desarrollo cerebeloso. C1 a 20 = cerebelo postnatal en el día 1 a 20, CA = cerebelo adulto.

La figura 2 describe esquemáticamente la estructura de la osteopontina y sus isoformas conocidas como también las construcciones de los terminales C y N.

La figura 3 describe esquemáticamente el plásmido Pac que contiene la secuencia codificadora para la osteopontina.

La figura 4 muestra un histograma que ilustra la regulación por aumento en veces del ARNm de la osteopontina en la línea celular del oligodendrocito oli-neu tratada con cAMP durante 6 horas (1), 2 días (2), 6 días (3), o 10 días (4) en comparación con el control. Las columnas 5 y 6 describen los niveles de ARNm de osteopontina a partir de un experimento de cuprizona. (5): 3 semanas de tratamiento con cuprizona, (6): 5 semanas de tratamiento con cuprizona.

La figura 5 muestra esquemáticamente el plásmido pDEST 12.2 que comprende la secuencia codificadora de osteopontina.

La figura 6 muestra esquemáticamente el plásmido pDEST 12.2 que comprende la secuencia codificadora de osteopontina más la secuencia codificadora de EGFP, un marcador fluorescente.

La figura 7 muestra esquemáticamente el plásmido pDEST 12.2 que comprende la secuencia codificadora de osteopontina con una marca HIS.

La figura 8 muestra la proliferación de las células después de la deficiencia de insulina y un tratamiento de 24 horas con osteopontina expresada en el baculovirus (Bacolo-OPN) o la osteopontina expresada en la célula HEK (HEK-OPN). La lectura de salida es fluorescencia de Alamar Azul, un tinte que mancha las células vivas.

La figura 9 muestra la curva de respuesta a la dosis de la proliferación de células oli-neu deficientes en insulina después de un tratamiento de 24 horas con osteopontina expresada en el baculovirus (BAC-OPN) u osteopontina

expresada en la célula HEK (HEK-OPN).

La figura 10 muestra la proliferación de las células oli-neu después de la deficiencia de insulina y el tratamiento o bien con osteopontina expresada en el baculovirus de longitud completa (BacOPN) o un fragmento del N-terminal de osteopontina (N-terminal BacOPN).

- 5 La figura 11 muestra la inmunohistoquímica del MBP en la mezcla de cultivos corticales tratado con 100 nM de osteopontina recombinante expresada en el baculovirus. A = control; B = tratado con OPN; C = magnificación de B; D = otro campo de células corticales mezcladas tratadas con OPN, donde no hay axones visibles.

La figura 12 muestra el aumento de la proteína MBP en los cultivos corticales mezclados, mielinizantes después del tratamiento con osteopontina expresada en LIF y en el baculovirus según se midió por ELISA.

- 10 La figura 13 muestra la proliferación de células CG4 después del tratamiento con diferentes dosificaciones (10 pM, 10 nM, 100 nM) de osteopontina expresada en E. coli fosforilada in Vitro (OPN-E-coli) u osteopontina expresada en el baculovirus (OPN Bac).

- 15 La figura 14 muestra los infiltrados inflamatorios perivasculares presentes en las médulas espinales de ratones EAE tratados por vía subcutánea con vehículo (PBS), vehículos más 0,1% de BSA, 1, 10 o 100 µg/kg de AS900011 (osteopontina) o con una combinación de 100 µg/kg de AS900011 y 20000 U/ratón de interferón beta murino (mIFNβ) o 20000 U/ratón de mIFNβ solo

- 20 La figura 15 muestra el porcentaje de área desmielinizante presente en las médulas espinales de ratones EAE tratados por vía subcutánea con vehículo (PBS), vehículos más 0,1% de BSA, 1,10 o 100 µg/kg de AS900011 (osteopontina) o con una combinación de 100 µg/kg de AS900011 y 20000 U/ratón de interferón beta murino (mIFNβ) o 20000 U/ratón de mIFNβ solo.

La figura 16 muestra los resultados clínicos al final del tratamiento, las infiltraciones inflamatorias y la desmielinización en ratones EAE tratados por vía subcutánea con vehículo (PBS), vehículos más 0,1% de BSA, 1,10 o 100 µg/kg de AS900011 (osteopontina) o con una combinación de 100 µg/kg de AS900011 y 20000 U/ratón de interferón beta murino (mIFNβ) o 20000 U/ratón de mIFNβ solo.

- 25 La figura 17 muestra el peso corporal de ratones neuropáticos inducidos por el aplastamiento del nervio ciático tratado con vehículo, 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

- 30 La figura 18 muestra la amplitud del potencial de acción muscular del compuesto en los ratones neuropáticos tratados con vehículo 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

La figura 19 muestra la latencia del potencial de acción muscular del compuesto en los ratones neuropáticos tratados con vehículo, 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

- 35 La figura 20 muestra la duración del potencial de acción muscular del compuesto en los ratones neuropáticos tratados con vehículo, 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

La figura 21 muestra el porcentaje de fibras degeneradas en los ratones neuropáticos tratados con vehículo, 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

- 40 La figura 22 muestra el número total de fibras por campo en los ratones neuropáticos tratados con vehículo, 1, 10 o 100 µg/kg de osteopontina (Ost), 10 µg/kg de un compuesto de control positivo (4-MC) o 100 µg/kg de osteopontina desnaturalizada (Ost-D).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 45 La presente invención se basa en el hallazgo de que la osteopontina se expresa en forma diferente durante la diferenciación del oligodendrocito y durante el desarrollo del cerebelo. Además se ha hallado que la expresión del ADNc de osteopontina en los oligodendrocitos conduce a un fenotipo diferenciado de estas células in vitro. Al cabo de la expresión de la osteopontina, los oligodendrocitos despliegan un fenotipo similar al fenotipo de una célula diferenciada, mielinizante. Además de estos hallazgos in vitro, se ha demostrado que la osteopontina, y en particular la combinación de osteopontina y un interferón, tienen un efecto benéfico en un modelo establecido de esclerosis múltiple. En un modelo experimental de neuropatía periférica, la osteopontina tuvo un efecto benéfico pronunciado sobre la actividad del nervio, y redujo significativamente el porcentaje de degeneración y mejoró la extensión de la mielinización.
- 50

La evidencia experimental presentada en la presente proporciona por lo tanto una nueva posibilidad de tratar las enfermedades neurológicas, en particular las unidas a la función celular nerviosa y glial. Estos hallazgos son particularmente sorprendentes porque el documento WO 00/63241 enseña inhibir la osteopontina para tratar la esclerosis múltiple.

- 5 Por lo tanto la invención se refiere al uso de osteopontina o de un agonista de la actividad de la osteopontina, para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas.

El término "osteopontina", tal como se usa en la presente, se refiere a la osteopontina humana de longitud completa, que tiene la secuencia de aminoácidos que ha sido conocida desde finales de los ochenta (Oldberg et al., 1986; Kiefer et al., 1989). La secuencia de osteopontina humana se informa en la presente como SEC ID NO: 1 del listado de secuencias adjunto. El término "osteopontina", como se usa en la presente, se refiere además a cualquier osteopontina que deriva de animales, tales como murino, bovino, u osteopontina de rata, en la medida que hay suficiente identidad a fin de mantener la actividad de osteopontina, y en la medida que la molécula resultante no sea inmunogénica en humanos.

El término "osteopontina", tal como se usa en la presente, además se refiere a las muteínas y fragmentos biológicamente activos, tales como las isoformas que se producen en forma natural de la osteopontina. La osteopontina se expresa en formas funcionalmente distintas que difieren en el nivel de transcripción (empalme alternativo) y modificaciones postraslacionales (fosforilación, glicosilación). Se conocen tres variantes de empalme de la OPN hasta ahora, la OPN-a designada (en la presente además denominada osteopontina de "longitud completa"), OPN-b y OPON-c (SEC ID NO.: 1, 2 y 3 del listado de secuencias anexo, que se describe además en la figura 2). Las isoformas se describieron por ej., en Kon et al. (2000). y se caracterizan por ej., en Sayito et al. (1995) y Kon et al. (2002).

Una escisión de trombina conduce a dos fragmentos de escisión proteolítica in vivo que comprende las porciones de los terminales N y C de la proteína. La fosforilación de osteopontina, en particular de la porción del C-terminal de las proteínas, puede ser importante para la función de la osteopontina. El término "osteopontina" tal como se usa en la presente, por lo tanto significa también estos fragmentos proteolíticos y las formas de osteopontina diferencialmente fosforilada.

El término "osteopontina", tal como se usa en la presente, además abarca isoformas, muteínas, proteínas fusionadas, derivados funcionales, fracciones o fragmentos activos, o derivados circularmente permutados, o sales de los mismos. Estas isoformas, muteínas, proteínas fusionadas o derivados funcionales, fracciones o fragmentos activos, o derivados circularmente permutados retienen la actividad biológica de la osteopontina. Preferiblemente, tienen una actividad biológica, la cual está mejorada en comparación con la osteopontina de tipo salvaje.

El término "agonista de la actividad de la osteopontina", tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula que estimula o imita la actividad de la osteopontina, tal como los anticuerpos agonistas del receptor de osteopontina, o pequeños agonistas de peso molecular que activan la señalización a través de un receptor de osteopontina. La osteopontina media su función a través de al menos dos grupos de receptores. Primero, interactúa con las integrinas αv (receptores de la integrina $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ a través de un motivo de unión celular RGD (Arg-Gly-Asp) bajo la influencia positiva de manganeso (Kunicki et al., 1997). En Segundo lugar, interactúa con las isoformas de la variante CD44 v6-v10. La parte del C-terminal de la osteopontina se cree que está involucrada en la interacción con la CD44, mientras que la parte del N-terminal de la osteopontina se cree que está involucrada en la interacción con los receptores de integrina, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación de los macrófagos. La porción del N-terminal de la osteopontina además induce la liberación de IL-12 e IL-10. Cualquier agonista, estimulador o mejorador de cualquiera de estos receptores está comprendido por el término "agonista de la actividad de la OPN", tal como se usa en la presente.

El término "agonista de la actividad de la osteopontina", tal como se usa en la presente, además se refiere a los agentes que mejoran las actividades medidas por la osteopontina, tal como la promoción de la unión celular a los componentes de la matriz extracelular, la morfogénesis de las células del linaje del oligodendrocito en las células que producen mielina, para promover el reclutamiento, la proliferación, la diferenciación o la maduración de las células del linaje de oligodendrocito (tales como las células progenitoras o precursoras), para promover la protección de las células del linaje del oligodendrocito de la apoptosis y la lesión celular.

Los términos "que trata" y "que previene" tal como se usan en la presente, deben entenderse como que previenen, inhiben, atenúan, alivian o revierten uno o más síntomas o causas de la enfermedad neurológica, como también los síntomas, las enfermedades o las complicaciones que acompañan la enfermedad neurológica. Cuando "se trata" una enfermedad neurológica, las sustancias de acuerdo con la invención se administran después del inicio de la enfermedad, "prevención" se refiere a la administración de sustancias antes de que los signos de la enfermedad pueda observarse en el paciente.

El término "enfermedades neurológicas", tal como se usa en la presente abarca todas las enfermedades o trastornos neurológicos conocidos, o las lesiones del SNC o el SNP, incluyendo las que se describen en detalle en los "Antecedentes de la invención".

Las enfermedades neurológicas comprenden los trastornos unidos a la disfunción del SNC o el SNP, tales como las enfermedades relacionadas con la neurotransmisión, migrañas, traumatismos craneales, infecciones del SNC, trastornos del nervio neuro-oftalmológico y craneal, función y disfunción de los trastornos de los lóbulos cerebrales del movimiento, estupor y coma, enfermedades desmielinizantes, delirio y demencia, anomalías de la unión cráneo cervical, trastornos por convulsiones, trastornos de la médula espinal, trastornos del sueño, trastornos del sistema nervioso periférico, enfermedad cerebrovascular, o trastornos musculares. Para las definiciones de estos trastornos, véase por ej., <http://www.merck.com/pubs/mrmanual/section14/sec14.htm>

Preferiblemente, las enfermedades neurológicas se seleccionan del grupo que consiste de lesión del nervio traumática, accidente cerebrovascular, enfermedades desmielinizantes del SNC o el SNP y las enfermedades neurodegenerativas.

La lesión del nervio traumática puede referirse al SNC o al SNP, puede ser traumatismo cerebral o de la médula espinal, incluyendo paraplegia, como se describe en los “antecedentes de la invención” anteriormente.

La apoplejía puede ser originada por hipoxia o por isquemia del cerebro. Además se denomina enfermedad o accidente cerebrovascular. Un accidente cerebrovascular involucra la pérdida de funciones cerebrales (déficits neurológicos) originada por una pérdida de circulación sanguínea a las áreas del cerebro. La pérdida de circulación sanguínea puede deberse a coágulos sanguíneos que se forman en el cerebro (trombo) o partes de la placa aterosclerótica u otro material que viaja hacia el cerebro desde otra ubicación (émbolo). El sangrado (hemorragia) dentro del cerebro puede causar síntomas que imitan el accidente cerebrovascular. La causa más común de un accidente cerebrovascular es el accidente secundario a la aterosclerosis (trombosis cerebral), y por lo tanto la invención además se refiere al tratamiento del aterosclerosis.

La neuropatía periférica puede estar relacionada con un síndrome de pérdida sensorial, debilidad muscular y atrofia, disminución de los reflejos profundos, y síntomas vasomotores, solos o en cualquier combinación. La neuropatía puede afectar un solo nervio (mononeuropatía), dos o más nervios en áreas separadas (múltiple mononeuropatía), o muchos nervios en forma simultánea (polineuropatía). El axón puede verse afectado esencialmente (por ej., la diabetes mellitus, borreliosis de Lyme, o uremia o con agentes tóxicos) o la vaina de mielina o las células Schwann (por ej., en polineuropatía inflamatoria aguda o crónica, leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré). Otras neuropatías, que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención, pueden deberse por ej., a la toxicidad del plomo, el uso de dapsona, fiebre americana, Porfirio, o síndrome de Guillain-Barré) afectan esencialmente las fibras motoras. Otros, tales como aquellos que se deben a la ganglionitis espinal del cáncer, lepra, SIDA, diabetes mellitus, o intoxicación con piridoxina crónica) pueden afectar esencialmente los ganglios espinales o las fibras sensoriales, produciendo síntomas sensoriales. Los nervios craneales también pueden estar involucrados, tales como por ej., en el síndrome de Guillain-Barré, borreliosis de Lyme, diabetes mellitus, y difteria.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno que involucra el deterioro de las funciones mentales que surgen de los cambios en el tejido cerebral. Esto puede incluir el encogimiento de los tejidos del cerebro, demencia degenerativa primaria y atrofia cerebral difusa. La enfermedad de Alzheimer además se denomina demencia senil/del tipo Alzheimer (SDAT).

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del cerebro que incluye temblores y la dificultad para caminar, moverse y coordinar. La enfermedad está asociada con el daño a una parte del cerebro que controla el movimiento muscular, y además se denomina parálisis agitante o parálisis con temblor.

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurológica dominante autosómica heredada.

La esclerosis lateral amiotrófica, ELA, es un trastorno que causa pérdida progresiva del control nervioso de los músculos voluntarios, incluyendo la destrucción de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La esclerosis lateral amiotrófica, también denominada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno que involucra la pérdida del uso y control de los músculos.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que toma un curso recurrente-remitente o un curso progresivo. La EM no es la única enfermedad desmielinizante. Su contrapartida en el sistema nervioso periférico (SNP) es la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria (PDIC). Además, hay trastornos monofásicos agudos, tales como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria denominada síndrome de Guillain-Barré (SGB) en el SNP, y la encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA) en el SNC.

Otros trastornos neurológicos comprenden neuropatías con mielinización anormal, tales como los únicos mencionados en los “antecedentes de la invención” anterior, como también el síndrome del túnel carpiano. La lesión del nervio traumático puede estar acompañada por las complicaciones ortopédicas de la columna vertebral, y esas también están dentro de las enfermedades de acuerdo con la presente invención.

Los trastornos neurológicos además pueden deberse a los trastornos metabólicos congénitos. En una realización preferida de la invención, la enfermedad neurológica se debe por lo tanto a un déficit metabólico congénito.

Los trastornos metabólicos congénitos pueden ser por ej., fenilcetonuria y otras aminoacidurias, las enfermedades de Tay-Sachs, Niemann-Pick, y Gaucher, el síndrome de Hurler; la enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias. Pueden afectar la vaina de mielina en desarrollo, principalmente en el SNC.

5 Las enfermedades neurológicas causadas por trastornos metabólicos congénitos han sido discutidas también en detalle en los “antecedentes de la invención”.

Además se divulgan enfermedades neurológicas menos conocidas, tales como la neurofibromatosis, o la atrofia de sistema múltiple (ASM). Otros trastornos que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención, han sido descritos en detalle en los “antecedentes de la invención” anterior.

10 En una realización preferida más, la enfermedad neurológica es una neuropatía periférica, más preferentemente neuropatía diabética. Las neuropatías asociadas a la quimioterapia también son preferidas de acuerdo con la presente invención.

15 El término “neuropatía diabética” se refiere a cualquier forma de neuropatía diabética, o a uno o más síntomas o trastornos que acompañan o causan la neuropatía diabética, o las complicaciones de la diabetes que afectan los nervios como se describe en detalle en los “antecedentes de la invención” anterior. La neuropatía diabética puede ser una polineuropatía. En la polineuropatía diabética, muchos nervios se ven afectados en forma simultánea. La neuropatía diabética además puede ser una mononeuropatía. En la mononeuropatía focal, por ejemplo, la enfermedad afecta un solo nervio, tal como los nervios craneales oculomotor o abducens. Además puede ser mononeuropatía múltiple cuando dos o más nervios están afectados en áreas separadas.

20 Incluso en realización preferida más, el trastorno neurológico es una enfermedad desmielinizante. Las enfermedades desmielinizantes comprenden preferiblemente las afecciones desmielinizantes del SNC, como la encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA) y la esclerosis múltiple (EM), como también las enfermedades desmielinizantes de sistema nervioso periférico (SNP). Este último comprende enfermedades tales como poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y trastornos monofásicos agudos, tales como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria denominada síndrome de Guillain-Barré (SGB).

25 Una realización preferida más de la invención se refiere al tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa.

30 Las fracciones o fragmentos activos pueden comprender cualquier porción o dominio de cualquiera de las isoformas de la osteopontina, tal como una porción del N-terminal o una porción del C-terminal, o cualquiera de OPN-a, -b, o -c, como se muestra en la figura 2. El motivo GRGDS puede estar presente, o ausente, o mutado. El sitio de unión de heparina puede estar mutado para hacer que la osteopontina esté privada de la unión a la heparina. La osteopontina de longitud completa o cualquier fragmento activo de la misma, puede ser fosforilada en uno o más de los siguientes residuos de serina, tales como los residuos de serina en las siguientes posiciones: 8, 10, 11, 33, 46, 47, 60, 62, 65, 86, 89, 92, 101, 104, 107, 110, 113, 155, 175, 170, 199, 203, 208, 212, 218, 223, 227, 238, 242, 247, 251, 254, 259, 264, 275, 287, 292, 294, 295.

35 Además, los sitios de fosforilación de serina pueden mutarse a partir de los residuos de serina glutamato, a fin de imitar la fosforilación.

El experto en la técnica apreciará que incluso porciones más pequeñas de osteopontina pueden ser suficientes para ejercer su función, tal como un péptido activo que comprende los residuos de aminoácidos esenciales requeridos para la función de la osteopontina.

40 El experto en la técnica además apreciará que las muteínas, las sales, las isoformas, las proteínas fusionadas, los derivados funcionales de osteopontina, las fracciones activas o los derivados circularmente permutados de osteopontina, retendrán una actividad biológica similar o incluso mejor de la osteopontina. La actividad biológica de la osteopontina y las muteínas, isoformas, muteínas, proteínas fusionadas, derivados funcionales, fracciones o fragmentos activos, o derivados circularmente permutados, o sales de los mismos, se pueden medir en un ensayo de cocultivo, tal como el que se describe a continuación en el ejemplo 8. La mezcla de cultivos corticales contiene oligodendrocitos, como también otras células derivadas del SNC (tales como neuronas, astrositos, microglia), e inducen o regulan por aumento los genes típicos involucrados en la mielinización, como PO, MBP, o MAG al cabo de la incubación con OPN o la muteína, isoforma, fragmento, fracción activa, derivado funcional o sal. La expresión de estos genes puede medirse mediante análisis de RT-PCR en tiempo real cuantitativa (TaqMan® RT-PCR), el cual se explica en detalle en los ejemplos a continuación. Otro ensayo simple para medir la actividad de la OPN es un ensayo de proliferación del oligodendrocito, que comprende incubar una línea celular de oligodendrocito adecuada, tal como las células oli-neu o CG4, con OPN o la muteína, isoforma, fragmento, fracción activa, derivado funcional o sal, como se describe en el ejemplo 7 a continuación, por ejemplo.

55 Las fracciones activas preferidas tienen una actividad que es igual o mejora que la actividad de la osteopontina de longitud completa, o que tienen otras ventajas, tales como una mejor estabilidad o una toxicidad inferior o inmunogenicidad, o son más fáciles de producir en grandes cantidades, o más fáciles de purificar. El experto en la técnica apreciará que las muteínas, los fragmentos activos y los derivados funcionales pueden generarse

clonando el correspondiente ADNc en plásmidos apropiados y ensayándolos en el ensayo de cocultivo, como se mencionó anteriormente.

Las proteínas de acuerdo con la presente invención pueden ser glicosiladas o no glicosiladas, pueden derivar de fuentes naturales, tales como los fluidos corporales, o pueden producirse preferentemente en forma recombinante. La expresión recombinante puede llevarse a cabo en los sistemas de expresión procariotas tales como *E. coli*, o en eucariotas, tales como células de insectos, y preferiblemente en los sistemas de expresión mamífera, tales como las células CHO o las células HEK.

Como se usa en la presente, el término "muteínas" se refiere a los análogos de osteopontina, en los cuales uno o más de los residuos de aminoácidos de una osteopontina natural se reemplazan por diferentes residuos de aminoácidos, o se suprimen, o uno o más residuos de aminoácidos se adicionan a la secuencia natural de osteopontina, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la osteopontina de tipo salvaje. Estas muteínas se preparan mediante síntesis conocidas y/o mediante técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquier otra técnica conocida adecuada para la misma.

Las muteínas de osteopontina, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o que codifican el ácido nucleico de la misma, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución o polinucleótidos que lo puede obtener en forma rutinaria un experto en la técnica, sin demasiada experiencia, basado en las enseñanzas y las guías que se muestran en la presente.

Las muteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que hibridan al ADN o ARN, que codifica la OPN de acuerdo con la presente invención, en condiciones moderadamente o extremadamente rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a la hibridación y a las condiciones de lavado subsiguientes, a las que los expertos en la técnica convencionalmente denominan "rigurosas". Véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992), and Sambrook et al. (Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, ejemplos de condiciones rigurosas incluyen las condiciones de lavado 12 – 20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido en estudio, por ej., en 2 x SSC y 0,5% de SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1% de SDS durante 15 minutos, 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 37°C durante 30 a 60 minutos y posteriormente, a 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68°C durante 30 a 60 minutos. Los expertos en la técnica entienden que las condiciones de rigurosidad también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas oligonucleotídicas (tales como 10 a 40 bases) o la mezcla de sondas oligonucleotídicas. Si se usa la mezcla de sondas, es preferible usar cloruro de tetrametil amonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

En una realización preferida, cualquier muteína de este tipo tiene al menos 40% de identidad u homología con la secuencia de la SEC ID NO.: 1, 2 o 3 del listado de secuencias adjunto. Con mayor preferencia, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, con máxima preferencia, al menos 90% de identidad u homología a la misma.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada por la comparación de las secuencias. En general, la identidad se refiere a un nucleótido exacto a nucleótido o aminoácido a la correspondencia de aminoácido de los dos polinucleótidos o dos secuencias polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de la longitud de las secuencias que se comparan.

Para las secuencias donde no hay una exacta correspondencia se puede determinar un "% de identidad". En general, las dos secuencias que deben compararse se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "brechas" en cualquiera o ambas secuencias, para mejorar el grado de alineamiento. Un % de identidad puede determinarse sobre la longitud completa de cada una de las secuencias que se comparan (denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma o muy similar longitud, o sobre longitudes definidas, más cortas (denominado alineamiento local), que es más adecuado para las secuencias de longitud desigual.

Los procedimientos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. De este modo, por ejemplo, los programas disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencia Wisconsin, versión 9.1 (Devereux et al 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, se pueden usar para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith and Waterman (1981) y encuentra la mejor única región de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre las secuencias también se conocen en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul S F et al, 1990, Altschul S F et al, 1997, accesible a través de la página de inicio de NCBI al www.ncbi.nlm.nih.gov) y FASTA (Pearson W R, 1990; Pearson 1988).

Los cambios preferidos para las muteínas de acuerdo con la presente invención son los que se conocen como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones de aminoácidos conservadoras de osteopontina, polipéptidos, pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente

similares que la sustitución entre los miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Queda claro que las inserciones y las supresiones de aminoácidos además pueden realizarse en las secuencias antes definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o supresiones sólo involucran unos pocos aminoácidos, por ej., por debajo de treinta, y preferiblemente por debajo de diez, y no se eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos a una conformación funcional, por ej., residuos de cisteína. Las proteínas y las mutéinas producidas por estas supresiones y/o inserciones están dentro del ámbito de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquéllos que se definen en la Tabla 1. Con mayor preferencia, los grupos de aminoácidos sinónimos son aquéllos que se definen en la Tabla II, y con máxima preferencia los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la Tabla III.

10 **Tabla 1**

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
15 Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Pro, Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
20 Gly	Gly, Thr, Pro, Ala
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Tre, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
25 His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gin
Asn	Gin, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gin, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
30 Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, lie, Val, Leo, Met
Trp	Trp

Tabla II

35 Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
40 Pro	Ala, Pro

	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, Ile
	Gly	Gly
5	Lle	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His, Gln, Arg
10	Gln	Glu, Gln, His
	Asn	Asp, Asn
	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
	Glu	Glu, Gln
15	Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
	Trp	Trp

Tabla III

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

	Aminoácido	Grupo sinónimo
20	Ser	Ser
	Arg	Arg
	Leu	Leu, Ile, Met
	Pro	Pro
	Thr	Thr
25	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
	Phe:	Phe
30	Tyr:	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
	Gln	Gln
	Asn	Asn
35	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu

Met Met, Ile, Leu

Trp Met

5 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden usar para obtener muteínas de osteopontina, polipéptidos o proteínas, para uso en la presente invención incluyen cualquier etapa del procedimiento conocida, tales como las que se presentan en las Patentes Estadounidenses 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, a Mark et al; 5.116.943 a Koths et al, 4.955.195 a Namen et al, 4.879.111 a Chong et al., y 5.017.691 a Lee et al.; y las proteínas sustituidas con lisina que se presentan en la Patente Estadounidense No. 4.904.584 (Shaw et al.).

