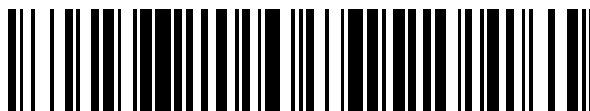


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 360**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2009** **PCT/CA2009/000074**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009** **WO09089635**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009** **E 09701647 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016** **EP 2249861**

54 Título: **Progranulina para su uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:

16.01.2008 US 11253

16.01.2008 US 11284

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.01.2017

73 Titular/es:

NEURODYN LIFE SCIENCES INC. (100.0%)
Suite 508 NRC-INH, 550 University Ave.
Charlottetown, P.E.I., C1A 4P3, CA

72 Inventor/es:

KAY, DENIS G.

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 596 360 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

Progranulina para su uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer

Campo de la invención

Esta invención se refiere a una composición que comprende polipéptido de progranulina o ácido nucleico de progranulina para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer.

Antecedentes y sumario

La progranulina (PGRN) es una proteína similar a factor de crecimiento que está implicada en la regulación de múltiples procesos incluyendo el desarrollo, la cicatrización de heridas, la angiogénesis, el crecimiento y mantenimiento de células neuronales y la inflamación. Se ha vinculado un aumento de la expresión de PGRN con el fomento de tumores. Adicionalmente, se ha mostrado la expresión alterada de PGRN en múltiples enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de las neuronas motoras y enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, estudios recientes en la etiología genética de enfermedades neurodegenerativas han mostrado que mutaciones heredables en el gen de PGRN pueden conducir a enfermedades neurodegenerativas de aparición en la vida adulta debido a una supervivencia neuronal reducida.

La muerte selectiva de células neuronales es el distintivo común de diversos trastornos neurodegenerativos. Se han vinculado formas esporádicas de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Lou Gehrig (esclerosis lateral amiotrófica (ELA)) a factores ambientales que provocan muerte de células neuronales mediante excitotoxicidad, estrés oxidativo, inhibición de partes de la cadena de transporte de electrones, perturbación de membrana celular y mitocondrial, alteraciones en orgánulos celulares, alteraciones en la cromatina, acción genotóxica general y específica, e inhibición y/o hiperactivación de efectores y receptores de proteínas de superficie celular. La bibliografía experimental y clínica respalda un posible papel de las excitotoxinas en algunas formas de neurodegeneración, particularmente ELA y enfermedad de Alzheimer. En particular, se han vinculado con ELA anomalías en la manipulación/transporte de glutamato y se ha mostrado que el ácido domoico, un agonista del receptor de cainato (es decir, un receptor de glutamato ionotrópico), es un factor causal en algunas formas de pérdida de memoria, de manera muy similar a lo notificado en enfermedad de Alzheimer. También se ha vinculado el estrés oxidativo con los mismos estados patológicos.

Las toxinas presentes en el entorno pueden desempeñar un papel en la patología de diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se ha identificado β -sitosterol- β -D-glucósido (BSSG) como toxina presente en la semilla de la palmera cíada (*Cycas circinalis*), históricamente un alimento básico de la dieta del pueblo chamorro de Guam. El consumo de semillas de cíadas se ha vinculado con el complejo parkinsonismo-demencia-ELA (CPD-ELA), un trastorno neurológico endémico de Guam. Estudios *in vivo* en los que ratones macho adultos consumen harina de semilla de cíada lavada como parte de su dieta han mostrado que los animales tratados tienen déficits conductuales motores, cognitivos y olfativos profundos y progresivos combinados con la pérdida de neuronas en cada uno de los subconjuntos neurales respectivos. La expresión de estos desenlaces refleja los déficits conductuales y patológicos en CPD-ELA. Experimentos *in vitro* usando fracciones de cíadas aisladas han identificado las probables neurotoxinas como moléculas de glucósido de esteroles variantes contenidas en harina de cíada lavada, específicamente BSSG y moléculas de glucósido de esteroles relacionadas.

Actualmente, no existe cura para ELA, enfermedad de Alzheimer (EA) o enfermedad de Parkinson. El tratamiento actual implica generalmente esfuerzos por parte de los médicos para ralentizar la progresión de los síntomas y hacer que los pacientes estén más cómodos. Aunque existen varios fármacos en desarrollo y un número limitado que están aprobados por la FDA para el tratamiento (riluzol, para ELA; L-dopa para enfermedad de Parkinson; potenciadores cognitivos, tales como Aricept, para EA) estos tratamientos sólo enmascaran la progresión de la enfermedad neurológica y pueden actuar para prolongar ligeramente las vidas de algunos pacientes. Por tanto, existe una necesidad importante de métodos y composiciones dirigidos al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

En una realización ilustrativa, se proporciona un método para tratar a un paciente con una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo el método las etapas de administrar al paciente una composición que comprende un polipéptido de progranulina, y reducir los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa en el paciente.

En la realización descrita anteriormente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente, la composición que comprende el polipéptido de progranulina puede estar adaptada para la administración parenteral, la vía de la administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en por vía

intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esterol, el glucósido de esterol puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, y el polipéptido de progranulina puede tener una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 2.

En otra realización ilustrativa, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de polipéptido de progranulina y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente.

En la realización descrita anteriormente, la composición puede estar adaptada para la administración parenteral, la vía de la administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esterol, el glucósido de esterol puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, la composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación parenteral, la forma de dosificación puede estar adaptada para la administración parenteral por una vía seleccionada del grupo que consiste en intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraventricular, intratecal, intracerebral e intracordal, y el polipéptido de progranulina puede tener una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 2.

En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente, comprendiendo el método las etapas de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de progranulina en el que la cantidad del péptido es eficaz para aumentar la supervivencia de células neuronales en un paciente con una enfermedad neurodegenerativa, y reducir la muerte de células neuronales en el paciente.

En la realización descrita anteriormente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, la cantidad del polipéptido de progranulina administrada al paciente puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente a aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente, la composición que comprende el polipéptido de progranulina puede estar adaptada para la administración parenteral, la vía de la administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esterol, el glucósido de esterol puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, y el polipéptido de progranulina puede ser un polipéptido en la que el polipéptido tiene una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 2.

En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para tratar un paciente con una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo el método las etapas de administrar al paciente una composición que comprende un efector que modifica la expresión de progranulina, y reducir los síntomas de la enfermedad neurodegenerativa en el paciente.

En la realización descrita anteriormente, la composición que comprende el efector puede estar adaptada para la administración parenteral, la vía de la administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal, la enfermedad neurodegenerativa puede

estar mediada por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esteroide, el glucósido de esteroide puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, el método puede comprender además la etapa de aumentar la expresión de progranulina en neuronas, el método puede comprender además la etapa de disminuir la expresión de progranulina en células no neuronales, y el efector puede ser un vector que comprende un ácido nucleico con una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1.

En otra realización ilustrativa, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un efector que modifica la expresión de progranulina y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa en un paciente.

En la realización descrita anteriormente, las cantidades terapéuticamente eficaces pueden comprender cantidades que pueden aumentar la expresión de progranulina en neuronas, las cantidades terapéuticamente eficaces pueden comprender cantidades que pueden disminuir la expresión de progranulina en células no neuronales, la composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación parenteral, la forma de dosificación puede estar adaptada para la administración parenteral por una vía seleccionada del grupo que consiste en intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraventricular, intratecal, intracerebral e intracordal, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esteroide, el glucósido de esteroide puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, la composición farmacéutica puede estar en una forma de dosificación parenteral, la forma de dosificación puede estar adaptada para la administración parenteral por una vía seleccionada del grupo que consiste en intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraventricular, intratecal, intracerebral e intracordal, y el efector puede ser un vector que comprende un ácido nucleico con una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1.

En otra realización ilustrativa, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente, comprendiendo el método las etapas de administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un efector que modifica la expresión de progranulina en el que la cantidad del efector es eficaz para aumentar la supervivencia de células neuronales en un paciente con una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental al paciente, y reducir la muerte de células neuronales en el paciente.

En la realización descrita anteriormente, la composición que comprende el efector puede estar adaptada para la administración parenteral, la vía de la administración parenteral puede seleccionarse del grupo que consiste en por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una agresión ambiental al paciente, el estado patológico neurodegenerativo puede estar mediado por una excitotoxina, la excitotoxina puede ser un glucósido de esteroide, el glucósido de esteroide puede seleccionarse del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos, la enfermedad neurodegenerativa puede seleccionarse del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson, la enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa puede ser esclerosis lateral amiotrófica, y el efector puede ser un vector que comprende un ácido nucleico con una homología de al menos el 95% con SEQ ID NO: 1.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una gráfica que indica una disminución progresiva en el reflejo de extensión de las piernas en ratones tras la exposición a esteril-glucósido (BSSG) sintético.

La figura 2 muestra una gráfica que indica una disminución progresiva en la actividad motora en campo abierto en ratones tras la exposición a esteril-glucósido (BSSG) sintético.

Las figuras 3A-D muestran gráficas que indican una pérdida progresiva de neuronas motoras en ratones tras 10 semanas de exposición a esteril-glucósido (BSSG) sintético. Tras la exposición a BSSG, se permitió que envejecieran los ratones durante 1 mes (paneles A-C) o 5 meses (panel D) con una dieta de comida normal antes del sacrificio. El panel A muestra la cuantificación de neuronas motoras en la médula lumbar tras tinción de Nissl e inmunohistoquímica de colina acetiltransferasa (ChAT). El panel B muestra la cuantificación de caspasa-3 activada en la médula espinal lumbar tras detección mediante inmunohistoquímica (asta anterior). El panel C muestra la

cuantificación de neuronas en la corteza motora tras detección mediante inmunohistoquímica frente a CTIP2 (altamente expresada en neuronas motoras corticoespinales). El panel D muestra la cuantificación de neuronas motoras en la médula lumbar tras tinción de Nissl.

5 La figura 4 muestra la hibridación *in situ* (ISH) para detectar la expresión de progranulina en el tronco encefálico de un ratón normal (aumento original 10X). Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido. Panel B: ISH usando ribosondas sentido.

La figura 5 muestra la hibridación *in situ* (ISH) para detectar la expresión de progranulina en el tronco encefálico de un ratón normal a gran aumento (aumento original 40X). Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido. Panel B: ISH usando ribosondas sentido.

10 La figura 6 muestra la hibridación *in situ* (ISH) para detectar la expresión de progranulina en células del asta anterior de la médula espinal de un ratón normal (aumento original 40X). Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido. Panel B: ISH usando ribosondas antisentido.

15 La figura 7 muestra la hibridación *in situ* (ISH) que indica la disminución de la expresión de progranulina en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada lavada (aumento original 10X). Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la corteza motora de ratones alimentados con comida normal. Panel B: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada. Panel C: ISH usando ribosondas sentido en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada.

20 La figura 8 muestra la hibridación *in situ* (ISH) que indica la disminución de la expresión de progranulina en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada lavada (aumento original 40X). Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la corteza motora de ratones alimentados con comida normal. Panel B: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada. Panel C: ISH usando ribosondas sentido en la corteza motora de ratones alimentados con harina de cícada.

25 La figura 9 muestra la hibridación *in situ* (ISH) que indica que la exposición a BSSG sintético da como resultado la disminución de la expresión de progranulina en las células del asta anterior de la médula espinal cervical de ratones. Panel A: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la médula espinal cervical de ratones alimentados con comida normal. Panel B: ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la médula espinal cervical de ratones alimentados con 1000 µg/día de BSSG. Panel C: ISH usando ribosondas sentido en la médula espinal cervical de ratones alimentados con comida normal (aumento original 10X).

30 La figura 10 muestra la hibridación *in situ* (ISH) que indica que el aumento de la exposición a BSSG en ratones da como resultado neuropatología y pérdida de la expresión de progranulina más pronunciadas en las células del asta anterior de la médula espinal cervical. Los paneles A, B, y C muestran ISH usando ribosondas específicas de progranulina, antisentido en la médula espinal cervical de ratones alimentados con 10, 100 y 1000 µg/día de BSSG, respectivamente (aumento original 40X).

La figura 11 muestra que un silenciamiento de la expresión de progranulina en pez cebra conduce a las manifestaciones morfológicas de dismorfogénesis craneofacial, edema pericárdico y distensión intestinal visceral.

40 La figura 12 muestra progranulina expresada por neuronas heterogéneas *in vitro*. Se derivaron cultivos neuronales primarios de una médula espinal embrionaria de ratón E13. Inmunolocalización de núcleos (DAPI; panel A), neurofilamento no fosforilado usando SMI32 (panel B) y progranulina de ratón (panel C). Se identificaron neuronas motoras primarias que expresan progranulina basándose en el tamaño de cuerpo celular e inmunorreactividad con SMI32 (paneles B-D). Se encontró progranulina en la totalidad de las neuronas motoras excepto por el núcleo. (Panel D) Canales fusionados de los tres fluoróforos. La barra de escala representa 20 µm.

45 La figura 13 muestra progranulina expresada por neuronas motoras de ratón *in vivo*. Se examinaron las neuronas motoras dentro de la médula espinal lumbar de ratones CD-1 de 8 semanas de edad. Inmunofluorescencia de la parte de asta posterior de la médula lumbar para DAPI (panel A), neurofilamento no fosforilado usando el anticuerpo SMI32 (panel B) y progranulina (panel C). (Panel D) Canales fusionados de los tres fluoróforos. La barra de escala representa 30 µm.

50 La figura 14 muestra la sobreexpresión de progranulina que da como resultado supervivencia celular en medio libre de suero. Se cultivaron células NSC34 no transfectadas (primera barra), transfectantes sólo de vector estable (NSC34-pcDNA; barra central) y células que sobreexpresan progranulina estables (NSC34-pcDNA-Pgrn; última barra) en medio RPMI libre de suero. (Panel A). Se determinaron recuentos de células promedio por campo (aumento 10x) a intervalos de tres días mediante microscopía de contraste de fase durante quince días. Las células que sobreexpresan progranulina demuestran un aumento de supervivencia en comparación con controles (los asteriscos indican $P < 0,005$). (Panel B) Ensayo de proliferación celular basado en la incorporación de BrdU durante 12 horas tras el cultivo durante 6 días en medio libre de suero. La sobreexpresión de progranulina (segunda barra) durante la privación de suero no aumenta significativamente las tasas de proliferación celular ($P > 0,1$). (Panel C).

Ensayo de apoptosis basado en el método de marcaje TUNEL tras 6 días en medio libre de suero. La sobreexpresión de progranulina (segunda barra) durante la privación de suero protege frente a la apoptosis (los asteriscos indican $P < 0,0001$, prueba de la *t* de Student de dos colas).

La figura 15 muestra que la progranulina es un factor trófico clave para la supervivencia celular durante hipoxia crónica. Se transfectó de manera estable la línea celular NSC34 con vector sólo (pcDNA; primera barra) o progranulina humana (pcDNA-Pgm; segunda barra). Se cultivaron las células en medio libre de suero o suero al 5% dentro de una atmósfera que consistía en oxígeno al 1% (tensión de oxígeno reducida del 80%) durante 72 horas y se contaron las células restantes usando un hemocitómetro (los asteriscos indican $P < 0,0001$).

La figura 16 muestra que la sobreexpresión de progranulina da como resultado la búsqueda de rutas neuronales dinámicas y supervivencia celular en células NSC34. (Paneles A-C) Microscopía de contraste de fase de células NSC34 transfectadas de manera estable con pcDNA3.1/Pgm. (Paneles A y B) Micrografías de contraste de fase de transcurso temporal a lo largo de un único periodo de 3 horas que demuestran extensión activa (flecha), retracción (punta de flecha) y reordenaciones macroscópicas (asteriscos) de procesos neuríticos, tras el mantenimiento de los cultivos en medio libre de suero durante 20 días. (Panel C) Supervivencia continuada y mantenimiento de una morfología de tipo neural tras 57 días en medio libre de suero.

La figura 17 muestra que la sobreexpresión de progranulina da como resultado el desarrollo de morfología neuronal en células NSC-34. Imágenes de inmunofluorescencia de núcleos [DAPI] (paneles A, E, y I), actina F [tinción con faloidina] (paneles B, F, y J), IHC de progranulina (paneles C, G, y H) y fusionados [nuclear/actina/progranulina] (paneles D, H, y L). Se representan células NSC-34 de control no transfectadas (paneles A-D), células NSC-34 transfectadas de manera simulada (paneles E-H) y células que sobreexpresan progranulina (paneles I-H). Obsérvese el citoplasma más extenso con extensiones de proceso en las células que sobreexpresan progranulina (paneles J-L). Aumento original 43x.

La figura 18 muestra la expresión de progranulina tras estrés neuronal agudo. En el día 3 tras la axotomía, se observa abundante inmunorreactividad con progranulina dentro de neuronas motoras con muy poca evidencia de tinción no neuronal (panel A). El patrón de inmunotinción es punteado y distribuido de manera difusa en la totalidad del citosol (panel C). En el día 7, en cambio, la inmunotinción se observa ahora intensamente en los microglíocitos (panel B), mientras que las neuronas motoras están desprovistas de tinción con progranulina (panel D).

La figura 19 muestra el efecto protector de progranulina frente a la neurotoxina MPTP en células PC-12.

La figura 20 muestra el análisis inmunohistoquímico de la carga de amiloide tras la administración intracerebral de vector viral de o bien GFP o bien PGRN en ratones Tg2576 de edad avanzada. El panel A muestra microfotografías representativas que presentan secciones frontales a través del hipocampo sometido a inmunotinción para detectar β -amiloide (AB), tras tratamiento con o bien GFP lentiviral o bien PGRN lentiviral. El panel B muestra la evaluación cuantitativa de cambios en la carga de $A\beta$. En animales que recibieron PGRN lentiviral, fue evidente una reducción significativa en la carga de amiloide en el hipocampo ipsilateral ($F_{2,47} = 5,86621$, $p < 0,0095$, efecto principal del tratamiento). Cada barra representa el área (μm^2) media ($\pm$ E.E.M.) ($n = 8$) ocupada por inmunomarcaje de amiloide, tal como se mide en 3 secciones a través del hipocampo (** dif. sig. con respecto al control de GFP lentiviral, $p < 0,001$)(dif. + sig. con respecto al hemisferio contralateral, $p < 0,05$).

La figura 21 muestra el análisis inmunohistoquímico de los efectos de MPTP sobre los recuentos de células TH^+ tras la administración intracerebral de vector viral de o bien GFP lentiviral (LV) o bien PGRN lentiviral. El panel A muestra microfotografías de fluorescencia representativas que presentan secciones frontales a través de la SNc sometida a inmunotinción para detectar TH, tras intoxicación por MPTP. El panel B muestra la evaluación cuantitativa de recuentos de células TH^+ en la SNc. En animales que recibieron LV-GFP, la exposición a MPTP dio como resultado una reducción significativa de los recuentos de células TH^+ (prueba de la *t* de Student, $p = 0,0041$), aunque no se observó una pérdida de células significativa en aquellos animales que recibieron LV-PGRN ($p = 0,64$). Cada barra representa el número medio ($\pm$ E.E.M.) ($n = 4-6$) de células TH^+ medido en 3 secciones a través de la SNc (** dif. sig. con respecto al controles tratados con vehículo, $p < 0,001$).

La figura 22 muestra la línea celular de neuronas motoras inmortalizadas (NSC-34) incubada con grn F y grn D o bien con proliferación/supervivencia (grn F) o bien sin efecto (grn D).

La figura 23 muestra la supervivencia de Tg2576 tras la administración intracerebral de lentivirus que expresan o bien GFP o bien PGRN.

La figura 24 muestra recuentos de neuronas motoras espinales y actividad colina acetiltransferasa en ratones tratados con lentivirus que expresan PGRN. El panel (A) muestra recuentos de neuronas motoras evaluados mediante tinción de Nissl. El panel B muestra la evaluación inmunohistoquímica de actividad colina acetiltransferasa (ChAT) en células del asta anterior de ratones expuestos a BSSG tratados con solución salina con relación a todos los demás grupos de tratamiento (paneles de la parte superior derecha de (B)). las imágenes en (B) son representativas y se toman de astas anteriores tanto a la izquierda como a la derecha (aumento inicial 100x). El panel C muestra neuronas motoras positivas para ChAT en ratones control (tratados con solución salina) y

expuestos a BSSG.

La figura 25 muestra beta-sitosteril-glucósido (ng/ml) representado gráficamente frente a la absorbancia de MTT para células NSC-34 normales y un transfectante estable que sobreexpresa progranulina humana (NSC-34 hPGRN). Se sembraron las células en placa a 8.000 células/pocillo y se mantuvieron en DMEM - FCS al 5% durante 72 horas en presencia de diversas concentraciones de BSSG. Como control negativo para la proliferación/supervivencia celular se cultivaron una serie de pocillos sin BSSG o suero. Se ilustran las barras de error estándar junto con los valores de P de <0,05 (*) o <0,001 (**).

La figura 26 muestra hPRRN (100 ng/ml) representada gráficamente frente a la absorbancia. La proteína progranulina (PGRN) recombinante humana a añadida a las células NSC-34 en cultivo dio como resultado un aumento de 2,5 veces (día 4) de la supervivencia celular tras la privación de suero. Las barras de error representan la desviación estándar de la media. Se midió la absorbancia a 570 nm.

La figura 27 muestra vistas laterales (parte anterior a la izquierda; parte posterior a la parte superior) de embriones de preparación completa inmunomarcados con el Acm znp1 a 27 htf (paneles A-F). Paneles A, B, C: embriones a los que se les inyectó progranulina MO. Paneles D, E: embriones a los que se les inyectó progranulina-A-MO +100 pg de ARNm de progranulina-A. Panel F: silvestre. Pérdida truncada o completa de nervios de axones motores (paneles A y B; flechas negras y panel C). Se producen nervios/axones motores ramificados (panel B; puntas de flecha negras), rescate parcial de axones motores (panel D; flechas blancas) y un aumento de los nervios/axones ramificados (panel E; puntas de flecha blancas).

La figura 28 muestra vistas laterales (parte anterior a la izquierda; parte posterior a la parte superior) de embriones de preparación completa marcados con el Acm znp1 a 27 htf (paneles A-F) en embriones a los que se les inyectó conjuntamente smn1 MO (paneles A y B), smn1 MO+100 pg de ARNm de progranulina-A (panel C), 100 pg de ARNm de progranulina-A (paneles D y E) o silvestre (panel F). Se producen nervios de axones motores truncados (panel A; flechas negras), nervios/axones motores ramificados (panel B; puntas de flecha negras), rescate de nervios/axones motores (panel C; flecha blanca) y un aumento de los nervios/axones ramificados (panel C; puntas de flecha blancas), nervios/axones ramificados (paneles D, E; puntas de flecha blancas) y axones motores normales (panel F; doble punta de flecha). Barra de escala = 50 µm.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan métodos y composiciones para tratar una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental a un paciente. En una realización ilustrativa, pueden tratarse pacientes con una enfermedad neurodegenerativa administrando al paciente una composición que comprende una progranulina, en los que el tratamiento del paciente con la composición que comprende una progranulina reduce los síntomas de la enfermedad neurológica en el paciente.

En la realización ilustrativa descrita anteriormente, la enfermedad neurodegenerativa puede estar mediada por una agresión ambiental.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente. El método comprende las etapas de administrar a un paciente con una enfermedad neurodegenerativa una cantidad terapéuticamente eficaz de una progranulina, en el que la cantidad de una progranulina es eficaz para aumentar la supervivencia o proliferación de células neuronales en el paciente.

En la realización ilustrativa descrita anteriormente, la enfermedad neurodegenerativa puede estar mediada por una agresión ambiental.

Tal como se usa en el presente documento "una progranulina" o "un polipéptido de progranulina" se refiere a un polipéptido seleccionado de un polipéptido de SEQ ID NO. 2, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 2; un polipéptido de SEQ ID NO. 12, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 12; un polipéptido de SEQ ID NO. 3, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 3; un polipéptido de SEQ ID NO. 4, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 4; un polipéptido de SEQ ID NO. 5, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 5; un polipéptido de SEQ ID NO. 6, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 6; un polipéptido de SEQ ID NO. 7, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 7; un polipéptido de SEQ ID NO. 8, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente

el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 8; o un polipéptido de SEQ ID NO. 9, un polipéptido con una homología de aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, una homología de aproximadamente el 99% con SEQ ID NO. 9.

