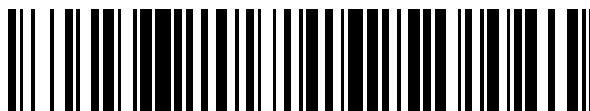


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 154**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2007 PCT/IL2007/000798**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2008 WO08001380**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2007 E 07766829 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2046366**

54 Título: **Copolímero-1 para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad**

30 Prioridad:

28.06.2006 US 806041 P

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

13.03.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED (100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**EISENBACH-SCHWARTZ, MICHAL y
BUTOVSKY, OLEG**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 605 154 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

Copolímero-1 para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.

10 **Abreviaturas:** A β , péptido β amiloide; **AD**, enfermedad de Alzheimer; **AMD**, degeneración macular relacionada con la edad; **APC**, células que presentan antígeno; **BrdU**, 5-bromo-2'-desoxiuridina; **CNS**, sistema nervioso central; **Cop-1**, copolímero-1; **GFP**, proteína fluorescente verde; **IB-4**, isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia*; **IGF**, factor de crecimiento similar a la insulina; **IL**, interleucina; **MG**, microglía; **MHC-II**, complejo de histocompatibilidad mayor de clase II; **MWM**, el laberinto de agua de Morris; **NPC**, células madre/progenitoras neurales; **RGC**, células
15 ganglionares de la retina; **Tg**, transgénico; **Th**, T auxiliares; **TNF- α** , factor de necrosis tumoral α .

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Degeneración macular relacionada con la edad

20 La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad que afecta a la región macular del ojo, que es el área de la retina en la que se obtiene la visión aguda. La degeneración macular está causada por el deterioro de la parte central de la retina, la capa posterior interior del ojo que registra las imágenes que vemos y las envía a través del nervio óptico desde el ojo hasta el cerebro. La parte central de la retina, conocida como la mácula,
25 es responsable de enfocar la visión central del ojo, y controla nuestra capacidad para leer, conducir un coche, reconocer rostros o colores y ver los objetos con detalle fino.

La AMD es la principal causa de ceguera irreversible en los ancianos en los países industrializados y su prevalencia aumenta en la población mayor de 60 años (Klein y otros, 1992; Mitchell y otros, 1995). Se han realizado numerosos
30 intentos para entender la etiología de la enfermedad, su fisiopatología y los factores implicados en la progresión de la enfermedad. Una señal temprana común de AMD es la acumulación de drusas, diminutos glóbulos de grasa de color amarillo o blanco y material extracelular en la retina del ojo o en la cabeza del nervio óptico. Las drusas se producen como drusas duras (depósitos pequeños y sólidos que parecen inofensivos) o depósitos más grandes de drusas blandas con bordes imprecisos. Las drusas blandas que se acumulan entre el epitelio pigmentario de la
35 retina (RPE) y la membrana de Bruch fuerzan la separación de estas dos estructuras.

La mayoría de las personas mayores de 40 años tienen una pequeña cantidad de drusas duras, que pueden unirse para formar drusas blandas en los casos de AMD. Sin embargo, no todas las drusas blandas proceden de drusas duras.
40

Existen dos tipos de degeneración macular: el tipo seco o atrófico y el tipo húmedo o hemorrágico. La forma seca de AMD, que afecta al 80% de todos los pacientes con AMD, se caracteriza por la aparición de drusas. La presencia de drusas se considera que es un factor preexistente asociado con la progresión de la enfermedad bien a AMD seca avanzada o bien a AMD húmeda.
45

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo relacionado con la edad, caracterizado por la pérdida de memoria y el deterioro cognitivo grave (Hardy y Selkoe, 2002). Las características
50 clínicas se manifiestan morfológicamente por la acumulación excesiva de agregados extracelulares de péptido β amiloide (A β) en forma de placas amiloides en el parénquima cerebral, particularmente en el hipocampo y la corteza cerebral, lo que conduce a la pérdida neuronal (Selkoe, 1991). Además, en la mayoría de los modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer, se interrumpe la neurogénesis que tiene lugar normalmente durante toda la vida en el hipocampo del cerebro adulto (Haughey y otros, 2002). En los pacientes de Alzheimer, al igual que en los ratones transgénicos (PDGF-APPsw, Ind), tiene lugar un cierto aumento de la neurogénesis, pero aparentemente no es
55 suficiente para superar la enfermedad (Jin y otros, 2004a, b).