10 El término "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende osteopontina, o una muteína o fragmento de la misma, fusionada con otra proteína, que, por ej., tiene un tiempo de residencia extendido en los fluidos corporales. Una osteopontina puede fusionarse de este modo a otra proteína, polipéptido o similar, por ej., una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

15 Los "derivados funcionales" como se usan en la presente, cubren derivados de osteopontina, y sus muteínas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos de N- o C-terminal, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención en la medida que permanezcan aceptables desde el punto de vista farmacéutico, es decir no destruyen la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de la osteopontina, y no confieren propiedades tóxicas sobre las composiciones que los contienen.

20 Estos derivados, por ejemplo, pueden incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y extienden la residencia de una osteopontina en los fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxi por la reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de los grupos amino libres de los residuos aminoácidos formados con restos de acilo (por ej., grupos alcanóilo o aroílo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo de residuos de serilo o treonilo) formados con restos de acilo.

25 Como "fracciones activas" de osteopontina, muteínas y proteínas fusionadas, esto cubre cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula proteínica sola o junto con las moléculas o residuos asociados enlazados a la misma, por ej., residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula proteica o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre que dicha fracción tenga actividad sustancialmente similar a la osteopontina.

30 El término "sales" en la presente se refiere a ambas sales de los grupos carboxilo y a las sales de adición de ácido de los grupos amino de la molécula de OPN o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férrica, o de zinc, y similares, y sales con bases inorgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de estas sales retiene la actividad biológica de la OPN relevante para la presente invención, es decir, ejercen un efecto proliferativo sobre los oligodendrocitos.

40 En una realización preferida de la invención, la osteopontina se fusiona a una molécula portadora, un péptido o una proteína que promueve el cruce de la barrera hematoencefálica ("BHE") Esto sirve para la focalización adecuada de la molécula al sitio de acción en esos casos, en los cuales el SNC está involucrado en la enfermedad. Las modalidades para la administración del fármaco a través de la BHE conlleva la ruptura de la BHE, ya sea por medios osmóticos o por vía bioquímica mediante el uso de sustancias vasoactivas tales como bradiquinina. Otras estrategias para ir a través de la BHE puede implicar el uso de los sistemas de transporte endógeno, que incluyen los transportadores mediados por vehículos tales como portadores de glucosa y aminoácidos; transcitosis mediada por el receptor para insulina o transferán; y transportadores de eflujo activo tal como p-glicoproteína. Las estrategias para la administración del fármaco detrás de la BHE además incluyen implantación intracerebral.

45 Los derivados funcionales de la osteopontina se pueden conjugar a los polímeros a fin de mejorar las propiedades de la proteína, tal como la estabilidad, la vida media, la biodisponibilidad, la tolerancia del cuerpo humano, o la inmunogenicidad. Para obtener este objetivo, la osteopontina puede enlazarse por ej., al polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos, que se describen en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la osteopontina está PEGilada.

55 En una realización preferida más de la invención, la proteína fusionada comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig). La fusión puede ser directa, o mediante un péptido conector corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos de aminoácidos en longitud o más largo, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos en longitud. Dicho conector puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia colectora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gin-Phe-Met introducida entre la secuencia de

osteopontina y la secuencia de inmunoglobulina, por ejemplo. La proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, tal como un tiempo de residencia extendido en los fluidos corporales (vida media) o una actividad específica aumentada, nivel de expresión aumentado. La fusión de Ig además puede facilitar la purificación de la proteína fusionada.

- 5 Incluso en otra realización preferida, la osteopontina se fusiona a la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona a regiones de cadena pesada, como los dominios CH₂ y CH₄ de la IgG1 humana, por ejemplo. Otras isoformas de las moléculas de Ig también son adecuadas para la generación de las proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención, tales como las isoformas IgG₂ o IgG₄, y otras clases de Ig, como IgM, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, hetero- u homomultiméricas.
- 10 La porción de inmunoglobulina de la proteína fusionada puede modificarse además de manera de no activar la unión del complemento o la cascada del complemento o unirse a los receptores Fc.

La divulgación además se refiere al uso de una combinación de osteopontina y un agente inmunosupresor para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos neurológicos, para uso simultáneo, secuencial o separado. Los agentes inmunosupresores pueden ser esteroides, metotrexato, ciclofosfamida, anticuerpos anti-leucocitos (tales como CAMPATH-1), y similares.

15

La invención además se refiere al uso de una combinación de osteopontina y un interferón beta para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos neurológicos, para uso simultáneo, secuencial o separado.

20 El término "interferón", tal como se usa en la presente solicitud de patente, incluye cualquier molécula definida como tal en la literatura, que comprende por ejemplo todas las clases de IFNs mencionadas en la sección anterior "antecedentes de la invención". El interferón preferiblemente puede ser humano, pero además deriva de otras especies, en la medida que la actividad biológica sea similar a los interferones humanos, y la molécula no sea inmunogénica en el hombre.

25 En particular, cualquier clase de IFN- α , IFN- β and IFN- γ se incluye en la definición anterior. El IFN- β es el IFN preferido de acuerdo con la presente invención.

El término "interferón-beta" (IFN- β), tal como se usa en la presente invención, incluye el interferón de fibroblasto humano, como se obtiene por aislamiento de los fluidos biológicos o como se obtiene por técnicas recombinantes de ADN de células huésped procariotas o eucariotas como también sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos.

30 Los "derivados funcionales" como se usan en la presente, cubren derivados que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que se producen como cadenas laterales sobre los residuos o los grupos de N- o C-terminal, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención en la medida que permanezcan aceptables desde el punto de vista farmacéutico, es decir no destruyen la actividad de las proteínas como se describió anteriormente, tal como la capacidad de unirse al receptor correspondiente e iniciar la señalización del receptor, y no confieren propiedades tóxicas sobre las composiciones que los contienen. Los derivados pueden tener restos químicos, tales como residuos de carbohidrato o fosfato, siempre que este derivado retenga la actividad biológica de la proteína y permanezca aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

35

Por ejemplo, los derivados pueden incluir ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por la reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo o grupos amino libres de los residuos de aminoácidos formados con restos de acilo (por ej., grupos alcanóilo o aroilo carbocíclico) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo de residuos de serilo o treonilo) formados con restos de acilo. Estos derivados además pueden incluir por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol que pueden enmascarar sitios antigénicos y extender la residencia de la molécula en los fluidos corporales.

40

De particular importancia es una proteína que ha sido derivada o combinada con un agente de complejación para durar más tiempo. Por ejemplo, las versiones PEGiladas, como se mencionó anteriormente, o las proteínas diseñadas por ingeniería genética para exhibir actividad de larga duración en el cuerpo se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

45

El término "derivados" incluye solo aquellos derivados que no cambian un aminoácido por otro de los veinte aminoácidos naturales que se producen normalmente.

50 El término "sales" en la presente se refiere a ambas sales de los grupos carboxilo y a las sales de adición de ácido de los grupos amino de las proteínas que se describieron anteriormente o sus análogos. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férrica, o de zinc, y similares, y sales con bases inorgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido, por ejemplo, sales con ácidos minerales, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de estas sales debe retener la actividad biológica de las proteínas (osteopontina e IFN-beta, respectivamente) relevante para la

55

presente invención, es decir, la capacidad de unirse al receptor correspondiente e iniciar la señalización del receptor.

Los interferones además pueden ser conjugados a polímeros a fin de mejorar la estabilidad de las proteínas. Un conjugado entre el interferón β y el poliol polietilenglicol (PEG) ha sido descrito en el documento WO 99/55377, por ejemplo.

- 5 En otra realización preferida de la invención, el interferón es interferón- β (IFN- β) y más preferiblemente IFN- β 1a.

La osteopontina se usa preferiblemente en forma simultánea, secuencial o separada con el interferón.

En una realización preferida de la presente invención, la osteopontina se usa en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

- 10 La invención además se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica como se define en las reivindicaciones.

El ácido nucleico puede por ej., ser administrado como una molécula de ácido nucleico desnudo, por ej., por inyección intramuscular.

- 15 Además puede comprender secuencias de vector, tal como la secuencia viral, útil para la expresión del gen codificado por la molécula de ácido nucleico en el cuerpo humano, preferiblemente en las células o tejidos apropiados.

Por lo tanto, en una realización preferida, la molécula de ácido nucleico además comprende una secuencia del vector de expresión. Las secuencias del vector de expresión son bien conocidas en la técnica, comprenden además elementos que sirven para la expresión del interés génico. Pueden comprender una secuencia reguladora, tal como secuencias promotoras o mejoradoras, secuencias marcadoras de selección, orígenes de multiplicación y similares. De este modo se usa un enfoque terapéutico del gen para tratar y/o prevenir la enfermedad. Ventajosamente, la expresión de la osteopontina posteriormente será in situ.

- 20 En una realización preferida, el vector de expresión es un vector derivado lentiviral. Los vectores lentivirales han demostrado ser muy eficientes en la transferencia de genes, en particular dentro del SNC. Otros vectores virales bien establecidos, tales como los vectores derivados adenovirales, también se pueden usar de acuerdo con la invención.

Un vector focalizado se puede usar para mejorar el pasaje de osteopontina a través de la barrera hematoencefálica. Estos vectores puede focalizar por ejemplo el receptor de transferrina u otros mecanismos de transporte endotelial.

- 25 En una realización preferida de la invención, el vector de expresión se puede administrar por inyección intramuscular.

El uso de un vector para inducir y/o mejorar la producción endógena de osteopontina en una célula normalmente silenciosa para la expresión de osteopontina, o que expresa las cantidades de osteopontina que no son suficientes, también se contempla de acuerdo con la invención. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células que se desean para expresar la osteopontina. Estas secuencias reguladoras pueden ser promotoras o mejoradoras, por ejemplo. La secuencia reguladora puede ser introducida posteriormente en el locus apropiado del genoma por recombinación homóloga, uniéndose operativamente de este modo la secuencia reguladora con el gen, la expresión del cual es necesario para ser inducida o mejorada. La tecnología se denomina usualmente "activación del gen endógeno" (EGA), y se describe por ej., en el documento WO 91/09955.

- 30 La invención además se refiere al uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para producir la osteopontina en la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas, como se define en las reivindicaciones.

La invención además se refiere a una célula que ha sido genéticamente modificada para producir la osteopontina para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades neurológicas, como se define en las reivindicaciones. De este modo, se puede usar un enfoque terapéutico del gen para administrar el fármaco a las partes apropiadas del cuerpo humano.

- 35 La invención además se refiere a las composiciones farmacéuticas, particularmente útiles para la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurológicas, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de osteopontina y una cantidad terapéuticamente efectiva de un interferón, opcionalmente además una cantidad terapéuticamente efectiva de un inmune supresor, como se define en las reivindicaciones.

- 40 La definición de "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" abarca cualquier vehículo, que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico al huésped al cual se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, las proteínas activas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución

de Ringer.

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden administrar a un individuo en una variedad de formas. Las vías de administración incluyen la vía intradérmica, transdérmica (por ej., en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica, intratecal, rectal, e intranasal. Cualquier otra vía terapéuticamente eficaz de administración puede usarse, por ejemplo absorción a través de los tejidos epiteliales o endoteliales o por terapia génica donde una molécula de ADN que codifica el agente activo se administra al paciente (por ej., a través de un vector), que hace que el agente activo se exprese y secrete in vivo. Además, las proteínas de acuerdo con la invención se pueden administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como los tensioactivos, excipientes, vehículos, diluyentes y vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Para la administración parenteral (por ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular), las proteínas activas se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral aceptable para uso farmacéutico (por ej., agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ej., manitol) o la estabilidad química (por ej., conservantes y buffers). La formulación se esteriliza mediante las técnicas normalmente usadas.

La biodisponibilidad de las proteínas activas de acuerdo con la invención también puede ser aliviada usando los procedimientos de conjugación que aumenta la vida media de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo, uniendo la molécula al polietilenglicol, como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095. Las cantidades terapéuticamente efectivas de las proteínas activas serán una función de muchas variables, incluyendo el tipo de proteína, la afinidad de la proteína, cualquier actividad citotóxica residual exhibida por los antagonistas, la vía de administración, la condición clínica del paciente (incluyendo el deseo de mantener un nivel no tóxico de la actividad de la osteopontina endógena).

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es tal que cuando se administra, la osteopontina ejerce un efecto benéfico sobre la enfermedad neurológica. La dosificación administrada, como dosis simples o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas de la osteopontina, la vía de administración, las condiciones del paciente, y las características (sexo, edad, peso corporal, salud altura), extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

Como se mencionó anteriormente, la osteopontina puede usarse preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg o aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. Otras cantidades preferidas de osteopontina son las cantidades de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.

La vía de administración, la cual se prefiere de acuerdo con la invención es la administración por vía subcutánea. La administración intramuscular también es preferida de acuerdo con la invención.

En otras realizaciones preferidas, la osteopontina se administra en forma diaria o día por medio.

Las dosis diarias usualmente se administran en dosis divididas o en forma de liberación sostenida efectivas para obtener los resultados deseados. Las segundas o subsiguientes administraciones se pueden realizar a una dosificación que es la misma, inferior que o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. Una segunda o subsiguiente administración se puede administrar durante o antes del inicio de la enfermedad.

De acuerdo con la invención, la osteopontina se puede administrar en forma profiláctica o terapéutica a un individuo antes a, en forma simultánea o secuencial con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ej., regímenes de múltiples fármacos), en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular con un interferón. Los agentes activos que se administra simultáneamente con otros agentes terapéuticos se pueden administrar en las mismas o diferentes composiciones.

La referencia a las etapas conocidas del procedimiento, las etapas convencionales del procedimiento, los procedimientos conocidos o los procedimientos convencionales no es de manera alguna un reconocimiento de que algún aspecto, descripción o realización de la presente invención se divulga, enseña o sugiere en la técnica relevante.

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará por completo la naturaleza general de la invención que otros pueden, aplicando el conocimiento de la técnica (incluyendo el contenido de las referencias mencionadas en la presente), modificar fácilmente y/o adaptar para varias aplicaciones dichas realizaciones específicas, sin demasiada experiencia, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, estas adaptaciones y modificaciones intentan estar dentro de un intervalo de equivalentes de las realizaciones divulgadas, basado en la enseñanza y guía que se muestra en la presente. Debe entenderse que la fraseología o la terminología en la presente es con fines de descripción y no de limitación, de modo que la terminología o la

fraseología de la presente memoria descriptiva debe ser interpretada por los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas y guías que se muestran en la presente, en combinación con el conocimiento de un experto en la técnica.

5 Habiendo descrito la invención, será de un entendimiento más fácil si se hace referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no intentan limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Osteopontina se expresa en forma diferencial en modelos *in vivo* e *in vitro* de enfermedades desmielinizantes.

Procedimientos

10 **Sistemas de modelo *in vitro***

La línea celular Oli-neu ha sido establecida a través de la inmortalización de los precursores oligodendrogliales con un retrovirus defectuoso de replicación que codifica el encogen t-neu, una tirosina quinasa constitutivamente activa: esta línea celular demostró ser inducida para diferenciarse en presencia de 1 mM de dibutilil-cAMP en el medio de cultivo (Jung et al., 1995). Esto proporcionó la posibilidad de estudiar los oligodendrocitos como un tipo de célula aislada.

La morfología y las características antigénicas de las células de la línea celular oligodendrocito de ratón Oli-neu, derivó de los precursores oligodendrocíticos de ratón A 825, en la condición no tratada y después de 6 días de tratamiento pro-diferenciación con 1-5 mM de dibutilil-cAMP difiere sustancialmente. Por lo que las células Oli-neu tiene una forma redonda y son más bipolares al igual que las células precursoras oligodendrocíticas, las células tratadas con cAMP generan múltiples procesos, tienen un fenotipo plano, e incluso producen estructuras “del tipo vaina” extendidas, planas.

Además, un ensayo de mielinización *in vitro* que usa una mezcla de cultivos corticales se puede usar para permitir la visualización de mielina funcional *in vitro*. Este sistema proporciona la posibilidad de estudiar cómo los oligodendrocitos se ponen en contacto y mielinizan los axones en presencia de otros tipos de célula del SNC (Lubetzki et al., 1993). En este sistema, se pueden ensayar los factores biológicos, los cuales podrían influenciar la proliferación de los precursores oligodendrocíticos o actuar sobre la diferenciación y supervivencia de los oligodendrocitos, tales como influir en la formación de los segmentos reales de mielina. La necesidad de estudiar el procedimiento de mielinización *in vitro* ha conducido al desarrollo de un intervalo de tipos de ensayo, que incluyen la agregación de cultivos de células del cerebro (Matthieu et al., 1992), cultivos de corte cerebelar (Notterpek et al., 1993), y sistemas de cocultivos (Shaw et al., 1996; Barres et al., 1993). Estos modelos tienen la ventaja de permitir el estudio del comportamiento oligodendrocítico en conjunto con otros tipos de célula y cómo estas células son estimuladas para producir mielina. La desmielinización además puede ser provocada en estos sistemas mediante insultos específicos, y el proceso de respuesta de la remielinización también se puede estudiar.

35 **Sistemas de modelo *in vivo***

Existe un amplio intervalo de modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para la esclerosis múltiple. La mayoría de los modelos *in vivo* se relacionan con el modelo animal clásico de EM, la encefalomielitis alérgica experimental (EAE). Hay muchas variantes de este modelo, las cuales se han adaptado para uso en un amplio intervalo de organismos mamíferos, incluyendo, el ratón, la rata, y los sistemas primates (revisado en Petry et al., 2000). Además, las metodologías han sido formuladas para “imitar” el componente viral propuesto de EM en modelos animales tales como el modelo de virus murino de Tehiler encefalitogénico de la EM (Del Canto et al., 1995).

Los modelos animales para estudiar exclusivamente la mielinización en el SNC o el SNP son menos usados normalmente. Se ha demostrado que es útil observar el procedimiento de la mielinización en desarrollo a fin de obtener algún conocimiento de los mecanismos que subyacen la diferenciación, migración y proliferación oligodendroglial o de las células Schwann, siguiendo la “hipótesis de la recapitulación (Franklin and Hinks, 1999). Sin embargo, a fin de comparar la mielinización en desarrollo, que se produce mientras el SNC o el SNP aún se está formando, y la remielinización, que se produce en un paradigma adulto, ha sido necesario formular modelos que se dirijan específicamente al procedimiento de remielinización.

El Modelo Cuprizona

50 Uno de los modelos de remielinización más conocido y ampliamente usado es el modelo Cuprizona para la remielinización en el ratón.

Estas condiciones patológicas se pueden visualizar mediante la tinción con anticuerpo anti-CNpasa o anticuerpo MBP. La mielina se tiñe con Luxol Rápido Azul-ácido periódico de Schiff (LFB-PAS). Los precursores del oligodendrocito remielinizantes se pueden visualizar usando anticuerpos para el receptor PDGF α o NG2.

La administración de cuprizona a ratones durante un período de 3 a 5 semanas da por resultado una desmielinización extensa del cuerpo calloso. Concomitante con la desmielinización, la síntesis de los transcritos génicos específicos de la mielina es regulada por aumento después de 3 semanas de administración de cuprizona (Morell et al., 1998).

- 5 La cesación subsiguiente del régimen de cuprizona crea un ambiente que conduce a la recuperación, de modo que 6 semanas después de cesar la alimentación de cuprizona, los ratones exhiben una remielinización extensa en el cuerpo callos. De este modo el modelo de cuprizona proporciona un completo paradigma *in vivo* dentro del cual estudiar los aspectos de la desmielinización y la remielinización. Sus ventajas incluyen la ausencia de infiltración de células T en el tejido del SNC, permitiendo un estudio más exclusivo de los procedimientos de mielinización, como también la reproducción de los resultados (Hiremath *et al.*, 1998).

Para el tratamiento con cuprizona, se usaron ratones hembras C57BL/6 (8 semanas de vida, 20 \pm 3g) en el estudio, que involucró 6 grupos, cada uno contiene 6 animales.

Grupo 1: grupo control alimentado con comida en polvo normal;

Grupo 2: alimentado durante 3 semanas con una dieta en polvo que contiene 0,2% de cuprizona (Cup3w);

- 15 Grupo 3: alimentado durante 5 semanas con una dieta en polvo que contiene 0,2% de cuprizona (Cup5w);

Grupo 4: alimentado durante 5 semanas con una dieta en polvo que contiene 0,2% de cuprizona, seguido de un período de recuperación de 1 semana sobre una dieta en polvo normal (1wR);

Grupo 5: alimentado durante 5 semanas con una dieta en polvo que contiene 0,2% de cuprizona, seguido de un período de recuperación de 3 semanas sobre una dieta en polvo normal (3wR);

- 20 Grupo 6: alimentado durante 5 semanas con una dieta en polvo que contiene 0,2% de cuprizona, seguido de un período de recuperación de 6 semanas sobre una dieta en polvo normal (6wR);

- Se recolectaron los cerebros de los animales en cada grupo al final de cada tratamiento en tiempos fijos. Primero se anestesiaron los ratones y se perfundieron mediante el ventrículo izquierdo. Se recolectaron los cerebros y las secciones coronales en serie se hicieron al nivel del cuerpo calloso – caudado y putamen (estriato) y el hipocampo. Las secciones del tejido cerebral se embebieron en parafina para inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

Preparación histológica del tejido

- Se preparó formalina diluyendo 1 volumen de formaldehído (Fluka, 36% p.a.), y 1 volumen de PBS estéril, con 8 volúmenes de agua estéril. Un tubo de silicio se adaptó a una bomba peristáltica y se ajustó con una aguja 1-1/5 de 20G que se llenó con 10 ml de PBS. El tubo se llenó posteriormente en forma continua con 40 ml de formalina, tomando la precaución de evitar la formación de burbujas de aire.

- Los animales se anestesiaron con pentobarbital de sodio (Sanofi®), diluido 1:1 con PBS estéril hasta una concentración de 3mg/100 ml, antes de la perfusión intracardiaca con fijador para permitir el análisis histológico subsiguiente de órganos y tejidos. Cada ratón recibió una inyección intraperitoneal de 0,05 ml (0,75 mg/kg). Una vez que los animales se adormilaron, sus miembros se fijaron con alfileres (agujas 5/8 de 25G) a través de la piel sobre un tablero de espuma de poliestireno. El abdomen de cada animal se limpió con etanol y se hizo una incisión con tijeras estériles en la piel al nivel del esternón. Posteriormente el abdomen se cortó hacia el lateral derecho y hacia el lateral izquierdo. El esternón se levantó con un par de forceps y el diafragma se abrió a través de una incisión diagonal, y una incisión bilateral perpendicular a los rasgos se realizó para exponer la cavidad torácica con el corazón latiendo en el medio. El corazón se mantuvo con forceps y el atrio derecho inmediatamente se cortó para permitir el sangrado venoso. Se permitió la circulación de 10 ml de PBS, seguido de 40 ml de formalina en el caso de cada ratón. El cerebro y la médula espinal de cada animal se diseccionó cuidadosamente y se colocó en 10 ml de solución de formalina en un tubo Falcon® de 50 ml durante 2 horas. La solución de formalina se cambió posteriormente por 10 ml de PBS estéril y el material se dejó a +4°C durante toda la noche. La solución de PBS se cambió nuevamente y el material se dejó a +4°C durante unas pocas horas. Los hemisferios del cerebro y la médula espinal se cortaron en rebanadas de aproximadamente 0,5 cm. y se colocaron en bolsas plásticas compatibles con la máquina de inclusión. La inmersión del cerebro y la médula espinal en parafina se realizó usando un procesador de infiltración al vacío Tissue Tek automático E1501E300 (Miles Inc. Diagnostics) de acuerdo con el programa que se describe a continuación:

- 50 30 minutos en 50% de etanol
60 minutos en 70% de etanol
60 minutos en 70% de etanol
60 minutos en 80% de etanol

90 minutos en 80% de etanol

30 minutos en 96% de etanol

90 minutos en 96% de etanol

120 minutos en 96% de etanol

5 30 minutos en 100% de xileno

60 minutos en 100% de xileno

Cuatro incubaciones de 60 minutos en parafina (Histosec, Merck 11609); última etapa es para la inmersión.

10 Todas las soluciones se mantuvieron a 40°C con la parafina a 65°C. Una vez que las secciones del tejido estuvieron listas, las secciones del cerebro y la médula espinal se colocaron en la orientación deseada sobre cámaras plásticas para la inclusión del bloque de parafina. El líquido de parafina se vertió y se dejó enfriar rápidamente a 0°C sobre una placa fría. Los bloques de parafina se procesaron en un micrótopo para seccionar (5 – 10 µm). Las secciones se montaron posteriormente sobre portaobjetos tratados con silano (SuperFrostPlus™, Menzel cat. no. 041300). A continuación del montaje, los portaobjetos se almacenaron en un ambiente libre de polvo.

15 **Cultivo celular**

Oli-neu: Las células de la línea celular oligodendrocítica de ratón (oli-neu) se enriquecieron mediante centrifugación y se resuspendieron en medio de Sato Trotter *et al.*, 1989). Las células se cultivaron en matraces de 75 ml a 37°C y condiciones controladas por 5% de CO₂. La diferenciación se realizó con 1 mM de dbcAMP adicionado directamente al medio de cultivo celular. El ARN se extrajo usando el Procedimiento Trizol (véase a continuación).

20 **Aislamiento de ARN**

25 El ARN total se aisló a partir de las células Oli-neu, las secciones del cerebro de ratón tratadas con cuprizona y los cerebros enteros posnatal de ratón en diferentes etapas del desarrollo usando el protocolo de extracción Tri.ZOL® (Life Technologies AG, Base!, Suiza). Se preparó Poli(A) ARN a partir de muestras de ARN total usando columnas Qiagen OLIGOTEX™ (QIAGEN Inc., 28159 Stanford Avenue, Valencia, CA 91355, EE.UU).

Análisis DGE usando micromatrices de ADNc

Se realizaron experimentos de micromatrices en Incyte Genomics (Incyte Genomics Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, California 94304, EE.UU). El análisis DGE se realizó usando una micromatriz de expresión génica GEM™ 1 de ratón de Incyte (<http://www.incyte.com/reagents/gem/products.shtml>).