5 Progranulina humana SEQ ID NO: 2

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG
FHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKI.PAQR TNRAVALSSVMCPDARSRCPDG
STCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDIHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDIHHCAPAGFTCDTQKGT
CEQGP HQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIP
EAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSC
PVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL
ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCA
ARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL

ADN de progranulina humana SEQ ID NO: 1

l ggcgagagga agcaggagg agagtattt gagtagaaa gaaacacagc attcaggct
61 ggccccacct ctatatgat aagtagccaa tgggagcggg tagccctgat cccctgccaa
121 tggaaactga ggtaggcggg tcatcgcgct ggggtctgta gtctgagcgc taccgggttg
181 ctgtgcecca aggaccgagg agtcggacgc aggcagacca tctggacct ggtgagctgg
241 gtggcctaa cagcagggct ggtggctgga acgcggtgcc cagatggtca gtctgacct
301 gtggctgct gctggaccc cggagtagcc agctacagct gctggctcc ccttctggac
361 aaatggccca caactagag caggcatctg ggtggccct gccagggtga tggccactgc
421 tctggcgcc actcctgcat cttaccgtc tcaggactt ccagttgctg ccccttccca
481 gagccgtgg catcgggga tggccatcac tctgcccac ggggttcca ctgcatgca
541 gacggcgat cctgttcca aagatcaggt aacaactccg tgggtgcat ccagtgacct
601 gatagtcagt tgaatgcc ggaacttcc acgtgctgtg ttatgtcga tggctcctgg
661 ggtgtgctcc ccatgcccga ggttctctg tgtgaagaca ggtgtcactg ctgtccgac
721 ggtgcttct ggaactggt tcacacccgc tgcacacac ccacgggac ccacccctg
781 gcaaagaagc tccctgccc gaggaactac agggcagtg cctgtccag ctcggctcatg
841 tctccgagc caggtcccg gtgacctgat ggttctacct gctgtgagct gccagtgagg
901 aagtatgct gctgcccatt gcccaagcc acctgtgct cagatcact gcactgtgc
961 ccccaagaca ctgtgtgta cctgatccag agtaagtgc tctccaagga gaacgtacc
1021 acggacctcc tcaataagct gctgcccac acagtggggg atgtgaaatg tgacatggag
1081 gtgagctgcc cagatggcta tacctgtgc cgtctacagt cgggggcctg gggctgctgc
1141 ccttttacc aggctgtgtg ctgtgaggac cacatacact gctgtccgc ggggtttacg
1201 tctgacacgc agaagggtae ctgtgaacag gggcccccac aggtgccctg gatggagaag
1261 gccccagtc acctcagct gccagacca caagcctga agagagatgt cccctgtgat
1321 aatgtcagca gctgtccct ctcgatacc tgcgtccaac tcaggtctgg gtagtggggc
1381 tctgtlcaa tcccagagge tctgtgctgc tgggaccacc agcactgctg cccccaggc
1441 tacacgtgtg tagctgagg gcagtgtag cgaggagcg agatcgtggc tggactggag
1501 aagatgctg cccgcccggc tcttatacc cccccagag acatggctg tgaccagcac
1561 accagctgcc cgtggggga gacctgtgc ccgagcctg gtaggagctg ggcctgctgc
1621 cagtgcccc atgtgtgtg ctgcaggat cgcagcact gctgcccgc tggctacac
1681 tgaacgtga aggtcgtac ctgcgagaag gaagtgtct ctgcccagc tggcacctc

1741 ctggcccgtg gccctcacgt ggggtggaag gacgtggagt gtggggaagg acactttgc
 1801 catgataacc agacctgctg ccgagacaac egacagggtt gggcctgctg tccctaccgc
 1861 caggggcgtt gttgtgctga tcggcgccac tctgtcctg ctggttccg ctgcgcagcc
 1921 aggggtacca agtgtttgct caggggaggcc ccgcgctggg acgccccttt gaggggacca
 1981 gecttgagac agctgctgtg agggacagta ctgaagactc tgcagccctc gggacccccc
 2041 tcggagggtg cctctgctc aggcctcctt agcactccc ctaacaaaa ttctccctgg
 2101 acccattct gagtcccca tccatggg aggtggggcc tcaatctag gcttccctg
 2161 tcagaagggg gttgtggcaa aagccacatt acaagctgcc atccccccc cgttcagtg
 2221 gacctgtgg ccagggtctt ttccctatcc acagggtgt ttgtgtgtg gcgctgtgc
 2281 gttcaataa agtttgtaca cttcaaaaa aaaaaaaaa aaa

Progranulina de ratón SEQ ID NO: 12

MWVLM SWLAFAAGLVAGTQCPDGQFCPVACCLDQGGANYSCNP
 LLDTWPRITSHHLDGSCQTHGHCPAGYSCLLTVSGTSSCCPFSGKGVSCGDGYHCCPQG
 FHCSADGKSCFQMSDNPLGAVQCPGSQFECPSATCCIMVDGSWGCCPMPQASCCEDR
 VIICCPHGASCDLVHTRCVSPTGHTLLKKFPAQKTNRAVSLPFSVVCDAKTQCPDDS
 TCCELPTGKYGCCPMPNAICCSDDLHCCPQDTCVCDLIQSKCLSKNYTTDLLTKLPGYP
 VKEVKCDMEVSCPEGYTCRLNTGAWGCCPFAKAVCCEDHIHCCPAGFQCHTEKGTCE
 MGILQVPWMKKVIAPLRLPDPQILKSDTPCDDFTRCPTNNTCCKLNSGDWGCCPIPEA
 VCCSDNQIICCPQGFTCLAQGYCQKGD TMVAGLEKIPARQTTPLQIGDIGCDQHTSCPV
 GQTCPSLKGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARTCEKD VDFIQPPVLLTL
 GPKVGNVECGEGHFCHDNQTCCCKDSAGVWACCPYLGKVCCRDGRHICCPGGFIHCSARGT
 KCLRKKIPRWDMLRDPVPRPLI.

ADN de progranulina de ratón SEQ ID NO: 13

1 gaaatgcctc ccaggagacc cggaccccga cgcaggcaga ccatgtgggt cctgatgagc
 61 tggctggcct tcgcggcagg gctqgtagcc ggaacacagt gtccagatgg gcagttctgc
 121 cctgttgccct gctgccttga ccaggagga gccaaactaca gctgclgtaa cctcttctg
 181 gacacatggc ctagaataac gagccatcat ctgatggct cctgccagac ccatggccac
 241 tgtcctgctg gctattcttg tcttctcact gtgtctggga cttccagctg ctgccgttc
 301 tctaagggtg tgtctgtgtg tgatggctac cactgctgcc cccagggtll ccatglagt
 361 gcagatggga aatcctgctt ccagatgtca gataacccct tgggtgctgt ccagtgtcct
 421 gggagccagt ttgaatgtcc tgactctgcc acctgtgtca llaaggtga tggttcgtg
 481 ggatgttgtc ccatgcccca ggctcttgc tgtgaagaca gactgcattg ctgtcccat
 541 ggggcctcct gtgacctgtt tcacacacga tgcgtttcac ccaagggeac ccacaccta
 601 ctaaagaagt tccctgcaca aaagaccaac agggcagtg ctttgcclll lclgtcgtg
 661 tgccctgatg ctaagaccca gtgtcccgat gattctacct gctgtgagct aacctggg
 721 aagtatggct gctgtccaat gcccaatgcc alclgtclgt cggaccacct gcaactgtgc
 781 cccaggaca ctgtatgtga cctgatccag agtaagtgcc tatccaagaa clacaccag
 841 gatctcctga ccaagctgcc tggataccca gtgaaggagg tgaagtgca catggaggtg
 901 agctgcctg aagatatatc ctgctgcgc ctcaacctg gggcctggg clgclgtcca
 961 ttgccaagg ccgtgtgllg tgaggatcac attcattgct gcccggaagg gtttcagtgt

ES 2 596 360 T3

1021 cacacagaga aaggaacctg cgaatgggt atcctccaag taccctggat gaagaaggtc
1081 atagccccc tccgctgcc agaccacag atcttgaaga gtgatacacc ttgtgatgac
1141 ttacttaggt gtccataaaa caataacctgc tgcaaaclea allctgggga ctggggctgc
1201 tgtcccatcc cagaggtgt ctgtgtctca gacaaccagc attgtgtccc tcagggttc
1261 acatgtctgg ctcaggggta ctgtcagaag ggagacacaa tgggtgctgg cctggagaag
1321 atacctgccc gccagacaac ccgctccaa attggagala tgggttgtga ccagcatacc
1381 agctgcccag tagggcaaac ctgtgtccca agcctcaagg gaagttgggc ctgtgtccag
1441 ctgcccctat ctgtgtgtgtg tgaggaccgg cagcactgtt gcccgccgg gtacacctgc
1501 aatgtgaagg cgaggacctg tgagaaggat glcgalitla tccagctcc cgtgtctctg
1561 accctcgccc ctaaggttgg gaatgtggag tgtggagaag ggcatttctg ccatgalaac
1621 cagacctgtt gtaaagacag tgcaggagtc tgggcctgcl glccctacct aaaggtgtc
1681 tqctgtaga atggacgtca ctgltgcccc ggtggttcc actgttcagc cagggaacc
1741 aagtgtttgc gaaagaagat tctcgtgtg gacatgtttt tgagggatcc ggtcccaaga
1801 ccgclactgt aaggaaaggc tacagactta aggaactcca cagtctggg aacctgtlc
1861 cgaggglacc cactactca gctccctag cgcctcctcc cctaactct ccccgccca
1921 ctcatctga gtcacctat caccalqgga ggtggagcct caaactaaa ccttctttta
1981 tggaaagaag gctgtggcca aaagccctgt atcaaactgc catttcttcc ggtttctgtg
2041 gaccttgtgg ccaggtgtct tcccagacc acaggtgttc tgtgagcllg cllglggtg
2101 tgtgcgctg tgcgtgtgtt gclccaalaa agtttgtaca ctttc

SEQ ID NO: 3 hGrA

DVKCDMEVS-CPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTC

EQ

SEQ ID NO: 4 hGrB

-VMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCL

5 S

SEQ ID NO: 5 hGrC

-VPCDNVSS-CPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQ-CQ

SEQ ID NO: 6 hGrD

DIGCDQHTS-CPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSC

E

10 SEQ ID NO: 7 hGrE

DVECGEGHF-CHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTK

CL

SEQ ID NO: 8 hGrF

AIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCI

SEQ ID NO: 9 hGrG

GGPCQVDAH-CSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCF

15

SEQ ID NO: 10 grn D

AMDIGCDQHTS-CPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKAR

SCE-KLAAALEHHHHHHH

SEQ ID NO: 11 grn F

AMAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHT
 RCI-KLAAALEIIIIIIIIII

Tal como conocen bien los expertos en la técnica, la alteración de cualquier aminoácido no crítico de una proteína mediante sustitución conservativa no debe alterar significativamente la actividad de esa proteína debido a que la cadena lateral del aminoácido que se usa para reemplazar el aminoácido natural debe poder formar enlaces y contactos similares que la cadena lateral del aminoácido que se ha reemplazado.

Son posibles sustituciones no conservativas siempre que estas no afecten en exceso a la actividad neuroprotectora o neuroregenerativa del polipéptido y/o reduzcan su eficacia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Tal como se conoce en la técnica, una “sustitución conservativa” de un aminoácido o una “variante de sustitución conservativa” de un polipéptido se refiere a una sustitución de aminoácido que mantiene: 1) la estructura del esqueleto del polipéptido (por ejemplo, una estructura de lámina beta o hélice alfa); 2) la carga o hidrofobicidad del aminoácido; y 3) la voluminosidad de la cadena lateral o una cualquiera o más de estas características. Más específicamente, las terminologías bien conocidas “residuos hidrófilos” se refieren a serina o treonina. “Residuos hidrófobos” se refieren a leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina. “Residuos cargados positivamente” se refieren a lisina, arginina o histidina. “Residuos cargados negativamente” se refieren a ácido aspártico o ácido glutámico. Residuos que tienen “cadenas laterales voluminosas” se refieren a fenilalanina, triptófano o tirosina.

La terminología “sustituciones de aminoácido conservativas” se conoce bien en la técnica, que se refiere a la sustitución de un aminoácido particular por uno que tiene una característica similar (por ejemplo, carga o hidrofobicidad similar, voluminosidad similar). Los ejemplos incluyen ácido aspártico por ácido glutámico, o isoleucina por leucina. Se facilita en la tabla 1 una lista de sustituciones de aminoácido conservativas ilustrativas. Una variante de sustitución conservativa 1) tendrá sólo sustituciones de aminoácido conservativas con relación a la secuencia original, 2) tendrá una identidad de secuencia de al menos el 90% con respecto a la secuencia original, preferiblemente una identidad de al menos el 95%, una identidad del 96%, una identidad del 97%, una identidad del 98% o una identidad del 99% o mayor; y 3) conservará la actividad neuroprotectora o neurorestauradora. A este respecto, se contempla cualquier variante de sustitución conservativa de las secuencias de polipéptido descritas anteriormente en el presente documento. Se considera que tales variantes son “una progranulina”.

TABLA 1

Para el aminoácido	Sustituir por
Alanina	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Asparagina	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido glutámico	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Isoleucina	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Lisina	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Metionina	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Prolina	D-Pro
Serina	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Treonina	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Tirosina	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Valina	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

En un aspecto ilustrativo, el estado patológico neurodegenerativo puede incluir, pero no se limita a, enfermedad de Parkinson y los parkinsonismos incluyendo parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de las neuronas motoras (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica); o cualquier otra enfermedad neurodegenerativa mediada por un aumento de la muerte de células neuronales y una modificación de la expresión de progranulina.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente eficaces de progranulina y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental a un paciente.

La dosificación diaria unitaria de la composición que comprende el polipéptido de progranulina puede variar significativamente dependiendo del estado del paciente, el estado patológico que esté tratándose, la vía de administración de progranulina y la distribución tisular, y la posibilidad de uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos. La cantidad eficaz de una progranulina que va a administrarse al paciente se basa en el área de superficie corporal, el peso del paciente, la evaluación por parte del médico de estado del paciente, y similares. En una realización ilustrativa, una dosis eficaz de una progranulina puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente.

En otra realización ilustrativa, una dosis eficaz del polipéptido de progranulina puede oscilar entre aproximadamente 1 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En diversas realizaciones ilustrativas, una dosis eficaz puede oscilar entre aproximadamente 1 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 500 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, y entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente.

En otra realización ilustrativa, una dosis eficaz del polipéptido de progranulina puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En diversas realizaciones ilustrativas, una dosis eficaz puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 5 µg/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal del paciente, y entre aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal del paciente.

La composición que comprende una progranulina se administra preferiblemente al paciente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral o por vía intracordal (espinal). Alternativamente, la composición de progranulina puede administrarse al paciente mediante otros procedimientos útiles desde un punto de vista médico, y pueden usarse cualquier dosis eficaz y forma de dosificación terapéutica adecuada, incluyendo formas de dosificación de liberación prolongada o sostenida. La administración puede ser mediante inyección. La composición que comprende progranulina también puede administrarse usando una bomba lenta.

Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen disoluciones acuosas del principio activo, en una solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros portadores líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos tales como alcoholes líquidos, glicoles, ésteres y amidas. La forma de dosificación parenteral puede estar en forma de un liofilizado reconstituible que comprende una dosis de una composición que comprende progranulina. En un aspecto de la presente realización, puede administrarse cualquiera de varias formas de dosificación de liberación prolongada o sostenida conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, las matrices de hidratos de carbono biodegradables descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 4.713.249; 5.266.333; y 5.417.982.

En una realización ilustrativa, se describen formulaciones farmacéuticas para su uso general con progranulinas para la administración parenteral que comprenden: a) una cantidad farmacéuticamente activa de la progranulina; b) un agente tamponante del pH farmacéuticamente aceptable para proporcionar un pH en el intervalo de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 9; c) un agente de modificación de la fuerza iónica en el intervalo de concentración de aproximadamente 0 a aproximadamente 250 milimolar; y d) un agente de modificación de la viscosidad soluble en agua en el intervalo de concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 7% del peso de fórmula total o cualquier combinación de a), b), c) y d).

En diversas realizaciones ilustrativas, los agentes tamponantes del pH para su uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son aquellos agentes que conoce el experto en la técnica e incluyen, por ejemplo, tampones acetato, borato, carbonato, citrato y fosfato, así como ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, óxido de magnesio, fosfato de monopotasio, bicarbonato, amoníaco, ácido carbónico, ácido clorhídrico, citrato de sodio, ácido cítrico, ácido acético, hidrogenofosfato de disodio, bórax, ácido bórico, hidróxido de sodio, ácido dietilbarbitúrico y proteínas, así como diversos tampones biológicos, por ejemplo, TAPS, bicina, Tris, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES.

En otra realización ilustrativa, los agentes de modulación de la fuerza iónica incluyen aquellos agentes conocidos en la técnica, por ejemplo, glicerina, propilenglicol, manitol, glucosa, dextrosa, sorbitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio y otros electrolitos.

Los agentes de modulación de la viscosidad útiles incluyen pero no se limitan a, polímeros solubles en agua iónicos y no iónicos; polímeros de ácido acrílico reticulados tales como la familia de los polímeros “carbómeros”, por ejemplo, carboxipolialquilenos que pueden obtenerse comercialmente con la marca comercial Carbopol®; polímeros hidrófilos tales como poli(óxidos de etileno), copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y poli(alcohol vinílico); polímeros celulósicos y derivados de polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y celulosa eterificada; gomas tales como goma tragacanto y goma xantana; alginato de sodio; gelatina, ácido hialurónico y sales del mismo, quitosanos, gelanos o cualquier combinación de los mismos. Se prefiere que no se empleen agentes de potenciación de la viscosidad ácidos, tal como que se emplee un agente neutro o básico para facilitar que se logre el pH deseado de la formulación. Si se desea un gel uniforme, pueden añadirse agentes dispersantes tales como alcohol, sorbitol o glicerina, o puede dispersarse el agente gelificante mediante trituración, mezclado mecánico o agitación, o combinaciones de los mismos. En una realización, el agente de potenciación de la viscosidad también puede proporcionar la base, analizado anteriormente. En una realización preferida, el agente de modulación de la viscosidad es celulosa que se ha modificado tal como mediante eterificación o esterificación.

En diversas realizaciones ilustrativas, se proporcionan composiciones de progranulina que pueden comprender la totalidad o partes de polipéptidos de progranulina, solos o en combinación con al menos otro agente, tal como un excipiente y/o un compuesto estabilizante y/o un agente solubilizante, y pueden administrarse en cualquier, portador farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, glucosa y agua. Excipientes adecuados son cargas de hidrato de carbono o proteína tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc.; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas incluyendo goma arábica y goma tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Los agentes disgregantes o solubilizantes adecuados incluyen agar, ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

En realizaciones ilustrativas, pueden administrarse polipéptidos de progranulina solos a un paciente, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas o en composiciones farmacéuticas en las que se mezclan con excipiente(s) u otros portadores farmacéuticamente aceptables. En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte. En otra realización, pueden administrarse polipéptidos de progranulina solos a un paciente que presenta una enfermedad neurológica.

Puede usarse cualquier régimen eficaz para administrar la composición que comprende progranulina. Por ejemplo, la composición que comprende progranulina puede administrarse como una dosis única, o la composición que comprende progranulina puede dividirse y administrarse como un régimen diario de múltiples dosis. Además, puede usarse un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a tres días a la semana como alternativa al tratamiento diario, y se considera que tal régimen diario intermitente o escalonado es equivalente al tratamiento cada día. En una realización, el paciente se trata con múltiples inyecciones de la composición que comprende progranulina para disminuir la muerte de células neuronales. En otra realización, al paciente se le inyecta múltiples veces (por ejemplo, aproximadamente de 2 hasta aproximadamente 50 veces) la composición que comprende progranulina, por ejemplo, a intervalos de 12-72 horas o a intervalos de 48-72 horas. Pueden administrarse inyecciones adicionales de la composición que comprende progranulina al paciente con un intervalo de días o meses después de la(s) inyección/inyecciones inicial(es) y las inyecciones adicionales previenen la recurrencia de la enfermedad. Alternativamente, la(s) inyección/inyecciones inicial(es) de la composición que comprende progranulina puede(n) prevenir la recurrencia de enfermedad.

En otra realización ilustrativa, pueden tratarse pacientes con una enfermedad neurodegenerativa administrando al paciente una composición que comprende un efector (por ejemplo, un ADN que codifica para una molécula terapéutica, tal como ADN que codifican para progranulina o partes de progranulina), o combinaciones de efectores, que modifican la expresión de progranulina, en el que tratamiento del paciente con la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina reduce los síntomas de la enfermedad neurológica en el paciente.

Aún en otra realización, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un efector que modifica la expresión de progranulina, y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente. El método comprende las etapas de administrar a un paciente con una enfermedad neurodegenerativa una cantidad terapéuticamente eficaz de un efector que modifica la expresión de progranulina, en el que la cantidad de efector es eficaz para aumentar la supervivencia o proliferación de células neuronales en el paciente. En otra realización

5

ilustrativa, la cantidad de efector es eficaz para aumentar la expresión de progranulina en neuronas. En realizaciones ilustrativas adicionales, la cantidad de efector es eficaz para disminuir la expresión de progranulina en células no neuronales.

En otra realización ilustrativa, pueden tratarse pacientes con una enfermedad neurodegenerativa mediada por limitar a ADN que codifican para progranulina en partes de progranulina una agresión ambiental, administrando al paciente

10

una composición que comprende un efector (por ejemplo, un ADN que codifica para una molécula terapéutica), o combinaciones de efectores que modifican la expresión de progranulina, en el que el tratamiento del paciente con la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina reduce los síntomas de la enfermedad neurológica en el paciente.

Aún en otra realización, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende

15

cantidades terapéuticamente eficaces de un efector que modifica la expresión de progranulina, y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental a un paciente.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente. El método comprende las etapas de administrar a un paciente con una enfermedad neurodegenerativa mediada por

20

una agresión ambiental una cantidad terapéuticamente eficaz de un efector que modifica la expresión de progranulina, en el que la cantidad de efector es eficaz para aumentar la supervivencia o proliferación de células neuronales en el paciente. En otra realización ilustrativa, la cantidad de efector es eficaz para aumentar la expresión de progranulina en neuronas. En realizaciones ilustrativas adicionales, la cantidad de efector es eficaz para disminuir la expresión de progranulina en células no neuronales.

Tal como se usa en el presente documento, “un efector que modifica la expresión de progranulina” significa un ácido nucleico (por ejemplo un ADN, un ADNc o un ARNm) que aumenta la expresión de progranulina en células diana. Tal como se usa en el presente documento “células diana” comprenden células neuronales. La dosificación diaria unitaria de la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina puede variar

30

significativamente dependiendo del estado del paciente, el estado patológico que esté tratándose, el peso molecular del efector, su vía de administración y la distribución tisular, y la posibilidad de uso conjunto de otros tratamientos terapéuticos. La cantidad eficaz que va a administrarse al paciente se basa en el área de superficie corporal, el peso del paciente y la evaluación por parte del médico de estado del paciente. En una realización ilustrativa, una dosis eficaz del efector puede oscilar entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente

35

1 mg/kg de peso corporal del paciente, más preferiblemente entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente.

En otra realización ilustrativa, una dosis eficaz del efector puede oscilar entre aproximadamente 1 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal del paciente. En diversas realizaciones ilustrativas, una dosis eficaz puede oscilar entre aproximadamente 1 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 500 pg/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, entre aproximadamente

45

100 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente, y entre aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal del paciente y aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal del paciente.

En otra realización ilustrativa, una dosis eficaz del efector puede oscilar entre aproximadamente 1 millón de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg y aproximadamente mil millones de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg. En diversas realizaciones ilustrativas, una dosis eficaz puede oscilar entre aproximadamente 1 millón de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg y aproximadamente 500 millones de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg, entre aproximadamente 200.000 efector moléculas por peso del paciente de 70 kg y aproximadamente 200 millones de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg, entre aproximadamente 1 millón de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg y aproximadamente 200 millones de moléculas efectoras por peso del paciente de 70 kg.

55

La composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina se administra preferiblemente al paciente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral o por vía intracordal (espinal). Alternativamente, la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina puede administrarse al paciente mediante otros procedimientos útiles desde un punto de vista médico,

60

y pueden usarse cualquier dosis eficaz y forma de dosificación terapéutica adecuada, incluyendo formas de dosificación de liberación prolongada. Puede lograrse la administración mediante inyección.

La composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina se inyecta preferiblemente por vía parenteral y tales inyecciones pueden ser inyecciones intradérmicas, inyecciones intraperitoneales, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares, inyecciones intravenosas, inyecciones intraventriculares, inyecciones intratecales, inyecciones intracerebrales o inyecciones intracordales (espinales). La composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina también puede administrarse usando una bomba lenta. Adicionalmente, las vías adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral o transmucosa. La administración terapéutica de un efector que modifica la expresión de progranulina de manera intracelular también puede lograrse tal como se describe a continuación. Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen disoluciones acuosas del principio activo, en una solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros portadores líquidos farmacéuticamente aceptables bien conocidos tales como alcoholes líquidos, glicoles, ésteres y amidas. La forma de dosificación parenteral puede estar en forma de un liofilizado reconstituible que comprende una dosis de una composición que comprende un efector que modifica la expresión de progranulina. En un aspecto de la presente realización, puede administrarse cualquiera de varias formas de dosificación de liberación prolongada conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, las matrices de hidratos de carbono biodegradables descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 4.713.249; 5.266.333; y 5.417.982.

Puede usarse cualquier régimen eficaz para administrar la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina. Por ejemplo, la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina puede administrarse como una dosis única, o la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina puede administrarse en múltiples dosis. Además, puede usarse un régimen escalonado, por ejemplo, de uno a tres días a la semana como alternativa al tratamiento diario, y se considera que tal régimen diario intermitente o escalonado es equivalente al tratamiento cada día. En una realización, el paciente se trata con una o más inyecciones de la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina. En otra realización, al paciente se le inyecta múltiples veces (por ejemplo, de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 veces) la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina, por ejemplo, a intervalos de 12-72 horas o a intervalos de 48-72 horas. Pueden administrarse inyecciones adicionales de la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina al paciente con un intervalo de días o meses después de la(s) inyección/inyecciones inicial(es) y las inyecciones adicionales previenen la recurrencia de enfermedad. Alternativamente, la una o más inyecciones iniciales de la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina pueden prevenir la recurrencia de enfermedad.

En diversas realizaciones ilustrativas, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada que codifica para el gen de progranulina o una parte del mismo. Los expertos en la técnica conocen bien métodos de purificación de ácidos nucleicos. En una realización, la secuencia está operativamente unida a secuencias reguladoras que dirigen la expresión del gen de progranulina. En realizaciones adicionales, la secuencia está operativamente unida a un promotor heterólogo. Todavía en realizaciones adicionales, la secuencia está contenida dentro de un vector. En algunas realizaciones, el vector está dentro de una célula huésped (por ejemplo, una célula neuronal).

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa con referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmento(s) de ADN o ARNm a células en el paciente. El vector contiene la secuencia de ácido nucleico y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante de ácido nucleico operativamente unida en el paciente. Un vector puede expresar una molécula de ácido nucleico insertada en el vector y producir un polipéptido o una proteína. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión incluyen habitualmente un promotor, un operador (opcional) y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias tales como potenciadores y señales de terminación y poliadenilación.

Si se usa una célula para la administración del ácido nucleico, el ácido nucleico puede introducirse en la célula mediante transducción, transfección, microinyección o electroporación de la célula con el ácido nucleico. Una célula de administración puede transformarse, transducirse o transfectarse (por ejemplo, mediante precipitación conjunta de fosfato de calcio-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por Polybrene, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral, biolística, etc.) mediante ácidos nucleicos exógenos o heterólogos cuando tales ácidos nucleicos se han introducido en el interior de la célula. Puede integrarse (unirse covalentemente) o no ADN transformante, por ejemplo, con ADN cromosómico que compone el genoma de la célula de administración. En células de mamífero, por ejemplo, puede mantenerse ADN transformante en un elemento episómico, tal como un plásmido. En una célula eucariota, una célula transformada de manera estable es una en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma, de modo que se hereda por células hijas a través de replicación cromosómica.

Tal como se usa en el presente documento, el efector que modifica la expresión de progranulina puede comprender un "ácido nucleico de progranulina" y el ácido nucleico de progranulina comprende una secuencia codificante de progranulina completa o una secuencia homóloga tal como se describe en el presente documento.

En otra realización ilustrativa, puede incorporarse un ácido nucleico de progranulina en un vector y administrarse a

un paciente mediante cualquier protocolo conocido en la técnica tal como los descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.333.194, 7.105.342 y 7.112.668. En realizaciones ilustrativas, puede introducirse ácido nucleico de progranulina o bien *in vitro* en una célula extraída de un órgano del paciente en el que luego vuelve a introducirse en su cuerpo la célula modificada, o bien directamente *in vivo* en el tejido apropiado o bien usando un

- 5 constructo dirigido de vector-ácido nucleico de progranulina. En diversas realizaciones ilustrativas, el ácido nucleico de progranulina puede introducirse en una célula o un órgano usando, por ejemplo, un vector viral, un vector retroviral, o métodos no virales, tales como transfección, inyección de ADN desnudo, electroporación, sonoporación, una "pistola génica" (por ejemplo, mediante disparo de partículas de oro recubiertas de ADN en células usando gas a alta presión), oligómeros sintéticos, lipocomplejos, policomplejos, virosomas o dendrímeros.
- 10 En una realización en la que se tratan células u órganos, el ácido nucleico de progranulina puede introducirse en una célula o un órgano usando un vector viral. El vector viral puede ser cualquier vector viral conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector viral puede ser un vector de adenovirus, un vector de lentivirus, un vector de retrovirus, un vector de virus adenoasociado, un vector de herpesvirus, un vector de herpesvirus modificado, y similares. En otra
- 15 realización ilustrativa en la que se transfectan células, el ácido nucleico de progranulina puede introducirse en una célula mediante transfección de ADN directa (lipofección, transfección con fosfato de calcio, electroporación con DEAE-dextrano, y similares).