Similitud entre la AMD y la enfermedad de Alzheimer

60 La AMD y la enfermedad de Alzheimer son ambos trastornos neurodegenerativos crónicos que afectan a una proporción sustancial de las personas de edad avanzada. Lo característico de estos trastornos es la pérdida irreversible de la función, para la que no existe cura. La degeneración que se produce en la AMD y la enfermedad de Alzheimer puede, en cierta medida, tener una patogénesis común (Klaver y otros, 1999). Aunque se desconoce la etiología tanto de la AMD como de la enfermedad de Alzheimer, la patogénesis de las dos enfermedades muestra algunas similitudes llamativas. En la AMD, las primeras manifestaciones histopatológicas son depósitos de drusas
65 extracelulares y depósitos laminares basales (Hageman y Mullins, 1999). Estas lesiones contienen lípidos,

glucoproteínas y glucosaminoglucanos, que presumiblemente se derivan de una neurorretina en degeneración (Kliffen y otros, 1995). La acumulación de estos depósitos se asocia con la pérdida de los fotorreceptores y el deterioro posterior de la función macular (Holz y otros, 1994). Como se ha señalado anteriormente, una característica patológica temprana en la enfermedad de Alzheimer es la presencia de placas seniles extracelulares (Selkoe, 1991). Estas placas se componen de muchos componentes, incluidos pequeños péptidos generados por escisión proteolítica de una familia de polipéptidos transmembrana conocidos como proteínas precursoras de amiloide. Dos péptidos que están ampliamente considerados como los principales contribuyentes a la patología de la enfermedad de Alzheimer se conocen como péptidos β amiloide ($A\beta$). Entre los componentes compartidos de los depósitos de amiloide y las drusas se incluyen proteínas tales como vitronectina, amiloide P, apolipoproteína E e incluso péptidos $A\beta$ y oligómeros de amiloide que están asociados con las placas de amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Luibl y otros, 2006; Mullins y otros, 2000; Yoshida y otros, 2005).

Los péptidos $A\beta$ presentes en la enfermedad de Alzheimer activan las células microgliales para producir sustancias potencialmente neurotóxicas, tales como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, citocinas proinflamatorias, proteínas de complemento y otros mediadores inflamatorios que provocan cambios neurodegenerativos (Akiyama y otros, 2000). La respuesta inflamatoria que se ha asociado con la enfermedad de Alzheimer a menudo implica microglía activada $CD11b^+$, que representa el brazo innato del sistema inmunitario en el sistema nervioso central (CNS) (Streit, 2004). Se ha descrito que la microglía $CD11b^+$ está asociada con el cerebro humano normal relacionado con la edad (Streit, 2004), y es posible que esta microglía sea la que contribuya tanto a la pérdida cognitiva relacionada con la edad como a la alteración de la neurogénesis (Monje y otros, 2003). La $CD11b$ también se ha encontrado en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Akiyama y McGeer, 1990). Por otra parte, están presentes mediadores de la inflamación en los depósitos de amiloide, así como en las drusas, lo que sugiere un posible papel común para la vía inflamatoria en la AMD y la enfermedad de Alzheimer (Hageman y otros, 2001). Un papel en la inflamación local en la biogénesis de las drusas sugiere que este proceso es análogo al proceso que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer, en la que la acumulación de placas extracelulares y depósitos provoca una respuesta inflamatoria crónica local que exacerba los efectos de los estímulos patógenos primarios (Akiyama y otros, 2000).