30 Los microcircuitos de Incyte usados en estos ensayos se cargaron con moléculas de ADNc correspondientes a 8734 genes, ambos conocidos y desconocidos (secuencias EST). La tecnología de Incyte permitió micro muestras de cada uno de estos genes para ser vistas sobre una matriz simple. Cada molécula de ADNc correspondiente a un gen conocido o EST fue de 500 a 5000 pb de longitud. Las especificaciones Incyte dieron un intervalo dinámico detectable de 2 a 2000 pg para el ARNm individual en una muestra. La cantidad de ARN requerida para cada experimento de matriz fue de 600 ng de poli(A)⁺ ARN. Los niveles establecidos de la expresión diferencial detectable se dieron como relaciones más grandes que 1,75.

Normalización de señal y determinación del nivel de expresión

40 Las relaciones computadas a partir de las 2 intensidades de fluorescencia proporcionan una medición cuantitativa de la expresión génica relativa en las 2 muestras de células que se analizan. Las relaciones asignadas a cada gen se computan sobre la base de los niveles de expresión normalizados. Un factor de normalización se computa dividiendo la expresión total de la segunda muestra (P₂) por la expresión total de la primera muestra (P₁). Este factor posteriormente se aplica al nivel de expresión de cada gen en P₂. Una vez que esta etapa de normalización ha sido aplicada, las relaciones génicas se computan de acuerdo con la siguiente regla:

45 Siendo E₁ el nivel de expresión de un gen dado en la muestra 1 y siendo E₂ el nivel de expresión normalizado del mismo gen en la muestra 2; si E₂ > E₁ entonces la relación E₂/E₁, de otro modo la relación = E₁/E₂.

50 Dado que la hibridación de la muestra se realiza simultáneamente en competición, la tecnología de microcircuitos de Incyte es más precisa al determinar los cambios de expresión relativos y se torna menos confiable para la medición de los niveles de expresión absolutos. No obstante, es posible usar estos valores del nivel de expresión para comparar los pares de poblaciones de ARN de muestra que no se compararon físicamente en realidad sobre un microcircuito. Estas comparaciones *in silico* son menos confiables pero pueden proporcionar información adicional sobre los mecanismos que se podrían aplicar a los sistemas que se ensayan.

Resultados

Modelos usados para el análisis de la expresión de osteopontina diferencial

La tabla IV muestra los modelos, que se usaron para la extracción de ARNm y la hibridación del microcircuito (análisis DGE), como se describió anteriormente.

5 **Tabla IV:** Modelos usados en el análisis DGE

Modelos	Tratamientos	Controles
1. Modelo de diferenciación del oligodendrocito in vitro	Células Oli-neu+ dibutilil-cAMP (6 horas)	Células Oli-neu (sin tratar)
	Células Oli-neu+ dibutilil-cAMP (6 días)	Células Oli-neu (sin tratar)
2. Modelo de desmielinización/remielinización de cuprizona in vivo	Lóbulo frontal del cerebro adulto + cuprizona (3 semanas)	Lóbulo frontal del cerebro adulto sin tratar
	Lóbulo frontal del cerebro adulto + cuprizona (5 semanas)	Lóbulo frontal del cerebro adulto sin tratar
	Lóbulo frontal del cerebro adulto + cuprizona (3 semanas)	Lóbulo frontal del cerebro adulto + cuprizona (5 semanas)
3. Mielinización en desarrollo	Cerebelo de ratón postnatal día 10 (P10)	Cerebelo de ratón postnatal día 2 (P2)

Control positivo para DGE: Regulación de genes específicos de la mielina.

Como control positivo, primero se ensayó si la regulación diferencial de los genes específicos de la mielina podían mostrarse usando DGE.

- 10 La tabla V muestra la regulación observada para los genes específicos de la mielina presentes en las micromatrices Incyte Los valores de expresión diferenciales para cada gen se informan tanto en los puntos de tiempo de 3 semanas como de 5 semanas de tratamiento con cuprizona. Estos datos son un control positivo para verificar la confiabilidad del microcircuito. Dado que la regulación de los genes estructurales de mielina en nuestras condiciones experimentales está bien caracterizada, la expresión observada de estos genes medida sobre los microcircuitos se podría usar para indicar a) la precisión de la tecnología y b) la reproducibilidad de nuestros modelos.
- 15

Tabla V: Regulación in vivo de los genes específicos de la mielina en ensayos de micromatriz sobre modelos de mielinización in vivo

Nombre del gen	Número de acceso	Cup 3w	Cup 5w	P 2110*
Proteína básica de mielina	AA059540	113.6	11.3	47.9
Proteína vesicular de mielina/proteína de mielina y linfocito (MVP/MAL)	AA519027	33.5	11.7	0
Fosfodiesterasa nucleotídica cíclica (CNPasa)	W63987	22.9	11.1	+2.9

*Cerebelo posnatal día 2/10

- 20 La tabla anterior muestra cómo algunos genes específicos de la mielina se regularon en los ensayos de micromatrices realizados sobre el ARN de diferentes modelos in vivo usados para estudiar la desmielinización, la

remielinización y la mielinización en desarrollo. Los cambios en la expresión de estos genes específicos de la mielina indican cómo el proceso de mielinización se puede estudiar en el nivel de regulación transcripcional usando micromatrices.

5 Después de 3 semanas de administración de cuprizona, el efecto desmielinizante del tratamiento se puede visualizar en áreas específicas del cerebro de ratón. Por lo tanto, en las 3 semanas se esperó observar la modulación por disminución de varios genes asociados con la síntesis de la mielina y/o el mantenimiento de la mielina. La regulación por disminución de genes específicos como se observó a través de la micromatriz sirve como confirmación de la precisión y la confiabilidad del sistema experimental. Los datos presentados en la Tabla V muestran que los niveles de ARNm para MBP, regulados por disminución 13,6 veces, y la fosfodiesterasa 1-nucleótido cíclica (CNPasa), regulada por disminución 2,9 veces, se redujeron a 3 semanas de tratamiento con cuprizona en comparación con los controles. Sin embargo, los niveles de ARN para ambos de estos genes habían vuelto a 1,3 y 1,1 veces por debajo de los niveles normales respectivamente después de 5 semanas de tratamiento con cuprizona, indicando que el sistema biológico estaba intentando establecer la remielinización estimulando la síntesis de las proteínas de mielina estructurales.

15 **Regulación diferencial de osteopontina:**

Sobre el microcircuito, la osteopontina se reguló por aumento a 3w (+2,2) y 5w (+2,8) de cuprizona.

Ejemplo 2 : Confirmación de la expresión génica diferencial de osteopontina mediante el ensayo de Transcriptasa Inversa Cuantitativa en Tiempo Real (RT)-PCR (TaqMan®)

Procedimientos

20 **Generación del molde de ADNc**

Los moldes de ADNc para el análisis TaqMan® se generaron a partir de muestras de ARN total mediante transcripción inversa (RT) usando los reactivos de transcripción inversa TaqMan® (P/N N808-0234). Todas las reacciones de RT se realizaron en un volumen de 100 µl que contiene: 10 µl de buffer de RT TaqMan, 22 µl de solución 25 mM de MgCl₂ (5,5 mM), 20 µl mezcla de deoxiNTPs (500 µM de cada dNTP), 5 µl de hexámeros aleatorios (2,5 µM), 2 µl de inhibidor de RNasa (0,4U/µl), 2,5 µl de Transcriptasa Inversa MultiScribe™ (1,25 U/µl) y 38,5 µl de muestra de ARN (1 µg total) en H₂O libre de RNasa. Las reacciones se realizaron sobre un Ciclador Maestro Eppendorf a 25°C durante 10 minutos (etapa de incubación), 48°C durante 30 minutos (transcripción inversa), y 95°C durante 5 minutos (etapa de inactivación). Todos los ADNc sintetizados se almacenaron a -20°C en volúmenes de 20 µl.

30 **Diseño de cebador y verificación**

Se diseñaron cebadores inversos y delanteros de PCR en tiempo real SYBR Green para todos los genes confirmados y GAPDH (control de servicio) usando el software Primer Express™ de PE Biosystems de acuerdo con las secuencias publicadas y ordenadas a una concentración de 0,02 µM de Interactiva (Interactiva: The Virtual Laboratory, Sedanstrasse 10, D-89077 Ulm). La especificidad y las concentraciones óptimas del cebador se ensayaron para cada conjunto cebador. La contaminación del ADN genómico potencial se monitoreó realizando reacciones de PCR sobre muestras de ADNc de control negativo que habían sido sometidas a reacciones de transcripción inversa en ausencia de la enzima de RT. La ausencia de amplificación no específica se confirmó analizando los productos de PCR mediante electroforesis de gel azarosa sobre 3,5% de geles MetaPhor o 4% de geles NuSieve® prefabricados.

40 La tabla anterior indica las secuencias de los cebadores específicos del gen diseñados para realizar el análisis TaqMan® para confirmar la expresión diferencial de los genes que se muestran como regulados diferencialmente en micromatrices. Los nombres de los genes correspondientes a cada par de cebadores y el número de acceso del GenBank de la secuencia usada para diseñar cada cebador con el software PrimerExpress™ también se incluyen.

Tabla VI: Cebadores usados para el análisis RT-PCR

Nombre del gen	Número de acceso	Nombre TaqMan® OLIGO	Secuencia TaqMan® OLIGO
Fosfoproteína secretada (osteopontina)	AA 108928	Osteopontina-166 F	<u>AGCCTGCACCCAGATCCTATAG</u>
		Osteopontina-235R	GCGCAAGGAGATTCTGCTTCT

Reacciones TaqMan

Se realizó la PCR en tiempo real SYBR Green con 5 µl / pocillo de productos de RT (0,5 ng de ARN total), 25 µl / pocillo de mezcla principal de PCR SYBR Green ((Applied Biosystems, CA, EE.UU) con AmpErasa Uracil N-glicosilasa (UNG) (0,5 unidad / pocillo) y 20 µl de cebadores (300 nM). La PCR se realizó a 50°C durante 2 minutos (para la incubación de AmpErasa UNG para eliminar cualquier traslado potencial eliminando el uracilo incorporado en los productos de PCR generados a partir de las corridas TaqMan previas), 95°C durante 10 minutos (para activación AmpliTaq Gold). Posteriormente las muestras se corrieron para 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minutos sobre el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7700. Las muestras de ADNc transcritas inversas se amplificaron de este modo y su valores C_T (ciclo de umbral) se determinaron. Todos los valores C_T se normalizaron para el gen de servicio GAPDH. Donde sea posible, las muestras se corrieron por duplicado o triplicado para calibrar la reproducibilidad del resultado. Una banda de ADN específico simple para todos los genes confirmados y GAPDH se observó al cabo del análisis electroforético.

Cálculo de la regulación génica mediante Ciclo Umbral (C_T)

El principio de la detección en tiempo real usando la mezcla maestra de PCR SYBR Green se basa en la detección directa del producto de PCR midiendo el aumento en fluorescencia creada por la unión del tinte SYBR Green al ADN bicatenario. Esto permite la cuantificación del aumento relativo en una amplificación específica del producto génico basado en las curvas de crecimiento de PCR.

La medición de las especies de ADNc específicas relativas a un muestra de control se realiza por cuantificación del ADNc convertido a partir de un ARN mensajero correspondiente al gen específico relativo a una muestra calibradora que se usa como referencia fisiológica. La calibración se proporciona mediante una muestra a partir de una condición control o no tratada. La cuantificación relativa de las especies de ADNc se completa a través de la normalización hacia un control endógeno (en este caso, GAPDH) para dar cuenta de cualquier variabilidad en la concentración inicial y la calidad del ARN total usada para generar los ADNc de molde y en la eficiencia de conversión de las reacciones de transcripción inversa. El cálculo de los valores de cuantificación relativa se realizó tomando el valor C_T medio para las reacciones replicadas que se corren para cada muestra, calculando la diferencia (ΔC_T) en C_T medio del calibrador para el blanco del ΔC_T de ese blanco (ΔΔC_T) y finalmente expresando el valor de cuantificación relativo para el blanco como 2^{-ΔΔC_T} para calibrar la extensión de la regulación por aumento o disminución en la expresión génica.

Normalización de las señales de fluorescencia en las reacciones TaqMan®

Las señales de fluorescencia del complejo de ADNds SYBR Green se normalizaron para las reacciones de referencia pasiva o de control negativo que no contienen el ADN molde. La normalización se realizó a través de la división de la intensidad de emisión del complejo de ADNds SYBR Green en la reacción experimental mediante la intensidad de emisión de la referencia pasiva. Esto da la relación (indicador normalizado) para la reacción:

- R_n⁻ = R_n valor de una reacción que contiene todos los componentes incluyendo el ADN molde.
- R_n⁺ = R_n valor de una muestra sin reaccionar (sin ADN molde)
- ΔR_n = (R_n⁺) - (R_n⁻) donde:

R_n⁺ = (intensidad de emisión del complejo de ADNds SYBR Green)/PCR con molde (intensidad de emisión de referencia pasiva)

R_n⁺ = (intensidad de emisión del complejo de ADNds SYBR Green)/sin molde (intensidad de emisión de referencia pasiva)

Cálculo de la regulación en veces de los valores de Ciclo Umbral (C_T)

ΔR_n representa la magnitud de la señal generada por el conjunto dado de condiciones de PCR para una reacción específica. El parámetro de umbral de ciclo constituye una medición del aumento relativo en la amplificación del producto específico del gen, que representa la abundancia relativa de un transcripto específico en una población de

ADNc experimental. Se fija como el punto del ciclo en el cual se detecta primero un aumento estadísticamente significativo en ΔR_n . El umbral se define como la desviación estándar promedio de R_n para los ciclos tempranos, multiplicado por un factor ajustable. El parámetro de umbral del ciclo se usa para la cuantificación de la expresión génica diferencial. Los valores específicos se calculan para cada curva de crecimiento específica del gen basado en el punto o ciclo en el cual un se detecta un aumento por encima de la intensidad de fluorescencia de fondo.

Todo el cálculo de los valores de cuantificación relativos se realizó tomando el valor de C_T medio para las reacciones replicadas que se corrieron para cada muestra, calculando la diferencia (ΔC_T) en el C_T medio entre las muestras blanco y los controles endógenos y sustrayendo el C_T medio del calibrador para el blanco del ΔC_T de ese blanco ($\Delta \Delta C_T$). Finalmente, el valor de cuantificación relativo para el blanco se expresó como $2^{-\Delta \Delta C_T}$ para calibrar la extensión de la regulación por aumento o disminución en la expresión génica.

Resultados

La transcriptasa inversa cuantitativa en tiempo real (RT)-PCR (TaqMan) proporciona un enfoque sensible y confiable para confirmar y dilucidar los cambios en la expresión génica. El detector de secuencia TaqMan (Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM® 7700, Applied Biosystems, Foster City, CA) integra un ensayo basado en PCR con instrumentación hardware/software para proporcionar un sistema para la cuantificación del elevado rendimiento de las secuencias de ácido nucleico. Esto combina el ciclo térmico, la detección de fluorescencia, y el software específico de aplicación para permitir la detección ciclo por ciclo del aumento en la cantidad de un producto de PCR específico.

La expresión de varios genes muy regulados señalada por el análisis de micromatriz se verificó usando la plataforma TaqMan®. En cada caso, en la medida de lo posible, se incluyó un curso de tiempo para cada sistema de modelo que se usa. Esto permitió que se reúnan más datos considerando el comportamiento de los genes específicos durante un proceso completo.

Los cambios en la expresión génica podrían cuantificarse mediante TaqMan® a través de la detección directa de un aumento en el producto de PCR mediante la medición de fluorescencia creada por la unión del tinte SYBR Green para el ADN bicatenario, representado por los productos de amplificación específicos para el gen que se analiza. La medición de las especies de ADNc específicas relativas a una muestra de control se realiza por cuantificación del ADNc convertido a partir de un ARN mensajero correspondiente al gen específico relativo a una muestra calibradora que se usa como referencia fisiológica. La calibración se proporciona mediante una muestra a partir de una condición control o no tratada. La cuantificación relativa de la especie de ADNc se calcula con la normalización a un GAPDH para dar cuenta de cualquier variabilidad en la concentración inicial y la calidad del ARN total usada para generar los ADNc de molde y en la eficiencia de conversión de las reacciones de transcripción inversa.

La expresión del gen de la fosfoproteína 1 secretada (osteopontina) se analizó en estudio del curso del tiempo que abarca el paradigma de desmielinización/ remielinización asociado con el modelo de cuprizona.

Los resultados de los experimentos TaqMan para la expresión de osteopontina en el modelo de remielinización de cuprizona se muestran en la figura 1(A). Se halló que los niveles de ARNm de osteopontina se regulan por aumento 18 veces en el lóbulo frontal del cerebro de ratón después de 3 semanas de administración de cuprizona (3w Cup), y 25 veces después de 5 semanas de tratamiento (5w Cup).

La expresión de osteopontina se reguló por disminución después de 1, 3 y 6 semanas de regeneración seguido de 5 semanas de tratamiento con cuprizona (5w cup. + 1w, 3w, y 6w). Estos hallazgos indican un rol importante de la osteopontina en la fase de desmielinización y remielinización del modelo, dado que la remielinización se inicia cuando la desmielinización todavía está en curso.

La figura 1(B) muestra los resultados de los niveles de expresión de la osteopontina en el cerebelo en desarrollo. El ARNm de la osteopontina se regula por aumento en forma transitoria durante el desarrollo postnatal temprano, días C4 a C8, que es el período de tiempo de iniciación de la mielinización en el cerebelo.

Los resultados de la micromatriz habían indicado la regulación por aumento de la osteopontina en los lóbulos frontales del cerebro de ratón durante el tratamiento con cuprizona. Este análisis extiende el perfil de la expresión de osteopontina para incluir las fases de desmielinización y remielinización del tratamiento con cuprizona, y muestra que el perfil de expresión de la osteopontina llega a su pico durante la fase de desmielinización del tratamiento con cuprizona, y durante el período de recuperación vuelve casi a los niveles de línea de base.

Los resultados se muestran en la tabla VII a continuación.

Los resultados del análisis TaqMan® de la expresión de osteopontina confirmaron su regulación por aumento en los lóbulos cerebrales de ratones alimentados con cuprizona durante 3 y 5 semanas.

Tabla VII: Análisis TaqMan® de regulación de osteopontina en el modelo de cuprizona

Tipo de tejido	Experimento	Niveles de expresión	de regulación
Lóbulo frontal	Control de cup.	1,00	Nivel de control
Lóbulo frontal	Control de cup.	-1,32	disminución
Lóbulo frontal	3 w. Cup.	17,51	aumento
Lóbulo frontal	3 w. Cup.	23,43	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup.	20,25	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup.	23,43	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 1 w. R.	1,79	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 1 w. R.	3,32	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 3 w. R.	2,95	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 3 w. R.	4,56	aumento
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 5 w. R.	-1,16	disminución
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 5 w. R.	1,04	Nivel de control
Lóbulo frontal	5 w. Cup. + 5 w. R.	1,07	Nivel de control

Ejemplo 3:

Confirmación de la expresión de osteopontina diferencial por Transferencia Northern

Procedimientos

5 Preparación de la transferencia

Para genes específicos, la especificidad del tejido de expresión se ensayó usando transferencias Northern de múltiples tejidos de ratón (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto CA). Estos contenían 2 µg de poli(A)⁺ ARN por senda de diferentes tejidos del ratón adulto. Las transferencias separadas se prepararon para el análisis de la expresión génica diferencial tanto en situaciones in vitro como in vivo. El ARN aislado de los lóbulos del cerebro de ratones tratados con cuprizona a las 3 semanas, 5 semanas, y los puntos de tiempo 1, 3 y 6 semanas durante el proceso de recuperación (hasta 6 semanas) se usó en un conjunto de transferencias. El ARN de cerebro entero de diferentes etapas diarias postnatales se usó en un segundo conjunto. Finalmente una serie cursos de tiempo de los ARNs se preparó a partir de células Oli-neu desarrolladas en cultivo y tratadas para diferentes extensiones de tiempo con dibutilil-cAMP. Este ARN se usó para preparar un tercer conjunto de transferencias. Las nuevas transferencias se usaron con cada sonda específica del gen para garantizar la máxima eficiencia de detección y minimizar las variantes en los resultados debido al agotamiento desigual después de la hibridación. Todas las transferencias se hibridaron dos veces, primero con una sonda contra el gen de interés y posteriormente, a continuación del agotamiento, con una sonda contra el gliceraldehído-3-fosfato de ratón (mGAPODH) para controlar las variaciones en la carga del ARN.

El ARN (10 µg/pocillo) se cargó sobre 1,2% de gel de agarosa desnaturalizado que contiene formaldehído y 5X MOPS (209,27g de ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico, 20,5 g de acetato de sodio, 50 ml de 0,5M de EDTA pH 8,0 en 5 l con H₂O estéril, hasta pH 7,0 con 12 M de NaOH). Cada muestra de ARN se mezcló con 2 µl de bromuro de etidio (0,01 mg/ml, 2 µl 5X ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico (MOPS), 3,5 µl de 37% de formaldehído y 10 µl de formamida. Las muestras posteriormente se calentaron a 65°C durante 10 minutos y se enfriaron rápidamente en hielo. Se adicionaron dos microlitros de buffer de carga de ARN (50% de glicerol, 1 mM de EDTA, 0,4% de bromofenol azul y 0,4% de tinte de xileno cianol) a cada muestra inmediatamente antes de cargar en el gel.

Cada corrida de gel fue de aprox. 3 horas en un buffer de corrida 1X MOPS (1 l = 330 ml 37% de formaldehído, 400 ml 5X MOPS, 270 ml de H₂O tratada con DEPC) a 5 V cm⁻¹ (longitud del gel). Esto fue seguido de una transferencia de ARN durante toda la noche hacia una membrana de nylon carga positivamente (Hybond™-N, Amersham Life Sciences, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra HP7 9NA) usando solución de SSC como se describió (Terry Brown, UNIT 4.9, Current Protocols, 1993 [ed. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl]). La eficiencia de la transferencia de ARN se controló visualizando la membrana y el gel aplanado bajo luz UV. Los ARNs se entrecruzaron hacia la membrana a través de Stratalinker (Stratagen, EE.UU). Las transferencias se almacenaron entre láminas de papel de filtro Whatman 3MM a temperatura ambiente antes de la hibridación.

Preparación de la sonda

Las sondas ³²P-etiquetadas radiactivas se prepararon usando fragmentos de restricción purificados con gel de clones de ADNc (-500 > 800 pb de longitud) correspondiente a los genes de interés. Los fragmentos de ADN se marcaron aleatoriamente hasta una actividad específica > 10⁹ cpm con ³²P-dCTP usando el sistema de etiquetado HighPrime™ (Roche Diagnostics AG, Industriestralle 7, 6343 Rotkreuz, Suiza). El ³²P-dCTP no incorporado se eliminó mediante elusión basada en la gravedad de la mezcla de sonda a través de una columna de Pharmacia NAP™-5 que contiene medio Sephadex® G-25 (grado de ADN en agua destilada que contiene 0,15% de Kathon® CG/ICP Biocide®).

Hibridación y detección de señal

La hibridación de la sonda se realizó usando ExpressHyb™ (Clontech Labs, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto CA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las transferencias se expusieron siguiendo la hibridación hasta Hyperfitm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech, England) a -80°C en casetes autoradiográficos. El agotamiento de la sonda a continuación de la exposición se realizó incubando la transferencia durante 10 minutos en H₂O estéril /0,5% de solución de SDS a 90-100°C y a continuación dejando la transferencia enfriar durante 10 minutos. Las membranas agotadas se cerraron en plástico y se almacenaron a -20°C hasta la necesidad del resondeo.

Resultados

El análisis de transferencia Northern ha sido empleado previamente como una técnica de confirmación secundaria en los estudios de expresión génica diferencia la gran escala (Chang *et al.*, 2000). Su sensibilidad y precisión permite el análisis de no sólo la especificidad del tejido de la expresión para un gen de interés dado sino además la magnitud de la regulación diferencial entre las condiciones experimentales y de control. Esto lo hace un procedimiento confiable para confirmar los resultados de DGE obtenidos mediante el análisis de la micromatriz. Además, las transferencias Northern proporcionan información con relación a los tamaños del transcrito y las posiciones isoformas de empalme alternativo correspondiente al gen de interés.

Las transferencias Northern habituales se prepararon usando ARN aislado de los lóbulos del cerebro de ratones control y tratados con cuprizona. Estos se sondearon con fragmentos de ADN radiactivamente etiquetados de clones que nos fueran enviados por Incyte Genomics. La capacidad de las transferencias Northern para reproducir los resultados observados mediante el análisis TaqMan® de la expresión génica se verificó usando una sonda radiactivamente etiquetada contra la osteopontina de ratón hibridada a una transferencia de ARNs aislados de los lóbulos del cerebro de ratones tratados con cuprizona. De esta manera, fue posible comparar el análisis de transferencia Northern con el análisis TaqMan® de la expresión de osteopontina en el modelo de cuprizona.

La figura 3 muestra el marco de lectura abierto para la osteopontina de ratón inserta en el vector pT7T3D-Pac como lo ordenó Incyte Genomics. La región gris es la secuencia codificadora y la flecha representa el ADNc complete para la osteopontina. El inserto realizado fue flanqueado por los sitios de restricción EcoRI y NotI. Para producir una sonda para uso en la transferencia Northern a fin de analizar la expresión del tejido de este gen, un fragmento de 893 pb se cortó del clon usando las enzimas de restricción HincII y Styl. Este fragmento se purificó con gel y se etiquetó para uso como sonda.

La expresión de la osteopontina de ratón se evaluó mediante el análisis de transferencia Northern usando una transferencia habitual con ARNs de los lóbulos del cerebro de ratón de cada etapa en el modelo de cuprizona, incluyendo los controles de recuperación y sin tratar. La transferencia se sondeó primero con un fragmento radiactivamente etiquetado del ADNc de osteopontina de ratón, que se agotó después de la exposición, y posteriormente se resondeó con un fragmento radiactivamente etiquetado de ratón GAPDH. Esto se usó como control positivo para dar cuenta de las diferencias en los niveles de expresión observados, basado en las variantes de las cantidades totales de ARN en cada senda de la transferencia.