En diversas realizaciones ilustrativas, el ácido nucleico de progranulina puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN, una molécula de ARN, una molécula de ADNc, o un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico de progranulina.

- 20 Los ácidos nucleicos de progranulina descritos en el presente documento pueden prepararse o aislarse mediante cualquier medio convencional usado normalmente para preparar o aislar ácidos nucleicos e incluyen los ácidos nucleicos de SEQ ID. No. (1) y (13). Por ejemplo, pueden sintetizarse químicamente moléculas de ADN y ARN usando reactivos y sintetizadores disponibles comercialmente mediante métodos que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos de progranulina descritos en el presente documento pueden purificarse mediante cualquier medio
- 25 convencional usado normalmente en la técnica para purificar ácidos nucleicos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de progranulina pueden purificarse usando métodos electroforéticos y kits de purificación de ácidos nucleicos conocidos en la técnica (por ejemplo, kits Qiagen). Los ácidos nucleicos de progranulina adecuados para la administración usando un vector viral o para la introducción en una célula mediante transfección de ADN directa también pueden prepararse usando cualquiera de los métodos recombinantes conocidos en la técnica.
- 30 También pueden usarse ácidos nucleicos que tienen uniones internucleosídicas modificadas en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento. Pueden sintetizarse ácidos nucleicos que contienen uniones internucleosídicas modificadas usando reactivos y métodos que se conocen en la técnica, por ejemplo, métodos para sintetizar ácidos nucleicos que contienen uniones internucleosídicas fosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforamidato, metoxietil-fosforamidato, formacetal, tioformacetal, diisopropilsililo, acetamidato, carbamato, dimetilen-sulfuro ($-\text{CH}_2--\text{S}-\text{CH}_2-$), dimetilen-sulfóxido ($-\text{CH}_2--\text{SO}-\text{CH}_2-$), dimetilen-sulfona ($-\text{CH}_2--\text{SO}_2-\text{CH}_2-$), 2'-O-
- 35 alquilo y 2'-desoxi-2'-fluorofosforotioato.

Las secuencias de progranulina modificadas, por ejemplo, secuencias que difieren de la secuencia que codifica para la progranulina nativa, también están englobadas siempre que la secuencia modificada todavía codifique para una proteína que presenta la actividad biológica de la progranulina nativa a un nivel mayor o menor de actividad. Estas

- 40 secuencias de progranulina modificadas incluyen modificaciones provocadas por mutaciones puntuales, modificaciones debidas a la degeneración del código genético o variantes alélicas que se producen de manera natural, y modificaciones adicionales que se introducen mediante ingeniería genética, para producir ácidos nucleicos de progranulina recombinantes.
- 45 Los ácidos nucleicos de progranulina incluyen ácidos nucleicos con una homología del 95% con SEQ ID No. 1 y 13 o ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de alta rigurosidad con el complemento de la secuencia codificante de ADN para una progranulina, SEQ ID No. 1 ó 13. Tal como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa con referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (por ejemplo, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ven afectadas por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_f (temperatura de fusión) del híbrido formado y la razón G:C dentro de los ácidos nucleicos. Tal como se usa en el
- 50 presente documento, el término "rigurosidad" se usa con referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, en las que se llevan a cabo las hibridaciones de ácidos nucleicos.

- 55 En un ejemplo ilustrativo, "condiciones de alta rigurosidad" pueden significar hibridación a 65°C en 5X SSPE y formamida al 50%, y lavado a 65°C en 0,5X SSPE. En otro ejemplo ilustrativo, "condiciones de alta rigurosidad" pueden significar hibridación a 55°C en un tampón de hibridación que consiste en formamida al 50% (vol./vol.); sulfato de dextrano al 10%; 1 x disolución de Denhardt; fosfato de sodio 20 mM, pH 6,5; 5 x SSC; y 200 µg de ADN de esperma de salmón por ml de tampón de hibridación durante de 18 a 24 horas, y lavado cuatro veces (5 min cada vez) con 2 x SSC; SDS al 1% a temperatura ambiente y luego lavado durante 15 min a 50-55°C con 0,1 x SSC. En
- 60 otro ejemplo ilustrativo, se describen condiciones para hibridación de alta rigurosidad en Sambrook *et al.*, "Molecular

Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). En algunos aspectos ilustrativos, se produce hibridación a lo largo de la longitud completa del ácido nucleico.

En diversas realizaciones de las composiciones y los métodos descritos en el presente documento, las sondas pueden marcarse, tal como con compuestos fluorescentes, isótopos radiactivos, antígenos, biotina-avidina, compuestos colorimétricos, u otros agentes de marcaje conocidos por los expertos en la técnica, para permitir la detección y cuantificación de ADN amplificado, tal como mediante PCR en tiempo real. En realizaciones ilustrativas, los marcadores pueden incluir 6-carboxifluoresceína (FAM™), TET™ (tetracloro-6-carboxifluoresceína), JOE™ (2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxifluoresceína), VIC™, HEX (hexacloro-6-carboxifluoresceína), TAMRA™ (6-carboxi-N,N,N',N'-tetrametilrodamina), BHQ™, SYBR® Green, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5, 6-FAM, fluoresceína, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, ROX y/o Texas Red.

La detección de hibridación de alta rigurosidad en el contexto de la presente invención indica fuerte similitud estructural u homología estructural (por ejemplo, estructura de nucleótidos, composición, disposición u orden de bases) con, por ejemplo, los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento.

También están incluidas moléculas de ácido nucleico que tienen una homología de aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% y el 99% con la secuencia codificante de ADN para una progranulina, SEQ ID No. 1 ó 13. Tal como se usa en el presente documento, el porcentaje de homología entre dos secuencias es equivalente al porcentaje de identidad entre las secuencias. La determinación del porcentaje de identidad u homología entre secuencias puede realizarse, por ejemplo, usando el programa GAP (software del Genetic Computer Group; ahora disponible a través de Accelrys en <http://www.accelrys.com>), y pueden realizarse alineaciones usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (software VNTI, InforMax Inc.). Puede buscarse una base de datos de secuencias usando la secuencia de ácido nucleico de interés. Los algoritmos para las búsquedas en base de datos se basan normalmente en el software BLAST (Altschul *et al.*, 1990). En algunas realizaciones, el porcentaje homología o identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa del ácido nucleico.

Tal como se usa en el presente documento, el término "complementario" se refiere a la capacidad de secuencias de nucleótidos de purina y pirimidina para asociarse a través de enlaces de hidrógeno para formar moléculas bicatenarias de ácido nucleico. Guanina y citosina, adenina y timina, y adenina y uracilo son complementarios y pueden asociarse a través de enlaces de hidrógeno, lo que da como resultado la formación de moléculas bicatenarias de ácido nucleico cuando dos moléculas de ácido nucleico tienen secuencias "complementarias". Las secuencias complementarias pueden ser secuencias de ADN o ARN. Las secuencias de ADN o ARN complementarias se denominan "complemento". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se aparean según las reglas de apareamiento de bases. O si no, puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos.

En realizaciones ilustrativas, la enfermedad neurodegenerativa está mediada por una agresión ambiental al paciente. Tal como se usa en el presente documento, una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental al paciente significa una enfermedad que está provocada por una agresión ambiental y no está provocada por una mutación heredable del gen de progranulina que modifica la expresión de progranulina. Una mutación heredable a una mutación permanente en el ADN de un paciente que puede transmitirse a la descendencia del paciente. Sin embargo, estas realizaciones ilustrativas no pretenden excluir la influencia de variantes alélicas de genes modificadores, que están implicados, por ejemplo, en el metabolismo de la neurotoxina, que hace que un individuo sea más o menos sensible al desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa. Tal como se usa en el presente documento, estos genes modificadores pueden modificar la evolución del desarrollo de la enfermedad.

La enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental al paciente puede ser una enfermedad esporádica vinculada con factores ambientales que provocan la muerte de células neuronales directa o indirectamente mediante la modificación de la expresión génica. En otras diversas realizaciones ilustrativas, la agresión ambiental se deriva de la dieta del paciente o es el resultado de síntesis endógena, o ambos. En una realización ilustrativa, la agresión ambiental provoca la síntesis de un compuesto que produce un efecto perjudicial *in vivo*. Puede producirse la muerte de células neuronales mediante cualquier variedad de medios incluyendo, pero sin limitarse a, excitotoxicidad o estrés oxidativo. Por ejemplo, se describen diversos medios mediante los que toxinas ambientales conducen a muerte de células neuronales en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006-0252705.

En otra realización ilustrativa, el estado patológico neurodegenerativo está mediado por una excitotoxina. Las excitotoxinas son una clase de sustancias que dañan las neuronas a través de hiperactivación de receptores, por ejemplo, receptores para el neurotransmisor excitador glutamato, lo que conduce a muerte de células neuronales. Los ejemplos de excitotoxinas incluyen aminoácidos excitadores, que pueden producir lesiones en el sistema nervioso central. Los ejemplos adicionales de excitotoxinas incluyen, pero no se limitan a, glucósido de esteroil, incluyendo beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, sulfoximina de metionina, y otras sustancias que se sabe en la técnica que inducen reacciones neuroexcitotóxicas en un paciente. En una realización ilustrativa,

la excitotoxina es un glucósido de estero. En realizaciones ilustrativas adicionales, el glucósido de estero se selecciona del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos.

En una realización ilustrativa, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y ELA. Las enfermedades neurológicas, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y ELA, dan como resultado generalmente déficits conductuales que pueden observarse clínicamente. Estas enfermedades seleccionan como diana poblaciones de neuronas, conduciendo a síntomas neuropatológicos y conductuales. La enfermedad de Alzheimer implica la muerte de neuronas de diversas regiones de la corteza cerebral y el hipocampo y da como resultado la pérdida de funciones cognitivas tales como memoria y aprendizaje. La enfermedad de Parkinson da como resultado la degeneración de partes del sistema nigroestriado. Las fases iniciales implican la pérdida de prolongaciones terminales de neuronas que contienen dopamina de la sustancia negra. A su vez, los cuerpos de las células neuronales en la sustancia negra mueren, teniendo un impacto sobre el control motor y conduciendo a temblores y alteraciones de la marcha.

Un ejemplo de una enfermedad de las neuronas motoras es la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). ELA implica principalmente la pérdida de neuronas motoras espinales y corticales, lo que conduce a una parálisis creciente y eventualmente a la muerte. Los primeros síntomas de ELA incluyen pero no se limitan a, pie caído o debilidad en las piernas, los pies o los tobillos de un paciente, debilidad en las manos o torpor, calambres musculares y fasciculaciones en los brazos, hombros y la lengua. ELA afecta generalmente a la masticación, al habla y a la respiración, y eventualmente conduce a parálisis de los músculos requeridos para realizar estas funciones. Se expone una revisión de diversas enfermedades neurológicas en Shaw *et al.*, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 27: 493 (2003). El método y las composiciones de la presente invención pueden usarse para aplicaciones tanto de medicina clínica en seres humanos como de medicina veterinaria. Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden usarse solos, o en combinación con otros métodos o composiciones.

En otra realización ilustrativa, pueden tratarse pacientes con una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental administrando al paciente una composición que comprende un efector (por ejemplo, un ADN que codifica para una molécula terapéutica), o combinaciones de efectores que modifican la expresión de progranulina, en el que el tratamiento del paciente con la composición que comprende el efector que modifica la expresión de progranulina reduce los síntomas de la enfermedad neurológica en el paciente. Cualquiera de las realizaciones anteriores usando efectores que median en la expresión de progranulina son aplicables a esta realización.

Aún en otra realización, se proporciona una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un efector que modifica la expresión de progranulina, y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que las cantidades terapéuticamente eficaces comprenden cantidades que pueden reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental a un paciente. Cualquiera de las realizaciones anteriores usando efectores que median en la expresión de progranulina son aplicables a esta realización.

En otra realización, se proporciona un método para reducir la muerte de células neuronales en un paciente. El método comprende las etapas de administrar a un paciente con una enfermedad neurodegenerativa mediada por una agresión ambiental una cantidad terapéuticamente eficaz de un efector que modifica la expresión de progranulina, en el que la cantidad de efector es eficaz para aumentar la supervivencia o proliferación de células neuronales en el paciente. En otra realización ilustrativa, la cantidad de efector es eficaz para aumentar la expresión de progranulina en neuronas. En realizaciones ilustrativas adicionales, la cantidad de efector es eficaz para disminuir la expresión de progranulina en células no neuronales. Cualquiera de las realizaciones anteriores usando efectores que median en la expresión de progranulina son aplicables a esta realización.

EJEMPLO 1

ANIMALES

Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* usando ratones CD-1 macho de 5-7 meses de edad criados en colonia adquiridos de Charles River (Wilmington, MA).

EJEMPLO 2

MICROSCOPÍA

Se capturaron la microscopía y todas las microfotografías de secciones de ratón usando una cámara Motic B5 Professional serie 3.0 (Motic Instruments Inc., Richmond, Canadá) y un microscopio Zeiss Axiovert Epifluorescence 2000. Se analizaron los datos usando Motic B5 Professional, Motic Images Advanced 3.0 y Zeiss Axiovert Zoom Axiovision 3.1 con AxioCam HRM.

EJEMPLO 3

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para experimentos conductuales e histológicos, se usaron los valores para cada ratón en las tareas individuales para calcular medias $\pm$ E.E.M. para cada grupo. Se compararon las medias usando una prueba de la t de dos colas, para datos independientes o ANOVA de un factor. Se realizó una prueba de Tukey *post hoc* para comparar todas las medias después de las pruebas de ANOVA (GraphPad Prism, San Diego, CA).

5 EJEMPLO 4

DISMINUCIÓN PROGRESIVA EN EL REFLEJO DE EXTENSIÓN DE LAS PIERNAS TRAS EXPOSICIÓN A ESTERIL-GLUCÓSIDO SINTÉTICO

Se alimentaron ratones CD-1 macho de tres meses de edad con 100 mg/día de BSSG sintético durante 15 semanas, luego se permitió que envejeciesen con una dieta de comida de laboratorio normal. Se midió la extensión de las
10 piernas semanalmente desde el inicio del experimento. Los resultados se muestran en la figura 1. Se realizaron pruebas tal como se describe en Wilson *et al.*, 2004 y Wilson *et al.*, 2005. Ningún análisis de regresión lineal demuestra una diferencia significativa a $* = p < 0,0001$ (representado gráficamente desde la semana 0-32) en los datos para los ratones de control y los ratones alimentados con BSSG. Incluso tras el cese de la exposición a BSSG, la disminución del reflejo de extensión de las piernas en los ratones alimentados con BSSG continuó progresando en
15 la duración del experimento.

Se usó la prueba del reflejo de extensión de las piernas como medida de la disfunción de las neuronas motoras (Barneoud y Curet, 1999). Se alteró esta prueba para discriminar entre conductas más sutiles, creando una escala de desde 0 hasta 4. Esta prueba con escala muestra la pérdida progresiva de función ya que el reflejo normal habitualmente se deteriora progresivamente a temblores y luego a retracción total. Esta escala permite la medida de
20 la progresión de manera continua a lo largo del tiempo. Se asigna una puntuación de 0-4 basándose en la respuesta mostrada por el ratón tal como sigue:

4: Extensión completa de ambas piernas (normal).

3: Las dos piernas extendidas con ligeros temblores y/o pinzamiento en una pierna.

2: Una pierna extendida, 1 retraída, o temblores en ambas piernas.

25 1: Una pierna retraída, temblores en la otra pierna.

0: Ambas piernas retraídas.

EJEMPLO 5

DISMINUCIÓN PROGRESIVA DE LA ACTIVIDAD MOTORA EN CAMPO ABIERTO TRAS EXPOSICIÓN A ESTERIL-GLUCÓSIDO SINTÉTICO

30 Se usaron los mismos ratones expuestos a BSSG en el ejemplo 4 para analizar la actividad motora en campo abierto. $* = p < 0,05$ (prueba de la t de Student). Los resultados se muestran en la figura 2. Los ratones alimentados con BSSG mostraron significativamente una disminución del movimiento tal como se midió mediante el cruce de rejilla en la semana 28 en comparación con controles. Tras el cese de la exposición a BSSG, se observó que la disminución en la actividad motora en campo abierto progresaba con el tiempo.

35 Para el análisis de la actividad motora en campo abierto, se pusieron los ratones en un campo abierto redondo (de 2 m de diámetro) durante 5 minutos y se registraron los movimientos usando una cámara de video para medir la emotividad y la exploración (actividad motora espontánea) (Karl *et al.*, 2003). Se reprodujeron videos en una TV y se cubrió la rejilla circular sobre la pantalla de TV. Se registraron los cruces de rejilla.

EJEMPLO 6

PÉRDIDA PROGRESIVA DE NEURONAS MOTORAS TRAS EXPOSICIÓN DURANTE 10 SEMANAS A ESTERIL-GLUCÓSIDO SINTÉTICO

Se alimentaron ratones CD-1 macho de seis meses de edad con dosis variables de BSSG sintético durante 10 semanas, luego se permitió que envejecieran durante 1 mes con una dieta de comida normal antes del sacrificio (véase la figura 3, paneles A-C). Se cuantificaron las neuronas motoras en la médula lumbar, mediante tinción de
45 Nissl e inmunohistoquímica (IHC) de colina acetiltransferasa (ChAT), tal como se muestra en la figura 3A. Se cuantificaron las neuronas motoras en la corteza motora en la que se detectaron las neuronas mediante IHC frente a CTIP2 (altamente expresada en neuronas motoras corticoespinales), tal como se muestra en la figura 3C. Se detectó caspasa-3 activada en la médula espinal lumbar (asta posterior) mediante IHC, tal como se muestra en la figura 3B. Se cuantificaron las neuronas motoras en la médula espinal lumbar de los animales que se permitió que
50 envejecieran durante 5 meses tras el cese de BSSG, tras la tinción de Nissl, tal como se muestra en la figura 3D ($* P < 0,01$, ANOVA). Se observa una pérdida progresiva de neuronas motoras cuando se permitió que envejeciesen los ratones en ausencia de exposición a BSSG adicional.

Se tiñeron secciones de médula espinal lumbar con violeta de cresilo y se contaron las neuronas motoras del asta posterior bajo un objetivo 40X. Se incluyeron todas las neuronas motoras en el campo de visión en los resultados. Se usaron múltiples secciones (N=6) de cada ratón. Se realizaron los recuentos en secciones de médula espinal que estaban separadas al menos 150 µm (en el plano rostrocaudal) asegurándose de que no se contaban neuronas motoras dos veces. Además, los recuentos incluyeron todas las neuronas motoras evidentes incluyendo neuronas motoras que pueden haber parecido atroficas o dañadas.

Se realizó el marcaje de caspasa-3 activa (Promega, Madison, WI) tal como sigue. Se identificaron los niveles de caspasa-3 activa mediante inmunohistoquímica basándose en el trabajo previo (Schulz *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005). En resumen, se incubaron secciones preparadas en portaobjetos en disolución de bloqueo durante 2 horas y luego con el anticuerpo primario (Casp-3 1:250, producido en conejo) durante la noche a temperatura ambiente. Se enjuagaron las secciones y se incubaron en anticuerpos secundarios fluorescentes (anticuerpo anti-IgG de conejo 1:200, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) durante 2 horas. Se visualizaron las secciones usando microscopía de fluorescencia. Se usó medio de preparación con DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) para la contratinción de todos los núcleos.

Después de las pruebas conductuales, se anestesiaron todos los animales con halotano y se perfundieron mediante perfusión con punción cardiaca con PBS helado y paraformaldehído (PFA) al 4%. Luego se sumergieron muestras de cerebro y médula espinal en PFA al 4%, durante 2 días, se crioprotegieron en sacarosa al 20%, disolución de azida de sodio al 0,5% durante 1 día, y se congelaron hasta la obtención de secciones para la inmunohistoquímica. Este ensayo puede realizarse mediante cualquier procedimiento de tinción inmunohistoquímica conocido en la técnica.

EJEMPLO 7

HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA DETECTAR LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN EL TRONCO ENCEFÁLICO DE UN RATÓN NORMAL

Se realizó ISH usando ribosondas antisentido específicas de progranulina en cerebro de ratón adulto normal incrustado en parafina cortado en sección sagital. Se detectaron altos niveles de expresión de progranulina en células grandes que tenían una morfología neuronal, tal como se muestra en la figura 4A a un aumento 10X y la figura 5A a un aumento 40X.

La figura 4B y la figura 5B muestran secciones de control a un aumento 10X y un aumento 40X, respectivamente, incubadas con sondas sentido.

EJEMPLO 8

HIBRIDACIÓN *IN SITU* PARA DETECTAR LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN CÉLULAS DEL ASTA ANTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL CERVICAL DE UN RATÓN NORMAL

Se realizó ISH usando ribosondas antisentido específicas de progranulina en secciones congeladas de médula espinal de ratón adulto normal cortada en sección transversal. Se detectaron altos niveles de expresión de progranulina en las neuronas motoras del asta anterior, tal como se muestra en la figura 6A frente a una sección de control mostrada en la figura 6B, incubada con una sonda sentido.

EJEMPLO 9

DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN LA CORTEZA MOTORA DE RATONES ALIMENTADOS CON HARINA DE CÍCADA LAVADA

Se alimentaron ratones CD1 macho adultos con una dieta de o bien comida normal o bien comida que contenía 1 gramo al día de harina de cícada lavada. Tras 10 semanas de alimentación, se sacrificaron los ratones y se realizó ISH usando ribosondas específicas de progranulina en secciones congeladas de corteza motora. Se detectaron altos niveles de expresión de progranulina en las capas 4-5 de la corteza del ratón de control usando una sonda antisentido (figura 7A). En cambio, usando una sonda antisentido, la corteza del ratón alimentado con cícada presentó una expresión reducida de progranulina tal como se muestra en la figura 7B. Hubo una disminución de la expresión de progranulina para cada célula en el tejido del ratón alimentado con cícada. No hubo evidencia de perturbación macroscópica de la arquitectura de la corteza tras el tratamiento con cícada. La figura 7C muestra una sección de control incubada con una sonda sentido (aumento 10X). En las figuras 8A-C, se representan las mismas secciones mostradas en la figura 7 a un mayor aumento (aumento 40X).

EJEMPLO 10

LA EXPOSICIÓN A BSSG SINTÉTICO DA COMO RESULTADO LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL

Se alimentaron ratones CD1 macho adultos con una dieta de o bien comida normal o bien comida que contenía

1000 µg al día de BSSG sintético. Tras 10 semanas de alimentación con comida que contenía BSSG y un mes adicional con comida de laboratorio normal, se sacrificaron los ratones y se realizó ISH usando ribosondas antisentido específicas de progranulina en secciones congeladas de médula espinal cervical cortada en sección transversal. Se detectaron altos niveles de expresión de progranulina en las células del asta anterior del ratón de control tal como se muestra mediante la sección en la figura 9A. En el ratón tratado con BSSG (sección mostrada en la figura 9B), la expresión de progranulina tanto disminuyó de intensidad como se observó en menos células del asta anterior. En la figura 9C, se muestra una sección de control negativo, incubada con una sonda sentido.

EJEMPLO 11

EL AUMENTO DE LA EXPOSICIÓN A BSSG DA COMO RESULTADO NEUROPATOLOGÍA Y PÉRDIDA DE LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA MÁS PRONUNCIADAS EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL

Se alimentaron ratones CD1 macho adultos con una dieta de comida que contenía 10, 100 ó 1000 µg al día de BSSG sintético. Tras 10 semanas de alimentación con comida que contenía BSSG y un mes adicional con comida de laboratorio normal, se sacrificaron los ratones y se realizó ISH usando ribosondas específicas de progranulina en secciones congeladas de médula espinal cervical cortada en sección transversal. Se asoció una neuropatología más pronunciada con el aumento de la exposición a BSSG. Una pérdida progresiva de células que expresan progranulina y que presentan una morfología de neuronas motoras es evidente con el aumento de exposición a BSSG. Adicionalmente, existe una pérdida más pronunciada de la expresión de progranulina por célula a medida que aumenta la exposición a BSSG. Los ratones evaluados en las figuras 9 y 10 son los mismos ratones analizados en el ejemplo 3, en los que se observó una pérdida dependiente de la dosis de la salud de las neuronas motoras en la médula espinal lumbar (véase la figura 3, paneles A, B y D).

EJEMPLO 12

EL SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN PEZ CEBRA CONDUCE A PÉRDIDA DE CÉLULAS DEL ASTA ANTERIOR

Cepas y cría de peces cebra

Se adquirieron peces cebra silvestres (cepa *zdr*) de Aquatica Tropicals Inc. (Plant City FL) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 14 h/10 h a 28,5°C en un acuario de laboratorio (Allantown Aquaneering, Allantown, NJ). Se alimentaron los peces dos veces al día, y se criaron tal como se describe en otro documento (Mullins *et al*, 1994). Se recogieron embriones para estudios de desarrollo de los tanques y se clasificaron según criterios convencionales (Kimmel *et al*, 1995) y por horas tras la fecundación (htf).

Microinyecciones de embriones

Se resuspendieron oligonucleótidos de morfolino (Gene Tools LLC, Philomath OR) en 100 µl de agua estéril a una concentración de 25 ng/µl. Las disoluciones de inyección consistieron en oligonucleótidos de morfolino (MO) 1-15 ng/nl diluido en tampón Danieu (NaCl 58 mM, KCl 0,7 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Ca(NO₃)₂ 0,6 mM, HEPES 5,0 mM; pH 7,6), y se incluyó rojo fenol al 0,05% como trazador visual (Nasevicius *et al*, 2000). Se inyectaron embriones de pez cebra en las fases de 1 y 2 células con 1-15 ng de MO/embrión. Los oligonucleótidos de morfolino se diseñaron para seleccionar como diana la 5'-UTR de pgrn-a de pez cebra y los controles son tal como sigue:

MO2-UTR, 5'-GAGCAGGTGGATTTGTGAACAGCGG-3'

Apareamiento erróneo de MO2, **5'-GAACACGTGGATTTCTGAAGAGAGG-3'**

Mezclado, **5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'**.

Se consideraron concentraciones de 15 ng/embrión (7,5 ng/nl) como el límite superior ya que el control mezclado produce una minoría constante de defectos de desarrollo no específicos a esta concentración. Se permitió que se desarrollasen los embriones a 28,5° C hasta que se recogieron para su análisis molecular en fases de desarrollo variables.