Activación microglial en la neurodegeneración

La microglía son células gliales derivadas de médula ósea, que están presentes dentro de todas las capas de la retina humana adulta (Penfold y otros, 1991). Están presentes varios tipos que pueden estar asociados con las neuronas o con los vasos sanguíneos, y algunas de éstas son células que presentan antígeno (APC) (Penfold y otros, 1991; Provis, 2001). La naturaleza de la activación microglial, ya sea beneficiosa o perjudicial, en el tejido neural dañado depende de cómo la microglía interpreta la amenaza (Butovsky y otros, 2005). A pesar de que la presencia de células microgliales en el tejido nervioso normal sin dañar se ha debatido durante años, en la actualidad es un hecho aceptado (Nimmerjahn y otros, 2005), incluyendo su presencia en el ojo. El papel de la microglía en los procesos inflamatorios es controvertido. Por una parte, la participación de la microglía en el proceso inflamatorio del ojo puede estimular las células ganglionares de la retina (RGC) maduras para regenerar sus axones (Yin y otros, 2003). Por otra parte, el papel de la microglía en procesos neurodegenerativos puede ser perjudicial para el tejido neuronal. Roque y otros (1999) demostraron que las células microgliales liberan uno o varios productos solubles que inducen la degeneración de las células fotorreceptoras cultivadas. Esta controversia puede explicarse por los informes contradictorios en cuanto a la presencia de células que presentan antígenos, que son factores cruciales de una respuesta inmunitaria mediada por células específicas de antígeno. Las respuestas inmunológicas en la microglía de la retina neural se relacionan con cambios patogénicos tempranos en la pigmentación del epitelio pigmentario de la retina y la formación de drusas. La microglía activada puede estar involucrada también en la muerte de los bastones en la AMD y la degeneración de la retina de inicio tardío. Un estudio reciente ha propuesto que la microglía, activada por la muerte de los bastones primarios, migra a la capa nuclear externa, elimina los restos celulares de los bastones y puede matar a los conos fotorreceptores adyacentes (Gupta y otros, 2003).

Al igual que los macrófagos derivados de sangre, la microglía muestra la captación de los depósitos extracelulares y la fagocitosis de los depósitos amiloides anormales en la enfermedad de Alzheimer. Esta microglía, a la vez que actúa de manera eficiente como células fagocíticas, provoca la muerte neuronal mediante la secreción de mediadores como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$) (Butovsky y otros, 2005) y, de este modo, aunque actúa como células fagocíticas (Frenkel y otros, 2005), al parecer no es lo suficientemente eficiente para combatir los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. En contraste con esta microglía residente, la microglía derivada de la médula ósea de ratones emparejados de tipo salvaje puede eliminar eficazmente las placas (Simard y otros, 2006). Por otra parte, la ausencia de macrófagos que funcionan normalmente conduce al desarrollo de la AMD clínica (Ambati y otros, 2003). De este modo, la AMD, como la enfermedad de Alzheimer, ilustra una enfermedad en la que la captación de los depósitos anormales induce inevitablemente la autoperpetuación de la progresión de la enfermedad mediada por las mismas células fagocíticas (Gupta y otros, 2003).

Autoinmunidad protectora

Hace algunos años, nuestro grupo formuló el concepto de 'autoinmunidad protectora' (Moalem y otros, 1999). Se descubrió que tanto las citocinas proinflamatorias como las antiinflamatorias eran componentes críticos de una

respuesta autoinmunitaria beneficiosa mediada por células T, siempre que la duración y la intensidad de la actividad de las células T se controlara de forma adecuada (Butovsky y otros, 2005; Shaked y otros, 2004) y dependiendo de la naturaleza de la enfermedad (Schwartz y otros, 2006). Según nuestro concepto, una autoinmunidad incontrolada conduce al estado conocido normalmente de las enfermedades autoinmunitarias asociadas con la activación saturada de la microglía (Butovsky y otros, 2006a), tal como se discutirá a continuación. Se descubrió que el efecto beneficioso de las células T autorreactivas se ejercía a través de su capacidad para inducir que la microglía residente en el CNS adoptara un fenotipo capaz de presentar antígenos (Butovsky y otros, 2001; Butovsky y otros, 2005; Schwartz y otros, 2006; Butovsky y otros, 2006a; Shaked y otros, 2004), expresar factores de crecimiento (Butovsky y otros, 2005; Butovsky y otros, 2006a; b) y tamponar el glutamato (Shaked y otros, 2005).