La expresión de osteopontina en los lóbulos de ratones tratados con cuprizona alcanza un pico a las 3 y 5 semanas de l alimentación con cuprizona, con una expresión levemente superior a las 5 semanas. Durante la fase de recuperación, los niveles de ARNm de osteopontina disminuyen en forma relativamente rápida, con una reducción apreciable en la expresión 1 semana más tarde de la cesación de la alimentación con cuprizona. Los niveles de ARNm de osteopontina vuelven a aproximadamente los niveles normales después de 6 semanas de recuperación. Esto es cualitativamente comparable con los resultados obtenidos en el análisis TaqMan® de la expresión de osteopontina en el modelo de cuprizona (véase la figura 1A).

Ejemplo 4: Regulación de la osteopontina en células oli-neu

La expresión de osteopontina en los oligodendrocitos (oli-neu) tratados con cAMP se midió por el análisis TaqMan. Los resultados se muestran en la figura 4, las columnas 1 a 4 muestran los resultados obtenidos en los oligodendrocitos. En comparación con el control (valor = 1), 6 horas de tratamiento con cAMP (col. 1) condujeron a una regulación por aumento del ARNm de osteopontina. Después de 2 días de tratamiento con cAMP (col. 2), se midió una regulación por aumento de 12 veces. El tratamiento prolongado durante 6 a 10 días

(col. 3, 4) condujo a niveles inferiores de ARNm de osteopontina. Una comparación con la regulación del ARNm de osteopontina en el modelo de cuprizona (col. 5, 6) mostró que la regulación por aumento de la osteopontina después de 3 y 5 semanas de cuprizona en el lóbulo frontal del cerebro fue comparable a la regulación por aumento en los oligodendrocitos después de 2 días de tratamiento con cAMP.

5 Ejemplo 5: Expresión de osteopontina en oligodendrocitos

Procedimiento

Las células oli-neu se transfectaron en forma transitoria siguiendo el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio. En breve, las células oli-neu de la fase de crecimiento exponencial se sembraron (10e5/ml) en una placa de 6 pocillos el día antes de realizar la transfección. Una solución de 100 µl de 250 mM de CaCl₂ se mezcló con 5 µg de ADN plásmido. Un volumen igual (100 µl) de solución 2X HEPES (140 mM de NaCl, 50 mM de HEPES pH 7,05) suplementado con fosfato de solución 300 mM de reserva de Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ a pH 7,5 se adicionó a la solución de Ca/ADN. Exactamente un minuto más tarde, la mezcla se adicionó suavemente a la placa de cultivo y se incubó durante 4 horas a 37°C en incubadora de CO₂. Después de esta hora, el medio se reemplazó con medio fresco y las células se incubaron posteriormente durante 24 a 72 horas antes de cosechar y analizar por transferencia Western.

Resultados

Diferentes construcciones de osteopontina de ratón, en el vector pDEST12.2 (pDEST 12.2-osteopontina-EGFP, pDEST12.2-osteopontina-His6, pDEST12.2-osteopontina, véase las figuras 4 a 7, y pCIE-EGFP como plásmido control) se transfectaron en células oli-neu. La proteína se produjo y se secretó mediante las células como se detectó mediante los anticuerpos comerciales específicos (R&D Systems, AF808). La construcción marcada con EGFP hizo el monitoreo de la transfección más fácil y 24 horas después de la transfección, un cambio específico de la morfología celular (aumento en los procesos oligodendrocíticos) pudieron detectarse en comparación con el control de pCIEGFP (que no se muestra), lo cual indicó que la osteopontina conduce la línea celular oligodendrocítica de ratón oli-neu hacia un fenotipo morfológico más maduro. La morfología presentada por las células oli-neu transfectadas con osteopontina fue muy similar a la morfología de un oligodendrocito mielinizante.

Estos resultados muestran que la expresión de osteopontina en los oligodendrocitos es beneficiosa para conducir estas células hacia la mielinización, y por lo tanto indican un efecto beneficioso de la osteopontina en enfermedades unidas a la disfunción de oligodendrocitos.

30 Ejemplo 6: Expresión de la proteína de osteopontina en regiones específicas del cerebro en el modelo de cuprizona.

La inmunohistoquímica de la osteopontina se realizó en varios puntos de tiempo durante la des- y re-mielinización del modelo de cuprizona. Las señales fuertes se hallaron en el cuerpo caloso desmielinizado y en los fascículos de estriato a las 5 semanas del tratamiento con cuprizona, un punto de tiempo asociado con el reclutamiento de microglia prominente a los sitios de desmielinización. A fin de visualizar las células microglia activadas, se llevó a cabo la tinción de CD68 en secciones consecutivas, y los patrones de expresión similares sugieren la expresión de microglia de osteopontina.

De interés, la osteopontina también se halló en células que revisten los ventrículos anteriores. Esta región se describió como la zona subventricular adulta que porta las células madres multipotentes para la producción de neuronas, astrositos y oligodendrocitos. Las tinciones dobles con receptor NG2, PSA-NCAM, PDGF α se realizaron para determinar la osteopontina que expresa las células precursoras oligodendrocíticas.

Ejemplo 7: Efectos de la proteína osteopontina en la proliferación de los oligodendrocitos

Una línea celular oligodendrocítica primaria murina (oligodendroglial) inmortalizada con el encogen t-neu (línea celular "oli-neu") se usó en este experimento. El establecimiento y las propiedades de la línea celular oli-neu como también las condiciones de cultivo se describen en Jung et al. (1995). (1995).

El objetivo de este estudio fue la medición de los efectos de la OPN sobre la proliferación de oligodendrocitos en un ensayo de proliferación de la oli-neu. Las células se plaquearon subconfluentemente. Se dejaron en ayunas durante 24 horas en medio libre de insulina antes del tratamiento con o bien proteínas de control o recombinantes. El número de células se cuantificó con Alamar azul, dando una lectura fluorescente. Los cálculos para la potenciación se basaron en la comparación con la curva estándar IGF1 (control). Los cálculos para la inhibición de proliferación se basaron en la comparación con la curva estándar de dbcAMP.

Material

Equipos y softwares

contador de múltiples etiquetas Wallac Victor 2

(excitación a 530-560 nm, emisión a 590 nm)

Software Graph Pad Prism

Reactivos

línea celular oli-neu (Eur J Neuro 7:125-1265 (1995))

- 5 Alamar azul (BioSourceIntl. Inc., Camarillo, CA93012)

Los componentes para el medio Sato fueron los siguientes:

Producto	Proveedor	Stock	µl por 500 ml
DMEM	Seromed F0435	500 ml	
Transferrina	Sigma T-2252	100 mg/ml (1mg en 10 ml de PBS)	50
Selenita de sodio	Sigma S-9133	1 mg/2,56 ml de PBS	50
Insulina	Sigma I-1882	10 mg/ml (100 mg / 10 ml de PBS)	500
Putrescina	Sigma P-7505	80,5 mg/ml (PBS)	500
Progesterona	Sigma P-0130	0,62 mg/ml (EtOH)	100
(Triyodotironina)			
L-Tiroxina	Sigma T-0397	2,88 mg/ml + 1 gota de NaOH 1N	100
L-Glutamina	Gibco 25030-024	200 mM	5000
Gentamicina	Gibco 15750-037	50 mg/ml	250
Sodio	Gibco 25080-052	7.50%	13000
Bicarbonato			
Suero de equino			5000

Placa de fondo plano BioCoat, recubierta con poli D lisina (356461) de Becton Dickinson), R3-IGF1 (11146 de Sigma); DbcAMP (D-0627 de Sigma)

- 10 Procedimiento

Cultivo de células para bioensayo in vitro

Las células oli-neu son células adherentes que se desarrollan sobre sustrato de poli-L-lisina. Las células se plaquearon sobre placas de 96 pocillos precubiertas con BioCoast™ poli-lisina. Las células se separaron 2-3x/ semana. A fin de partirlas, primero se lavaron con PBS y posteriormente se separaron con PBS más 1 mM de EDTA. Las células se desarrollaron en incubadora con 10% de CO₂ humidificada

- 15 El medio de congelamiento usado fue el Medio Sato con 20% de FCS y 10% de DMSO. En este experimento, se usaron células oli-neu no más alta que el pasaje 16. Las células se usaron a una concentración final de 4000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos después de 24 horas de inanición en medio Sato menos insulina.

Tinción con Alamar azul

- 20 Después de 48 horas en incubadora de CO₂, se adicionaron 10 µl de reserva de Alamar azul a los pocillos y se incubaron durante 2,5 horas adicionales. La fluorescencia se monitoreó a una excitación de 530-560 nm y una longitud de onda de 590 nm de emisión. Las placas podrían leerse hasta 4 horas y hasta 1 millón de unidades de fluorescencia relativa.

Diseño experimental

Como controles, se usaron 100 ng/ml R3-IGF-1 (control positivo), o 1 mM de dbcAMP (control negativo), o medio sin insulina, o 100 nM de OPN en ebullición. Las muestras experimentales fueron 1 nM, 10 pM, 0,1 pM, 0,01 pM o 100 nM de osteopontina recombinante. Los controles y las muestras experimentales se diluyeron hasta las concentraciones deseadas con un volumen final de 50 μ l en medio Sato menos insulina y se adicionaron a los pocillos. Las células oli-neu se desarrollaron en medio libre de insulina durante 24 horas, y posteriormente se trataron con controles o muestras experimentales durante 48 horas. Las células oli-neu separadas que se privaron frescas durante 24 horas en medio menos insulina, se cosecharon del matraz de desarrollo con PBS más 1 mM de EDTA. Las células se prepararon a 300.000 células por ml y se adicionaron 50 μ l por pocillo. Posteriormente, las células se incubaron 48 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada. Se adicionaron 10 μ l de alamar azul y las células se retornaron a la incubadora durante 2,5 horas. Posteriormente, se transfirieron 70 μ l de cada pocillo a las placas de 96 pocillos negras e inmediatamente se midió la fluorescencia.

La proliferación de las células oli-neu no diferenciadas se midió después de 24 horas en respuesta a diferentes cantidades de osteopontina, que se produjo usando las células de insecto (BacOPN), o un sistema de expresión mamífero (HEK-OPN). La tasa de desarrollo se cuantificó midiendo la actividad metabólica celular con un indicador de crecimiento fluorométrico/colorimétrico, Alamar Azul. Este agente contiene un indicador de oxidación-reducción que muestra la fluorescencia y cambia su color en respuesta a la reducción química del medio de desarrollo que surge del crecimiento celular. El agente y el ensayo usado se describen en Ahmed et al. (1994) y la Patente Estadounidense 5.501.959.

Resultados

Los resultados se muestran en las figuras 8 a 10.

Una respuesta de la dosis se observó con osteopontina recombinante, expresado en el baculovirus y expresada en las células HEK. La degeneración de la proteína por ebullición destruyó la actividad biológica, como se esperaba. La adición de la osteopontina expresada en el baculovirus (BacOPN) y la OPN expresada en las células HEK (HEK-OPN) dio por resultado un incremento dependiente de la dosis de la proliferación celular (Fig. 8) con una IC₅₀ para BacOPN de 3,7 nM y 0,05 nM para HekOPN (Fig. 9). Además, una construcción de OPN del N-terminal correspondiente a los aminoácidos 1 a 168 de la isoforma de OPN (véase la figura 2 N.term. OPN-a) se expresó en las células de insecto. La proteína purificada se ensayó en el ensayo de proliferación en comparación con la proteína de longitud completa. La proteína truncada fue activa (10 nM, 100 nM); véase la figura 10.

Ejemplo 8: Efectos de la osteopontina sobre la expresión de los marcadores de mielinización en la mezcla de cultivos corticales

La mezcla de cultivos corticales, desarrollados en cubreobjetos, se trató con BacOPN (100 nM) durante 12 días a partir de DIV (días in vitro) 5-17. A los 17 días in vitro los cultivos se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo anti-MBP. Los resultados muestran que los cubreobjetos de BacOPN tuvieron más oligodendrocitos positivos con MBP muy ramificado que los controles (Fig. 11). Además, mientras que en los cultivos de control (fig. 11A) no se observaron oligodendrocitos mielinizantes, los cultivos tratados con OPN (Fig. B, C y D) son ricos en oligodendrocitos, que se envuelven alrededor de los axones y forman los segmentos de mielina y los internodos. (Fig. 11 B a D). El recuento de los agrupamientos de segmentos reveló que mientras ningún segmento podía ser observado en el control, tres muestras tratadas con OPN diferentes mostraron 16, 22 y 18 agrupamientos de segmentos. Estos resultados indican que el tratamiento de las células de mezcla cortical con osteopontina conduce a un fenotipo diferenciado de oligodendrocitos, que es característico para los oligodendrocitos mielinizantes.

Ejemplo 9: Efectos de la osteopontina sobre la expresión de MBP en la mezcla de cultivos corticales según se mide por ELISA de MBP.

El ELISA de MBP se usó para monitorear el aumento de la proteína de MBP y de este modo la mielinización en la mezcla de cultivos corticales tratada con OPN y LIF.

Cultivos primarios

La fuente del material fue el tejido del cerebro de un ratón embrionario a partir de embriones, aislados de ratones hembras NMR1 preñadas a 16 días posteriores al coito. Los embriones se diseccionaron de acuerdo con el protocolo de Lubetzki et al., las cortezas cerebrales se disociaron por digestión de tripsina y las células disociadas (incluyendo neuronas, astrositos, oligodendrocitos, microglia y precursores neuronales) se sembraron a 1×10^5 células por pocillo sobre las placas de cultivo de 96 pocillos precubiertas con poli-L-lisina (a un volumen inicial de 50 μ l) para cada pocillo.

Tratamiento de la proteína recombinante

Los tratamientos se realizaron usando proteínas recombinantes (control positivo, factor inhibidor de leucemia de ratón recombinante (LIF) adquirido de AMRAD laboratories, a concentraciones de 1 μ g/ml, 100 ng/ml, y 10

ng/ml; osteopontina de longitud completa producida por el baculovirus de ratón a concentraciones de 100 nM, 10 nM, y 10 pM). Todas las proteínas se diluyeron en medio de cultivo hasta las concentraciones apropiadas de material de reserva, antes de la adición a las células *in vitro*. Los cultivos se dejaron desarrollar durante 5 días *in vitro* y posteriormente se trataron durante 17 días subsiguientes. El medio se cambió cada 3 días.

Protocolo de placa de micropocillo para cosechar muestras

Las células se lisaron y las muestras se cosecharon después de 17 días *in vitro* (DIV 17). El lisis celular se realizó usando buffer detergente triple.

Buffer detergente triple *Conc* *Entración final*

10	50 ml de Tris pH 8,0 1 M	50 mM
	8,77 g de NaCl	150 mM
	2 ml de NaN ₃ (10%)	0.02%
	5 ml de SDS 20%	0.1%
	10 ml de NP40	1%
15	5g de deoxicolato de sodio	0.5%

Se adicionó un solo comprimido de inhibidores de proteasa (Roche no. 1836170) a 10 ml de solución de buffer detergente triple antes del uso.

El medio se eliminó de las muestras de cultivo cortical mezclado que habían sido sembradas en placas precubiertas de 96 pocillos. Las células se lavaron suavemente dos veces con 50 µl de 1X PBS y posteriormente se adicionaron 50 µl de buffer detergente triple a cada pocillo. Todas las placas de micro pocillos que contienen las muestras lisadas se almacenaron posteriormente a -20°C antes del análisis.

Ensayo de proteína BCA

El Ensayo de proteína Pierce BCA es una formulación compatible con detergente basada en ácido bicinónico (BCA) para la detección colorimétrica y la cuantificación de la proteína total. Este procedimiento combina la reducción bien conocida de Cu^{+2} a Cu^{+1} por proteína en un medio alcalino con la detección colorimétrica muy sensible y selectiva del catión cuproso (Cu^{+1}) usando un único reactivo que contiene ácido bicinónico.

El producto de reacción de color púrpura de este ensayo se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. Este complejo hidrosoluble exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es lineal con las concentraciones crecientes de proteína sobre un amplio intervalo de trabajo de 20 µg/ml a 2000 µg/ml. El procedimiento BCA no es un procedimiento de punto final cierto, el color final continua desarrollándose pero, a continuación de la incubación, la tasa de desarrollo del color disminuye lo suficiente como para permitir grandes números de muestras se realicen en una única corrida. Se informó que la estructura macro molecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos (cisteína, cisteína, triptófano y tirosina) son los responsable de la formación del color con BCA.

Protocolo de placa de micropocillos para la determinación del contenido de proteína total

Se adicionaron 25 µl de cada estándar (concentración de BSA: 2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml) y muestras a los pocillos de la placa de micropocillos apropiada. Se usaron 25 µl del diluyente (buffer detergente triple) para los pocillos en blanco (intervalo de trabajo 20-2000 µg/ml).

Se adicionaron 200 µl de reactivo de trabajo (mezcla de 50 partes de reactivo A de BCA con 1 parte de reactivo B de BCA), a cada pocillo. El pocillo de la placa se agitó durante 30 segundos y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación los valores de absorbancia se midieron a 570 nm.

ELISA Sandwich de MBP

Se incubaron microplacas estériles de fondo plano de 96 pocillos (Costar) durante toda la noche a +4°C con el anticuerpo anti-MBP (Chemicon, MAB5274) diluido 1:5000 en 1X PBS, 50 µl de la solución de anticuerpo diluido se adicionó a cada pocillo.

Al día siguiente, la solución de anticuerpo se eliminó de todos los pocillos en las placas y se realizó una etapa de bloqueo usando 50 µl de una solución al 1% de BSA en 1X PBS para cada pocillo. El bloqueo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron robóticamente 3 veces a continuación de

la etapa de bloqueo usando PBS/Tween.

La incubación se realizó después de la adición de diluciones en serie del estándar peptídico MBP o las muestras en 1% de BSA/PBS a las placas de micropocillos. Se diluyeron 100 ng/ml de solución de reserva del péptido MBP 2 en 2. Las diluciones usadas aquí se determinaron después del cálculo de contenido de la proteína total usando los resultados del Ensayo de Proteína BCA. Fueron los siguientes:

100 µg; 50 µg; 25 µg; 12,5 µg; 6,2 µg; 3,1 µg.

A continuación de la incubación con el estándar del MBP y las muestras de proteína, las placas se lavaron 3 veces nuevamente en 1% de BSA/PBS.

Se realizó una segunda incubación usando un anticuerpo anti-MBP policlonal (Zymed 10-0038, 1:300) diluido en 1% de BA/PBS. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación de la incubación, las placas se lavaron 3 veces nuevamente como se hizo anteriormente.

La incubación con biotina de anti-conejo de cabra biotina (Vector BA-1000, 1:10,000), adicionada en volúmenes de 50 µl a todos los pocillos después de la dilución en 1% de BSA/PBS, se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente a continuación de la incubación como se indicó anteriormente.

La incubación final se realizó con 50 µl de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante conjugada (strep-HRP) (Amersham RPN 1051, 1:8000) diluida en 1X PBS que se adiciona a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación de la etapa de lavado, la reacción se reveló usando ortofenilendiamina (OPD) (Sigma, solución preparada adicionando 1 comprimido a un volumen de 20 ml de agua). Esta reacción se bloqueó mediante la adición de HCl 3M o 30% de H₂SO₄. La densidad óptica se midió usando un lector de placa de flúor multiscan (Labsystems Multiskan EX) a 492 nm.

Resultados

Como se muestra en la figura 12, los niveles de proteína MBP se incrementaron 3 veces en los cultivos tratados con bacOPN (10 nM) a DIV 17 en comparación con los cultivos control. Esta observación apoya los resultados previos que muestran un efecto positivo de la OPN expresada en el baculovirus sobre la proliferación del precursor oligodendrocítico y la mielinización.

Ejemplo 10: Efecto de la osteopontina sobre la proliferación de CG4

La línea celular CG4 es una línea celular oligodendrocítica inmortalizada de rata, que se obtuvo espontáneamente de los precursores oligodendrocíticos A285 primarios. Las células CG4 son una línea celular que se usa normalmente para estudiar la diferenciación o la supervivencia de los oligodendrocitos. La línea celular CG4 tiene las siguientes ventajas:

- Alta tasa proliferativa como los progenitores oligodendrocíticos (del tipo O2A) (células positivas GD3, A285);
- Mantenimiento de bajo costo en medio condicionado (con concentraciones del factor de crecimiento efectivas) que se obtuvo de la línea celular de neuroblastoma de rata B104 (Louis J.C. et al. 1992) obtenido de ATCC.
- El medio definido (sin FBS) se puede usar (suplementado con FGF2+PDGF) en lugar de medio condicionado B104 para la proliferación durante períodos cortos;
- La diferenciación en oligodendrocitos (O4, GalC-positivo) se puede disparar con un medio definido;
- La diferenciación en astrocitos (GFAP-positivo) se puede disparar en presencia de FBS.

El número de pasaje 35 de las células CG4 se usó para ensayar un efecto de dos proteínas de OPN (expresadas en células de E.coli o de insectos) sobre la proliferación. Para este ensayo se usó la osteopontina producida por E.coli R&D System (Cat 441-OP), la cual posteriormente se fosforiló in vitro con proteína quinasa 2 (GST fusionada) en un volumen de 60 µl de la siguiente manera:

45	Buffer de quinasa 6x:	Buffer muestra 2x pH6
	Hepes 50mM	Tris-Cl 0,125
	MgCl ₂ 10mM	Glicerol 20%
	DTT 1 mM	DTT 0,2M

Vanadato de sodio 0,2 mM

Bromofenol azul 0,02%

Beta glicerolfosfato 25 mM

Mezcla ATP (60 μ M)

5 30 μ l ATP a 600 μ M

5 μ l de 32 pATP

265 μ l de H₂O₂

10 A fin de iniciar la reacción se adicionó mezcla de ATP y la incubación se realizó a 30°C durante 1 hora. Después de 90 minutos de incubación a 30°C (con agitación), se adicionaron 100 μ l de perlas de glutatión sefarosa (Pharmacia) a la mezcla de reacción que se lavó previamente en PBS a fin de eliminar la proteína quinasa. A continuación, la mezcla se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. La suspensión se centrifugó a 500 g durante 5 minutos para sedimentar las perlas. A continuación, el sobrenadante se dializó durante toda la noche a 4°C contra el PBS. La proteína se cuantificó por BCA (Pierce).

Reacción de quinasa:

15 10 μ l de caseína quinasa a 0,05 μ g/ μ l

10 μ l de OPN a 0,05 μ g/ μ l

20 μ l de 50 mM Tris-HCl pH 8

10 μ l de buffer de quinasa 6x

10 μ l de mezcla de ATP

20 Ensayo de proliferación

25 Las proteínas BacOPN y OPN fosforilada in vitro se ensayaron a concentraciones de 10 pM, 10 nM y 100 nM sobre la proliferación de las células CG4. Como lectura se usó BrdU (Amersham) como se describió en Avellana et al. 1996. Las células se cultivaron en 70% de medio definido N1 (DMEM que contiene 4,5 g de glucosa, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 1 mM de piruvato de sodio y suplementado con 5 μ g/ml de transferrina, 100 mM de putrescina, 30 nM de selenita de sodio y 10 ng/ml de biotina) y 30% de medio condicionado B104 (N1 sin biotina) (Louis J.C. et al. 1992). El ensayo se realizó en placas de 24 pocillos tratadas con poli-ornitina (100 μ g/ml) sembradas con 3×10^4 células/por pocillo. Se adicionaron 10 nM de BrdU en el mismo momento y las células se incubaron durante 18 horas. Después de la fijación, se realizó la inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-BrdU para detectar las divisiones celulares. Las células además se mancharon con tinción Hoechst 44432 (Sigma) para permitir los conteos de números celulares totales. Las imágenes se adquirieron y se analizaron usando el Sistema de Análisis de Imagen Leica QWin.

Resultados

Los resultados se describen en la figura 13.

35 La osteopontina expresada en el baculovirus conduce a la proliferación aumentada de las células CG4. El efecto más pronunciado podría observarse a una concentración de 10 nM de OPN, si bien 100 nM de OPN condujeron a la proliferación también. La OPN expresada en E. coli, fosforilada in vitro conduce a una menor proliferación de las células CG4.

40 El análisis de la morfología de la OPN tratada versus las células CG4 no tratadas reveló que mientras en el control, no se podía observar diferenciación alguna, las células CG4 tratadas con OPN se diferenciaron en que la mayoría de las células desarrollaron procesos. Mientras la diferenciación fue más pronunciada usando OPN expresada en el baculovirus, la OPN expresada en E. coli fosforilada in vitro condujo a la diferenciación de la célula CG4 también (que no se muestra).

45 **Ejemplo 11: Efecto de la osteopontina sobre la encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por MOG (EAE) en ratones.**

Finalidad del estudio

La osteopontina (OPN; AS900011) es una citoquina con funciones pleiotrópicas incluyendo aquéllas de adhesión,

migración, diferenciación, supervivencia y secreción de la citoquina de varios tipos de células. La OPN se identificó en un enfoque de la expresión génica diferencial (DGE) con el fin de detectar genes que pudieran regular la remielinización y la función del oligodendrocito (véase el ejemplo 1). El tratamiento de los precursores oligodendrocíticos con OPN expresada en baculovirus recombinantes (AS900011) aumentó la proliferación de una manera dependiente de la dosis (IC₅₀: 3,7 pM, véase ejemplo 7). Además, la AS900011 mostró un efecto sobre la diferenciación de la línea celular CG4 y las neuroesferas primarias (véase ejemplo 8). La OPN se expresa en la región del cerebro de cuerpo callos desmielinizado de ratones tratados con cuprizona, donde la expresión fue más fuerte en las células microgliales (véase ejemplo 1). Además, la expresión de la OPN se observó en la zona subventricular (SVZ), donde se ha sugerido que genera precursores oligodendrocíticos que participan en la remielinización (véase ejemplo 4). Se crea la hipótesis de que la OPN, una citoquina con varias propiedades inmuno reguladoras, además puede cumplir el rol de moderadora de la función neuronal y glial.

La finalidad de este estudio fue ensayar el efecto terapéutico de la OPN en el modelo de EAE inducido por MOB en ratones.

Procedimiento de ensayo

El procedimiento de inducción de EAE usado para este estudio ha sido adaptado del protocolo publicado por Sahrbacher et al. (1998). La protección de animales usada en el experimento está de acuerdo con la Directiva 86/609/EEC, puesta en vigencia por el D.L. Italiano No. 116 del 27 de enero de 1992. Las instalaciones físicas y el equipo para el alojamiento y el cuidado de los animales están de acuerdo con las disposiciones de la Directiva 86/609 del Consejo EEC. El instituto está totalmente autorizado por las Autoridades de Salud Veterinaria competentes. Todas las partes de este protocolo se refieren al cuidado animal que ha sido aprobado por el veterinario oficial. Este protocolo está autorizado por el Ministerio Italiano de Salud (Decreto No. 51/99-B).