Inmunofluorescencia de preparación completa

Para la inmunotinción con Zn8, se fijaron embriones usando paraformaldehído (PFA) al 4% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se almacenaron en metanol al 100% a -20°C. Se rehidrataron los embriones con PBST (Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 20mM, NaCl 137mM, KCl 27 mM, Tween-20 al 0,1%, pH 7,4) y se permeabilizaron mediante digestión con proteinasa K 10 µg/ml durante 20 minutos seguido por fijación posterior en PFA al 4%/PBS durante 20 minutos. Después de varios lavados con PBST, se bloquearon los embriones en PBST que contenía suero de ternero al 5%. Después de tres horas, se añadió el anticuerpo monoclonal primario anti-Zn8 (ZIRC, Eugene OR) a una dilución 1:1000 y se incubó durante la noche a 4° C. Después de lavado extenso en PBST, se incubaron los embriones con anticuerpo anti-ratón conjugado con

Alexa488 (Invitrogen) a 1:200 durante 2 horas en PBST con suero de ternero al 5%. Se visualizó la fluorescencia con un estereomicroscopio Leica MZ FLIII equipado con un filtro de GFP.

Tal como se muestra en la figura 11, un silenciamiento de la expresión de progranulina en pez cebra conduce a las manifestaciones morfológicas de dismorfogénesis craneofacial, edema pericárdico y distensión intestinal visceral. Adicionalmente, aunque no es visible en la fotografía, se observó una pérdida de neuronas motoras.

EJEMPLO 13

CULTIVO DE CÉLULAS NSC34

Se mantuvo la línea celular NSC34 en DMEM con suero bovino fetal al 10% a menos que se establezca de otro modo [véase Cashman *et al.*, Dev Dyn. 194:209-21 (1992)]. Para transfecciones estables, se transfectaron células NSC34 con progranulina humana (pcDNA-Pgrn) o vector vacío (pcDNA) usando Lipofectamine (Invitrogen) y se seleccionaron con G418 durante un mes según las instrucciones del fabricante. Se llevaron a cabo ensayos de privación de suero en placas de 6 pocillos usando 200.000 células/pocillo y se cultivaron en 4 ml de RPMI (con glutamina) durante 3, 6, 9, 12 y 15 días sin la adición o el intercambio de medio nuevo. Para cada punto temporal, se determinó el número de células promedio a lo largo de 6 campos visuales por pocillo a un aumento 10x usando un microscopio de contraste de fase Olympus (figura 14, panel A).

Para ensayos de hipoxia, se sembraron las células a una densidad de 50.000/pocillo en placas de 24 pocillos, se privaron de nutrientes durante 24 horas en RPMI sin suero seguido por la adición de DMEM o RPMI libre de suero nuevo o que contenía suero al 5% y se mantuvieron en una cámara de hipoxia que contenía el 1% de O₂, el 5% de CO₂, siendo el resto N₂ durante 72 horas. Se mantuvieron células en el entorno hipóxico durante 3 días, se tripsinizó y se contaron usando un hemocitómetro (figura 15).

Para cultivos a largo plazo, se sembraron células NSC34 a una densidad de 200.000/pocillo en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en medio RPMI libre de suero. Se proporcionó medio nuevo cada 10 días y se tomaron fotos con aumento 10x a los 20 y 57 días usando un microscopio de contraste de fase Olympus (figura 16).

EJEMPLO 14

INMUNOFLUORESCENCIA DE CÉLULAS NSC34

Se cultivó la línea celular NSC34, junto con transfectantes estables sobre cubreobjetos de vidrio en DMEM con suero bovino fetal al 10%. Se fijaron las células en PFA al 4%, se enjuagaron dos veces con PBST, y se incubaron con tampón de permeabilización (PBST con Triton X-100 al 0,2%) durante 20 minutos. Después de lavarse tres veces con PBST, se sometieron los cultivos a fijación posterior durante 10 minutos con PFA al 4%, seguido por lavado extenso. Se incubaron las células fijadas en PBST con reactivo de bloqueo de membrana al 0,5% (p/v) (GE Healthcare) durante una hora seguido por la adición de anticuerpo de oveja anti-progranulina de ratón, (dilución 1:500, R&D Systems).

Se continuó con la incubación con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Se lavaron los cultivos tres veces en PBST, luego se incubaron con anticuerpo de asno anti-oveja-Alexa-488 (1:200, Invitrogen) junto con conjugado faloidina-Alexa 594 (20 µM), en el tampón de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces en PBST, luego se sometieron a contratinción usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron los cultivos tres veces con PBST, dos veces con ddH₂O y luego se prepararon sobre portaobjetos usando Immu-mount (Thermo Fisher). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio Axioskop 2 equipado con los filtros de fluorescencia apropiados. Se fusionaron las imágenes usando Adobe Photoshop 7.0 (figura 17).

EJEMPLO 15

ENSAYO TUNEL DE APOPTOSIS

Se sembraron células NSC34 sobre cubreobjetos sometidos a fotograbado, de vidrio alemán (Electron Microscopy Sciences) en placas de 6 pocillos a 200.000/pocillo y se cultivaron en 4 ml de RPMI (con glutamina) durante seis días. En el momento de la fijación, se lavaron las células dos veces en PBS, luego se fijaron usando PFA al 4%/PBS durante 20 minutos. Después de enjuagarse tres veces en PBST, se incubaron las células en tampón de permeabilización (Triton X-100 al 0,2% en PBST) durante 20 minutos. Después, se sometieron las células a fijación posterior durante 10 minutos con PFA al 4%/PBS. Después de lavarse extensamente con PBST, se almacenaron las células a 4°C en PBS estéril.

En el momento del procesamiento, se enjuagaron las células una vez con PBS, luego se recubrieron con disolución de reacción del kit de detección de muerte *in situ* con fluoresceína (Roche Applied Science), tal como se indica en las instrucciones del fabricante. Se incubaron las células a 37°C durante 1 hora, y luego se enjuagaron dos veces con PBST a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de enjuagar tres veces en PBST, se sometieron las células a contratinción con DAPI 300 nM durante 5 minutos en la oscuridad. Entonces se enjuagaron las células dos

veces con PBST, una vez con ddH₂O y luego se prepararon sobre portaobjetos usando Immu-mount (Thermo Fisher). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio Axioskop 2 equipado con filtros apropiados y se contaron manualmente las células totales (DAPI) frente a las células apoptóticas (FITC) mediante inspección visual (figura 14, panel C).

5 EJEMPLO 16

ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON BROMODESOXIURIDINA (BRDU)

Se sembraron células NSC34 sobre cubreobjetos sometidos a fotograbado, de vidrio alemán (Electron Microscopy Sciences) en placas de 6 pocillos a 200.000/pocillo y se cultivaron en 4 ml de RPMI (con glutamina) durante seis días. 12 horas antes de la fijación/procesamiento, se añadió disolución de marcaje con BrdU a cada pocillo a una
10 concentración de 10 µM (Roche Applied Sciences). En el momento de la fijación, se lavaron las células tres veces en PBS para retirar la BrdU no incorporada en exceso, luego se fijaron usando PFA al 4%/PBS durante 20 minutos. Después de enjuagarse tres veces en PBST, se incubaron las células en tampón de permeabilización (Triton X-100 al 0,2% en PBST) durante 20 minutos. Después, se sometieron las células a fijación posterior durante 10 minutos con PFA al 4%/PBS. Después de enjuagarse tres veces con PBST, se pusieron las células en borato de sodio 0,1 M
15 pH 8,5 durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Se incubaron los cultivos en PBST con reactivo de bloqueo de membrana al 0,5% (p/v) (GE Healthcare) durante una hora seguido por la adición de anticuerpo anti-BrdU-Alexa-488 (1:200, Invitrogen) durante 45 minutos en tampón de bloqueo a temperatura ambiente. Después de enjuagar tres veces en PBST, se sometieron las células a contratinción con DAPI 300 nM durante 5 minutos en la oscuridad. Entonces se enjuagaron las células dos veces con PBST, una
20 vez con ddH₂O y luego se prepararon sobre portaobjetos usando Immu-mount (Thermo Fisher). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio Axioskop 2 equipado con filtros apropiados y se contaron manualmente las células totales (DAPI) frente a las células en proliferación (Alexa-488) mediante inspección visual (figura 14, panel B).

EJEMPLO 17

NEURONAS MOTORAS PRIMARIAS DE RATÓN

Se prepararon cultivos disociados de neuronas motoras primarias a partir de ratones en el día embrionario 13 (E13), se sembraron sobre cubreobjetos o bien de 25 mm o bien de 14 mm (Electron Microscopy Sciences), y se hicieron crecer durante de 4 a 7 semanas después de la disociación [véase Roy *et al.*, J. Neurosci. 18:9673-9684 (1998)]. Se fijaron los cultivos dentro de las placas originales usando PFA al 4%, se enjuagaron dos veces con PBST, y se incubaron con tampón de permeabilización (PBST con Triton X-100 al 0,2%) durante 20 minutos. Después de
30 lavarse tres veces con PBST, se sometieron los cultivos a fijación posterior durante 10 minutos con PFA al 4%, seguido por lavado extenso. Se incubaron los cultivos fijados en PBST con reactivo de bloqueo de membrana al 0,5% (p/v) (GE Healthcare) junto con anticuerpo de cabra anti-Fab de ratón 50 µg/ml (Rockland Immunochemicals) durante una hora seguido por la adición de anticuerpo de oveja anti-progranulina de ratón, (dilución 1:500, R&D Systems) y anticuerpo de ratón anti-SMI 32, (1:1000, Sternberger Monoclonals).

Se continuó con la incubación con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Se lavaron los cultivos tres veces en PBST, luego se incubaron con el anticuerpo de asno anti-oveja-Alexa 594 (1:200, Invitrogen) y anticuerpo de cabra anti-ratón-Alexa-488 (Invitrogen) en tampón de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces en PBST, luego se sometieron a contratinción usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron los cultivos tres veces
40 con PBST, dos veces con ddH₂O, y se prepararon sobre portaobjetos usando Immu-mount (Thermo Fisher). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio Zeiss Axioskop 2 equipado con los filtros de fluorescencia apropiados. Se fusionaron las imágenes usando Adobe Photoshop 7.0 (figura 12). La identificación de las neuronas motoras primarias dentro del cultivo heterogéneo se basó en la inmunoreactividad con SMI32 y el tamaño de cuerpo celular [véase Roy *et al.*, J. Neurosci. 18:9673-9684 (1998)].

45 EJEMPLO 18

CRIOSECCIONES DE MÉDULA ESPINAL DE RATÓN

Se almacenaron crio secciones preparadas en OCT de ratones CD-1 de 8 semanas de edad a -80°C antes de la inmunofluorescencia. Se descongelaron las crio secciones a temperatura ambiente y se fijaron con PFA al 4%, se enjuagaron dos veces con PBST, y se incubaron con tampón de permeabilización (PBST con Triton X-100 al 0,2%)
50 durante 20 minutos. Después de lavarse tres veces con PBST, se sometieron los cultivos a fijación posterior durante 10 minutos con PFA al 4%, seguido por lavado extenso. Se incubaron las secciones fijadas en PBST con reactivo de bloqueo de membrana al 0,5% (p/v) (GE Healthcare) junto con anticuerpo de cabra anti-Fab de ratón 50 µg/ml (Rockland Immunochemicals) durante una hora seguido por la adición de anticuerpo de oveja anti-progranulina de ratón (dilución 1:500, R&D Systems) y anticuerpo de ratón anti-SMI 32 (1:1000, Sternberger Monoclonals).

Se continuó con la incubación con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C. Se lavaron los cultivos tres veces en PBST, y se incubaron con anticuerpo de asno anti-oveja-Alexa 594 (1:200, Invitrogen) y anticuerpo de cabra anti-

ratón-Alexa-488 (Invitrogen) en tampón de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces en PBST y se sometieron a contratinción usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se lavaron los cultivos tres veces con PBST, dos veces con ddH₂O y se prepararon sobre portaobjetos usando Immu-mount (Thermo Fisher). Se visualizó la fluorescencia con un microscopio Zeiss Axioskop 2 equipado con los filtros de fluorescencia apropiados. Se fusionaron las imágenes usando Adobe Photoshop 7.0 (figura 13). La identificación de las neuronas motoras dentro de la sección de tejido se basó en la inmunorreactividad con SMI32 y el tamaño de cuerpo celular [véase Roy *et al.*, J. Neurosci. 18:9673-9684 (1998)].

EJEMPLO 19

AXOTOMÍA

Se sometieron ratones de control (C57bl/6) a axotomía proximal unilateral de las raíces espinales L3-L5 y se les realizó la autopsia en el día 0 bien 3 o bien 7 tras la axotomía. Los ratones tenían 6 semanas de edad en el momento de la cirugía, y tras la axotomía se les permitió recuperarse con alimentos y agua a voluntad. Se anestesiaron los ratones y se sacrificaron mediante perfusión cardiaca. Se obtuvieron secciones en parafina a través del nivel de origen espinal de las unidades motoras y se tiñeron las secciones para detectar la inmunorreactividad frente a progranulina usando inmunohistoquímica de rutina (1:200, R&D Systems, durante la noche a 4°C, recuperación antigénica durante 7 minutos en un tampón TRIS-EDTA de alto pH en ebullición; desarrollo del anticuerpo secundario usando anticuerpo anti-oveja biotilado con vector y el kit Vectastain Elite ABC y visualización con DAB) (figura 18).

EJEMPLO 20

PROTECCIÓN FRENTE A LA TOXICIDAD POR MPTP EN CÉLULAS PC12

Se hicieron crecer células PC12 sobre placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno, en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) en presencia de suero de ternero fetal (FCS) al 10% complementado con glutamina, penicilina y estreptomycin. Un día después de la siembra en placas (a una confluencia del 60-70%, ≈ 40.000 células/pocillo), se reemplazó el medio de crecimiento por medio con bajo contenido en suero (FCS al 2%) con progranulina 4 nM (PGRN+) o sin progranulina (PGRN-) (figura 19). Veinticuatro horas después, se retiró el medio y se expusieron las células a: MPTP 0, 100, 200, 500 ó 1000 µM en presencia de DMEM que contenía FCS al 1%. Tras otras 24 h de cultivo, se retiró el medio que contenía MPTP y se realizó el ensayo colorimétrico con metil-tiazolil-tetrazolio (MTT) para evaluar la viabilidad celular [véase Zheng *et al.*, *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 43(5-6):155-158 (2007)]

EJEMPLO 21

TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El modelo de ratón Tg2576 de enfermedad de Alzheimer expresa la mutación sueca de APP (APP_{K670N,M671L}) a altos niveles bajo el control del promotor de la proteína priónica de hámster. Estos ratones generan altos niveles de Aβ en cerebro y desarrollan una deposición progresiva, relacionada con la edad en forma de placas de amiloide en el hipocampo, de manera similar a lo observado en seres humanos. Para evaluar la influencia de progranulina sobre el desarrollo de estas placas, se trataron ratones de 8 meses de edad, mediante infusión intrahipocámpica unilateral, con un vector lentiviral recombinante que codifica para o bien la proteína fluorescente verde (GFP) o bien progranulina (PGRN). Luego se sacrificaron los animales mediante perfusión a los 12 meses de edad. Se realizó un análisis inmunocitoquímico de la deposición de Aβ en secciones frontales de 20 µm de flotación libre. Para la evaluación cuantitativa, se midió el área total ocupada por los depósitos inmunoreactivos anti-Aβ a lo largo de 3 secciones a través del hipocampo. La figura 23 muestra la supervivencia de ratones Tg2576 tras la administración intracerebral de lentivirus que expresan o bien GFP o bien PGRN. La terapia génica con lentivirus que expresa PGRN da como resultado el aumento de supervivencia de los ratones transgénicos para amiloide.

Animales: Los estudios usaron ratones Tg2576 hembra de 20-25 g. Se alojaron los animales en un entorno de temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y acceso a voluntad a comida convencional y agua. Los procedimientos usados en este estudio los aprobó el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) de la Fundación Mayo.

Administración de vector viral: Se anestesiaron los animales usando isoflurano (al 1%) y se colocaron en un marco estereotáxico de Kopf. Para la transducción hipocámpica, se inyectó el vector lentiviral que expresa o bien GFP o bien PGRN de manera unilateral en la parte izquierda del hipocampo (A.P. -1,7, M.L. -1,5, D.V. -2,3) (2 µl/sitio) a una velocidad de 0,25 µl/minuto mediante una cánula de infusión conectada mediante tubos de polietileno (50 PE) a una jeringa de Hamilton de 50 µl accionada por una bomba de Harvard. Tras la infusión, se permitió que el vector difundiera alejándose de la cánula durante cuatro minutos antes de la retirada.

Inmunohistoquímica: Se sacrificaron los ratones mediante perfusión transcárdica de solución salina al 0,9%, se extirparon los cerebros y se sometieron a fijación posterior en paraformaldehído al 4% para el análisis inmunohistoquímico. Se cortaron secciones frontales de 20 µm de grosor simétricas en un criostato y se

almacenaron en una disolución de Millionigs. Se pretrataron secciones de flotación libre con formamida al 70% en Triton X-100/solución salina tamponada con Tris [TBSt] a 37°C durante 30 minutos y se enjuagaron en TBSt. Luego se incubaron las secciones en H₂O₂ al 1% en TBSt durante 30 minutos, se enjuagaron en TBSt, y se incubaron en disolución de bloqueo (suero de cabra al 5%/lisina 100 mM/TBSt al 0,3%) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con el anticuerpo primario contra A β (MM-27 33,1.1; 1:2000) durante la noche a temperatura ambiente. Luego se incubaron las secciones en un anticuerpo secundario biotinilado seguido por complejo avidina-biotina-peroxidasa usando el kit Vectastain Elite. Se prepararon las secciones sobre portaobjetos recubiertos con gelatina y se taparon con cubreobjetos con Entallen (figura 20, panel A).

Análisis cuantitativo: Se realizaron estudios de deposición de A β en un campo 100X en secciones tomadas del hipocampo dorsal. Para la evaluación cuantitativa, se midió el área total ocupada por depósitos inmunorreactivos anti-A β en tres niveles anterior-posterior. Se calculó la carga de amiloide como el área total en el campo de medición ocupado por producto de reacción. Se calcularon las mediciones para toda la región hipocámpica contenida dentro de cada sección (figura 20, panel B). Se obtuvieron mediciones estereológicas no sesgadas usando un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador y el software de análisis de imágenes Zeiss Axiovision 4.7. El investigador era ciego para las condiciones de tratamiento.

Análisis estadístico: Se analizaron los datos usando un análisis de la varianza. Cuando se obtuvieron valores de F significativos, se realizaron comparaciones por pares planificadas usando Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

EJEMPLO 22

TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON

Se determinó la influencia de progranulina sobre la pérdida de célula neuronales dopaminérgicas en un modelo de ratón inducido con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) de enfermedad de Parkinson, mediante tratamiento de ratones C57/BL6, a través de infusión intranigral unilateral, con un vector lentiviral que codifica para o bien la proteína fluorescente verde (GFP) o bien progranulina (PGRN). Tres semanas después, los animales recibieron inyecciones diarias de MPTP (20 mg/kg, i.p.) durante 5 días y luego se sacrificaron mediante perfusión 10 días tras la última inyección. Se realizó inmunomarcaje para TH en secciones frontales de 20 μ m de flotación libre. Para la evaluación cuantitativa, se contó el número total de células TH⁺ a lo largo de 3 secciones a través de la SNC.

Animales: Los estudios usaron ratones C57/B16 macho de 20-25 g. Se alojaron los animales en un entorno de temperatura controlada con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y acceso a voluntad a comida convencional y agua. Los procedimientos usados en este estudio los aprobó el Comité Institucional de Cuidado de Animales.

Administración de vector viral: Se anestesiaron los animales usando isoflurano (al 1%) y se colocaron en un marco estereotáxico de Kopf. Para la transducción intranigral, se inyectó el vector de LV que expresa o bien GFP o bien PGRN de manera unilateral en la parte izquierda de la SNC (A.P. -2,8, M.L. -1,3, D.V. -4,5) (2 μ l/sitio) a una velocidad de 0,25 μ l/minuto mediante una cánula de infusión conectada mediante tubos de polietileno (50 PE) a una jeringa de Hamilton de 50 μ l accionada por una bomba de Harvard. Tras la infusión, se permitió que el vector difundiera alejándose de la cánula durante cuatro minutos antes de la retirada.

Inmunohistoquímica: Se sacrificaron los ratones mediante perfusión transcardiaca de solución salina al 0,9%, se extirparon los cerebros y se sometieron a fijación posterior en paraformaldehído al 4% para el análisis inmunohistoquímico. Se cortaron secciones frontales de 20 μ m de grosor simétricas en un criostato y se almacenaron en una disolución de Millionigs. Se pretrataron secciones de flotación libre con formamida al 70% en Triton X-100/solución salina tamponada con Tris [TBSt] a 37°C durante 30 minutos y se enjuagaron en TBSt. Luego se incubaron las secciones en H₂O₂ al 1% en TBSt durante 30 minutos, se enjuagaron en TBSt, y se incubaron en disolución de bloqueo (suero de cabra al 5%/lisina 100 mM/TBSt al 0,3%) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por incubación con el anticuerpo primario contra A β (MM-27 33,1.1; 1:2000) durante la noche a temperatura ambiente. Luego se incubaron las secciones en un anticuerpo secundario biotinilado seguido por complejo avidina-biotina-peroxidasa usando el kit Vectastain Elite. Se prepararon las secciones sobre portaobjetos recubiertos con gelatina y se taparon con cubreobjetos con Entallen (figura 21, panel A).

Recuento celular: Se contó el número de cuerpos celulares inmunopositivos por un observador ciego para el historial de tratamiento. Se obtuvieron recuentos de células celulares estereológicas no sesgadas usando un sistema de análisis de imágenes asistido por ordenador y el software de análisis de imágenes Zeiss Axiovision 4.7. Para el recuento de células de la sustancia negra, se definieron regiones de la parte compacta mediante la distribución de células TH-positivas dentro de un conjunto de puntos de referencia/límites anatómicos claros, usados para demarcar el SNC. Se contaron las células inmunopositivas usando un objetivo 20X (área de marco de toma de muestra, 90.000 μ m²) que contenía una rejilla óptica. Se colocó el marco de recuento sobre el área de recuento y luego se movió sistemáticamente en la dirección X-Y hasta que se tomaron muestras de toda el área demarcada. Se sumó para cada animal el número de células inmunopositivas contadas a lo largo de 4 secciones por animal (figura 21, panel B).

Análisis estadístico: Se analizaron los datos usando una prueba de la t de Student, de dos colas con una varianza independiente y un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

EJEMPLO 23

5 LA INCUBACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE NEURONAS MOTORAS INMORTALIZADAS CON MÓDULOS DE GRANULINA/EPITELINA (GEM) INFLUYE EN LA PROLIFERACIÓN/SUPERVIVENCIA CELULAR

Se sembraron células NSC 34 (5000 célula/pocillo) en placas de 96 pocillos usando 100 μ l de DMEM/FBS al 10%. Al día siguiente, se retiró el medio y se reemplazó por 100 μ l de RPMI (sin suero) que contenía: 0, 50 ó 100 ng/ml de grn D o grn F. Se incubaron los cultivos durante 13 días tras lo cual se determinó la proliferación/supervivencia celular usando el ensayo con CyQUANT® NF (kit n.º C35006).

El ensayo con CyQUANT® NF se basa en la medición del contenido de ADN celular mediante la unión a un colorante fluorescente. Se determina el grado de proliferación/supervivencia comparando la intensidad de fluorescencia para células NSC-34 tratadas con GEM (50 y 100 ng) con relación a controles no tratados (0 ng).

Según las instrucciones de los fabricantes, el protocolo incluía la aspiración de medio de crecimiento, el reemplazo por 100 μ l de disolución de unión de colorante por pocillo, incubación durante 30 minutos tras lo cual se medía la intensidad de fluorescencia de cada muestra usando un lector de microplacas de fluorescencia con excitación a ~485 nm y detección de emisión a ~530 nm (figura 22). La línea celular de neuronas motoras inmortalizadas (NSC-34) respondió a la incubación con grn F y grn D con o bien proliferación/supervivencia (grn F) o bien sin efecto (grn D) de manera similar a la respuesta de células neuronales extra incubadas en presencia de estos GEM (descritos en: Tolkatchev D. *et al.*, Protein Sci. 17:711-724, 2008).

EJEMPLO 24

EL LENTIVIRUS QUE EXPRESA PROGRANULINA PROTEGE A RATONES EXPUESTOS A BSSG

La figura 24 muestra recuentos de neuronas motoras espinales y actividad colina acetiltransferasa en ratones tratados con lentivirus que expresa PGRN. Se evaluaron los recuentos de neuronas motoras mediante tinción de Nissl. Los recuentos de neuronas motoras fueron más normales en ratones tratados con lentivirus que expresa PGRN expuestos a BSSG con relación a ratones de control (tratados con solución salina) expuestos a BSSG, con un valor de P (prueba de la t de Student) que se aproximaba a la significación en 0,068. La evaluación inmunohistoquímica de colina acetiltransferasa (ChAT) sugirió una disminución de la actividad de este marcador de neuronas motoras en células del asta anterior de ratones expuestos a BSSG tratados con solución salina con relación a todos los demás grupos de tratamiento (paneles en la parte superior derecha de la figura 24, panel (B). Para la tinción de Nissl, parecieron reducirse los números de neuronas motoras positivas para ChAT (figura 24, panel C) en ratones de control (tratados con solución salina) expuestos a BSSG.

Vector lentiviral: El vector lentiviral que expresa progranulina se diseñó y produjo bajo contrato por Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Se determinó que el título era de 1×10^8 UT/ml mediante el ensayo de resistencia a blasticidina. Se almacenó el lentivirus en crioviales congelados a -80°C hasta el día de la inyección.

Animales: Se alojaron individualmente ratones CD-1 macho obtenidos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA) a 22°C con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h. Se dividieron aleatoriamente cuarenta animales en 4 grupos: i) a los que se les inyectó PGRN-LV con alimentación con BSSG, ii) a los que se les inyectó PGRN-LV con comida para ratones normal, iii) a los que se les inyectó solución salina con alimentación con BSSG y iv) a los que se les inyectó solución salina con comida para ratones normal. Las manipulaciones experimentales las aprobó el Comité para el Cuidado de Animales de la Universidad de Columbia Británica.

Administración viral: A los tres meses de edad, se anestesiaron ratones CD-1 macho que recibieron el lentivirus que expresa progranulina y ratones de control a los que se les inyectó solución salina, usando isoflurano y se administró el vector lentiviral o control de solución salina mediante inyección directa en el músculo gastrocnemio derecho. Se realizaron cinco inyecciones que consistía cada una en 5 μ l (1×10^8 UT/ml) para aumentar el número de neuronas motoras transducidas.