En un intento por aumentar la eficacia de las células T autorreactivas de protección, hemos probado muchos compuestos en la búsqueda de un antígeno seguro y apto para la neuroprotección. Entonces, sugerimos la utilización de acetato de glatiramer, también conocido como copolímero-1 o Cop-1 (Kipnis y otros, 2000; Avidan y otros, 2004; Angelov y otros, 2003), un copolímero sintético de 4 aminoácidos del que se conoce que es seguro y que actualmente se utiliza como un tratamiento para la esclerosis múltiple mediante un régimen de administración diaria (Copaxone®, Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Israel). En nuestros estudios hemos demostrado su baja afinidad de reacción cruzada con una amplia gama de autoantígenos del CNS. Debido a que la afinidad de la reacción cruzada es baja, las células T activadas con, después de infiltrarse en el sistema nervioso central, tienen el potencial de activarse localmente con poco o ningún riesgo asociado de enfermedad autoinmunitaria (Kipnis y otros, 2000).

Una sola inyección de Cop-1 es protectora en modelos agudos de lesiones del CNS (Kipnis y otros, 2000; Avidan y otros, 2004; Kipnis y Schwartz, 2002), mientras que en modelos crónicos se requiere un refuerzo ocasional para un efecto protector de larga duración (Angelov y otros, 2003). En el modelo de rata de presión intraocular crónicamente elevada, la vacunación con Cop-1 reduce significativamente la pérdida de RGC incluso si la presión sigue siendo elevada. Cabe señalar que la vacunación no impide el inicio de la enfermedad, pero puede ralentizar su progresión mediante el control del entorno extracelular local del nervio y de la retina, por lo que es menos hostil a la supervivencia neuronal y permite que las RGC sean más capaces de soportar la tensión (Schori y otros, 2001; Benner y otros, 2004; Kipnis y Schwartz, 2002; Kipnis y otros, 2000).

Para los trastornos crónicos se necesita un refuerzo ocasional. Por ejemplo, en un modelo de presión intraocular crónicamente elevada, se descubrió que la administración semanal de Cop-1 sin adyuvante daba lugar a neuroprotección (Bakalash y otros, 2005). El efecto neuroprotector del Cop-1 se ha atribuido en parte a la producción de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Kipnis y otros, 2004b; Ziemssen y otros, 2002).

El agregado A β induce toxicidad en la microglía residente y dificulta la renovación celular

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio sugirieron que la microglía expuesta a agregado A β , aunque es eficaz en la eliminación de placas, es tóxica para las neuronas y afecta a la renovación celular neural (Butovsky y otros, 2006a); estos efectos recuerdan a la respuesta de la microglía a la invasión de microorganismos (tal como se ejemplifica por su respuesta a LPS) (Butovsky y otros, 2005; Schwartz y otros, 2006). Estas actividades se manifiestan por un aumento de la producción de TNF- α , la regulación a la baja del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), la inhibición de la capacidad de expresar las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y CD11c (un marcador de células dendríticas) y, de este modo, de actuar como células que presentan antígeno (APC), y la incapacidad de contribuir a la supervivencia y la renovación del tejido neural ((Butovsky y otros, 2006a; Butovsky y otros, 2005; Butovsky y otros, 2006b). Además, hemos descubierto que cuando la microglía se encuentra con el amiloide agregado β , su capacidad para eliminar estos agregados sin ejercer efectos tóxicos sobre las neuronas vecinas o alterar la neurogénesis depende de que pueda sufrir un cambio de fenotipo. Un cambio en el fenotipo microglial podría tener lugar a través de un diálogo local entre la microglía y las células T, que está mediado por citocinas derivadas de células T, tales como interleucina (IL)-4. La adición de la IL-4, una citocina derivada de células T auxiliares (Th)-2, a la microglía activada por agregado A β puede revertir la regulación a la baja de la expresión de IGF-I, la regulación al alza de la expresión de TNF- α , y la incapacidad de actuar como APC (Butovsky y otros, 2005). La importancia de la microglía para la renovación celular neural en vivo se demostró por el aumento de la neurogénesis en el giro dentado de la rata después de la inyección intracerebroventricular de microglía activada por IL-4 y por la presencia de microglía que expresa IGF-I en el giro dentado de ratas mantenidas en un ambiente enriquecido (Ziv y otros, 2006). En roedores con EAE aguda o crónica, la inyección de microglía activada por IL-4 en el líquido cefalorraquídeo dio como resultado un aumento de la oligodendrogénesis en la médula espinal y la mejora de los síntomas clínicos. Los oligodendrocitos recién formados se asociaron espacialmente con microglía que expresaba MHC-II e IGF-I (Butovsky y otros, 2006c).