Sistema de ensayo

Especie, cepa, subcepa y sexo:

Ratones hembras C57 BL/6JICO de la colonia IFFA CREDO (Saint Germain sur l'Arbresle, Francia) fueron suministrados por Charles Rivera Italia (Calco, lecho, Italia). Justificación para la selección del sistema de ensayo:

El ratón C57 BL/6JICO se eligió como un modelo experimental; esta cepa seleccionada ha documentado susceptibilidad al EAE.

Proveedor:

Charles River Italia S.p.A.

Via Indipendenza, 11

23885 - Calco (Lecco)

Acimatación:

Al menos 5 días antes de iniciar el estudio. En este período los animales se observaron diariamente para evaluar su aptitud para el estudio.

Edad y peso corporal (aleatoriedad):

Aproximadamente 8 semanas de vida; 18-22 g.

Alojamiento:

10 animales /jaula en salas con aire acondicionado

Temperatura: 22°C ± 2

Humedad relativa: 55% ± 10

Cambios de aire: aproximadamente 15-20/hora ajustado sobre HEPA 99,99%

Luz: ciclo de 12 horas (7 am – 7 pm).

Jaula: Jaula Makrolon® 42,5x26,6x15h cada una ajustada con un estante con cubierta para alimentación de inoxidable. Se inserta una parrilla sobre el fondo de la jaula. Los desperdicios que caen a través de la parrilla sobre el fondo de la jaula serán periódicamente eliminados.

Identificación del animal:

Por una marca de la oreja. La tarjeta de la jaula dará el número de experimento, el grupo de dosificación y la fecha de administración del compuesto.

Dieta:

5 Dieta peletizada de certificado superior GLP 4F25 producida por la licencia alimentaria Mucedola S.r.l., Settimo Milanese de Charles River Italia. Para facilitar la nutrición de los animales enfermos, desde el día 7 se colocan pellets húmedos todos los días sobre el fondo de la jaula. El productor suministra un certificado de análisis para los nutrientes y contaminantes, cuyos niveles están dentro de los límites propuestos por EPA-TSCA (44FR:44053-44093, Julio 26, 1979). RBM reanaliza el alimento animal al menos dos veces al año para contaminación bacteriana. La dieta está disponible "ad libitum" para los animales.

10 Agua:

Del sistema de regadero principal municipal, se filtra agua y se distribuye "ad libitum" a los animales mediante un sistema de válvula automático. Se usan botellas de plástico además del sistema de regadero automático. Periódicamente se analiza el agua para beber para el recuento microbiológico, metales pesados, otros contaminantes (por ej., solventes, pesticidas) y otras características químicas y físicas. Los límites de aceptación de la calidad del agua para beber son aquéllos definidos en la Directiva EEC 80/778.

Los contaminantes que podrían interferir con los objetivos del estudio no se espera que estén presentes en la dieta o en el agua para beber.

Sustancias de ensayo:

Osteopontina 6his-marcada, murina (AS900011) y mIFN β

20 **Procedimiento de inmunización:**

Se inmunizaron ratones (día = 0) inyectando s.c. en el flanco izquierdo 0,2 ml de una emulsión compuesta de 200 μ g de péptido MOG₃₅₋₅₅ (Neosystem, Strasbourg, Francia) en adyuvante de Freund completo ((CFA, Difce, Detroit, EE.UU.) que contiene 0,5 mg de *Mycobacterium tu ber culosis*. Inmediatamente después, recibieron una inyección i.p. de 500 ng de toxina pertussis (List Biological Lab., Campbell, CA, EE.UU) disuelta en 400 μ l de buffer (0,5M de NaCl, 0,017% de Triton X-100, 0,015 M de Tris, pH = 7,5). El día 2 a los animales se les administró una segunda inyección i.p. de 500 ng de toxina pertussis. El día 7, los ratones recibieron una segunda dosis de 200 μ g de péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA inyectado s.c. en el flanco derecho. Partiendo aproximadamente del día 8 al 10, este procedimiento da por resultado una parálisis gradualmente progresiva, que surge desde la cola y asciende hasta las extremidades anteriores.

30 **Diseño del estudio:**

El estudio involucró 7 grupos de 15 animales cada uno. Todos los grupos se inmunizaron con péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA y toxina pertussis, de acuerdo con el protocolo de inmunización y se trató de la siguiente forma:

Grupo 1:	Grupo control positivo dosificado con vehículo OPN solo (PBS + 0,1% de BSA) por vía s.c.
Grupo 2:	Grupo control positivo dosificado con vehículo mIFN β solo (PBS) por vía s.c.
Grupo 3:	dosificado con 1 μ g/kg s.c. de osteopontina (AS900011).
Grupo 4:	dosificado con 10 μ g/kg s.c. de osteopontina (AS900011).
Grupo 5:	dosificado con 100 μ g/kg s.c. de osteopontina (AS900011).
Grupo 6:	dosificado con 10 μ g/kg s.c. de osteopontina (AS900011) más 20.000 U/ratón s.c. de mIFN β
Grupo 7:	dosificado con 20.000 U/ratón s.c. de mIFN β

35 El número de animales por grupo es el número mínimo que permite una evaluación precisa de los efectos farmacológicos observados.

Vehículo:

Se usará PBS más 0,1% de BSA para diluir osteopontina hasta la concentración apropiada. Se usará PBS para diluir

mIFN β hasta la concentración apropiada. Vía de administración:

5 Osteopontina (AS900011) a la dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ se administró s.c. en un volumen de 10 ml/kg. Se administrará mIFN β a la dosis de 20.000 U/ratón s.c. en un volumen de 200 $\mu\text{l}/\text{ratón}$. El grupo 1 se dosificará s.c. con PBS más 0,1% de BSA en un volumen de 10 ml/kg y el grupo 2 se dosificará s.c. con 200 $\mu\text{l}/\text{PBS}/\text{ratón}$.

Duración del tratamiento:

El tratamiento de los grupos de este estudio se inició para cada animal con la apariencia de un resultado clínico ≥ 1 y posteriormente continuará durante 35 días consecutivos.

Forma de administración:

10 El compuesto y el mIFN β se administraron como soluciones en el vehículo apropiado. Se prepararán respectivas formulaciones de acuerdo con las instrucciones del patrocinador.

Observaciones clínicas:

Partiendo del día 7 pos-inmunización los animales se examinaron individualmente para la presencia de parálisis por medio de un resultado clínico de la siguiente forma:

15 0 = sin señales de la enfermedad

0,5 = parálisis de cola parcial

1 = parálisis de cola

1,5 = parálisis de cola + parálisis de cuartos traseros unilateral parcial

2 = parálisis de cola + debilidad de los cuartos traseros o parálisis de los cuartos traseros parcial.

20 2,5 = parálisis de cola + parálisis de cuartos traseros parcial (pelvis disminuida)

3 = parálisis de cola + parálisis de cuartos traseros completa

3,5 = parálisis de cola + parálisis de cuartos traseros completa + incontinencia

4 = parálisis de cola + parálisis de los cuartos traseros + debilidad o parálisis parcial de las extremidades anteriores.

5 = moribundo o muerto

25 La observación de los animales tuvo lugar en una sala tranquila. Los signos clínicos fueron monitoreados diariamente en cada grupo de tratamiento de una manera ciega por un técnico que no sabe de tratamientos.

El peso corporal de los animales se monitoreó diariamente.

30 Los animales que se consideró que tenían dolor o estaban en una condición moribunda fueron examinados por el personal veterinario o el personal autorizado y, si fue necesario se sacrificaron para minimizar el dolor o el sufrimiento indebido.

Muestreo de sangre:

35 Veinticuatro horas después del último tratamiento, las muestras de sangre se recolectarán (bajo anestesia pentobarbital) de cada animal. Se separarán el suero mediante un procedimiento de rutina y las muestras de suero se mantendrán almacenadas a -20°C . Los sueros congelados se enviarán posteriormente al SPRI para las determinaciones relativas de la concentración de cuerpo en el compuesto.

Exámenes histopatológicos:

40 Al final del tratamiento, los animales bajo anestesia pentobarbital se perfusionarán fijos con 4% de formaldehído a través del ventrículo izquierdo. A continuación sus médulas espinales se diseccionarán cuidadosamente y se fijarán en formalina. Los cortes de la médula espinal se embeberán en bloques de parafina. Se realizará el seccionamiento y la tinción con hematoxilina y eosina para la inflamación, y con Kluver-PAS (Luxol azul rápido más tinción de ácido periódico de Schiff) para la detección de la desmielinización.

Evaluación de datos:

Los resultados de los exámenes clínicos se expresan como el resultado medio (\pm SEM) dentro de cada grupo. Los efectos de las sustancias de ensayo se compararán con el del grupo control positivo tratado con el vehículo. Las

diferencias de los valores del resultado clínico entre los grupos se analizarán mediante el ensayo Kruskal-Wallis seguido, en caso de significancia, por el ensayo Wilcoxon de par en par, en cada momento de la medición. Los datos del peso corporal se evaluarán por ANOVA de una vía seguido, en caso de significancia, por el ensayo Tukey. Se usará el software S- Plus®

5 Resultados:

Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 14 a 16.

El análisis histopatológico del infiltrado inflamatorio perivascular reveló que había una tendencia hacia una cantidad inferior de infiltrados perivascuales en los animales tratados con OPN, especialmente a la cantidad administrada más baja de 1 µg/kg. La combinación de OPN y IFNβ, que es un compuesto conocido por ser activo en el tratamiento de la esclerosis múltiple, fue más eficaz que la administración de OPN o IFN solo, respectivamente (Figura 14).

A continuación, se midió el porcentaje de las áreas desmielinizadas (Figura 15). Nuevamente, en los animales tratados con OPN, se pudo observar una tendencia hacia menos áreas desmielinizadas. La combinación de IFN y OPN condujo a una reducción muy significativa de la desmielinización, lo que incluso fue mucho más bajo que la extensión de desmielinización que se observó con el IFN solo (Figura 15).

La figura 16 resume los resultados clínicos observados al final del tratamiento, las infiltraciones inflamatorias y la desmielinización medida en este estudio. Si bien los resultados clínicos observados en ratones tratados con OPN no fueron significativamente inferiores que el control, la combinación de la OPN y el IFN condujo a un efecto pronunciado sobre los resultados clínicos, que fueron tan bajos como con el control positivo, interferón-beta. Esta observación está de acuerdo con la medición de los infiltrados inflamatorios y la extensión de la desmielinización. Ambos parámetros fueron significativamente reducidos después de la administración de OPN e IFNβ (Fig. 16).

En síntesis, los siguientes resultados se obtuvieron en este estudio:

La osteopontina (AS900011) ensayada sola a las dosis de 1, 10 y 100 mg/kg s.c. no redujo las infiltraciones perivascuales y la desmielinización con significancia estadística. El tratamiento con mIFN beta (20.000 U/ratón s.c.) indujo una reducción en las infiltraciones perivascuales (55%) y la desmielinización (53%). Cuando el mIFN beta en la misma dosis se combinó con AS900011 a la dosis de 100 mg/kg s.c., se observó una reducción significativa y marcada en las infiltraciones inflamatorias (71%) y en la desmielinización (81%).

Los datos histológicos correlacionados con los resultados clínicos se observaron el día 35 (fin del tratamiento), cuando los animales se sacrificaron y se recolectó la médula espinal para el análisis histológico. La osteopontina (AS900011) que se ensayó sola a las dosis de 1, 10 y 100 mg/kg s.c. no redujo significativamente la severidad de la enfermedad. El tratamiento con mIFN beta (20.000 U/ratón s.c.) redujo significativamente la severidad de la enfermedad. Cuando el mIFN beta a la misma dosis se combinó con AS900011 a la dosis de 100 mg/kg s.c., se observó una disminución estadísticamente significativa de los signos clínicos.

Estos datos sugieren que el tratamiento combinado de osteopontina y el mIFN beta efectivo es efectivo en la reducción tanto de los efectos clínicos como los patológicos en el modelo EAE de ratón, y por lo tanto puede ser un tratamiento eficiente para la esclerosis múltiple.

Ejemplo 12: Efecto protector de la osteopontina sobre la neuropatía inducida por el plasmaje del nervio ciático en ratones.

Abreviaturas

40 CMAP: potencial de acción muscular del compuesto

EMG: electromiografía

IGF-1: factor de crecimiento del tipo insulina

SC: subcutáneo

s.e.m.: error estándar de la media

45 vs: *versus*

Introducción

Las neuropatías son usualmente selectivas para el tipo de neurona del SNP afectada. (por ej., sensorial versus autosómico) y en verdad además por el subtipo de neuronas (pequeñas versus grandes). La axotomía de los nervios periféricos es el modelo animal más comúnmente usado para evaluar los efectos neuroprotectores de los factores neurotróficos. La lesión del nervio traumático, las lesiones del plexo y las lesiones radicales son una seria

complicación de acciones. Además, la presión sobre el nervio periférico que puede causar daño a la mielina frecuentemente visto en los trastornos tales como el síndrome del túnel carpiano o está asociado con las complicaciones ortopédicas de la columna vertebral. La axotomía produce fenómenos, tales como la muerte celular, la velocidad de conducción axonal reducida, y los niveles del neurotransmisor alterados en las neuronas dañadas. Las lesiones por aplastamiento permiten la regeneración, un proceso adicional de interés con relación a los estados neuropáticos (McMahon S. and Priestley J. V. 1995).

Una cuestión fundamental en la neurobiología celular es la regulación de la regeneración nerviosa después de la lesión o la enfermedad. La regeneración del nervio funcional requiere no sólo el brote y el alargamiento axonal, sino además nuevas síntesis de mielina. La remielinización es necesaria para la restauración de la conducción nerviosa normal y para la protección de los axones de nuevos ataques inmunológicos neurodegenerativos. El objetivo esencial de investigación en los trastornos neurodegenerativos es finalmente desarrollar intervenciones que eviten la muerte neuronal, mantienen el fenotipo neuronal y reparan el daño neuronal y de la mielina. Se han dedicado muchos estudios al desenmaramiento de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la completa regeneración de las neuronas motoras espinales axotomizadas (Fawcett *et al.*, 1990; Funakoshi *et al.*, 1993). La expresión inducida por la lesión de factores neurotróficos y los correspondientes receptores pueden cumplir un rol importante en la capacidad de la regeneración nerviosa. Estudios previos han demostrado una mejora significativa de la regeneración nerviosa con varios compuestos peptídicos y no peptídicos del tipo factor de crecimiento del tipo insulina (IGF-1), ACTH (Lewis *et al.*, 1993; Strand *et al.*, 1980), testosterona (Jones, 1993), SR57746A (Fournier *et al.*, 1993) y 4-metilcatecol (Kaechi K *et al.* 1993, 1995; Hanaoka Y *et al.* 1992).

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la regeneración nerviosa en ratones tratados con osteopontina en diferentes dosis. En este modelo un efecto positivo de la OPN sobre la supervivencia y regeneración neuronal y axonal (neuronas sensoriales y motoras), sobre la mielinización o la información de los macrófagos podría conducir a una restauración de la función motora. La regeneración puede medirse de acuerdo con la restauración de las funciones sensoriomotoras. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizaron registros electrofisiológicos e histomorfométricos en paralelo.

Materiales y procedimientos

Animales

Se usaron ochenta y cuatro ratones C57bl/6 RJ hembras de 8 semanas de vida (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Se dividieron en 7 grupos (n = 12): (a) grupo operado por falso vehículo; (b) grupo operado con vehículo por aplastamiento del nervio (c) aplastamiento del nervio/osteopontina (1 µg/kg); (d) aplastamiento del nervio/osteopontina (10 µg/kg); (e) aplastamiento del nervio/osteopontina (100 µg/kg); (f) aplastamiento del nervio/4-metilcatecol (10 µg/kg); (g) aplastamiento del nervio/osteopontina desnaturalizada (100 µg/kg).

Se alojaron por grupo (5 animales por jaula) y se mantuvieron en una incubadora con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo inverso de luz-oscuridad (12 horas/ 12 horas) con alimento y agua disponible *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las guías institucionales.

Lesión del nervio ciático

Los animales se anestesiaron con inyección IP de 60 mg/kg de clorhidrato de cetamina (Imalgene 500[®], Rhône Mérieux, Lyon, Francia). El nervio ciático derecho se expuso quirúrgicamente al nivel del muslo medio y se aplastó 5 mm próximo a la trifurcación del nervio ciático. El nervio se aplastó dos veces durante 30 seg con un forceps hemostático (ancho 1,5 mm; Koenig; Strasbourg; Francia) con una rotación de 90 grados entre cada aplastamiento.

Planificación de los experimentos y el tratamiento farmacológico

Las pruebas electromiográficas (EMG) se realizaron una vez antes del día de la cirugía (línea de base) y cada semana durante 3 semanas siguientes a la operación.

El día de la cirugía del aplastamiento del nervio se consideró como día (D) 0. Ninguna prueba se realizó los 4 días siguientes al aplastamiento.

El peso corporal y la tasa de supervivencia se registraron día a día.

A partir del día de la lesión del nervio al final del estudio, se administraron osteopontina y osteopontina desnaturalizada diariamente por vía s.c. mientras que la inyección diaria de 4-metilcatecol se realizó en IP.

A la cuarta semana, 4 animales por grupo se sacrificaron y el nervio ciático se diseccionó para realizar los ensayos morfológicos.

Registro electrofisiológico

Los registros electrofisiológicos se realizaron usando un electromiógrafo Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les

Ulis, Francia). Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de clorhidrato de cetamina (Imalgene 500®, Rhône Mérieux, Lyon, Francia). La temperatura normal del cuerpo se mantuvo a 30°C con una lámpara de calentamiento y controlada por un termómetro de contracto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la cola.

- 5 El potencial de acción muscular del compuesto (CMAP) se midió en el músculo *gastrocnemius* después de una estimulación simple de 0,2 ms del nervio ciático a una intensidad supramáxima (12,8 mA). Se midieron la amplitud (mV), la latencia (ms) y la duración (tiempo necesario para una sesión de despolarización y una sesión de repolarización) de la acción potencial. La amplitud es indicativa del número de unidades motoras activas, mientras que la latencia distal refleja indirectamente la conducción del nervio motor y las velocidades de transmisión neuromuscular.

Análisis morfométrico

- 15 El análisis morfométrico se realizó 3 semanas después del aplastamiento del nervio. Cuatro animales seleccionados aleatoriamente por grupos se usaron para este estudio. Se anestesiaron con inyección IP de 100 mg/kg de Imalgene 500®. Un segmento de 5 mm del nervio ciático se eliminó para histología. El tejido se fijó durante toda la noche con una solución acuosa al 4% de glutaraldehído (Sigma, Liste d'Abeau-Chesnes, Francia) en solución de buffer de fosfato (pH = 7,4) y se mantuvo en 30% de sacarosa a +4°C hasta su uso. El nervio se fijó en 2% de tetróxido de osmio (Sigma, Liste d'Abeau-Chesnes, Francia) en buffer de fosfato durante 2 horas y se deshidrató en soluciones de alcohol en serie y se embebió en Epon. Los tejidos embebidos se colocaron a continuación a +70°C durante 3 días para polimerización. Las secciones transversales de 1,5 µm se realizaron con un micrótopo y se tiñeron de 1% de azul toluidina (Sigma, L'Ilse d'Abeau-Chesnes, Francia) durante 2 minutos y se deshidrataron y se montaron en Eukitt. Veinte secciones por muestra se observaron usando un microscopio óptico (Nikon, Tokio, Japón) y el análisis morfométrico se realizó sobre 6 rebanadas aleatorizadas por muestra de nervio, con un software de análisis de imagen digital semi-automatizada (Biocom, Francia). Se estudiaron dos campos por rebanada. Se calcularon los siguientes parámetros: el porcentaje de fibras degeneradas (por campo) y el número total de fibras.

Análisis de datos

- 30 El análisis global de los datos se realizó usando un factor o análisis de medición repetida de varianza (anova) y un anova de una vía, ensayos no paramétricos (ensayo de mann whitney). El ensayo de Dunnett se usó posteriormente cuando fue apropiado. El nivel de significancia se estableció a $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (s.e.m).

Resultados

Todos los animales sobrevivieron después de los procedimientos de aplastamiento del nervio. Un ratón (aplastamiento del nervio/ vehículo nº 2) murió el día 7 y 2 (operado con vehículo falso nº 3 y nº 6) el día 14, como consecuencia de la anestesia durante la evaluación EMG.

35 Peso del animal

Como se ilustra en la figura 17, se observó un grupo significativo en la evolución del peso corporal a través del estudio [F (6, 132) = 1,93 y $p < 0,001$; ANOVA de mediciones repetidas]

Todos los grupos diferentes mostraron un aumento del peso corporal a través del estudio.

Mediciones electrofisiológicas:

40 Amplitud del potencial de acción muscular del compuesto (figura 18):

Hubo una significativa diferencia de intergrupo en la amplitud del CMAP a través del estudio [F 6, 18) = 49,185 y $p < 0,001$; ANOVA de medición repetida](Figura 19).

- 45 Después de la lesión del nervio, todos los animales presentados para el aplastamiento del nervio desplegaron una disminución significativa de la amplitud de CMAP en comparación con el grupo operado falso ($p < 0,001$; ensayo de Dunnett).

Además, el D 7 y el D 14, la amplitud del CMAP de los ratones tratados con osteopontina a 100 µg/kg o 4-metilcatecol a 10 µg/kg fue significativamente superior que el aplastamiento del nervio /vehículo uno ($p < 0,05$; ensayo de Dunnett).

- 50 No se observó diferencia alguna entre el aplastamiento del nervio /grupo vehicular y el aplastamiento del nervio /D-osteopontina 100 µg/kg.

Latencia del potencial de acción muscular del compuesto (figura 19):

Como se ilustra en la figura 20, se halló una diferencia intergrupo significativa en la latencia del CMAP [F (6, 18) = 2,521 y $p < 0,001$; ANOVA de mediciones repetidas]. El día 21, los grupos de aplastamiento del nervio presentaron una latencia de CMAP aumentada en comparación con el grupo operado falso ($p < 0,001$; ensayo de Dunnett). Además, el tratamiento con osteopontina a 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostró un efecto significativo, en verdad la latencia de estos grupos fue significativamente más pequeña que la del aplastamiento del nervio/ vehículo uno ($p = 0,017$; ensayo de Dunnett).

No hubo diferencia significativa entre los grupos de aplastamiento del nervio /vehículo y el aplastamiento del nervio /D-osteopontina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Duración del potencial de acción muscular del compuesto (figura 20):

Hubo una significativa diferencia de intergrupo en la duración del CMAP a través del estudio [F 6, 18) = 25,15 y $p < 0,001$; ANOVA de medición repetida](Figura 20).

Desde el D 7, se observó un aumento significativo de la duración del CMAP en los grupos de aplastamiento del nervio (grupo operado falso vs los grupos de aplastamiento del nervio : $p < 0,001$; ensayo de Dunnett). Además, el D 7 el aplastamiento del nervio/ osteopontina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mostró una duración significativamente más corta que la del aplastamiento del nervio / grupo vehicular ($p < 0,001$; ensayo de Dunnett).

El D 14 y el D 21, tres grupos presentaron una duración disminuida significativa en comparación con el aplastamiento del nervio /grupo vehicular : (a) aplastamiento del nervio/ osteopontina 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (b) aplastamiento del nervio/ osteopontina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (c) aplastamiento del nervio/ 4 metilcatecol 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Más aún, no se observó diferencia significativa entre los grupos de aplastamiento del nervio /vehículo y el aplastamiento del nervio /D-osteopontina 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Análisis morfométrico*Porcentaje de fibras degeneradas (Fig. 21):*

El análisis estadístico reveló una diferencia intergrupo significativa en el porcentaje de fibras degeneradas por campo ($p < 0,001$; ANOVA de una vía) (Fig. 22). Todos los grupos de aplastamiento del nervio mostraron un porcentaje aumentado significativo de fibras degeneradas ($p < 0,001$, ensayo de Dunnett). Además, los ratones con aplastamiento del nervio/ tratados presentaron un porcentaje significativamente inferior que el grupo de aplastamiento del nervio /vehículo ($p < 0,001$; ensayo de Dunnett). Además, el grupo tratado con D- osteopontina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) mostró un porcentaje más alto de fibras degeneradas que los grupos tratados con osteopontina ($p < 0,001$; ensayo de Dunnett).

Número total de fibras (Fig. 22):

Se observaron secciones usando un microscopio óptico y el análisis morfométrico se realizó con la ayuda del software Visiolab 2000 (Biocom, París, Francia). Se analizaron cinco secciones por animal, 2 campos por sección. Solo las fibras mielinizadas funcionales se registraron mediante la computadora (todas las fibras degeneradas que significa una degeneración de la vaina de la mielina no se registran).

Conclusiones

El modelo de aplastamiento del nervio, un modelo muy drástico de neuropatía periférica. Inmediatamente después del aplastamiento del nervio la mayoría de las fibras de diámetro grande se pierden, debido a la lesión mecánica, conduciendo a la fuerte disminución en la amplitud del CMAP. La latencia del CMAP no se ve inmediatamente afectada pero muestra un incremento a los 21 días debido a la degeneración adicional de fibras de diámetro pequeño por degeneración mediada inmune secundaria (macrófagos, granulocitos). La duración del CMAP aumenta el día 7, alcanza su pico el día 14 y vuelve a los niveles el día 21 los cuales son comparables con el punto de tiempo de 7 días. Esto se debe al hecho de que a los 21 días, las lesiones por aplastamiento permiten la regeneración, un proceso adicional de interés con relación a los estados neuropáticos. Este brote/regeneración axonal fue evidente además en los grupos control en el punto de tiempo de tres semanas.

La osteopontina mostró un efecto protector en el modelo de aplastamiento del nervio en ratones. Las funciones sensorimotrices se restauraron significativamente a los 7, 14 y 21 días posteriores a la lesión de una manera dependiente de la dosis y los estudios morfológicos realizados a los 21 días posteriores al aplastamiento muestran una disminución significativa en el porcentaje de degeneración de las fibras y un incremento en el número total de fibras. La OPN es tan efectiva como la molécula control usada en este estudio, la proteína OPN degenerada, inactivada por el calor y 4-metilcatecol no muestra un efecto significativo sobre los parámetros funcionales o histológicos. Este efecto positivo sobre la recuperación funcional e histológica puede deberse a los efectos de la OPN sobre:

- protección directa de las fibras a partir de la degeneración mediada inmune secundaria;
- remielinización acelerada y protección de axones;
- regeneración acelerada /brote de axones dañados;
- limpieza de restos de mielina aumentada por parte de los macrófagos.