Administración de BSSG: Se sintetizó β -sitosterol β -D-glucósido (BSSG) bajo contrato en el Departamento de Química en la Universidad de Columbia Británica. Se caracterizó el compuesto sintetizado usando RMN (^1H y ^{13}C) y espectrometría de masas de alta resolución. Se verificó una pureza de al menos el 95% mediante HPLC. Para crear este gránulo experimental a la concentración deseada (2 mg de BSSG/día), se mezcló BSSG con gránulos molidos para ratones (Mouse Diet, Lab Diet®, Richmond, IN). Se inició el paradigma de alimentación tres semanas tras las inyecciones intramusculares. Se proporcionaron los gránulos tratados cada mañana, restableciendo el acceso a comida habitual a voluntad por la noche una vez que los animales habían ingerido el gránulo proporcionado. En general, todos los ratones en el grupo de BSSG se tomaron de manera rutinaria todo el gránulo. Se alimentaron ratones de control sólo con comida para ratones normal. Se realizó la alimentación con BSSG diariamente durante 15 semanas seguido por un periodo de lavado de 5 semanas.

Histología: En el momento del sacrificio, se anestesiaron los animales con halotano y se perfundieron mediante una punción cardiaca con PBS helado y paraformaldehído (PFA) al 4%. Se extirparon muestras de médula espinal y cerebro y se sumergieron en PFA al 4% durante 2 días, se crioprotegieron en sacarosa al 30% en disolución de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4 durante 1 día, y luego se almacenaron congeladas a -80°C hasta la obtención de secciones para la inmunohistología en un criostato motorizado Leica CM3050 S (Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Se obtuvieron secciones de médula espinal en serie a 20 µm. Se obtuvieron secciones de médula espinal lumbar (L4-L6) en el plano frontal coronal [Wilson *et al.*, Neuromolecular Medicine, 3, 105-118 (2003); Wilson *et al.*, Neuroimage, 23, 336-343 (2004)]. Se realizó la inmunohistoquímica al mismo tiempo para las secciones para todos los animales. Se llevó a cabo microscopía de las secciones teñidas y el registro del nivel de marcaje por observadores ciegos para la identidad de los ratones.

Tinción de Nissl: Se determinaron recuentos de neuronas motoras usando la tinción de Nissl. Se preparó una disolución de violeta de cresilo al 0,5% añadiendo 0,5 g de acetato de violeta de cresilo (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO) a 100 ml de ddH₂O caliente, luego acidificando con 10 gotas de ácido acético glacial. Después de haberse mezclado y enfriado la disolución, se filtró a través de papel de filtro (Whatman® n.º 1). En primer lugar se enjuagaron las secciones preparadas en portaobjetos dos veces en 1X PBS durante 2 minutos para retirar el O.C.T. en exceso. Luego se pusieron las secciones en etanol al 95% (5 minutos), etanol al 70% (3 minutos) y dH₂O (2 minutos). Se dejó que se tiñesen los portaobjetos en disolución de violeta de cresilo al 0,5% durante 3 minutos. Después de la tinción, se enjuagaron los portaobjetos en ddH₂O durante 1 minuto, luego se deshidrataron en etanol al 70% + ácido acético al 1% (1,5 minutos), etanol al 70% (30 segundos), etanol al 95% (2 minutos), dos cambios de etanol al 100% (varias inmersiones) y dos cambios de xileno (varias inmersiones). Se permitió que se secasen los portaobjetos antes de prepararlos en medio de preparación Clarion™ (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO).

Inmunohistoquímica: Se determinaron los niveles de colina acetiltransferasa (ChAT, Milipore, Billerica, MA) usando el método con diaminobencidina no fluorescente. En primer lugar se enjuagaron los portaobjetos que contenían secciones preparadas de médula espinal lumbar dos veces en 1X PBS (5 minutos). Se extinguió la actividad peroxidasa endógena usando peróxido de hidrógeno al 3% en PBST (PBS + Triton X-100 al 0,5%) durante 5 minutos. Se enjuagaron las secciones dos veces en 1X PBS (2 minutos) antes del bloqueo a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora en suero normal al 10% + albúmina sérica bovina (BSA) al 1 % en PBST. Se diluyó el anticuerpo primario en suero normal al 1% + BSA al 1% en PBST. Las diluciones y el tiempo y la temperatura de incubación fueron tal como sigue: ChAT (1:100 durante 1 hora a TA). Después de la etapa de incubación con el anticuerpo primario, se enjuagaron los portaobjetos dos veces en 1X PBS, y luego se incubaron en el anticuerpo secundario (kit Vectastain ABC Elite, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) durante 1 hora a TA. Se enjuagaron las secciones en 1X PBS (2X 2 minutos) antes de la incubación en los reactivos Vectorstain ABC Elite durante otros 30 minutos a TA. Se enjuagaron de nuevo los portaobjetos en 1X PBS (2X 2 minutos). Se realizó el desarrollo de color usando el kit de sustrato de peroxidasa Vector - DAB. Llevó 1-2 minutos que se desarrollase el color marrón deseado. Cuando se logró el color deseado, se enjuagaron los portaobjetos en ddH₂O durante 5 minutos y se sometieron a contratinción en verde de metilo al 0,5% durante diez minutos. Después de la contratinción, se enjuagaron los portaobjetos brevemente en dH₂O, dos cambios de etanol al 95% y dos cambios de etanol al 100%. Se permitió que se secasen los portaobjetos antes de prepararse en el medio de preparación.

Microscopía: Se visualizaron las secciones usando el microscopio Motic B5 Professional Serie 3.0 (Motic Instruments Inc., Richmond, ON) y se capturaron imágenes usando el software Motic Images Advanced 3.0.

EJEMPLO 25

LA SOBREEXPRESIÓN DE PROGRANULINA PROTEGE LAS CÉLULAS NSC-34 FRENTE A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR BSSG

Se mantuvieron un transfectante de NSC-34 normal y un transfectante de NSC-34 estable que sobreexpresaban PGRN humana (NSC-34-hPGRN) en cultivo usando DMEM complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 5% (v/v). Se tomaron alícuotas de las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 8.000 células/pocillo en 200 µl de DMEM - FCS al 5%. Después de dos horas, se añadió la neurotoxina beta-sitosteril-glucósido (BSSG) a concentraciones de 0, 100, 250, 500, 1000 y 2500 ng/ml con un volumen de cultivo final de 250 µl junto con DMSO al 0,1% (v/v) en la totalidad del experimento. Como control negativo para la proliferación/supervivencia celular, se lavaron una serie de pocillos y se reemplazaron los medios por DMEM que no contenía FCS. Tras 72 horas, se midió la viabilidad celular usando el ensayo con MTT (ensayo de proliferación celular con MTT Vybrant; Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Las células NSC-34 son un modelo inmortalizado de la función de las neuronas motoras y se ha mostrado que BSSG provoca citotoxicidad en esta línea celular [Cashman *et al.*, Dev Dyn 1992, 194(3):209-221; Tabata *et al.*, Neuromolecular Med 2008, 10(1):24-39]. La progranulina (PGRN) fomenta el crecimiento y la supervivencia en numerosas líneas celulares incluyendo un aumento de supervivencia de neuronas motoras de rata con privación de suero [Van Damme *et al.*, J Cell Biol 2008, 181(1):37-41]. Para determinar si PGRN pudo proteger células NSC-34 frente a la neurotoxicidad por BSSG, se desarrolló un transfectante estable que sobreexpresaba PGRN humana de manera constitutiva. La progranulina protegió a las células NSC-34 durante una incubación de 72 horas con 1000 y 2500 ng/ml de BSSG (figura 25). Además, la sobreexpresión de PGRN aumentó la supervivencia celular en cultivos

libres de suero.

EJEMPLO 26

LA PROTEÍNA PROGRANULINA PUEDE PROTEGER A LA LÍNEA CELULAR DE NEURONAS MOTORAS INMORTALIZADAS NSC-34 FRENTE A LA PRIVACIÓN DE SUERO

- 5 La proteína progranulina (PGRN) humana recombinante añadida a células NSC-34 en cultivo dio como resultado un aumento de 2,5 veces (día 4) de la supervivencia celular tras privación de suero (figura 26). Se mantuvieron células NSC-34 normales en cultivo usando DMEM complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 5% (v/v). Se tomaron alícuotas de las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 6.000 células/pocillo en 200 µl de DMEM - FCS al 5%. Después de dos horas de cultivo (para garantizar la adhesión celular) se retiraron los medios, se lavaron las células 1 vez con PBS y DMEM medio libre de suero con o sin hPGRN (100 ng/ml) añadida a las células. Tras uno y cuatro días de cultivo, se detectaron las células metabólicamente activas restantes usando la metodología Alamar Blue® (Molecular Probes/Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos datos indican la conservación de la función de proteínas PGRN.

EJEMPLO 27

DEMOSTRACIÓN IN VIVO DEL RESCATE PARCIAL POR PROGRANULINA DE UN DEFECTO DE DESARROLLO/SUPERVIVENCIA EN EL SISTEMA MOTOR DE PEZ CEBRA

- 15 Durante el primer día de desarrollo de los peces cebra, se restringieron las conexiones neuromusculares a las tres motoneuronas primarias (CaP, MiP y RoP) por hemisegmento de médula espinal donde inervan tres áreas miotomales que se desarrollan en última instancia para dar el músculo de la pared del tronco. Durante las primeras 24 htf, sobresalen axones de CaP para establecer la trayectoria común. Este es el periodo de desarrollo englobado en la figuras 27 y 28.

- 20 Se examinó el desarrollo de neuronas primarias anteriores en los embriones de preparación completa a las 26-28 htf y se visualizaron mediante inmunotinción con anticuerpo monoclonal znp1 que marca las neuronas motoras primarias. (El desarrollo silvestre de neuronas Cap presenta ramificación sólo más allá del "punto de elección" (figura 27, panel F, dobles puntas de flecha).

- 25 El silenciamiento de progranulina-A (usando un MO dirigido hacia la 5'-UTR) generó una gama de fenotipos Morphant que van de truncamiento (figura 27, panel A, B, flechas negras), ramificación prematura (figura 27, panel B, puntas de flecha negras) a ausencia completa de neuronas motoras primarias (figura 27, panel C). La inyección conjunta de ARNm de progranulina con progranulina-A MO produce un rescate parcial (figura 27, paneles D y E). Hay una incidencia reducida ($P < 0,001$) de neuronas truncadas (figura 27, panel D, flechas blancas) junto con un aumento de la incidencia ($P < 0,001$) de ramificación temprana y tardía (figura 27, panel E, puntas de flecha blancas) tal como se muestra en la tabla 2. Se acumularon conjuntos de datos de 50 embriones (WT, progranulina MO, progranulina MO más ARNm). Estos datos sugirieron que el desarrollo de neuronas motoras anteriores ramificadas es muy sensible a la sobre o subexpresión de progranulina-A.

- 35 Tabla 2. El silenciamiento de progranulina induce un crecimiento aberrante de nervios/axones motores anteriores

Tipo de inyección	Truncamiento	Ramificación
Wt (sin inyección)	0,16±0,07	0,32±0,12
PGRN-MO2	3,02±0,31***a	1,0±0,19*c
PGRN-MO2 + 100 pg (PGRN)	0,94±0,19***b	2,8±0,32***d

Número promedio de defectos de nervios/axones motores especificados por lado afectado (n=50 cada grupo)

Se determinó la significación mediante una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls

- a- comparación de truncamiento de WT frente a MO2 $p < 0,001$
 b- comparación de truncamiento de MO2 frente a MO2 + 100 pg de ARNm de pgrnA $p < 0,001$
 40 c- comparación de ramificación de WT frente a MO2 $p < 0,05$
 d- comparación de ramificación de MO2 frente a MO2 +100 pg de ARNm de pgrnA $p < 0,001$

- 45 El silenciamiento de Smn1 dio como resultado nervios/axones motores truncados (figura 28, panel A; flechas negras) y ramificados (figura 28, panel B; puntas de flecha negras). Aunque el valor medio de truncamiento entre Smn1 MO frente a la inyección conjunta de Smn1 MO con ARNm de progranulina-A no es significativo, el valor medio reducido desde 0,38 hasta 0,18 por lado afectado de embrión confirma un rescate parcial del defecto de truncamiento (tabla: 3, la figura 28, panel C; flecha blanca) y aumenta los nervios/axones ramificados de manera similar a los resultados mostrados en la figura 27 (panel C; puntas de flecha blancas) y la tabla 3.

Tabla 3. La inyección conjunta de Smn1 MO y 100 pg de ARNm de progranulina-A reduce el truncamiento y aumenta la ramificación del crecimiento de nervios/axones motores anteriores

Tipo de inyección	Truncamiento	Ramificación
WT	0,10±0,04	0,38±0,08
Smn1MO	0,38±0,01	1,52±0,23 _a
Smn1MO + 100 pg de ARNm de PgrnA	0,18±0,08	2,22±0,31 _b
100 pg de ARNm de PgrnA	0,10±0,04	1,36±0,22 _c

Se determinó la significación mediante una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls

a- comparación de ramificación de WT frente a Smn1MO p<0,001

b- comparación de ramificación de WT frente a Smn1MO + 100 pg de ARNm de progranulina-A p<0,001

c- comparación de ramificación de WT frente a 100 pg de ARNm de progranulina-A p<0,001

- 5 *Cría de peces:* Se adquirieron peces cebrá silvestres de Aquatica Tropicals (Florida) y se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 14h/10h a 28,5°C en un acuario de laboratorio (Allentown Caging Equipment Co. Inc., Allentown, NJ). Se alimentaron los peces dos veces al día. A última hora de la tarde antes de que se soliciten los huevos, se transfieren los peces a una red situada hacia la parte superior de un tanque de contención y se cubren. Por la mañana, después de comenzar el ciclo de luz y detenerse el desove, se recogieron los huevos que habían caído a través de la red, desde el fondo del tanque. Se recogieron embriones que iban a usarse en estudio de desarrollo y se clasificaron según las horas tras la fecundación (htf).

- 15 *Microinyección en embriones de oligonucleótidos de morfolino:* Se obtuvieron oligonucleótidos de morfolino (MO) de Gene Tools, Inc. (Philomath, OR) y se diluyeron en tampón de Danieaux (NaCl 58 mM, KCl 0,7 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Ca(NO₃)₂ 0,6 mM, Hepes 5,0 mM pH 7,6) que contenía rojo de fenol al 0,1% (Nasevicius y Ekker 2000). Se inyectaron aproximadamente 2 nl de oligonucleótidos de morfolino junto con FITC al 0,05%-dextrano (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canadá) en el saco vitelino de embriones en la fase de 1 a 2 células usando un sistema de microinyección PLI-100 (Harvard Apparatus, St. Laurent, QC, Canadá). Se logró la observación y documentación del fenotipo usando una cámara digital Leica DC300F conectada a un estereomicroscopio Leica MZFLIII y se procesó con el software Adobe Photoshop 7.0. La secuencia la región 5'-UTR de PgrnA-oligonucleótido de morfolino (MO) era 5'GAGCAGGTGGATTTGTGAACAGCGG3'. También se usaron los oligonucleótidos de morfolino frente al iniciador AUG de Smn1 (5'CGACATCTTCTGCACCATTGGC3') y UTR de Smn1 (5'TTTAAATATTTCCCAAGTCCAACGT). Para la inyección de oligonucleótidos de morfolino, se usaron 10 ng de PgrnA o 9 ng de Smn1.

- 25 *Microinyección de ARNm de Pgrn:* Para los experimentos de sobreexpresión de ARNm de Pgrn y rescate, se generó el vector tal como sigue: Se adquirió la secuencia de progranulina-a de longitud completa de RZPD (Berlín, Alemania) como el clon UCDMp574E2318Q2 y se subclonó en el vector pcDNA3.1-V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un cebador directo que se solapaba con el iniciador AUG de un cebador inverso que lee a través del codón de terminación. Los constructos de vector finales consistían en progranulina-A de longitud completa con una etiqueta carboxi-terminal que consistía en el epítipo V5 y 6xhistidina. Se diseñó el oligonucleótido de morfolino frente a la región 5'-UTR. Puesto que el constructo para la microinyección de ARNm no contiene la secuencia en 5' no traducida, no hay posibilidad de unión entre el ARNm y el oligonucleótido de morfolino cuando se inyectan conjuntamente. Se sintetizó ARNm de extremos ocupados potenciado para la traducción con el kit mMessage mMachin (Ambion, Huntingdon, Inglaterra). Para experimentos de sobreexpresión de ARNm o rescate, se usaron 100 pg de ARNm de PgrnA.

- 35 Se usó la microinyección de un vector que codifica para GFP como control para demostrar que la microinyección y sobreexpresión no afectan de manera inherente al desarrollo. Se transcribió en primer lugar la proteína fluorescente verde clonada en el vector pcDNA3 y se inyectó hasta 1 ng por embrión y se observó la señal bajo un filtro de GFP potenciado usando un estereomicroscopio Leica MZFLIII. La señal de GFP fluorescente confirma que el ARNm estaba intacto y se tradujo para dar proteína.

- 40 *Inmunohistoquímica:* Se complementaron embriones (aproximadamente 26-28 htf) hechos crecer en tampón de Danieaux con el 0,003% del inhibidor de tirosinasa 1-fenil-2-tiourea (feniltiocarbamida P-5272, Sigma-Aldrich) para impedir la aparición de pigmentación de melanina. Se retiró manualmente el corión de embriones clasificados y se fijaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C en paraformaldehído al 4%/PBS. Después de varios lavados en PBS, se almacenaron los embriones en metanol al 100% hasta que se requirieron. Se realizó la rehidratación de los embriones durante 5 min cada vez en disoluciones sucesivas de MeOH / PBST y luego 3 veces en PBST. Se permeabilizaron los embriones con proteínaasa K diluida en PBST a una concentración final de 10 µg/ml. Luego se llevó a cabo fijación posterior en PFA al 4%/PBS durante 20 min a temperatura ambiente seguido por 3 enjuagues en PBST. Se incubaron los embriones con tampón de bloqueo (suero de ternero al 5%, DMSO al 1% en PBST durante 3-5 horas. Se incubaron los embriones con anticuerpo monoclonal znp1 (ZIRC) (1:200) que se diluyó en tampón de bloqueo. Se llevaron a cabo incubaciones durante la noche a 4°C seguido por seis lavados en PBST. Luego se incubaron los embriones con conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón-AP (Calbiochem) se diluyó el anticuerpo secundario a 1:200 con tampón de bloqueo en PBST durante 2 h a temperatura ambiente seguido por seis lavados en PBST. Se incubaron los embriones en tampón de tinción (Tris-HCl 100 mM pH

9,5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 al 0,1%, levamisol 1 mM) con NBT y BCIP-T. Después de 30 min, se detuvo la tinción y se visualizaron las neuronas motoras primarias (NMP) inferiores dentro del tronco (excluyendo la región de la cola) de los embriones bajo un microscopio invertido de contraste de fase Olympus. Se tomaron fotografías con una cámara Olympus DP12 y se procesaron con el software Adobe Photoshop 7.0.

- 5 *Análisis del crecimiento de subtipos de NMP:* Se analizaron los axones motores primarios inferiores en embriones de 26-28 htf de preparación completa marcados con anticuerpo monoclonal Znp1. Sólo se puntuaron las NMP de tronco (12 pares). Todas estas habían crecido más allá del borde anterior de la notocorda en la somita anterior en embriones silvestres a las 24 htf. Se puntuaron hemisegmentos de tronco como “ramificados” cuando los nervios se ramificaron en o por debajo del borde anterior de la notocorda. Se empleó esta estrategia para excluir ramificación
- 10 que se produce de manera natural que se observa a veces de manera anterior a la notocorda. También se puntuaron hemisegmentos de tronco como “truncados” cuando los nervios no crecieron más allá del miosepto horizontal. Cuando más de un fascículo axonal inmunomarcado con znp1 salió de la médula espinal, se puntuó esto como una salida múltiple. Se numeraron los embriones con fenotipos respectivos y se expresaron como un porcentaje. También se contaron los embriones con respecto a cuántos de los nervios de los 12 pares en cada uno
- 15 demostró un defecto particular. Para cada tratamiento, se realizaron al menos tres experimentos. Se expresaron los valores como la media $\pm$ error estándar de la media. Se realizó un análisis estadístico usando la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls.

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. En la memoria descriptiva, el término “que comprende” se usa como término abierto, sustancialmente equivalente a la expresión “incluyendo, pero sin limitarse a”, y el término “comprende” tiene un significado correspondiente.

Lista de secuencias

- <110> NEURODYN, INC.
- <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS CON PROGRANULINA (PGRN)
- <130> EP71914HVPau
- 25 <140> Documento 09 701 647.1
- <141> 16-01-2009
- <150> Documento PCT/CA2009/000074
- <151> 16-01-2009
- <150> Documento 61/011.253
- 30 <151> 16-01-2008
- <150> Documento 61/011.284
- <151> 16-01-2008
- <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 2323
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 596 360 T3

ggcgagagga agcagggagg agagtgattt gagtagaaaa gaaacacagc attccaggct	60
ggccccacct ctatatgat aagtagccaa tgggagcggg tagccctgat ccctggccaa	120
tggaaactga ggtaggcggg tcatcgcgct ggggtctgta gtctgagcgc tacccggttg	180
ctgctgcccc aggaccgcgg agtcggacgc aggcagacca tgtggaccct ggtgagctgg	240
gtggccttaa cagcagggct ggtggctgga acgcggtgcc cagatggtca gttctgccct	300
gtggcctgct gcctggaccc cggaggagcc agctacagct gctgccgtcc ctttctggac	360
aaatggcccc caacactgag caggcatctg ggtggccccct gccagggttg tgccccactgc	420
tctgccggcc actcctgcat ctttaccgtc tcagggactt ccagttgctg ccccttccca	480
gagggcgtgg catgcgggga tggccatcac tgctgcccac ggggcttcca ctgcagtgc	540
gacgggcgat cctgcttcca aagatcaggt aacaactccg tgggtgccat ccagtgccct	600
gatagtcagt tcgaatgccc ggacttctcc acgtgctgtg ttatggtcga tggctcctgg	660
gggtgctgcc ccatgcccc ggttctctgc tgtgaagaca gggtgactg ctgtccgcac	720
ggtgccttct gcgacctggt tcacaccgc tgcacacac ccacgggcac ccacccccctg	780
gcaaagaagc tccctgcccc gaggactaac agggcagtggt ccttgtccag ctcggtcatg	840
tgtccggacg cacgggtccc gtgccctgat gttctacct gctgtgagct gcccagtggtg	900
aagtatggct gctgccaat gcccaacgcc acctgctgct ccgatcacct gactgctgc	960
ccccaagaca ctgtgtgtga cctgatccag agtaagtgcc tctccaagga gaacgctacc	1020
acggacctcc tactaagct gcctgcgcac acagtggggg atgtgaaatg tgacatggag	1080
gtgagctgcc cagatggcta tacctgctgc cgtctacagt cgggggcctg gggctgctgc	1140

ES 2 596 360 T3

cctttttaccc aggctgtgtg ctgtgaggac cacataâact gctgtccccgc ggggttttacg 1200
 tgtgacacgc agaagggtac ctgtgaacag gggccccacc aggtgccctg gatggagaag 1260
 gccccagctc acctcagcct gccagaccca caagccttga agagagatgt cccctgtgat 1320
 aatgtcagca gctgtccctc ctccgatacc tgctgccaac tcacgtctgg ggagtggggc 1380
 tgctgtccaa tcccagaggc tgtctgtctgc tcggaccacc agcactgctg cccccagggc 1440
 tacacgtgtg tagctgaggg gcagtgtcag cgaggaagcg agatcgtggc tggactggag 1500
 aagatgcctg cccgccgggc ttccttatcc caccacagag acatcggctg tgaccagcac 1560
 accagctgcc cggtggggca gacctgtctgc ccgagcctgg gtgggagctg ggctgtctgc 1620
 cagttgcccc atgtctgtgtg ctgagaggat cgccagcact gctgcccggc tggctacacc 1680
 tgcaacgtga aggctcgcac ctgagagaag gaagtgggtct ctgcccagcc tgccaccttc 1740
 ctggcccgtg gccctcacgt ggggtgtgaag gacgtggagt gtggggaagg acatttctgc 1800
 catgataacc agacctgctg ccgagacaac cgacagggct gggcctgctg tccctaccgc 1860
 cagggcgtct gttgtgctga tcggcgccac tgctgtcctg ctggcttccg ctgagcagcc 1920
 aggggtacca agtgtttgcg cagggaggcc ccgcgtggg acgccccctt gagggaccca 1980
 gccttgagac agctgctgtg agggacagta ctgaagactc tgcagccctc gggacccac 2040
 tcggaggggtg ccctctgctc aggcctccct agcacctccc cctaaccaaa ttctccctgg 2100
 accccattct gagctcccca tcaccatggg aggtggggcc tcaatctaag gccttccctg 2160
 tcagaagggg gttgtggcaa aagccacatt acaagctgcc atccccctccc cgtttcagtg 2220
 gaccctgtgg ccaggtgctt ttccctatcc acaggggtgt ttgtgtgtgt gcgcgtgtgc 2280
 gtttcaataa agtttgtaca ctttcaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2323

<210> 2

<211> 593

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Trp Thr Leu Val Ser Trp Val Ala Leu Thr Ala Gly Leu Val Ala
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
20 25 30

Asp Pro Gly Gly Ala Ser Tyr Ser Cys Cys Arg Pro Leu Leu Asp Lys
35 40 45

Trp Pro Thr Thr Leu Ser Arg His Leu Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp
50 55 60

Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr
65 70 75 80

Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala Val Ala Cys Gly Asp Gly His

ES 2 596 360 T3

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

ES 2 596 360 T3

355 360 365

Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys Gln Leu Thr Ser Gly
370 375 380

Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp His
385 390 395 400

Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val Ala Glu Gly Gln Cys
405 410 415

Gln Arg Gly Ser Glu Ile Val Ala Gly Leu Glu Lys Met Pro Ala Arg
420 425 430

Arg Ala Ser Leu Ser His Pro Arg Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr
435 440 445

Ser Cys Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp
450 455 460

Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His
465 470 475 480

Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
485 490 495

Lys Glu Val Val Ser Ala Gln Pro Ala Thr Phe Leu Ala Arg Ser Pro
500 505 510

His Val Gly Val Lys Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His
515 520 525

Asp Asn Gln Thr Cys Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys
530 535 540

Pro Tyr Arg Gln Gly Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro
545 550 555 560

Ala Gly Phe Arg Cys Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Arg Glu
565 570 575

Ala Pro Arg Trp Asp Ala Pro Leu Arg Asp Pro Ala Leu Arg Gln Leu
580 585 590

Leu

<210> 3

<211> 57

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

ES 2 596 360 T3

<400> 3

Asp Val Lys Cys Asp Met Glu Val Ser Cys Pro Asp Gly Tyr Thr Cys
1 5 10 15

Cys Arg Leu Gln Ser Gly Ala Trp Gly Cys Cys Pro Phe Thr Gln Ala
20 25 30

Val Cys Cys Glu Asp His Ile His Cys Cys Pro Ala Gly Phe Thr Cys
35 40 45

Asp Thr Gln Lys Gly Thr Cys Glu Gln
50 55

<210> 4

<211> 57

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Val Met Cys Pro Asp Ala Arg Ser Arg Cys Pro Asp Gly Ser Thr Cys
1 5 10 15

Cys Glu Leu Pro Ser Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala
20 25 30

Thr Cys Cys Ser Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys
35 40 45

Asp Leu Ile Gln Ser Lys Cys Leu Ser
50 55

<210> 5

10 <211> 54

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Val Pro Cys Asp Asn Val Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asp Thr Cys Cys
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Glu Trp Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val
20 25 30

Cys Cys Ser Asp His Gln His Cys Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Cys Val
35 40 45

Ala Glu Gly Gln Cys Gln
50

15 <210> 6

ES 2 596 360 T3

<211> 56

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr 'Ser Cys' Pro Val Gly Gln Thr Cys
1 5 10 15

Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro His Ala
20 25 30

Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr Thr Cys
35 40 45

5 Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu
50 55

<210> 7

<211> 56

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 7

Asp Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His Asp Asn Gln Thr Cys
1 5 10 15

Cys Arg Asp Asn Arg Gln Gly Trp Ala Cys Cys Pro Tyr Arg Gln Gly
20 25 30

Val Cys Cys Ala Asp Arg Arg His Cys Cys Pro Ala Gly Phe Arg Cys
35 40 45

Ala Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu
50 55

<210> 8

<211> 57

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 596 360 T3

Ala Ile Gln Cys Pro Asp Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe Ser Thr
1 5 10 15

Cys Cys Val Met Val Asp Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln
20 25 30

Ala Ser Cys Cys Glu Asp Arg Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Phe
35 40 45

Cys Asp Leu Val His Thr Arg Cys Ile
50 55

<210> 9

<211> 56

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Gly Gly Pro Cys Gln Val Asp Ala His Cys Ser Ala Gly His Ser Cys
1 5 10 15

Ile Phe Thr Val Ser Gly Thr Ser Ser Cys Cys Pro Phe Pro Glu Ala
20 25 30

Val Ala Cys Gly Asp Gly His His Cys Cys Pro Arg Gly Phe His Cys
35 40 45

Ser Ala Asp Gly Arg Ser Cys Phe
50 55

<210> 10

10 <211> 71

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15 <400> 10

ES 2 596 360 T3

Ala Met Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys Pro Val Gly Gln
1 5 10 15

Thr Cys Cys Pro Ser Leu Gly Gly Ser Trp Ala Cys Cys Gln Leu Pro
20 25 30

His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys Pro Ala Gly Tyr
35 40 45

Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Ser Cys Glu Lys Leu Ala Ala Ala Leu
50 55 60

Glu His His His His His His
65 70

<210> 11

<211> 72

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11

Ala Met Ala Ile Gln Cys Pro Asp Ser Gln Phe Glu Cys Pro Asp Phe
1 5 10 15

Ser Thr Cys Cys Val Met Val Asp Gly Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met
20 25 30

Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp Arg Val His Cys Cys Pro His Gly
35 40 45

Ala Phe Cys Asp Leu Val His Thr Arg Cys Ile Lys Leu Ala Ala Ala
50 55 60

10 Leu Glu His His His His His His
65 70

<210> 12

<211> 589

<212> PRT

<213> *Mus* sp.