Hay componentes sistémicos tanto en la enfermedad de Alzheimer como en la AMD

Nuestra primera observación de que las células inmunitarias sistémicas (en forma de células T dirigidas hacia ciertos autoantígenos) pueden proteger a las neuronas lesionadas de la muerte, vino de estudios en roedores que muestran que la transferencia pasiva de células T específicas a la proteína básica de mielina reduce la pérdida de RGC

después de una lesión traumática del nervio óptico (Moalem y otros, 1999). Descubrimos que estas células T son también eficaces cuando se dirigen contra los epítomos crípticos o patógenos de la proteína básica de mielina, así como a otros antígenos de la mielina o sus epítomos (Mizrahi y otros, 2002). Estos descubrimientos plantean una serie de preguntas críticas. Por ejemplo, ¿son los antígenos de mielina capaces de proteger el sistema nervioso de cualquier lesión de tipo aguda o crónica? ¿Es la actividad neuroprotectora observada de las células inmunitarias simplemente un descubrimiento anecdótico que refleja nuestras condiciones experimentales, o apunta a la participación crítica del sistema inmunitario para combatir los estados perjudiciales en el sistema visual y en el CNS en general? En este último caso, ¿se deduce que las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades sistémicas? Si es así, ¿este descubrimiento puede ser traducido a una terapia sistémica que proteja el cerebro, el ojo y la médula espinal?

En una serie de experimentos llevados a cabo en los últimos años hemos aprendido que, en primer lugar, la respuesta protectora de las células T es una respuesta fisiológicamente suscitada que podría no ser suficiente en lesiones graves o quizás no esté siempre controlada adecuadamente. Además, descubrimos que la especificidad de estas células T protectoras depende del sitio de la lesión. De este modo, por ejemplo, el efecto protector de la vacunación con antígenos asociados a la mielina está restringido a las lesiones de la sustancia blanca, es decir, a los axones mielinizados (Mizrahi y otros, 2002; Avidan y otros, 2004; Schorl y otros, 2001). Si la lesión se produce en la retina, que no contiene mielina, los antígenos de mielina no tienen ningún efecto. En segundo lugar, observamos que la respuesta inducida por la lesión de las células T reactivas a autoantígenos específicos que residen en el sitio de tensión (ojo o cerebro) es una respuesta fisiológica espontánea (Yoles y otros, 2001). Entonces, tratamos de identificar el fenotipo de las células T autoinmunitarias beneficiosas y entender lo que determina el equilibrio entre un resultado beneficioso (neuroprotector) de la respuesta mediada por células T a una lesión del CNS y un efecto destructivo que provoca la enfermedad autoinmunitaria. También examinamos las formas de traducir la respuesta beneficiosa en una terapia para el glaucoma. Descubrimos que en los animales inmunodeficientes el número de RGC supervivientes después de una lesión en los ojos, la médula espinal o el cerebro es significativamente menor que en controles emparejados con un sistema inmunitario intacto, lo que sugiere que la capacidad de soportar una lesión al CNS depende de la integridad del sistema inmunitario y específicamente de la población específica dentro del sistema inmunitario; aquellos que reconocen los autoantígenos específicos del sitio. Curiosamente, la utilización de esteroides provocó una pérdida significativa de RGC (Bakalash y otros, 2003).