5 1. **Referencias**

2. Abramsky, O. and Ovadia, H (1998) *Frontiers in Multiple Sclerosis, clinical research and therapy*. Martin Dunitz publisher, London.
3. Allschul S F et al., *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402, 1997.
- 10 4. Barres, B.A., and Raff, M.C. Axonal control of oligodendrocyte development. *Journal of Cell Biology* 147(6): 1123-8, 1999.
5. Barres, B.A., Schmid, R. Sendnter, M., and Raff, M.C. Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development* 118 (1): 283-95, 1993
6. Bjartmar, C., Yin, X., and Trapo, B.D. Axonal pathology in myellin disorders. *Journal of Neurocytology* 28:383-395, 1999.
- 15 7. Brighton, B and Hayden, MR: *S Afr Med J*. 1981 Feb 21; 59(8): 250.
8. Dal Canto, M.C., Melvoid, R.W., Kim, B.S., and Miller, S.D. Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc. Res. tTech*. 32(3): 215-29, 1995.
9. Derynk R. et al., *Nature* 285, 542-547, 1980
- 20 10. Devereux J et al, *Nucelic Acids Res.*, 12, 387-395, 1984.
11. Dubois-Dalcq, M., Feigenbaum, V., and Aubourg, P. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. *Trends in Neurosciences* 22(1): 4-12, 1999.
12. Dubois-Dalcq, M., and Murray, K. Why are growth factors important in oligodendrocyte physiology? *Pathol Biol (Paris)* 48(1): 80-6, 2000.
- 25 13. Fernández, P.A., Tang, D.G., Cheng., L., Prochianitz, A. Mudge, A.W., and Raff, M.C. Evidence that axone.derived neuregulina promotes oligodendrocyte survival in the developing rat optic nerve. *Neuron* 28(1): 81-90, 2000.
14. Franklin, R.J. and Hinks, G.L. Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *Journal of Neuroscience Research* 58(2): 207-13, 1999.
- 30 15. Grantham, *Science*, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).
16. Grinspan, J.B., Reeves, M.F., Coulaloglou, M.J., Nathanson, D.; and Pleasure, D. Re-entry into the cell cycle is required for bFGF-induced oligodendroglial dedifferentiation and survival. *Journal of Neuroscience Research* 46(4): 456-64, 1996.
- 35 17. Grinspan, J.B., Stern, J.L. Franceschini, B., and Pleasure, D. Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia: a mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage. *Journal of Neuroscience Research* 36(6): 672-80, 1993.
18. Hajihosseini, M. Tham, T.N. and Dubois-Dalcq, M. Origin of oligodendrocytes within the human spinal cord. *Journal of Neuroscience* 16(24): 7981-94, 1996.
- 40 19. Hartung, H.P., van der Meche, F.G./, Pollard, J.D (1998) Guillain-Barre syndrome, CIDP and other chronic immne-medaited neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 11, 497-513.
20. Hiremath, M.M., Salto, Y., Knapp, G.W., Ting, J.P., Suzuki, K., and Matsushima, G.K. Microglial/macrophage accumulation during Cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology* 92(1-2): 38-49, 1998.
21. Ichikawa H, Itoal T, Nishtani Y., Torii Y., Inoue K, Sugimoto T. *Brain Res* 2000 Apr 28; 863 (1-2): 276-61.
- 45 22. Jung, M., Kramer, E., Grzenkowski, M., Tang, K., Blakemore, W.F., Aguzzi, A., Khazaie, K., Chlichilia, K., von

- Blankenfeld, G., Kettenmann, H., and Trotter, J. Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. *European Journal of Neuroscience* 7(6): 1245-65, 1995.
- 5 23. Kiefer et al. The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.* 1989 Apr 25; 17(8): 3306.
24. Kon S., Maeda M. Segawa T. Hagiwara Y, Horikoshi Y, Chikuma S, Tanaka K, Rashid MM, Inobe M, Chambers AF, Uede T. (2000) Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms. *Journal of Cellular Biochemistry* 77(3): 487-98.
- 10 25. Kon S., Yokosaki Y, Maeda M, Segawa T, Horikoshi, Y, Tsukagoshi H., Rashid MM, Morimoto J, Inobe M, Shijubo N, Chambers AF, Uede T. (2002) Mapping of functional epitopes of osteopontin by monoclonal antibodies raised against defined internal sequences. *Journal of Cellular Biochemistry* 84(2): 420-32.
26. Kunicki, T.J., Annis, D.S., and Felding-Habermann, B. Molecular determinants of arg-gly-asp ligand specificity for β 3 integrins. *Journal of Biological Chemistry* 272(7): 4103-7, 1997.
- 15 27. Lee et al., Transient upregulation of osteopontin mRNA in hippocampus and striatum following global forebrain ischemia in rats. *Neurosci. Lett.*, 1999 Aug 20; 271 (2): 81-4.
28. Lipton, S.A., and Rosenberg, P.A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl J Med*, 330, 613-22.
29. Louis J.C., Magal E., Muir D., Manthorpe M., Varon S. (1992) CG-4 A new bipontial glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. *J. Neuroscience Research* 31, 193-204.
- 20 30. Lubetzki, C., Demerens, C., Anglade, P., Villarroya, H., Frankfurter, A., Lee, M.Y. and Zalc, B. Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 6820-6824, 1993.
31. Marchionni, M.A., Cannella, B., Hoban, C., Gao, Y.L., Garcia-Arenas, R., Lawson D., Happel, E., Noel, F., Tofilon, P., Gwynne, D., and Raine, C.S: Neuregulin in neuron/glia interactions I n the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocyte progenitor expansion, and enhances remyelination. *Advances in Experimental and Medical Biology* 468: 283-95, 1999.
- 25 32. Mark et al., (Mark D.F. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (18) 5662-5666, 1984).
33. Matthieu, J.M., Comte, V., Tomic, M., and Honegger, P. Myelin gene expression during demyelination and remyelination in aggregating brain cell cultures. *Journal of Neuroimmunology* 40(2-3): 231-4, 1992.
- 30 34. McDonald, J. W. Althomsons, S.P. , Hyrc., K. L. Choi, D. W., and Goldberg, M. P. (1998). Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainite receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med.*, 4, 291-7.
- 35 35. Morell, P., Barrett, C.V. Mason, J. L., Toews, A.D., Hoslettler, J. D., Knapp. G. W. and Matsushima, G. K. Gene expression in brain during Cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Molecular and Cellular Neurosciences* 12 (4/5): 220-227, 1998.
36. Nait-Oumesmar, B., Decaer, L., Lachapelle, F., Avellana-Adalid, V., Bachelin, C., and Van Evercooren, A.B. Progenitor cells of the adult Mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocyte after demyelination. *European Journal of Neuroscience* 11 (12): 4357-66, 1999.
- 40 37. Ng. W. P., Cartel, N., Roder, J., Roach, A., and Lozano, A. Human central nervous system myelin inhibits neurite outgrowth. *Brain Research* 720 (1-2): 17-24, 1996.
38. Noseworthy, J.H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399: A40-A47, 1999.
39. Oldberg et al., Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1986 Dec; 83(23): 88 19-23.
- 45 40. Pantoni, L., Garcia, J. H., and Gutierrez, J. A. (1996). Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*, 27, 1641-6.
41. Pearson W R., *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990
42. Pearson W R., and Lipman D. J., *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448, 1988.
43. Petry, K.G., Boullerne, A.I., Pousset, F., Brochet, B., Caille, J.M., and Dousset, V. Experimental allergic

- encephalomyelitis animal models for analyzing features of multiple sclerosis. *Pathol. Biol. (Paris)* 48(1): 47-53, 2000.
44. Pohlau, D., Aktas, O., Epplen, C. Hartung, H.P. Hoffmann, V. and Przuntek, H. (1998) Promoting remyelination as a future therapeutic principle in Multiple Sclerosis. *Nervenarzt*, 69, 841-850.
- 5 45. Prineas, J.W., Barnard, R.O., Kwon, E.E., Sharer, L.R., and Cho, E.S. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology* 33(2): 137-51, 1993.
46. Rodríguez-Peña, A. Oligodendrocyte development and thyroid hormona. *Journal of Neurobiology* 40(4): 497-512, 1999.
47. Rogister, B., Ben-Hur, T., and Dubois-Dalcq, M. From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences* 14 (4-5): 287-300, 1999.
- 10 48. Sahrbacher, U.C., Lechner, F., Eugster, H.P., Frei, K., Lassmann, H., and Fontana, A. Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology* 28(4): 1332-8, 1998.
49. Sayito Y, Kuratsu J, Takeshima H., Yamamoto S. Ushio Y. (1995) Expression of osteopontin in human glioma, correlation with the malignancy. *Laboratory Investigations*. 72(1): 55-63.
- 15 50. Scarlato, M., Beesley, J., and Pleasure, D. Analysis of oligodendroglial differentiation using cDNA arrays. *Journal of Neuroscience Research* 59(3): 430-5, 2000.
51. Scherer, S.S. Molecular genetics of demyelination: new wrinkles on an old membrana. *Neuron* 18: 13-16, 1997.
52. Scolding N., and Lassmann, H. Demyelination and remyelination. *Trends in Neurosciences* 19(1): 1-2, 1996.
53. Shaw, C.E., Milner, R., Compston, A.S., and French.constant, C. Analysis of integrina expression on oligodendrocytes during axo-glia interaction by using rat-mouse xenocultures. *Journal of Neurosciences* 16 (3): 1163-72, 1996.
- 20 54. Shin et al., Expression of osteopontin mRNA in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 1999 Oct 1; 273 (2): 73-6.
55. Shepard H. M. et al., *Nature*, 294, 563-565, 1981
56. Sodek J, Ganss B, McKee MD, *Crit Rev Oral Biol Med* 2000; 11 (3): 279-303.
- 25 57. Smith, P.K., Krohn, R. J., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gartner, F.H., Provenzano, MD., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M. Olson, B.J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
58. Smith and Waterman *J Mol Biol*, 147, 195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981.
59. Storch, M. K., Piddlesden, S.; Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan P., and Lassmann, H. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of Neurology* 43(4): 465-71, 1998.
- 30 60. Trojaborg W (1998) Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, and overview and an update. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, 107, 303-316.
61. Trotter, J. Bitter-Suermann, D., and Schachner, M. Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *Journal of Neurosciences Research* 22(4): 369-83, 1989.
- 35 62. Wiechelman, K., Braun, R. and Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231-237. The degenerated fibers and the normal fibers were counted.
- 40 63. Whitney, L.W., Becker, K. G., Tresser, N.J., Caballero-Ramos, C.I., Munson, P.J., Prabhu, V. V., Trent, J.M., McFarland, H. F., and Biddison, W.F., Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Annals of Neurology* 46(3): 425-8, 199.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Uso de osteopontina para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades desmielinizantes

<130> WO 473

<150> 01111296

<151> 2001-05-17

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 314

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ile Ala Val Ile Cys Phe Cys Leu Leu Gly Ile Thr Cys Ala
1 5 10 15

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Leu
20 25 30

Tyr Asn Lys Tyr Pro Asp Ala Val Ala Thr Trp Leu Asn Pro Asp Pro
35 40 45

Ser Gln Lys Gln Asn Leu Leu Ala Pro Gln Asn Ala Val Ser Ser Glu
50 55 60

Glu Thr Asn Asp Phe Lys Gln Glu Thr Leu Pro Ser Lys Ser Asn Glu
65 70 75 80

Ser His Asp His Met Asp Asp Met Asp Asp Glu Asp Asp Asp Asp His
85 90 95

Val Asp Ser Gln Asp Ser Ile Asp Ser Asn Asp Ser Asp Asp Val Asp

	195		200		205														
Thr	His	Ser	His	Lys	Gln	Ser	Arg	Leu	Tyr	Lys	Arg	Lys	Ala	Asn	Asp				
	210					215					220								
Glu	Ser	Asn	Glu	His	Ser	Asp	Val	Ile	Asp	Ser	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys				
225					230					235					240				
Val	Ser	Arg	Glu	Phe	His	Ser	His	Glu	Phe	His	Ser	His	Glu	Asp	Met				
				245					250					255					
Leu	Val	Val	Asp	Pro	Lys	Ser	Lys	Glu	Glu	Asp	Lys	His	Leu	Lys	Phe				
			260					265					270						
Arg	Ile	Ser	His	Glu	Leu	Asp	Ser	Ala	Ser	Ser	Glu	Val	Asn						
		275					280					285							

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4

agcctgcacc cagatcctat ag

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

gcgcaaggag attctgcttc t

21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de osteopontina para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica en la que la enfermedad neurológica se selecciona de un grupo que consiste de neuropatía periférica, neuropatía diabética y esclerosis múltiples (EM), y en la que la osteopontina se selecciona del grupo que consiste de:
- a) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 1;
- b) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 2;
- c) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 3;
- 10 d) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) a (c);
- e) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que cualquier cambio en la secuencia de aminoácido son sustituciones de aminoácidos conservadoras a las secuencias de aminoácidos en (a) a (c);
- f) una sal, isoforma, proteína fusionada, un derivado funcional, de cualquiera de (a) a (c),
- 15 en la que dicha muteína, sal, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, interactúa con α v-integrinas y/p con variantes CD44 de las isoformas v6-v10.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la osteopontina se fusiona a una molécula portadora, un péptido o una proteína que promueve el cruce de la barrera hematoencefálica.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la osteopontina es PEGilada.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que la proteína fusionada comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig)
- 20 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento además comprende un interferón para uso simultáneo, secuencial o separado.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el interferón es interferón β .
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la osteopontina se usa en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 a 10 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.
- 25 8. Uso de una molécula de ácido nucleico para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo que consiste de
- 30 a) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 1;
- b) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 2;
- c) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 3;
- d) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) a (c);
- 35 e) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que cualquier cambio en la secuencia de aminoácido son sustituciones de aminoácidos conservadoras a las secuencias de aminoácidos en (a) a (c);
- f) una isoforma de cualquiera de (a) a (c),
- 40 en la que la enfermedad neurológica se selecciona del grupo que consiste de neuropatía periférica, neuropatía diabética, y esclerosis múltiples (EM) y en la que dicha muteína o isoforma interactúa con α v-integrinas y/p con variantes CD44 de las isoformas v6-v10.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la molécula de ácido nucleico además comprende una secuencia del vector de expresión.
10. Uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para producir osteopontina en la producción de un

medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica en la que la enfermedad neurológica se selecciona de un grupo que consiste de neuropatía periférica, neuropatía diabética y esclerosis múltiples (EM), y en la que la osteopontina se selecciona del grupo que consiste de:

- a) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 1;
- 5 b) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 2;
- c) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 3;
- d) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) a (c);
- 10 e) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que cualquier cambio en la secuencia de aminoácido son sustituciones de aminoácidos conservadoras a las secuencias de aminoácidos en (a) a (c);
- f) una isoforma, proteína fusionada, un derivado funcional, de cualquiera de (a) a (c)

y en la que dicha muteína, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, interactúa con α v-integrinas y/p con variantes CD44 de las isoformas v6-v10.

- 15 11. Una composición farmacéutica que comprende osteopontina, y un interferón β , opcionalmente junto con uno o más excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico, para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurológica en la que la enfermedad neurológica se selecciona de un grupo que consiste de neuropatía periférica, neuropatía diabética y esclerosis múltiples (EM), y en la que la osteopontina se selecciona del grupo que consiste de:

- a) un polipéptido que comprende la SEC ID NO:
- 20 b) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 2;
- c) un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 3;
- d) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que la secuencia de aminoácidos tiene al menos 90% de identidad con al menos una de las secuencias en (a) a (c);
- 25 e) una muteína de cualquiera de (a) a (c) en la que cualquier cambio en la secuencia de aminoácido son sustituciones de aminoácidos conservadoras a las secuencias de aminoácidos en (a) a (c);
- f) una sal, isoforma, proteína fusionada, un derivado funcional, de cualquiera de (a) a (c)

y en la que dicha muteína, sal, isoforma, proteína fusionada, derivado funcional, interactúa con α v-integrinas y/p con variantes CD44 de las isoformas v6-v10.

30

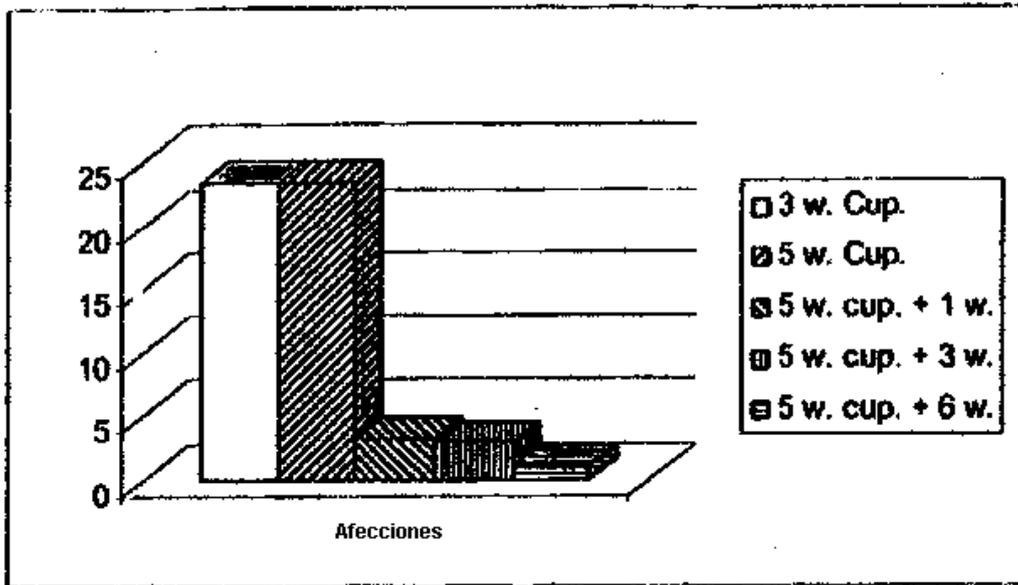


Fig. 1 A

Cerebello en desarrollo	osteop	MBP	PLP
C1	1	1	1
C2	2	2	2
C4	5	6	5
C5	9	6	4
C6	10	16	14
C8	9	?	?
C10	1	26	56
C12	1	32	111
C14	1	32	104
C20	2	26	137
CA	3	9	39