15 <400> 12

ES 2 596 360 T3

Met Trp Val Leu Met Ser Trp Leu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Val Ala
 1 5 10 15
 Gly Thr Gln Cys Pro Asp Gly Gln Phe Cys Pro Val Ala Cys Cys Leu
 20 25 30
 Asp Gln Gly Gly Ala Asn Tyr Ser Cys Cys Asn Pro Leu Leu Asp Thr
 35 40 45
 Trp Pro Arg Ile Thr Ser His His Leu Asp Gly Ser Cys Gln Thr His
 50 55 60
 Gly His Cys Pro Ala Gly Tyr Ser Cys Leu Leu Thr Val Ser Gly Thr
 65 70 75 80
 Ser Ser Cys Cys Pro Phe Ser Lys Gly Val Ser Cys Gly Asp Gly Tyr
 85 90 95
 His Cys Cys Pro Gln Gly Phe His Cys Ser Ala Asp Gly Lys Ser Cys
 100 105 110
 Phe Gln Met Ser Asp Asn Pro Leu Gly Ala Val Gln Cys Pro Gly Ser
 115 120 125
 Gln Phe Glu Cys Pro Asp Ser Ala Thr Cys Cys Ile Met Val Asp Gly
 130 135 140
 Ser Trp Gly Cys Cys Pro Met Pro Gln Ala Ser Cys Cys Glu Asp Arg
 145 150 155 160
 Val His Cys Cys Pro His Gly Ala Ser Cys Asp Leu Val His Thr Arg
 165 170 175
 Cys Val Ser Pro Thr Gly Thr His Thr Leu Leu Lys Lys Phe Pro Ala
 180 185 190
 Gln Lys Thr Asn Arg Ala Val Ser Leu Pro Phe Ser Val Val Cys Pro
 195 200 205
 Asp Ala Lys Thr Gln Cys Pro Asp Asp Ser Thr Cys Cys Glu Leu Pro
 210 215 220

ES 2 596 360 T3

Thr Gly Lys Tyr Gly Cys Cys Pro Met Pro Asn Ala Ile Cys Cys Ser
 225 230 235 240
 Asp His Leu His Cys Cys Pro Gln Asp Thr Val Cys Asp Leu Ile Gln
 245 250 255
 Ser Lys Cys Leu Ser Lys Asn Tyr Thr Thr Asp Leu Leu Thr Lys Leu
 260 265 270
 Pro Gly Tyr Pro Val Lys Glu Val Lys Cys Asp Met Glu Val Ser Cys
 275 280 285
 Pro Glu Gly Tyr Thr Cys Cys Arg Leu Asn Thr Gly Ala Trp Gly Cys
 290 295 300
 Cys Pro Phe Ala Lys Ala Val Cys Cys Glu Asp His Ile His Cys Cys
 305 310 315 320
 Pro Ala Gly Phe Gln Cys His Thr Glu Lys Gly Thr Cys Glu Met Gly
 325 330 335
 Ile Leu Gln Val Pro Trp Met Lys Lys Val Ile Ala Pro Leu Arg Leu
 340 345 350
 Pro Asp Pro Gln Ile Leu Lys Ser Asp Thr Pro Cys Asp Asp Phe Thr
 355 360 365
 Arg Cys Pro Thr Asn Asn Thr Cys Cys Lys Leu Asn Ser Gly Asp Trp
 370 375 380
 Gly Cys Cys Pro Ile Pro Glu Ala Val Cys Cys Ser Asp Asn Gln His
 385 390 395 400
 Cys Cys Pro Gln Gly Phe Thr Cys Leu Ala Gln Gly Tyr Cys Gln Lys
 405 410 415
 Gly Asp Thr Met Val Ala Gly Leu Glu Lys Ile Pro Ala Arg Gln Thr
 420 425 430
 Thr Pro Leu Gln Ile Gly Asp Ile Gly Cys Asp Gln His Thr Ser Cys
 435 440 445
 Pro Val Gly Gln Thr Cys Cys Pro Ser Leu Lys Gly Ser Trp Ala Cys
 450 455 460
 Cys Gln Leu Pro His Ala Val Cys Cys Glu Asp Arg Gln His Cys Cys
 465 470 475 480
 Pro Ala Gly Tyr Thr Cys Asn Val Lys Ala Arg Thr Cys Glu Lys Asp
 485 490 495

ES 2 596 360 T3

Val Asp Phe Ile Gln Pro Pro Val Leu Leu Thr Leu Gly Pro Lys Val
500 505 510

Gly Asn Val Glu Cys Gly Glu Gly His Phe Cys His Asp Asn Gln Thr
515 520 525

Cys Cys Lys Asp Ser Ala Gly Val Trp Ala Cys Cys Pro Tyr Leu Lys
530 535 540

Gly Val Cys Cys Arg Asp Gly Arg His Cys Cys Pro Gly Gly Phe His
545 550 555 560

Cys Ser Ala Arg Gly Thr Lys Cys Leu Arg Lys Lys Ile Pro Arg Trp
565 570 575

Asp Met Phe Leu Arg Asp Pro Val Pro Arg Pro Leu Leu
580 585

<210> 13

<211> 2145

<212> ADN

5 <213> *Mus* sp.

<400> 13

ES 2 596 360 T3

gagatgcctc ccagggagcc cggaccccga cgcaggcaga ccatgtgggt cctgatgagc	60
tggctggcct tcgcggcagg gctggtagcc ggaacacagt gtccagatgg gcagttctgc	120
cctgttgctt gctgccttga ccagggagga gccaaactaca gctgctgtaa ccctcttctg	180
gacacatggc ctagaataac gagccatcat ctagatggct cctgccagac ccatggccac	240
tgtcctgctg gctattcttg tcttctcact gtgtctggga cttccagctg ctgcccgttc	300
tctaagggtg tgtcttggtg tgatggctac cactgctgcc cccagggctt ccactgtagt	360
gcagatggga aatcctgctt ccagatgtca gataaccctt tgggtgctgt ccagtgtcct	420
gggagccagt ttgaatgtcc tgactctgcc acctgctgca ttatggttga tggttcgtgg	480
ggatgttgct ccatgccccca ggcctcttgc tgtgaagaca gagtgcattg ctgtcccat	540
ggggcctcct gtgacctggt tcacacacga tgcgtttcac ccacgggcac ccacacccta	600
ctaaagaagt tccctgcaca aaagaccaac agggcagtggt ctttgccttt ttctgtcgtg	660
tgccctgatg ctaagaccca gtgtcccgat gattctacct gctgtgagct acccactggg	720
aagtatggct gctgtccaat gcccaatgcc atctgctggt ccgaccacct gcactgctgc	780
ccccaggaca ctgtatgtga cctgatccag agtaagtgcc tatccaagaa ctacaccacg	840
gatctcctga ccaagctgcc tggataccca gtgaaggagg tgaagtgcga catggagggtg	900
agctgccctg aaggatatac ctgctgccgc ctcaacactg gggcctgggg ctgctgtcca	960
tttgccaagg ccgtgtgttg tgaggatcac attcattgct gcccggcagg gtttcagtgt	1020
cacacagaga aaggaacctg cgaaatgggt atcctccaag taccctggat gaagaaggtc	1080
atagccccc tccgcctgcc agaccacag atcttgaaga gtgatacacc ttgtgatgac	1140

ES 2 596 360 T3

```

ttcactaggt gtcctacaaa caatacctgc' tgcaaaàctca attctgggga ctgggggctgc 1200
tgtcccatcc cagaggctgt ctgctgctca gacaaccagc attgctgccc tcagggcttc 1260
acatgtcttg ctcaggggta ctgtcagaag ggagacacaa tgggtggctgg cctggagaag 1320
atacctgccc gccagacaac cccgctccaa attggagata tcggttggtga ccagcatacc 1380
agctgcccag tagggcaaac ctgctgccc aacctcaagg gaagtggggc ctgctgccag 1440
ctgccccatg ctgtgtgctg tgaggaccgg cagcactgtt gcccggccgg gtacacctgc 1500
aatgtgaagg cgaggacctg tgagaaggat gtcgatttta tccagcctcc cgtgctcctg 1560
accctcggcc ctaaggttgg gaatgtggag tgtggagaag ggcatttctg ccatgataac 1620
cagacctgtt gtaaagacag tgcaggagtc tgggcctgct gtccctacct aaagggtgtc 1680
tgctgtagag atggacgtca ctgttgcccc ggtggcttcc actgttcagc caggggaacc 1740
aagtgtttgc gaaagaagat tcctcgctgg gacatgtttt tgagggatcc ggtcccaaga 1800
ccgctactgt aaggaagggc tacagactta aggaactcca cagtcctggg aaccctgttc 1860
cgagggtacc cactactcag gcctccctag cgctcctcc cctaacgtct ccccggccta 1920
ctcatcctga gtcaccctat caccatggga ggtggagcct caaactaaaa ccttctttta 1980
tggaagaag gctgtggcca aaagccccgt atcaaactgc catttcttcc ggtttctgtg 2040
gaccttgctg ccaggtgctc tccccagacc acaggtgttc tgtgagcttg cttgtgtgtg 2100
tgtgcgcgtg tgcgtgtgtt gctccaataa agtttgtaca ctttc 2145

```

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 14

gagcaggtgg atttgtgaac agcgg 25

10 <210> 15

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 15

gaacacgtgg atttctgaag agagg 25

<210> 16

	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
	cctctttacct cagttacaat ttata	25
	<210> 17	
	<211> 22	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
15	cgacatcttc tgcaccattg gc	22
	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
	tttaaataatt tcccaagtcc aacgt	25
	<210> 19	
25	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: cola de 6xHis sintética	
30	<400> 19	
	His His His His His His	
	1 5	

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un efector que aumenta la expresión de progranulina en neuronas o un polipéptido de progranulina para su uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, en la que el efector es un ácido nucleico de progranulina y en la que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición está adaptada para la administración parenteral, y en la que la vía de la administración parenteral se selecciona del grupo que consiste en por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intraventricular, por vía intratecal, por vía intracerebral y por vía intracordal.
3. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la enfermedad neurodegenerativa está mediada por una excitotoxina, y en la que la excitotoxina es un glucósido de esterol.
4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el glucósido de esterol se selecciona del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos.
5. Composición farmacéutica para su uso en un método para reducir o prevenir los síntomas de una enfermedad neurodegenerativa, comprendiendo dicha composición un efector que aumenta la expresión de progranulina en neuronas o un polipéptido de progranulina y un portador farmacéuticamente aceptable para el mismo, en la que el efector es un ácido nucleico de progranulina y en la que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer.
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en una forma de dosificación parenteral, en la que la forma de dosificación está adaptada para la administración parenteral por una vía seleccionada del grupo que consiste en intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraventricular, intratecal, intracerebral e intracordal.
7. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, en la que la enfermedad neurodegenerativa está mediada por una excitotoxina, en la que la excitotoxina es un glucósido de esterol, y en la que el glucósido de esterol se selecciona del grupo que consiste en beta-sitosterol-beta-D-glucósido y glucósido de colesterol, o análogos o derivados de los mismos.
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que el ácido nucleico de progranulina es un ADN que codifica para progranulina o partes de la misma.
9. Composición para su uso según la reivindicación 1 o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que el ácido nucleico de progranulina es un ADN que codifica para el polipéptido de progranulina de SEQ ID NO. 7 u 11.
10. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que el ácido nucleico de progranulina tiene una homología de al menos el 80% con la secuencia codificante de ADN para progranulina de SEQ ID NO. 1.
11. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 8-10 o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en la que el ácido nucleico de progranulina está contenido dentro de un vector.