Fig. 1 B

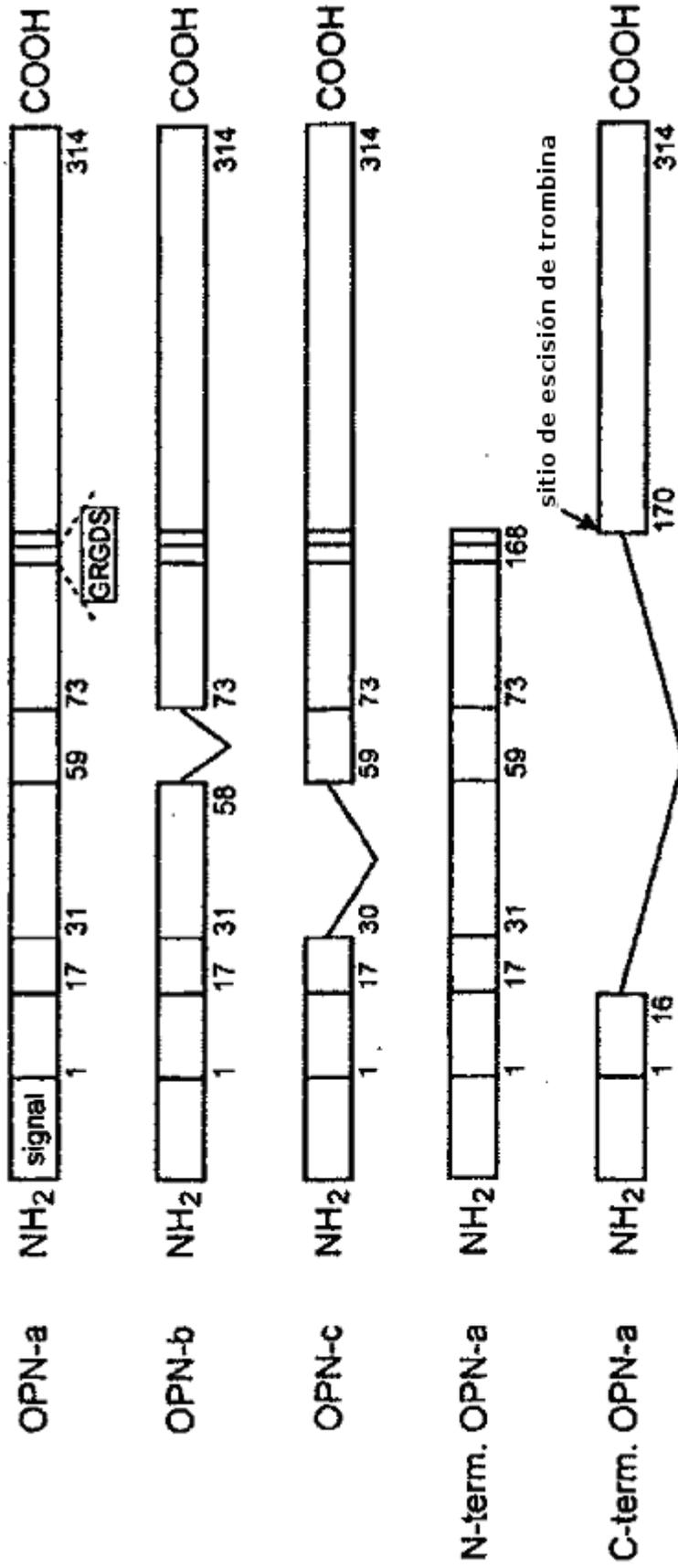


Fig. 2

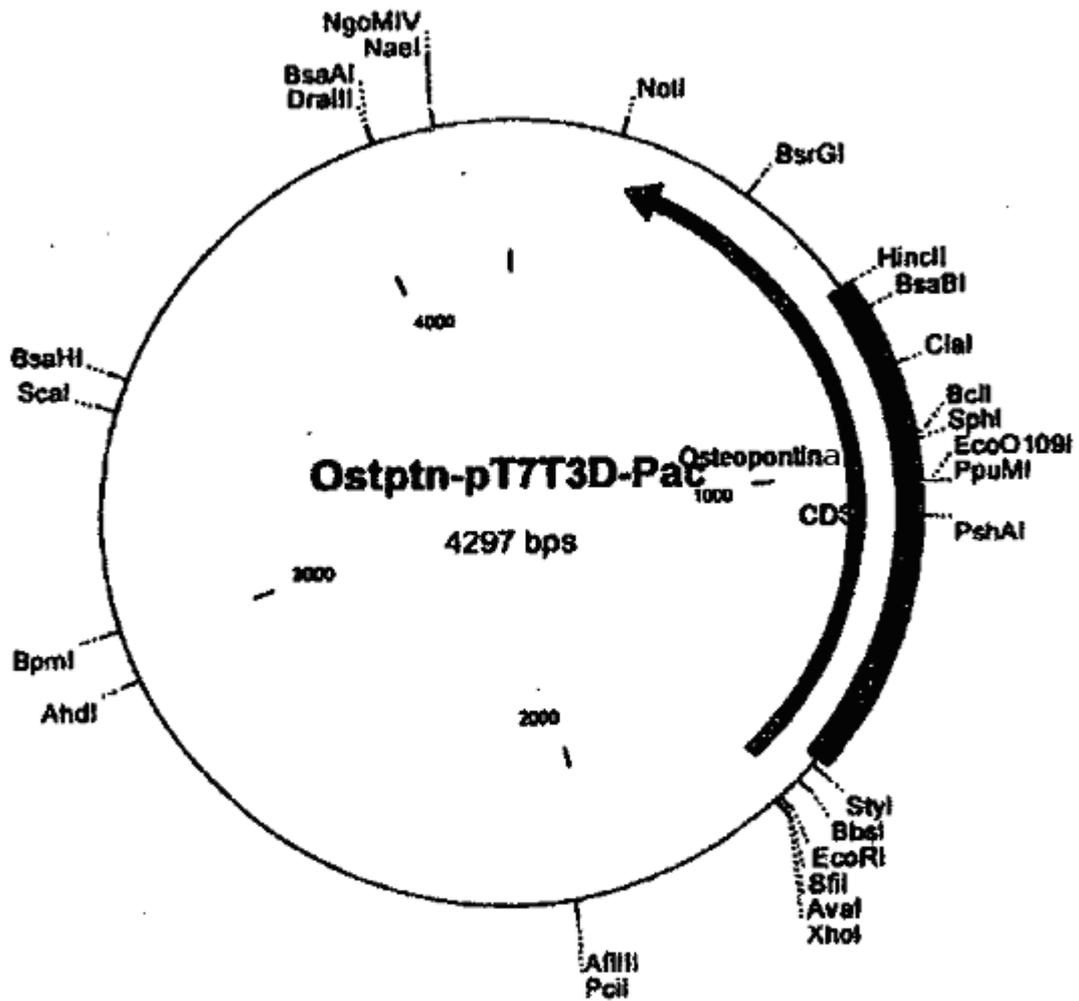


Fig. 3

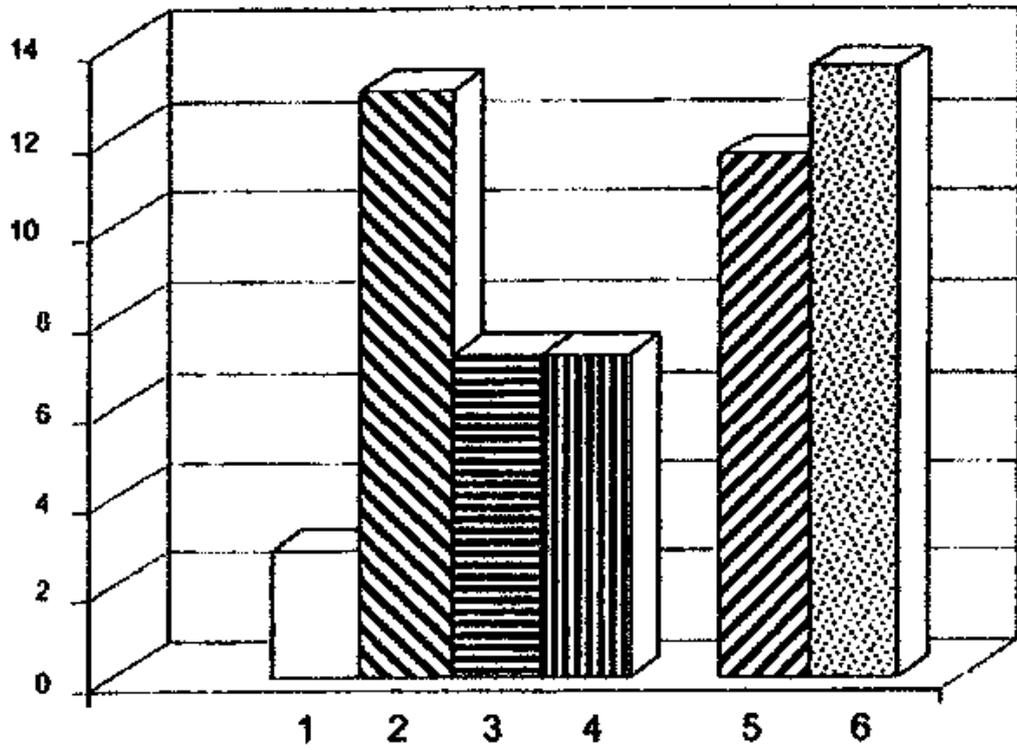


Fig. 4

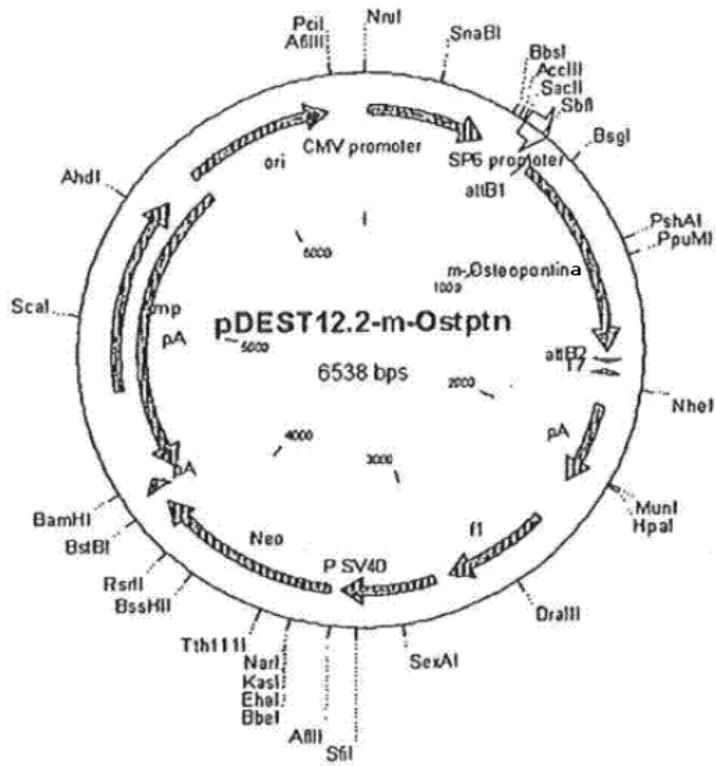


Fig. 5

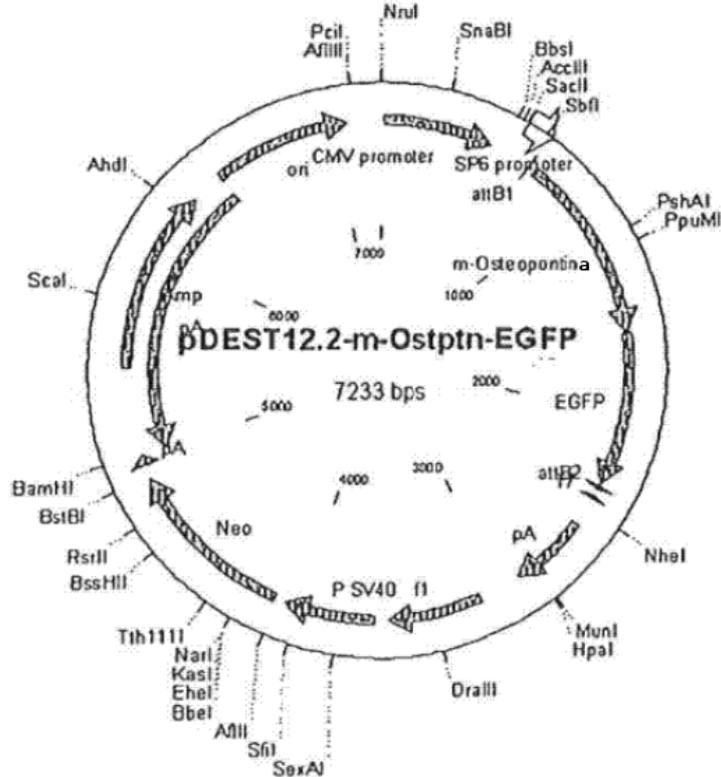


Fig. 6

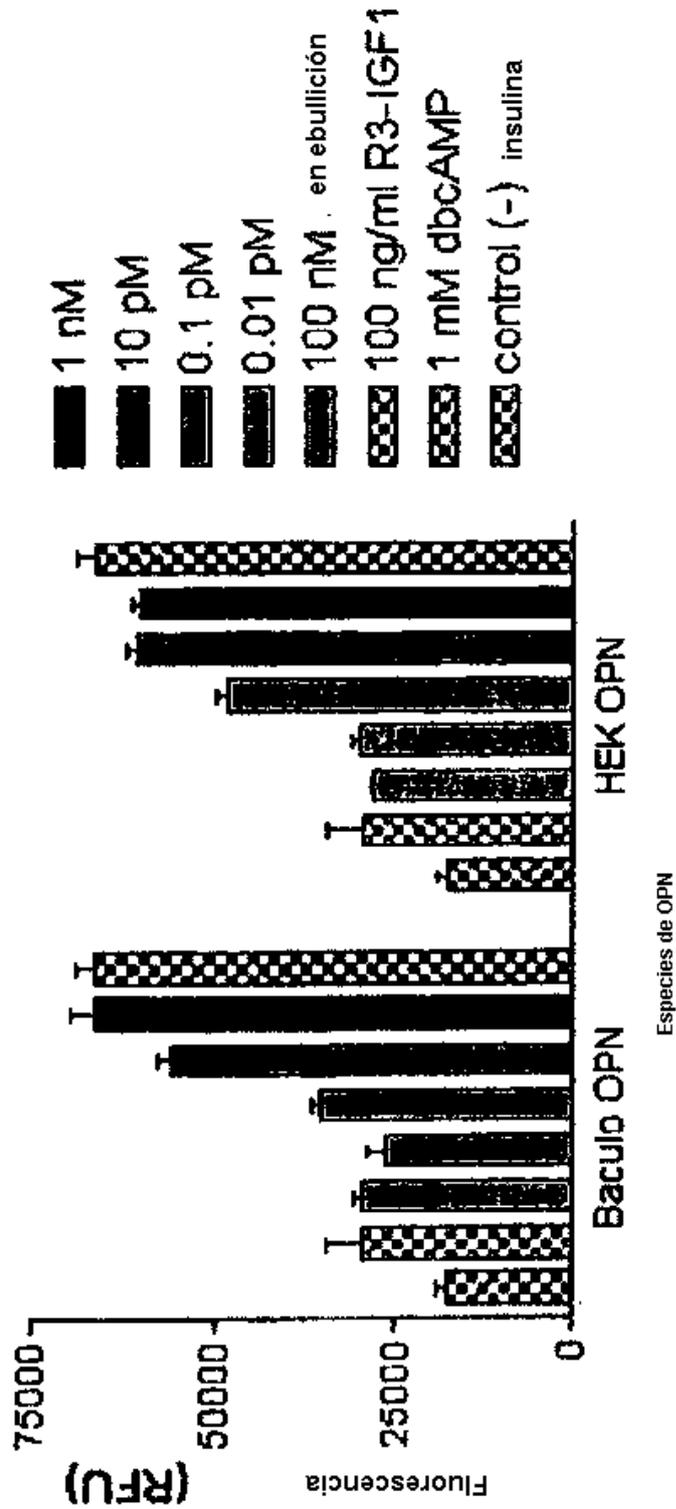


Fig. 8

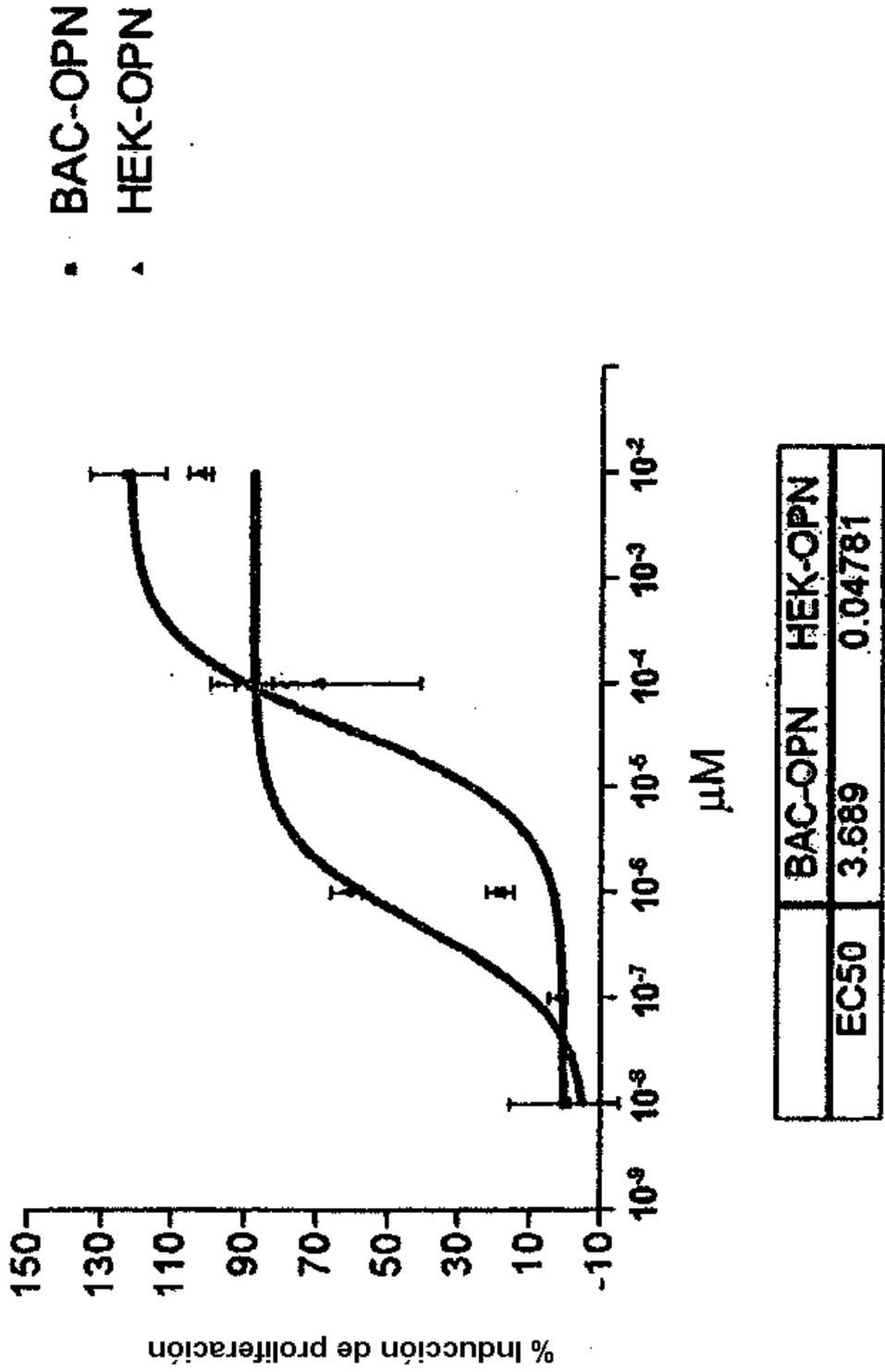


Fig. 9

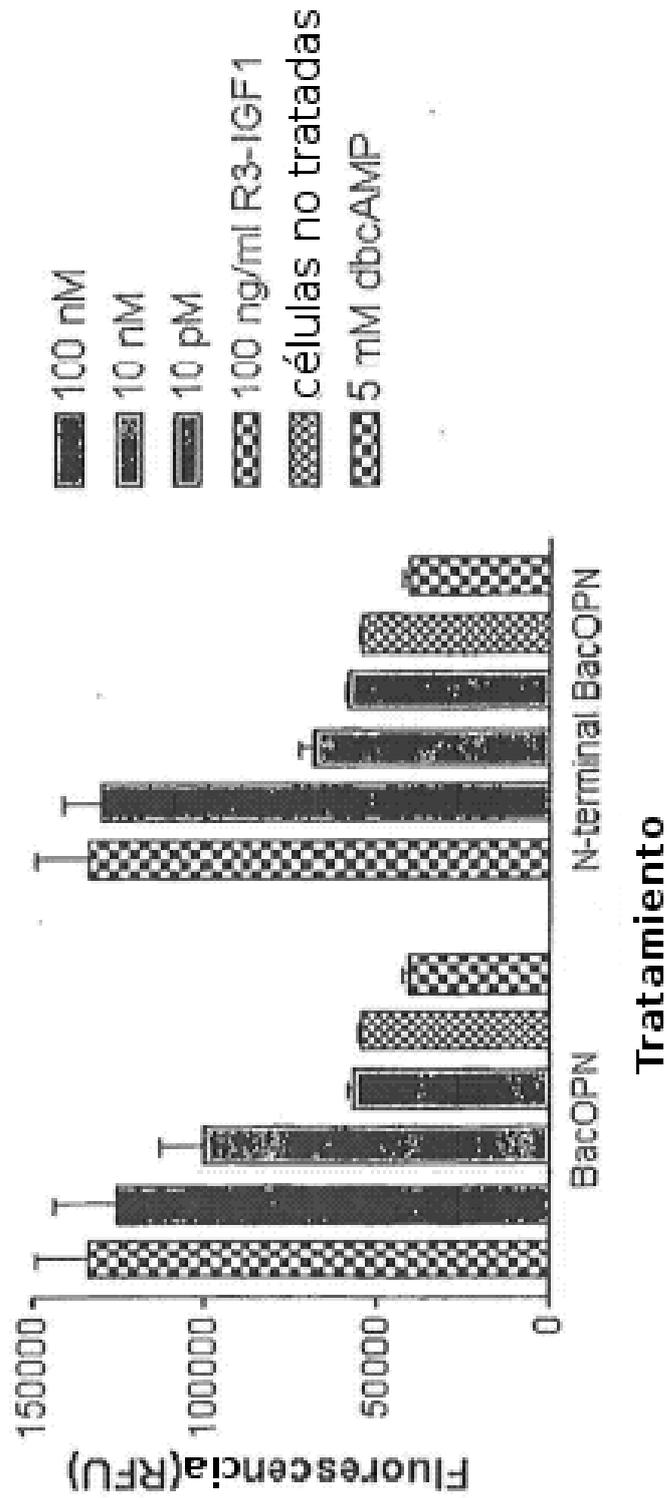


Fig. 10

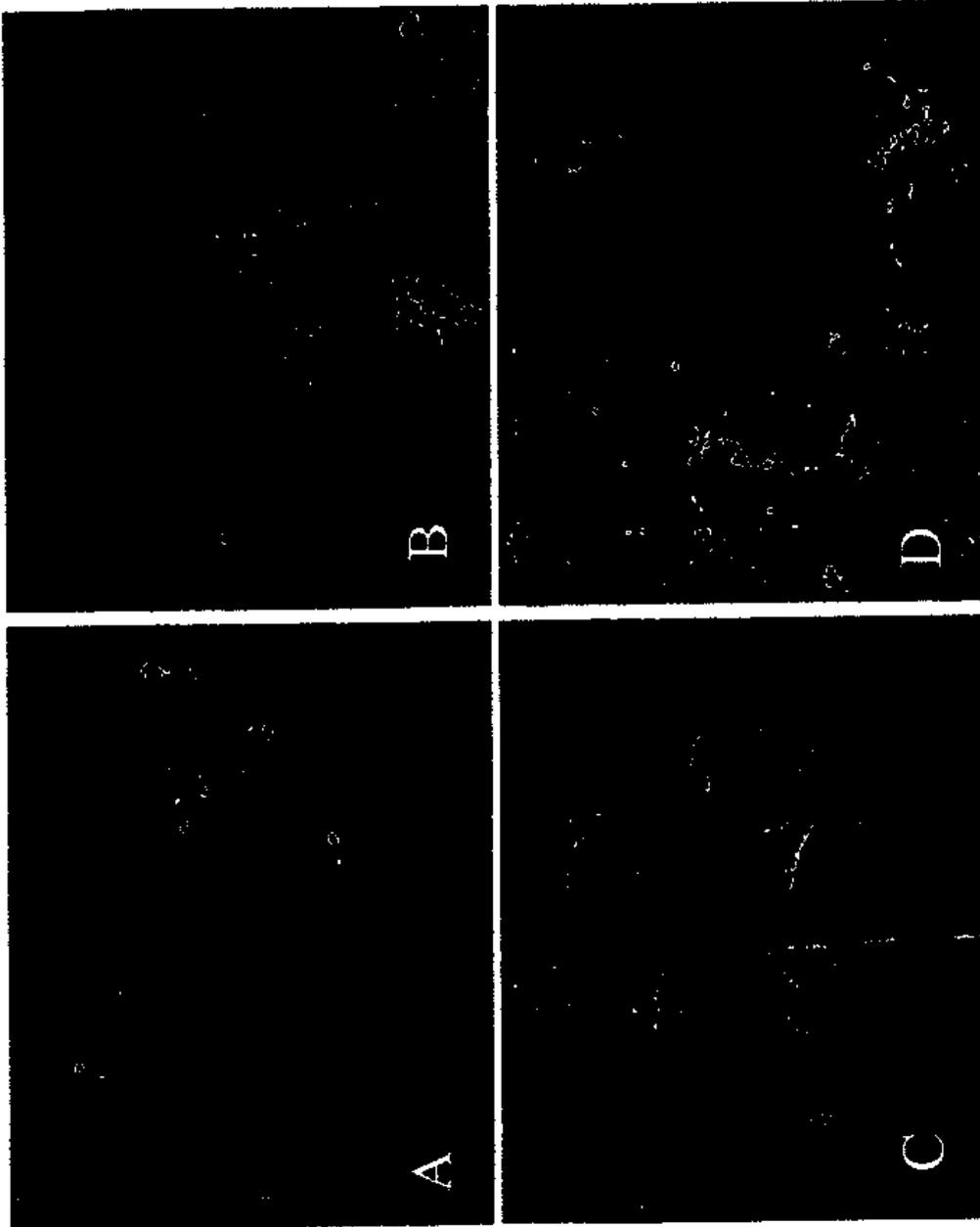


Fig. 11

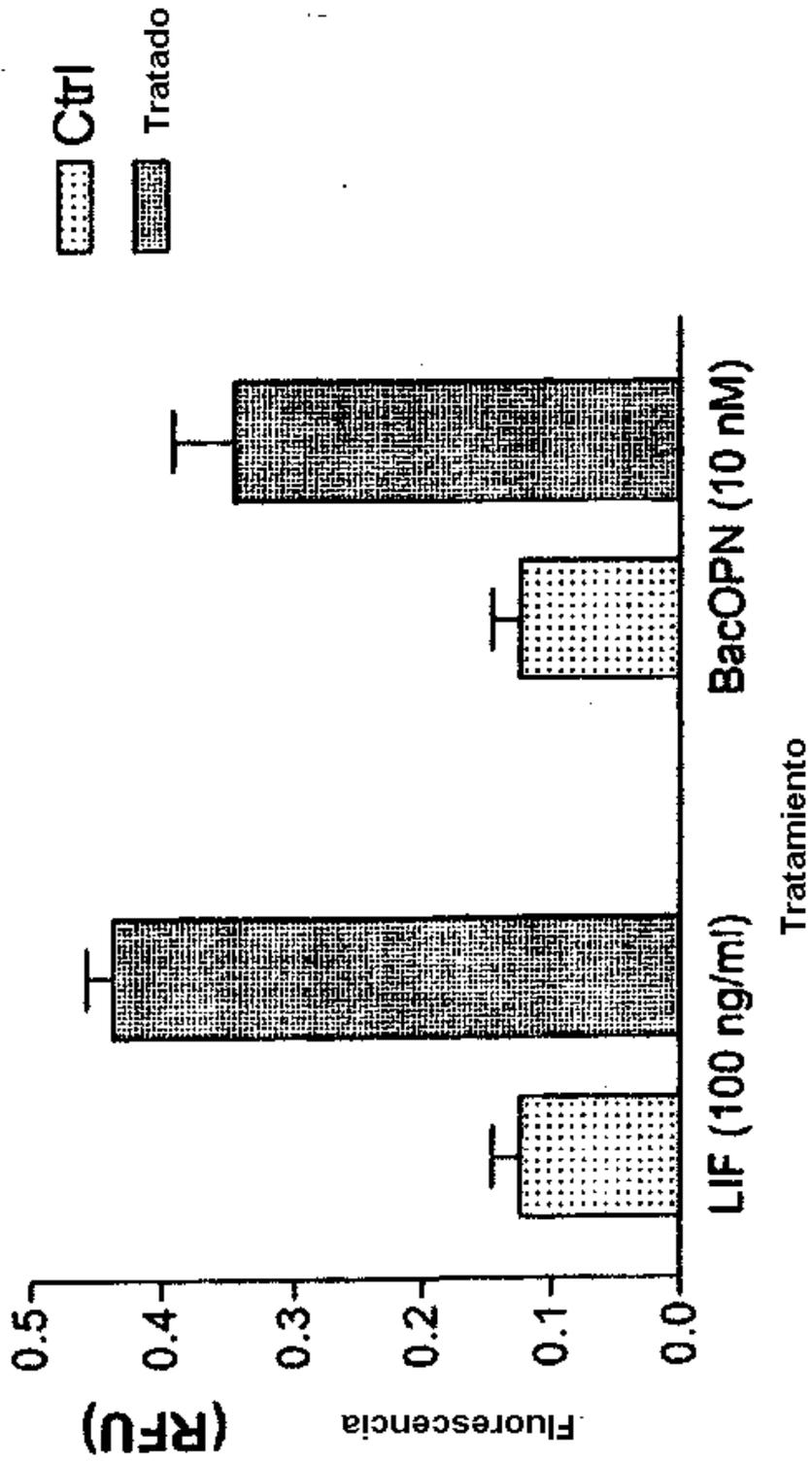


Fig. 12

	OPN E-coli	OPN Bac
10 pM	3.2%	6.1%
10 nM	5.4%	29.8%
100 nM	ND	14.8%
control	1.4%	1.4%

Fig. 13

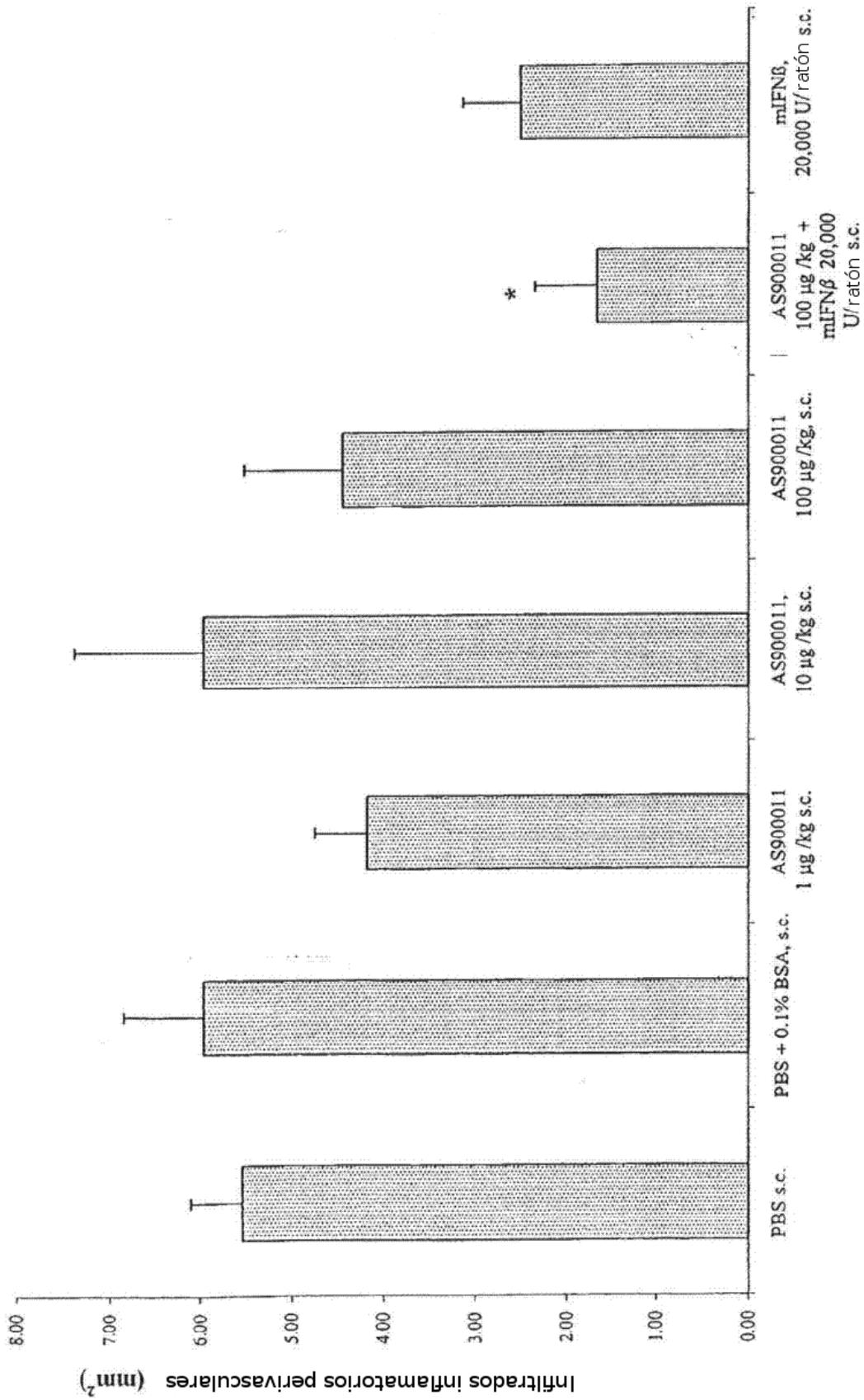


Fig. 14

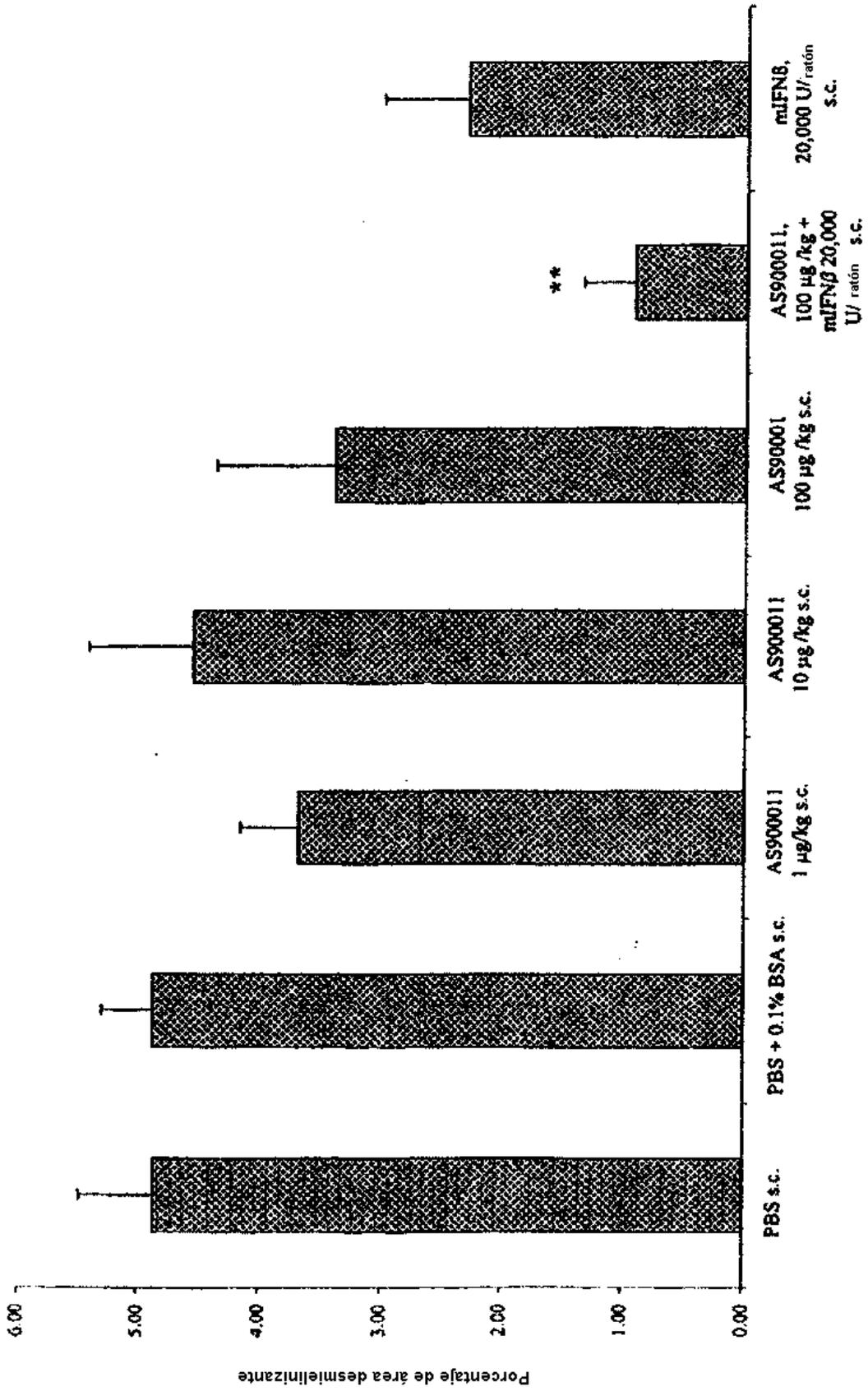


Fig. 15

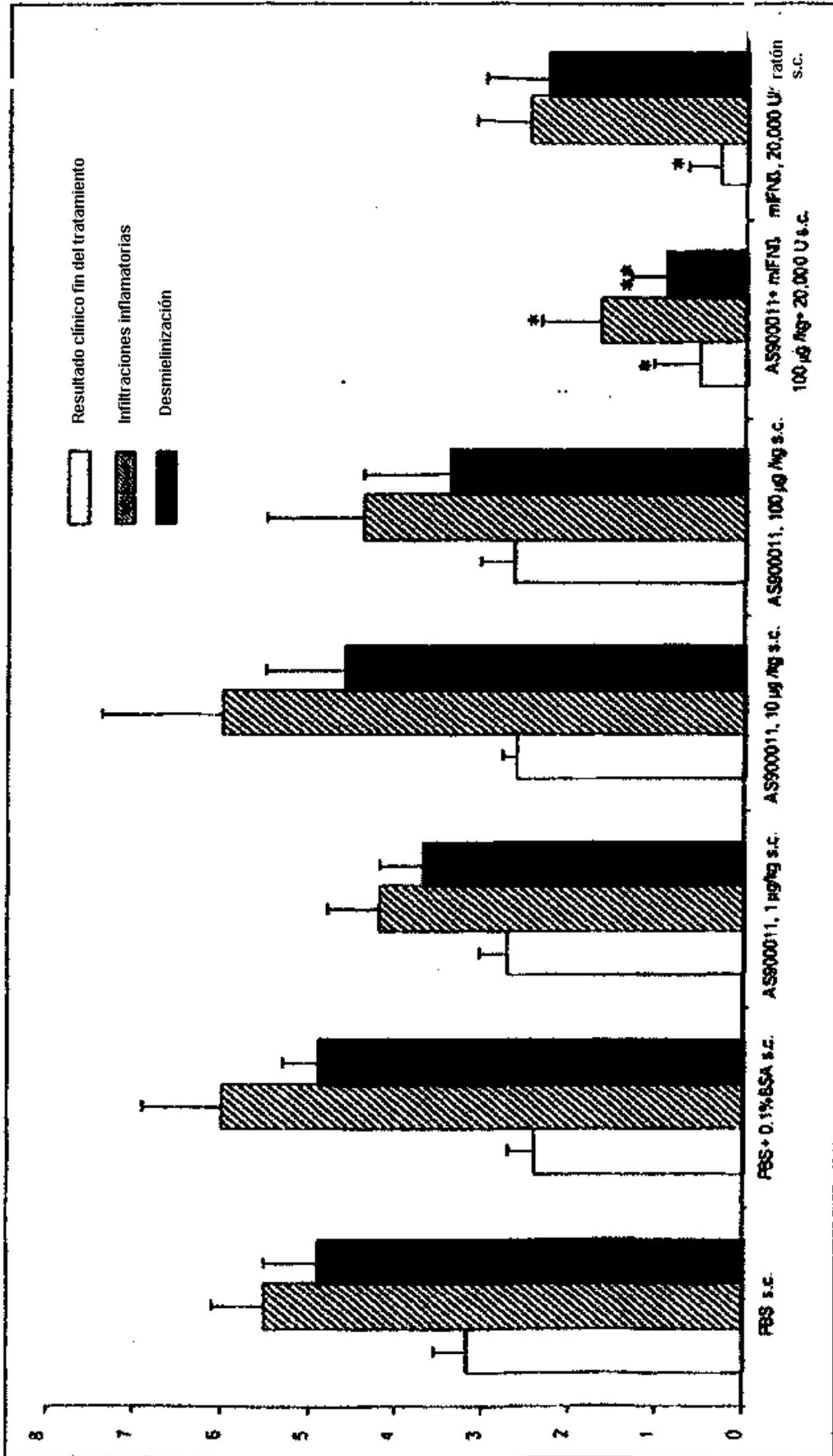


Fig. 16

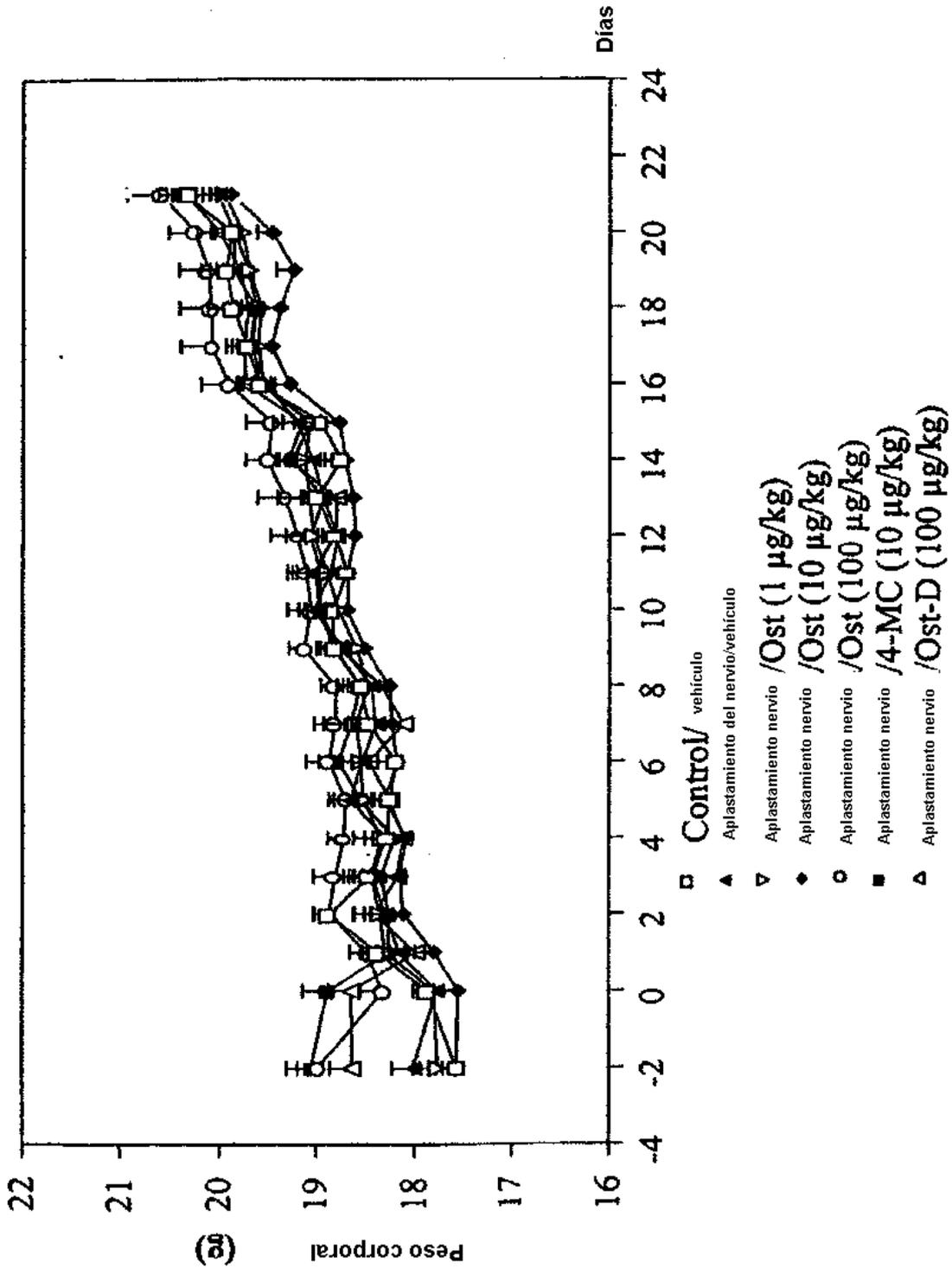


Fig. 17

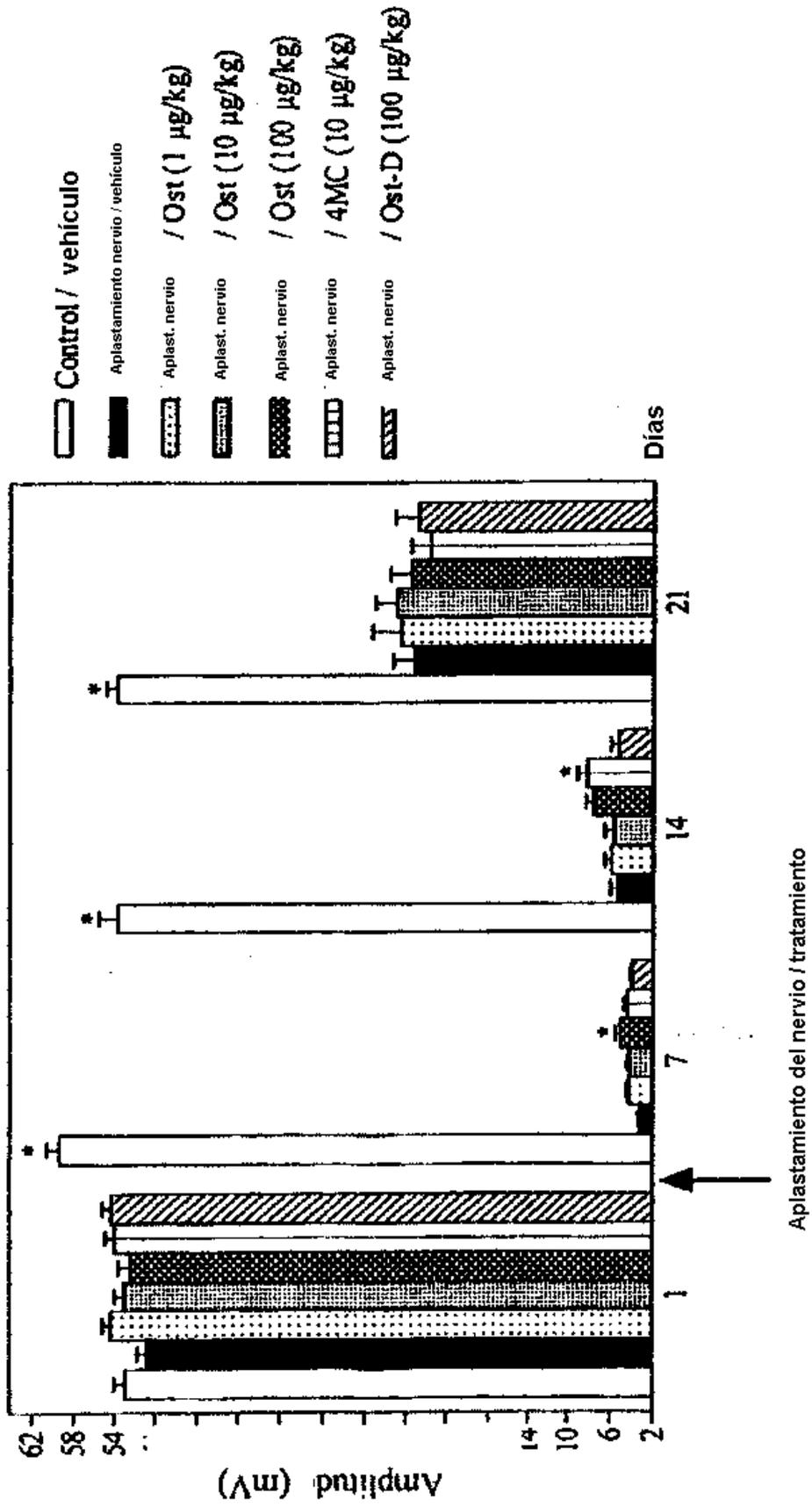


Fig. 18

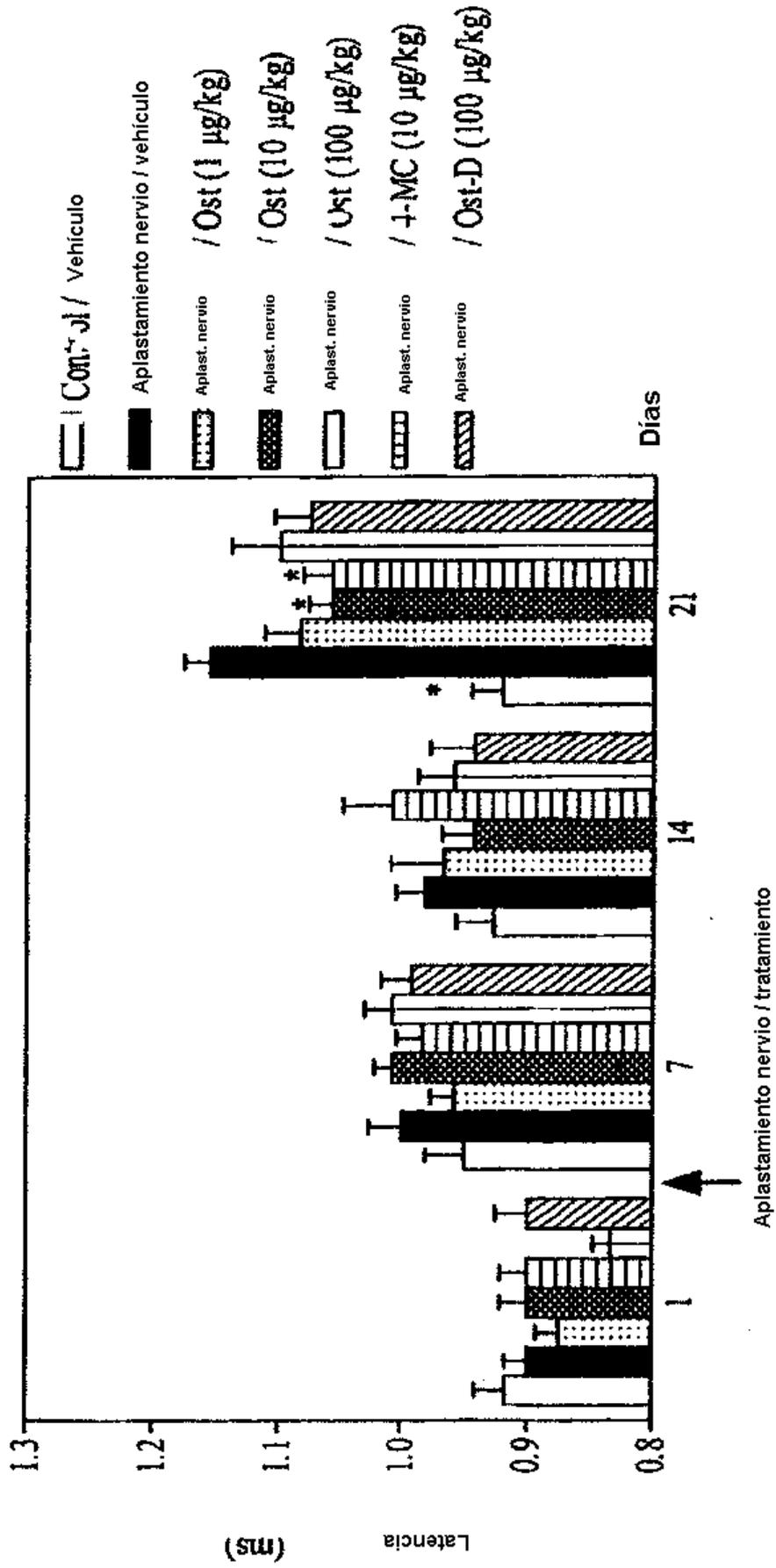


Fig. 19

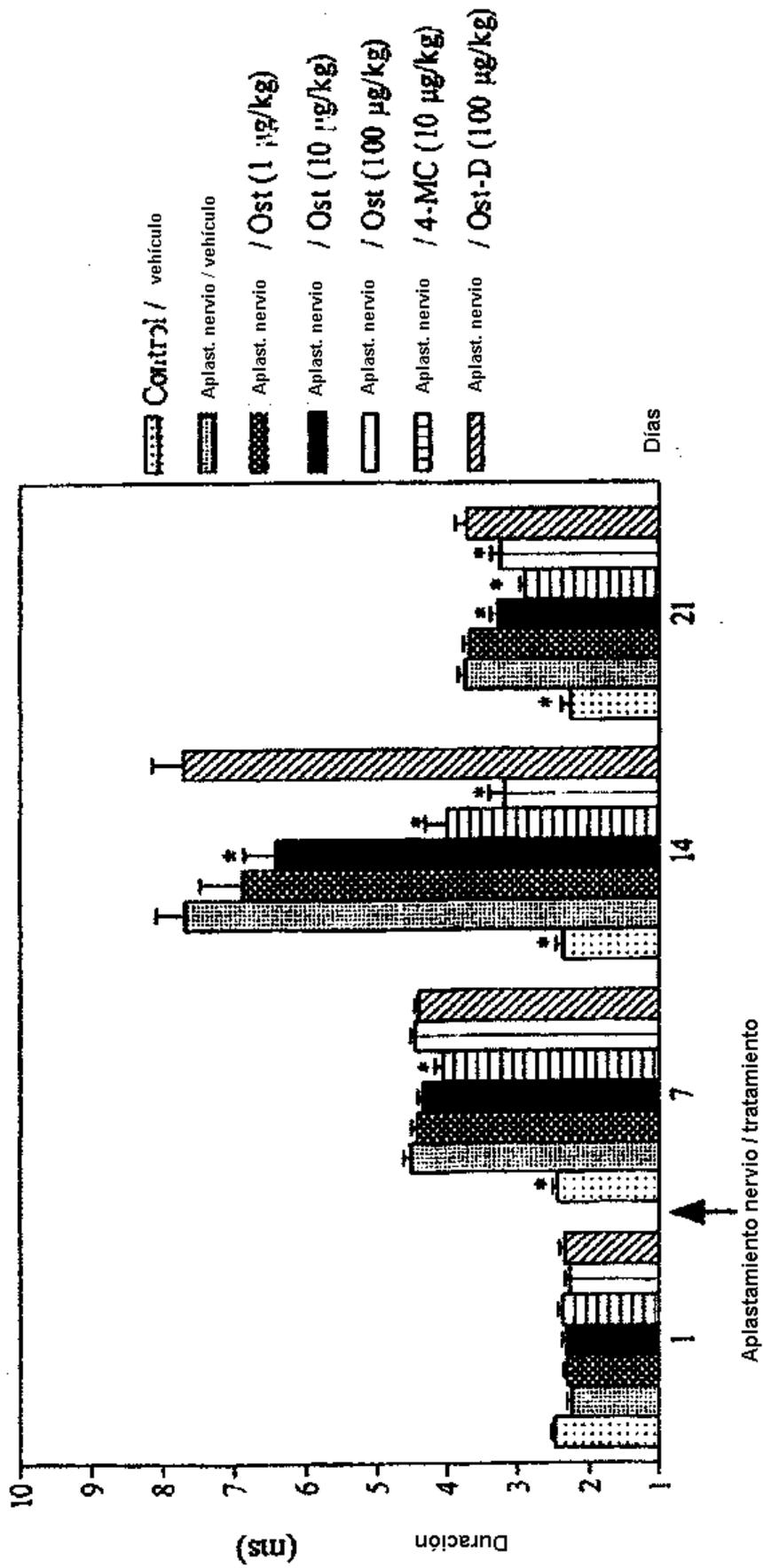


Fig. 20

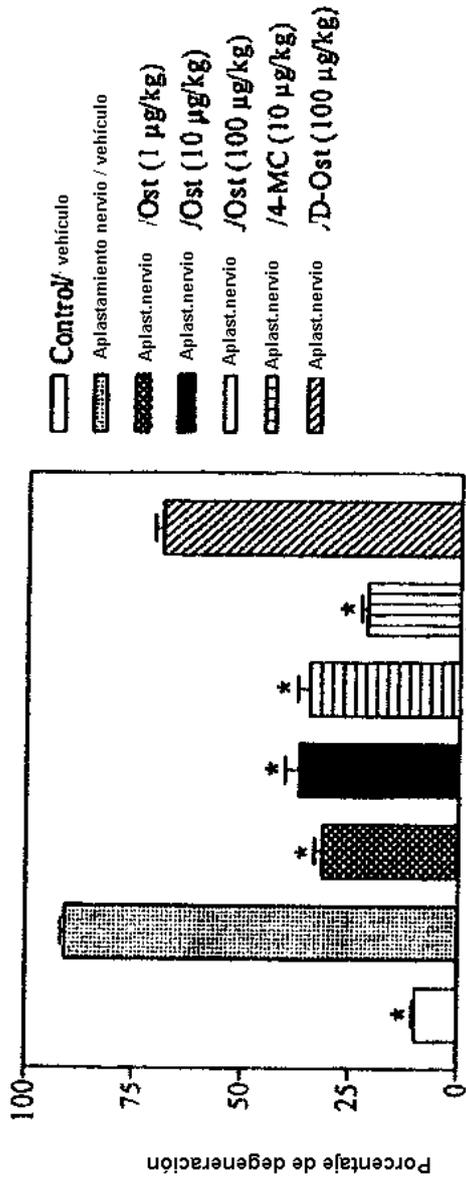


Fig. 21

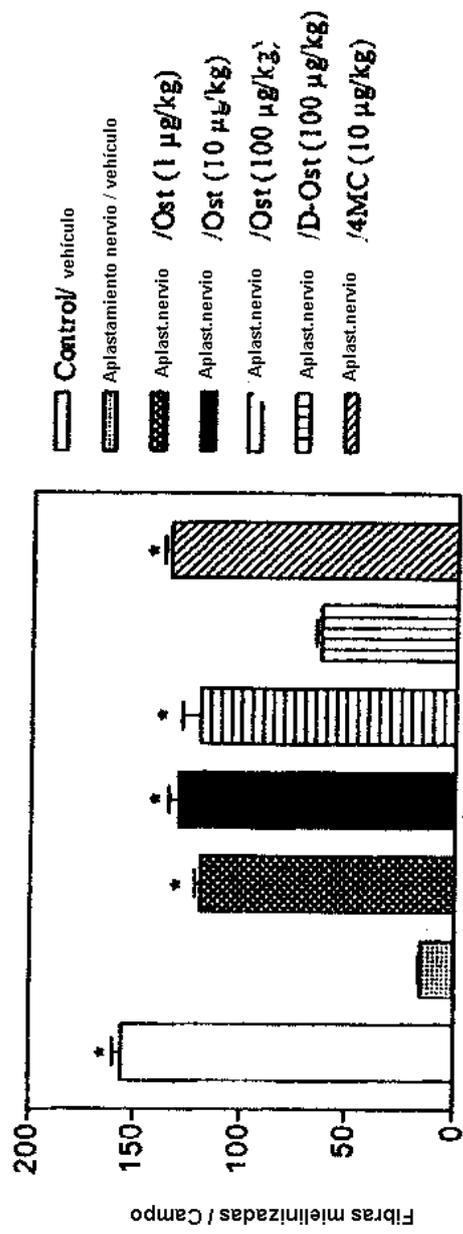


Fig. 22