FIGURA 1

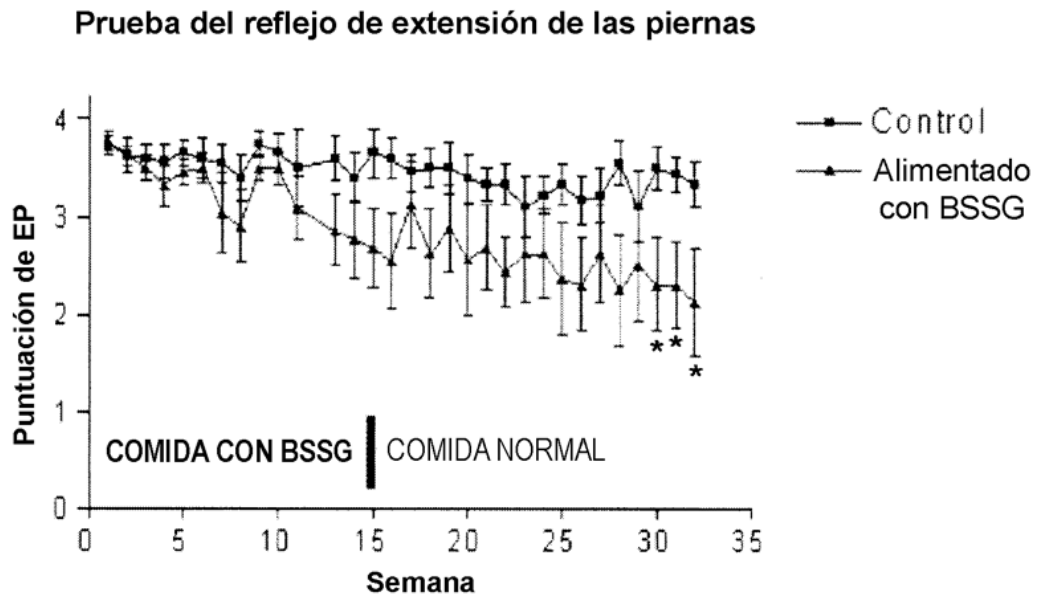


FIGURA 2

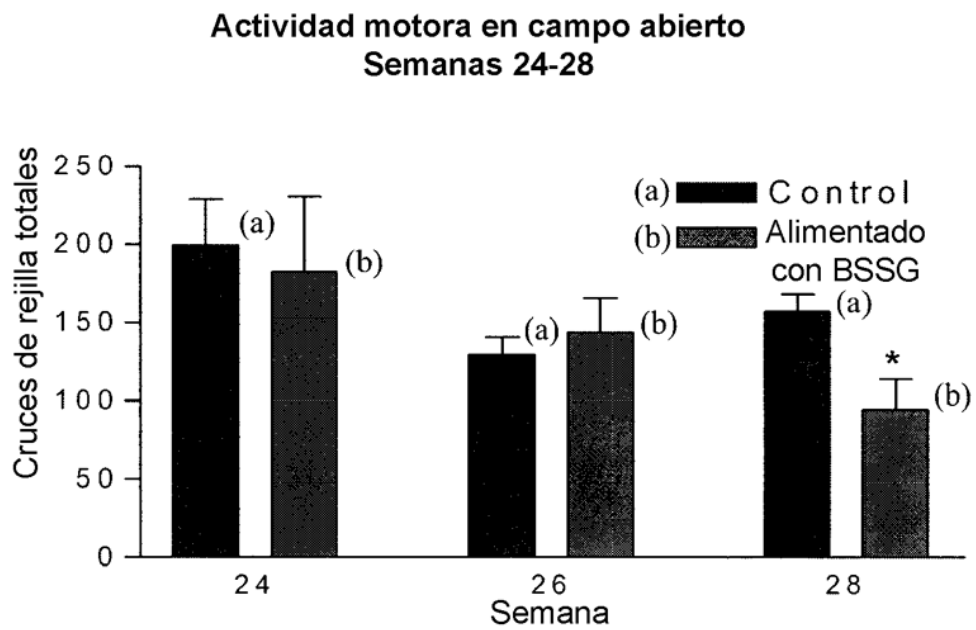


FIGURA 3

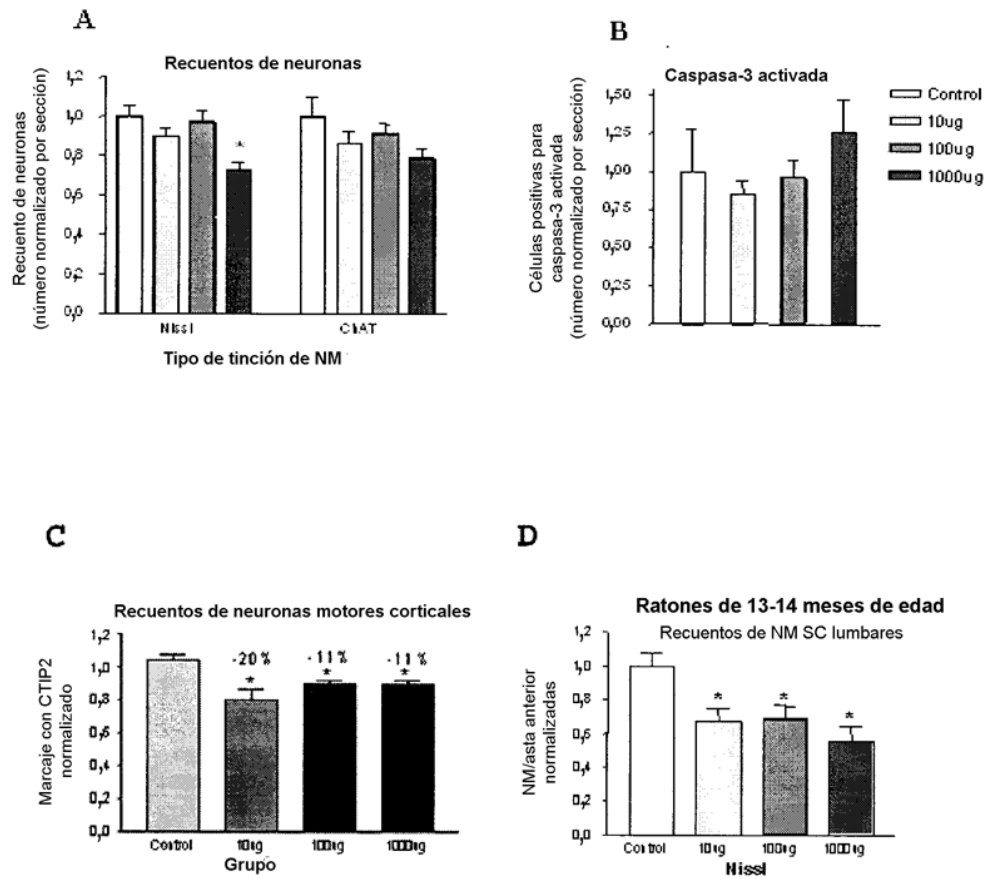


FIGURA 4

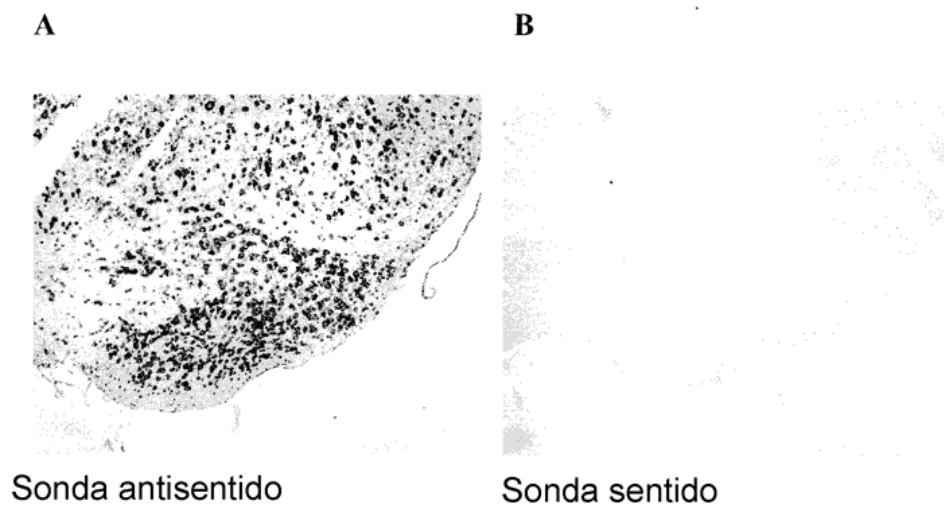


FIGURA 5

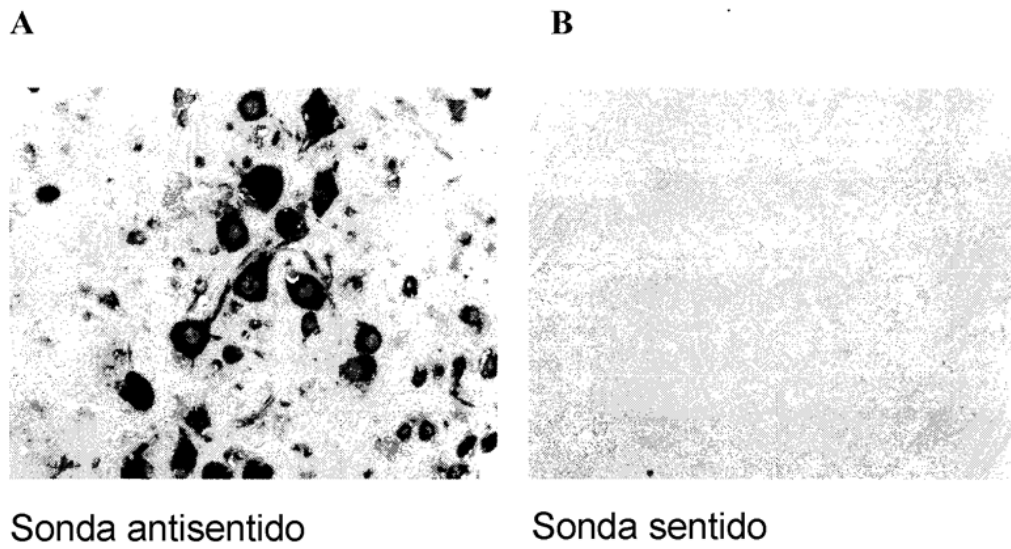


FIGURA 6

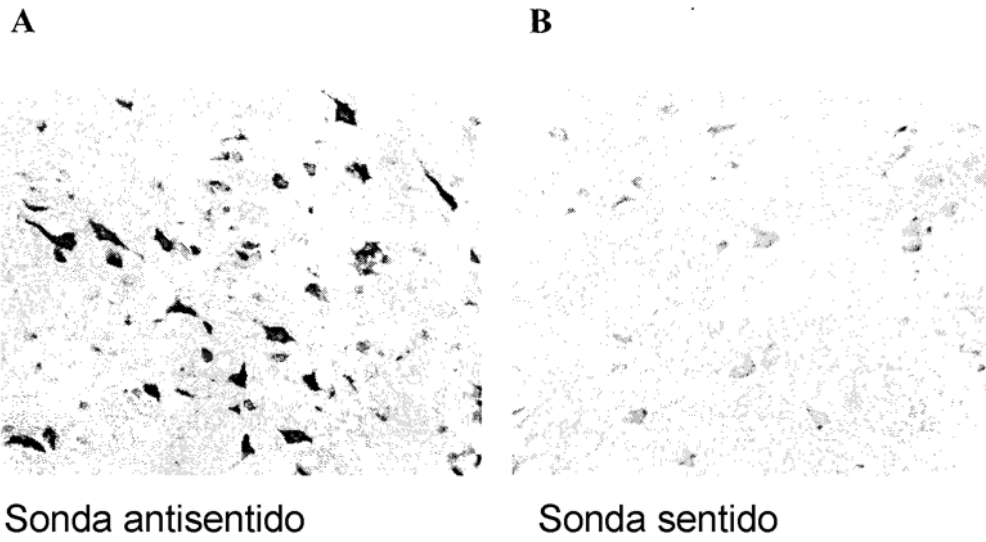


FIGURA 7

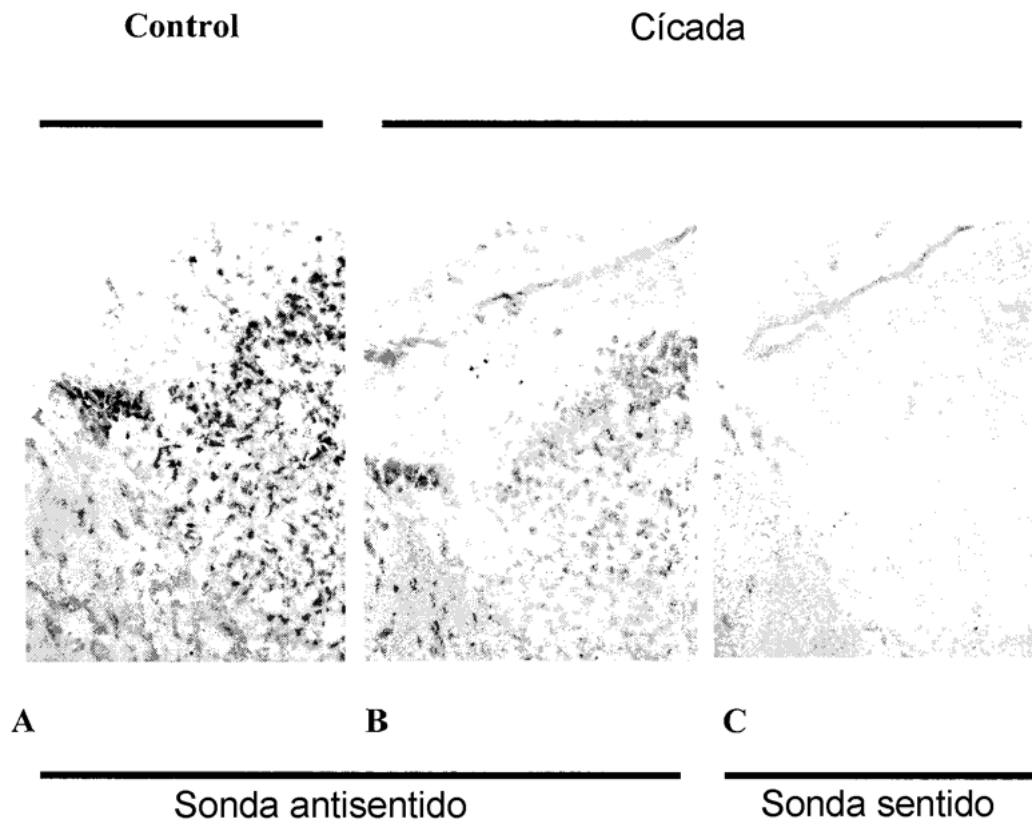


FIGURA 8

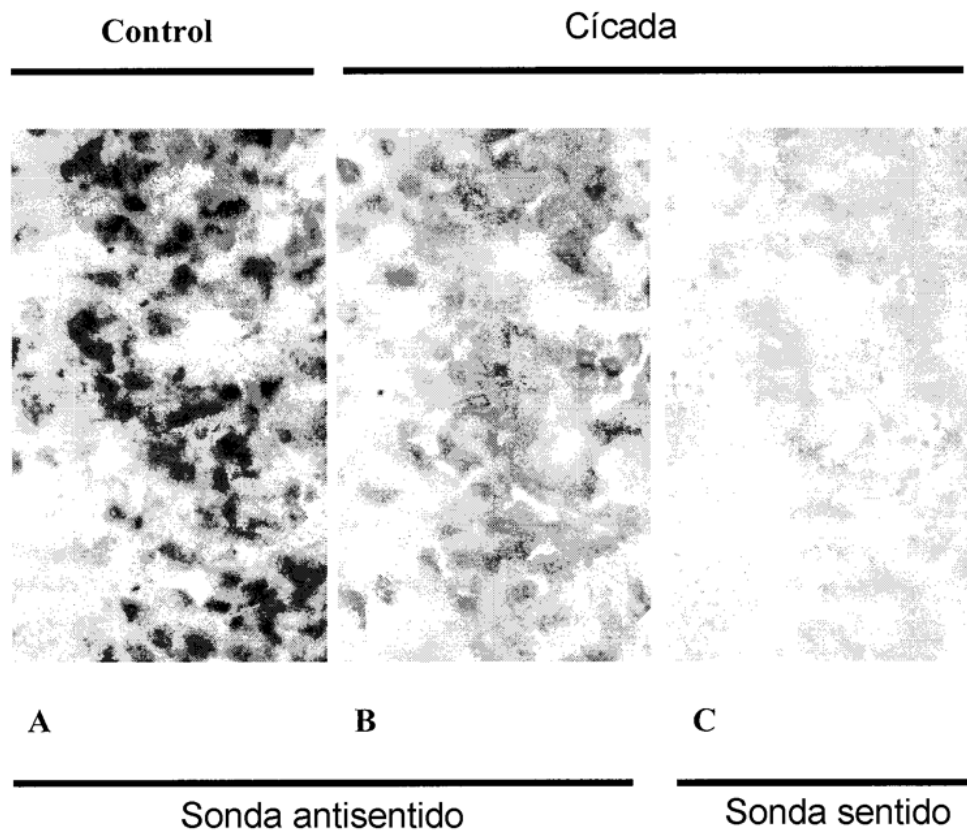


FIGURA 9

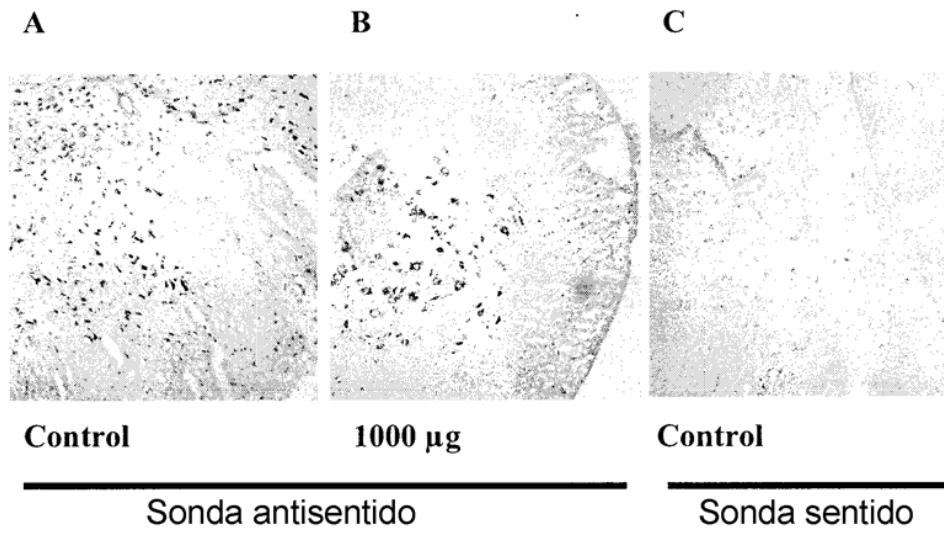


FIGURA 10

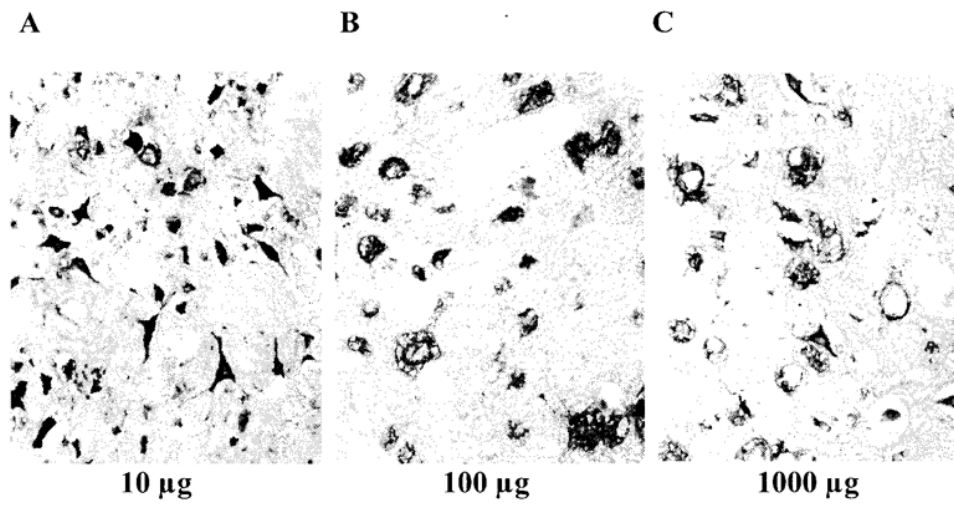
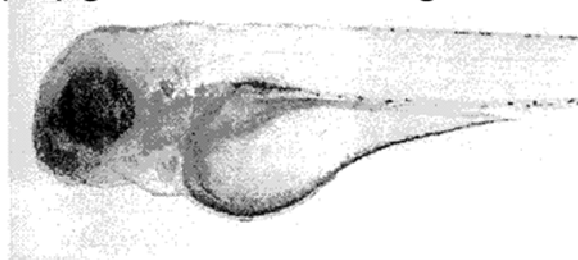


FIGURA 11

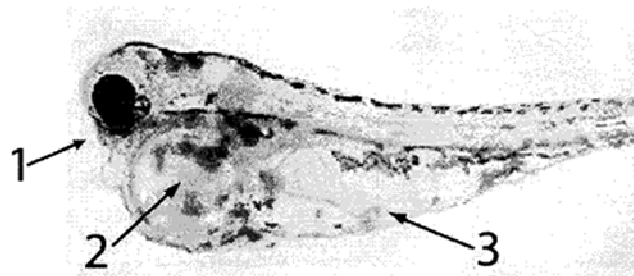
**Manifestación morfológica visible de
silenciamiento de Progrn-a a las 120 htf**

(Prpgrn-a-MO1, 10 ng/embrión)

Silvestre



**Tratado con
Morfolino**



- 1 - Dismorfogénesis craneofacial
- 2 - Edema pericárdico
- 3 - Distensión intestinal visceral

FIGURA 12

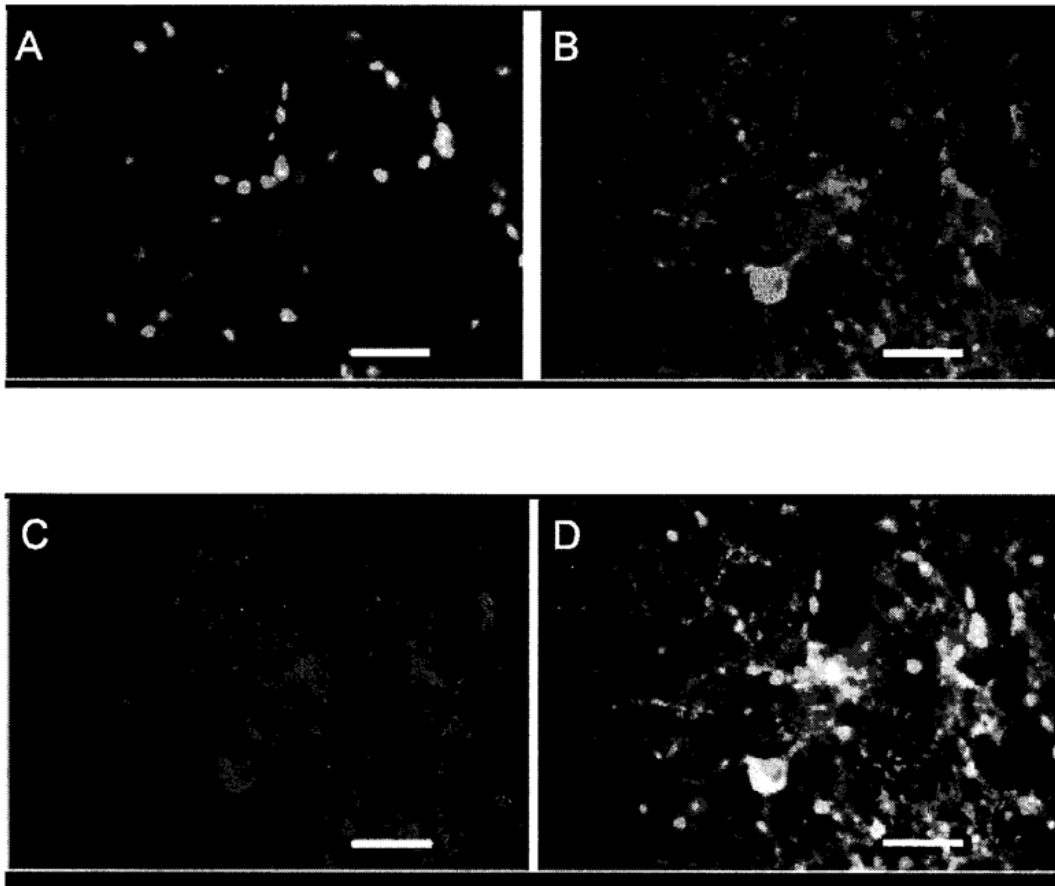


FIGURA 13

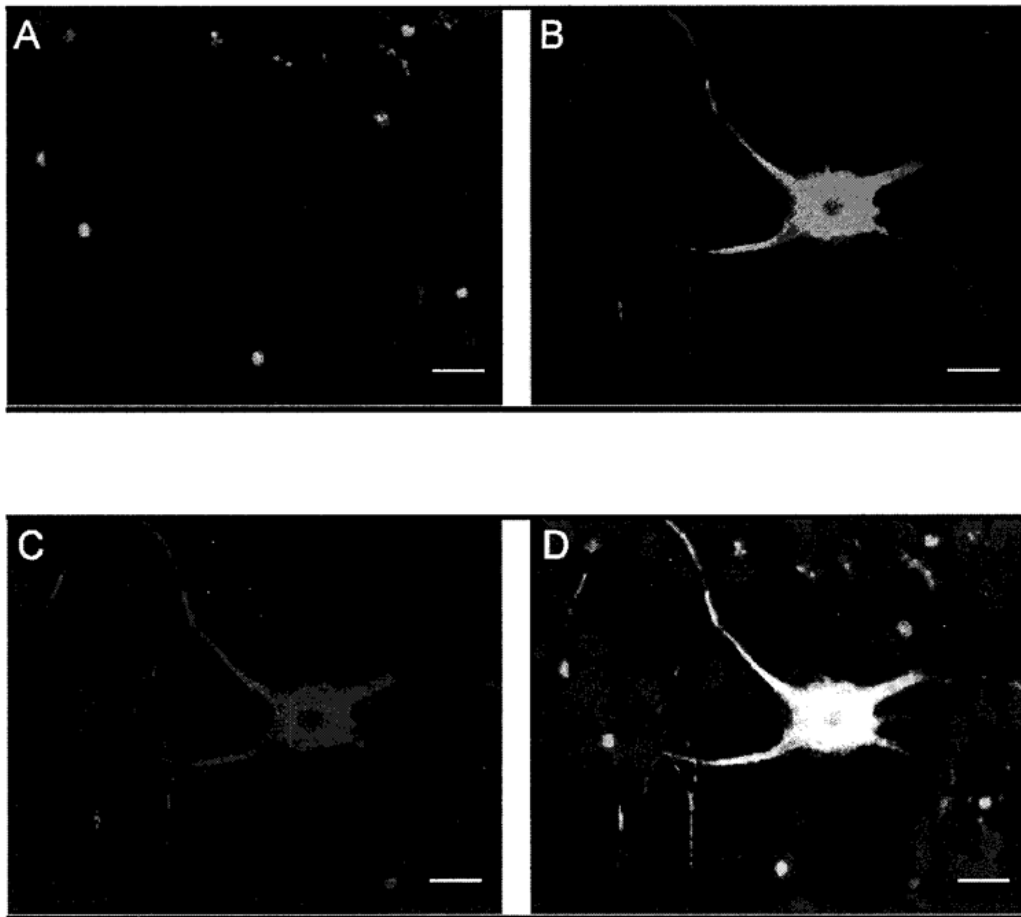


FIGURA 14A

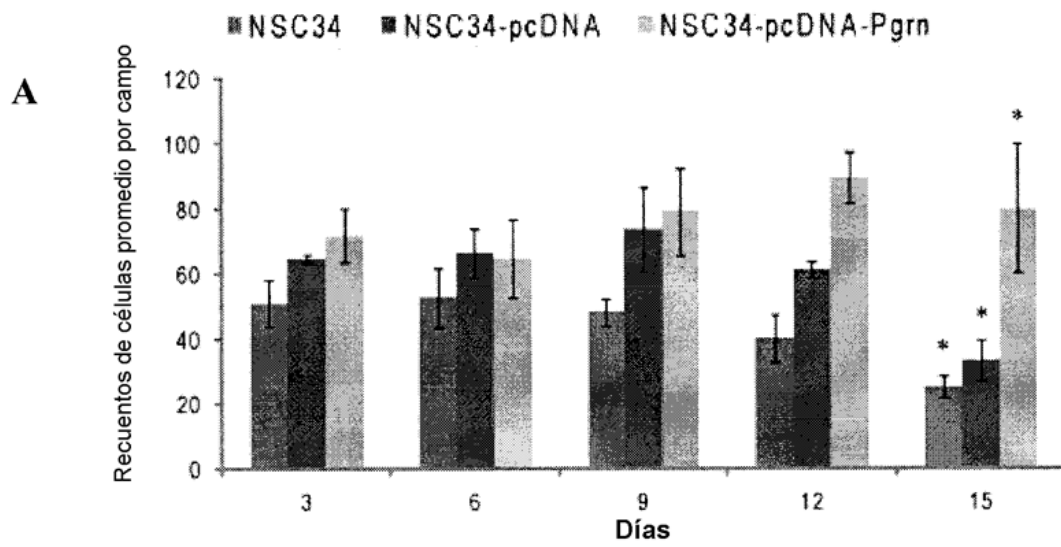


FIGURA 14B

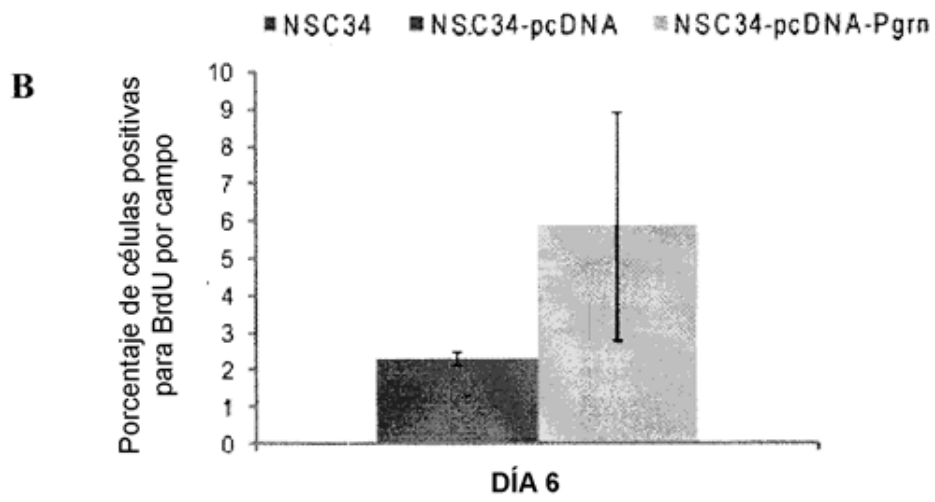


FIGURA 14C

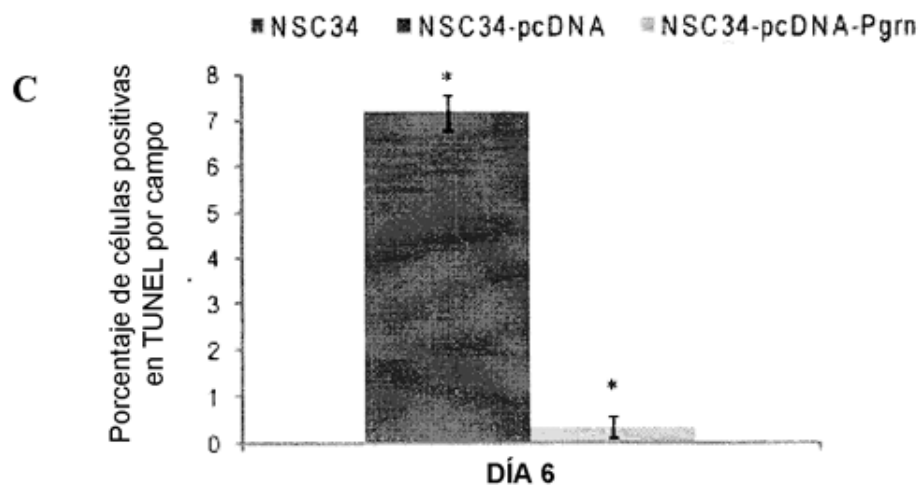


FIGURA 15

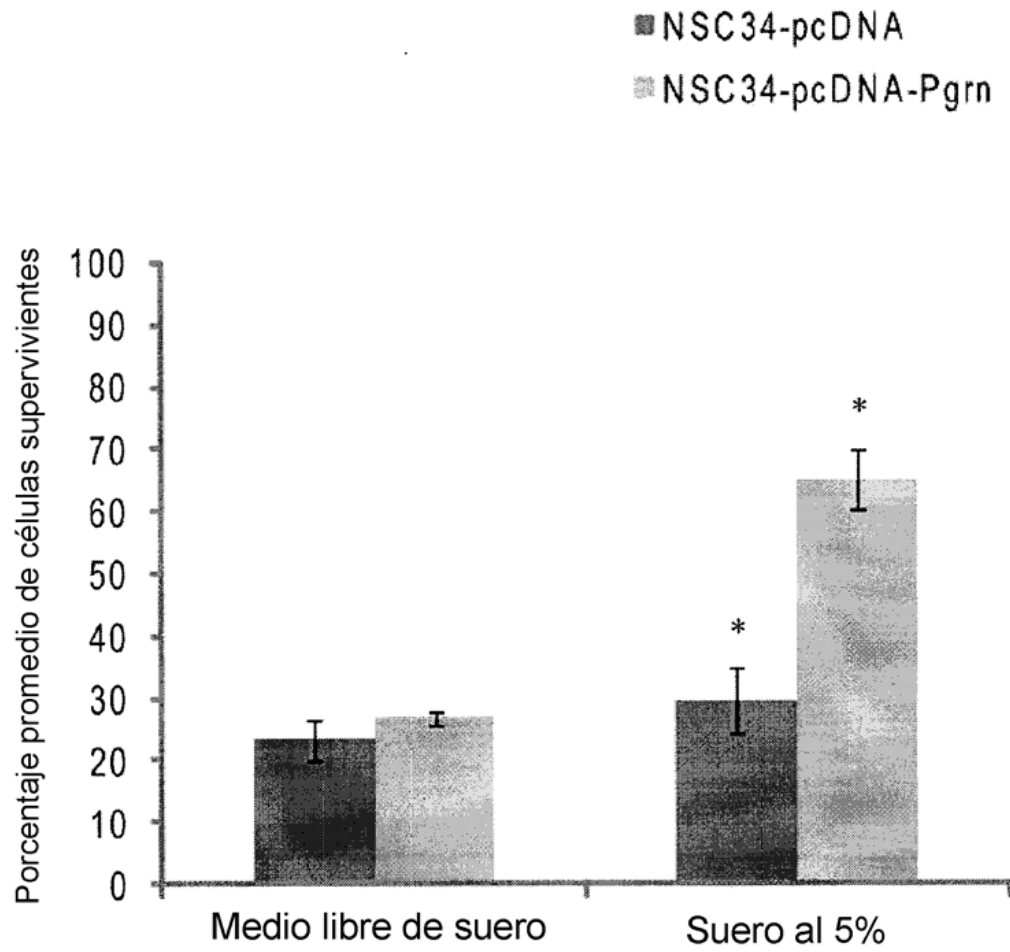


FIGURA 16

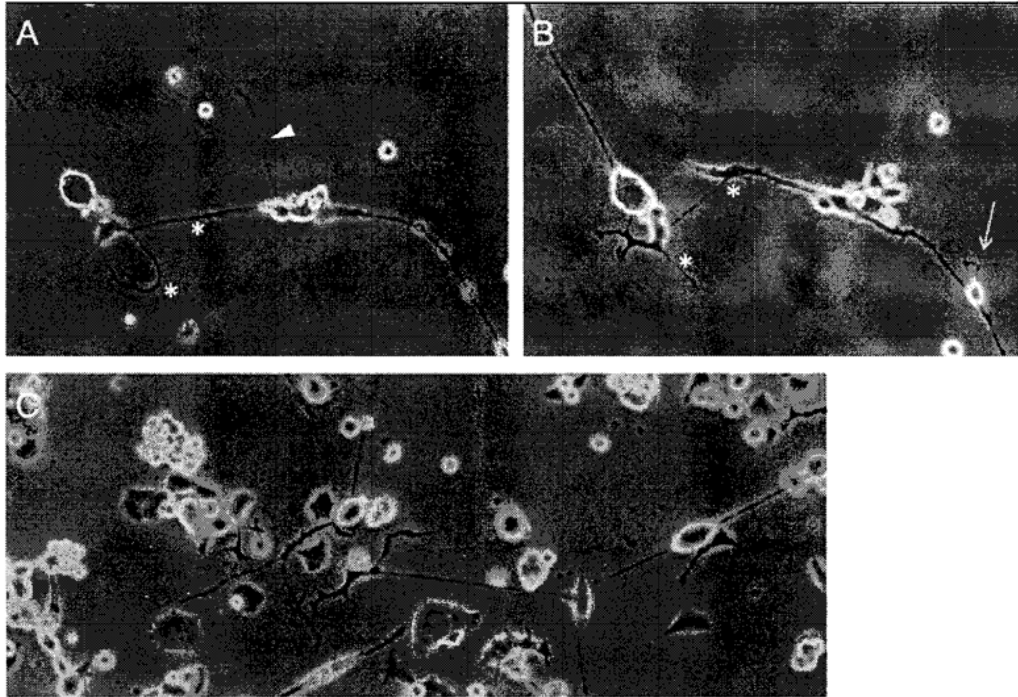


FIGURA 17

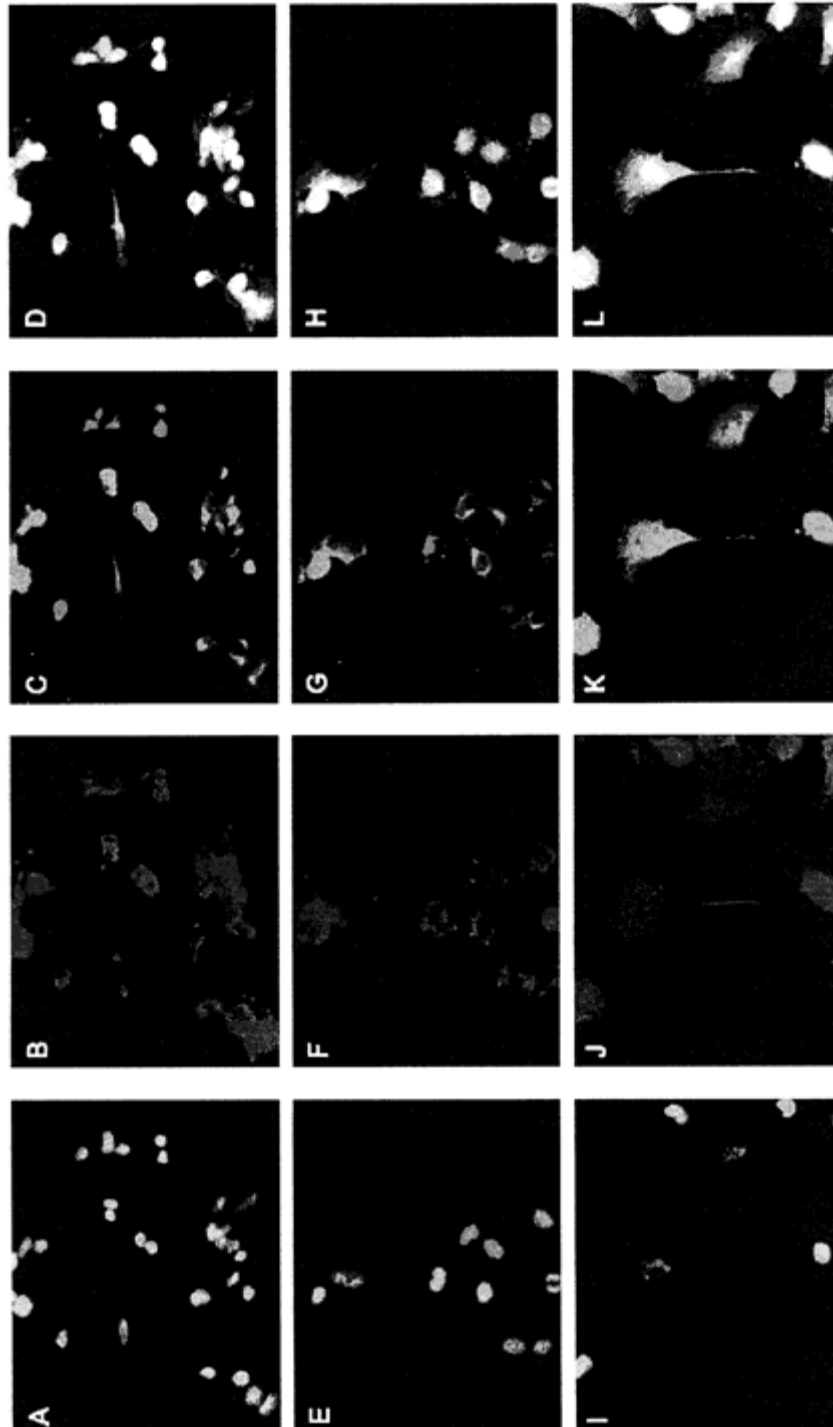


FIGURA 18

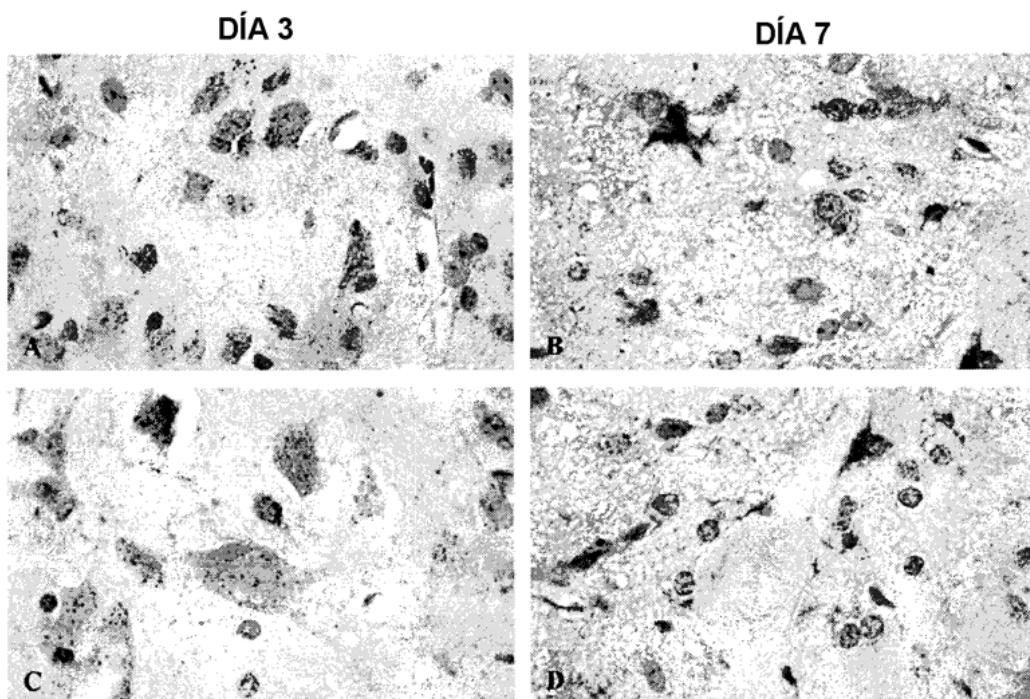


FIGURA 19

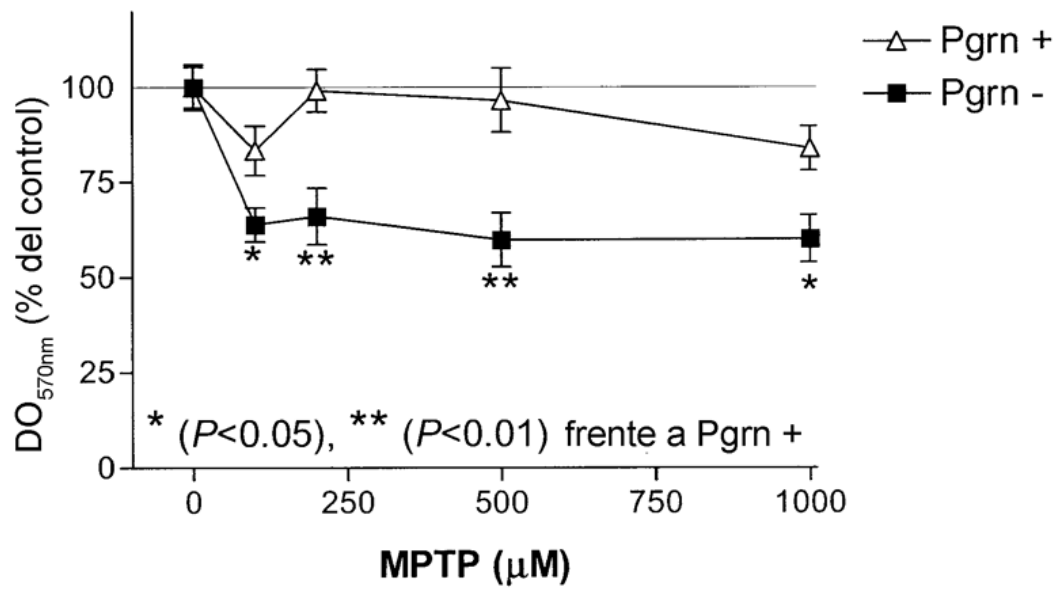


FIGURA 20

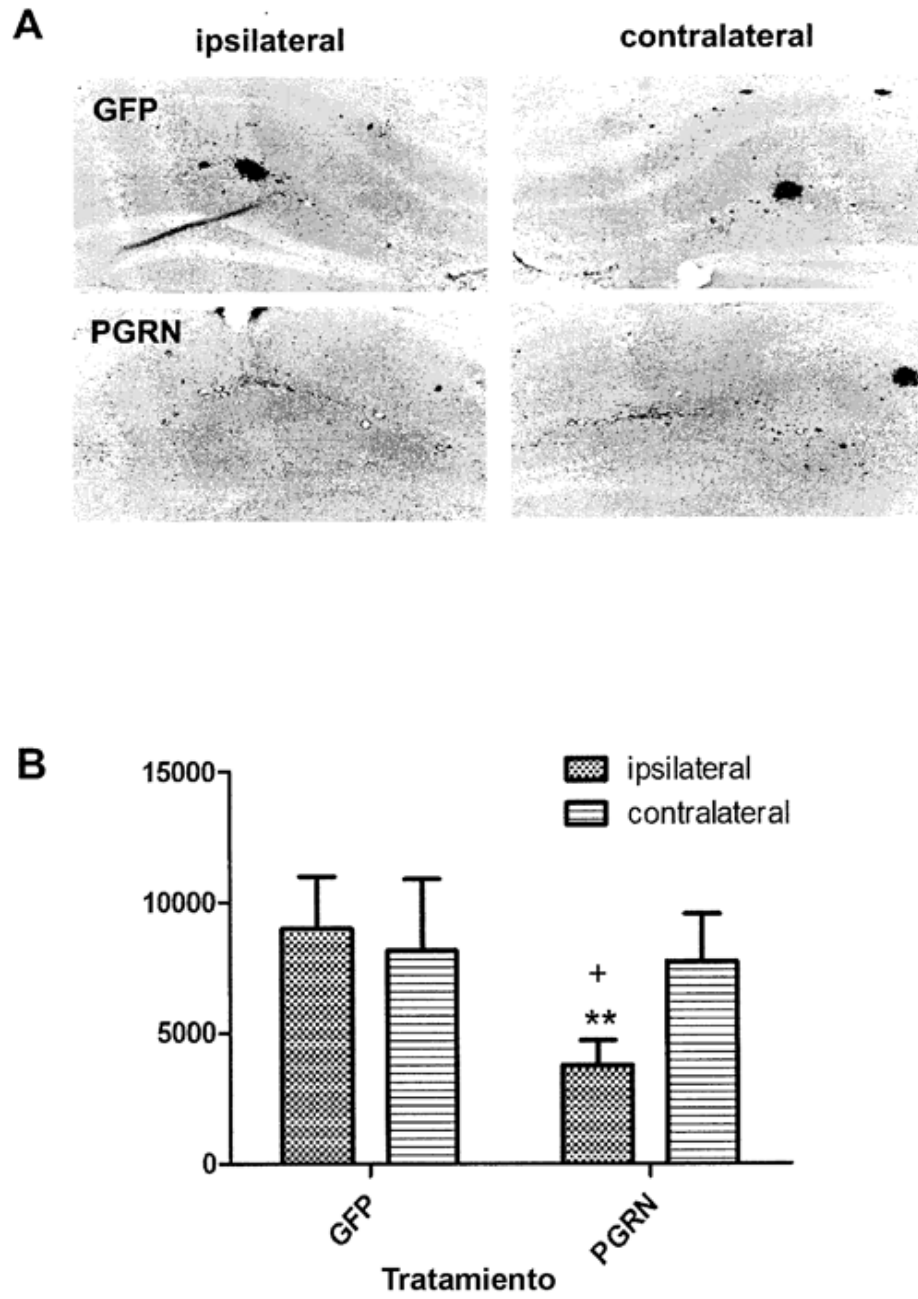


FIGURA 21

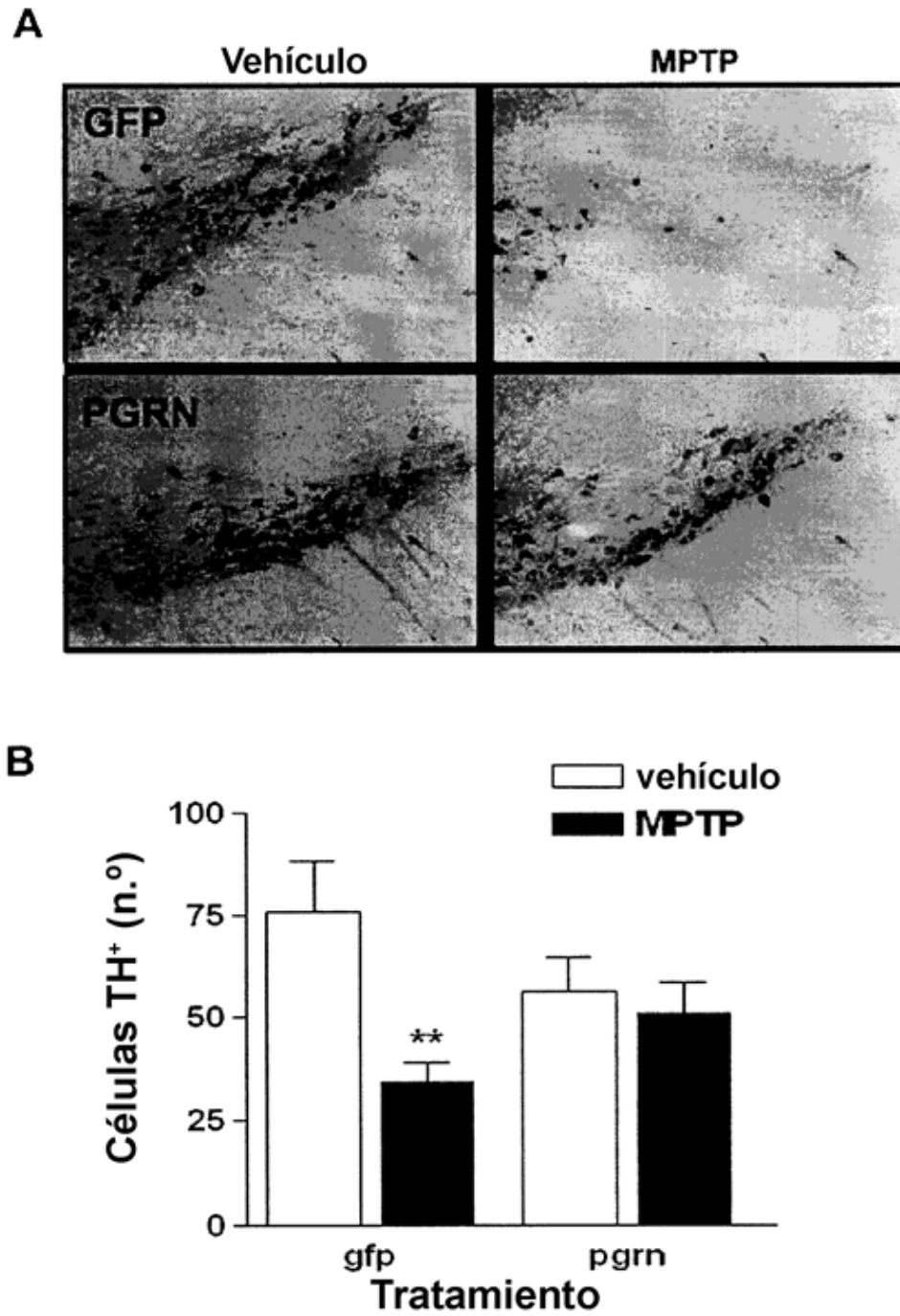


FIGURA 22

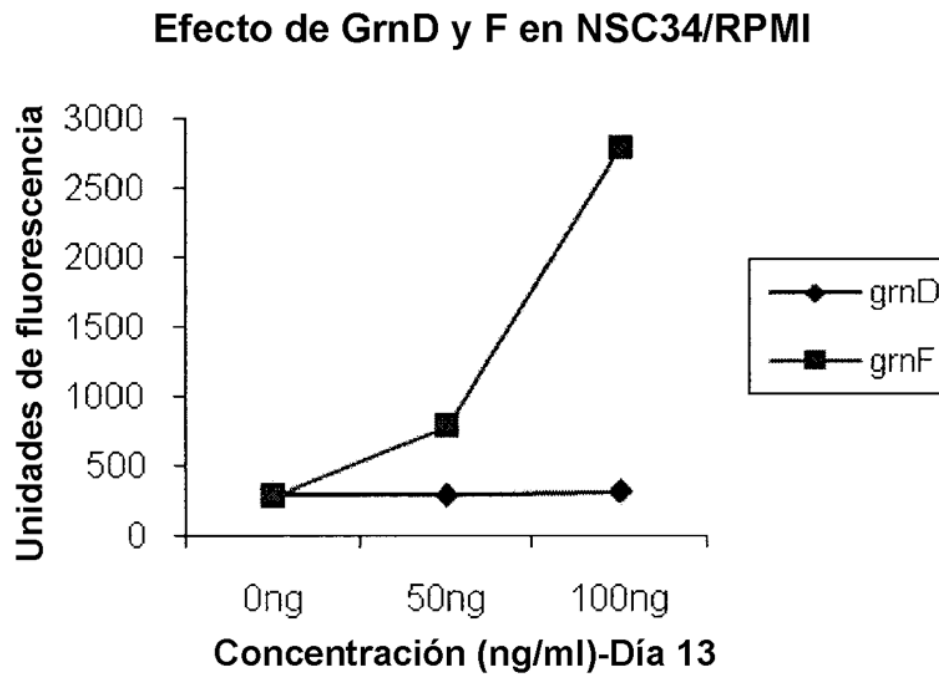


FIGURA 23

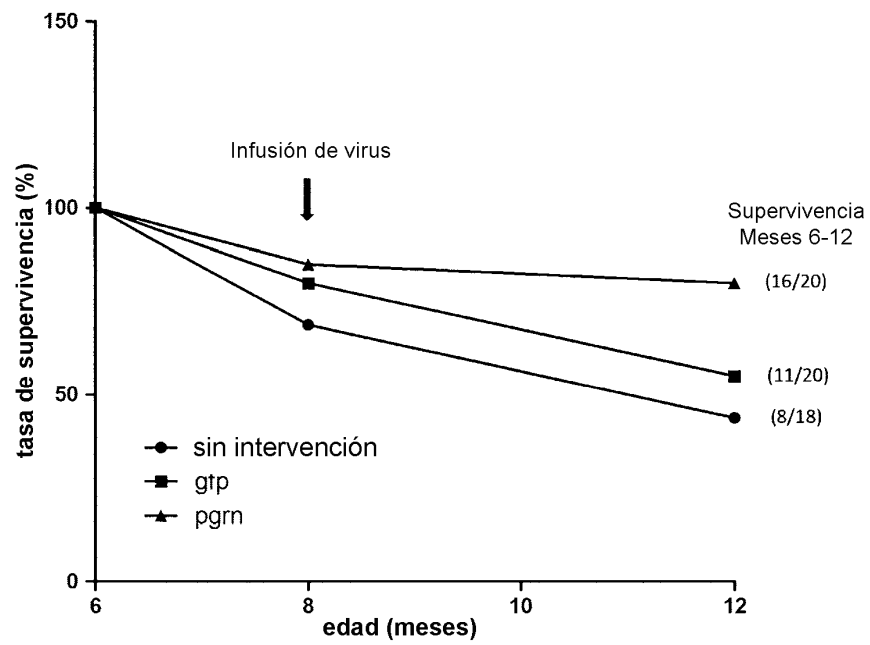


FIGURA 24

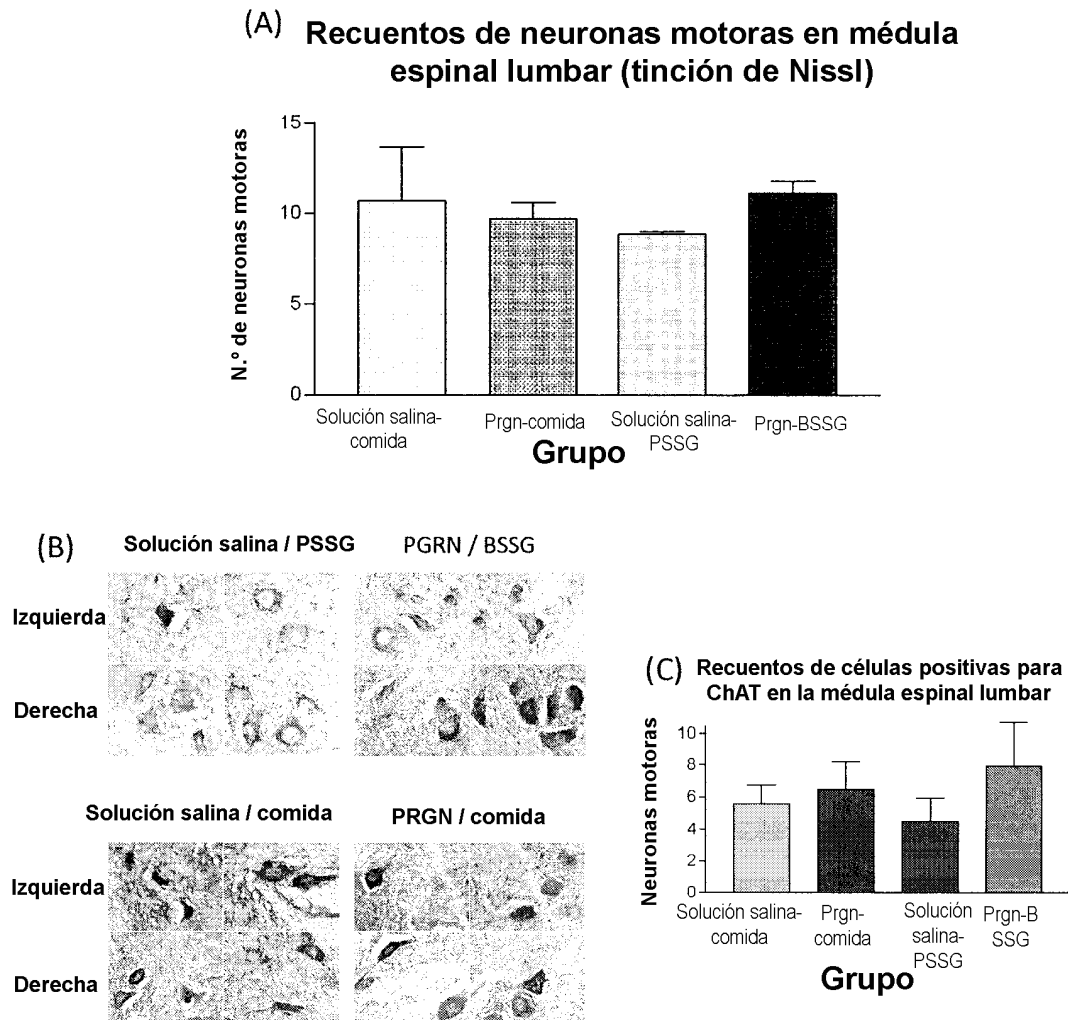


FIGURA 25

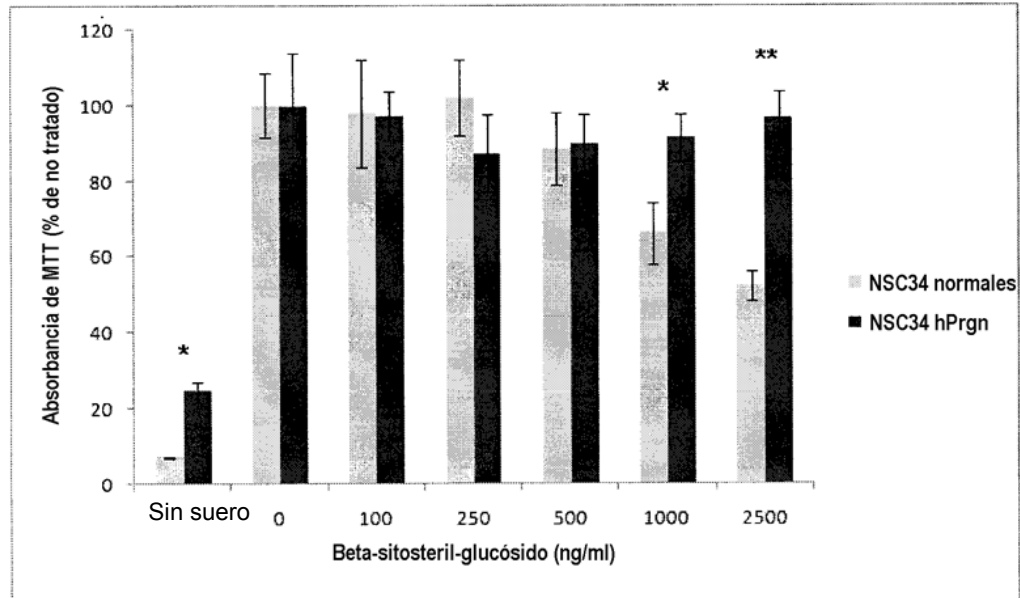


FIGURA 26

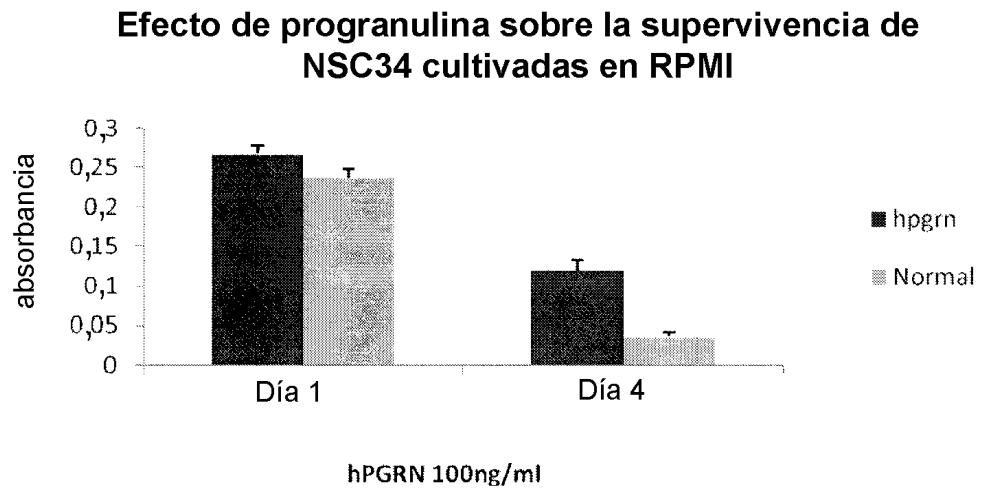


FIGURA 27

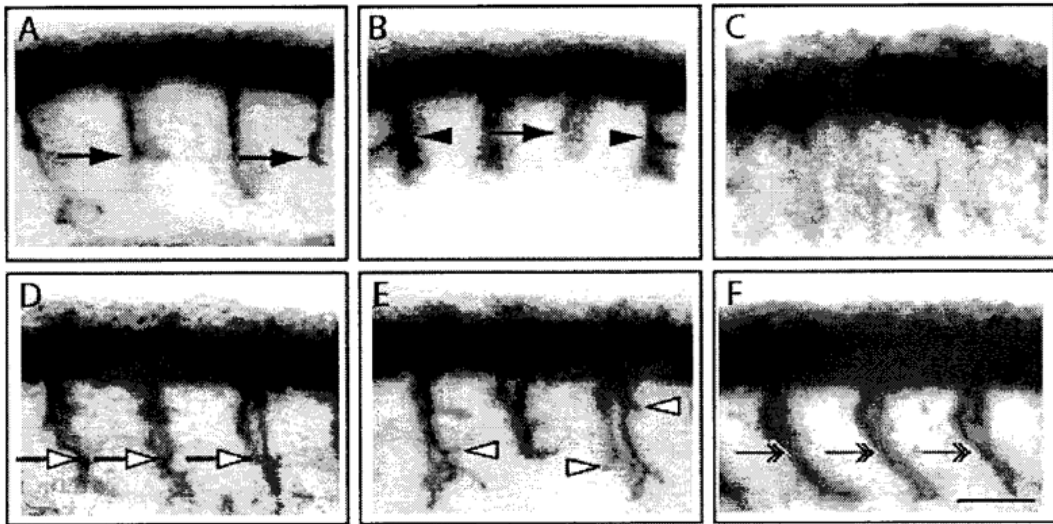


FIGURA 28