Las células T específicas de antígenos que residen en el sitio del daño ayudan a limpiar y sanar

Para que sean protectoras, las células T anti-antígenos propios deben migrar al sitio del daño y activarse de forma local. Por eso, sólo aquellos antígenos que están presentes en el lugar de la lesión se pueden utilizar para la vacunación. Una vez activadas, las células T proporcionan una fuente de citocinas y factores de crecimiento que dan forma a las células centinelas residentes en el ojo (la microglía), para volverlas células defensivas activas que el ojo puede tolerar. Concretamente, este tipo de microglía activada puede aceptar glutamato, eliminar los residuos y producir factores de crecimiento, mientras que se abstiene de producir agentes que forman parte de su mecanismo de eliminación (por ejemplo, TNF- α) a los que el ojo, al igual que el cerebro, tiene una baja tolerancia (Butovsky y otros, 2005; Butovsky y otros, 2001; Barouch y Schwartz, 2002; Moalem y otros, 2000; Shaked y otros, 2005). Estas células T están constitutivamente controladas por las células T reguladoras fisiológicamente existentes, que son a su vez susceptibles de control si es necesario (Kipnis y otros, 2004a; Kipnis y otros, 2002).

Se hace referencia a la solicitud de patente internacional en tramitación No. PCT/IL2007/... titulada "Activated microglial cells for promoting tissue repair and detecting damaged tissue", presentada por el solicitante en la Oficina Receptora de PCT de Israel (RO/IL) en la misma fecha, y cuyo contenido está explícitamente excluido del ámbito de aplicación de la presente invención.

La cita de cualquier documento en la presente memoria no debe interpretarse como una admisión de que tal documento sea técnica anterior pertinente, o material considerado para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente solicitud. Cualquier declaración en cuanto a contenido o una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible para el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión de la exactitud de esta declaración.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención el dar a conocer una terapia de base inmunológica para la degeneración macular relacionada con la edad.

La presente invención se refiere a realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. De este modo, se refiere a los siguientes puntos:

1. Un agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo, para su utilización en el tratamiento de la degeneración macular seca relacionada con la edad, en el que dicho agente es el copolímero-1.

2. Un agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo, para su utilización en la reducción de la zona de drusas en un individuo con degeneración macular relacionada con la edad, en el que dicho agente es el copolímero-1.

3. El agente para su utilización, según el punto 2, en el que dicha degeneración macular relacionada con la edad es la degeneración macular seca relacionada con la edad.

4. El agente para su utilización, según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que dicho agente se administra semanalmente.

5. El agente para su utilización, según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que dicho agente se administra mediante inyección subcutánea.

Además, se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad, que comprende provocar que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo de un paciente que lo necesita, para de este modo detener o retrasar el progreso de la degeneración macular.

Se da a conocer que la acumulación de células T en el ojo está provocada por la administración a dicho paciente de un agente seleccionado entre el grupo que comprende:

- (i) copolímero-1, un péptido relacionado con el copolímero-1 o un polipéptido relacionado con el copolímero-1;
- (ii) IL-4;
- (iii) células dendríticas, monocitos, células mieloides derivadas de médula ósea o células mononucleares de sangre periférica activadas por IL-4;
- (iv) células modificadas genéticamente que producen IL-4;
- (v) células mieloides derivadas de médula ósea o células mieloides derivadas de sangre periférica activadas con IL-13 o con hasta 20 ng/ml de IFN- γ ;
- (vi) un autoantígeno patógeno asociado con una enfermedad autoinmunitaria específica del ojo mediada por células T;
- (vii) un péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de dicho autoantígeno patógeno de (vi) o un péptido obtenido mediante la modificación de dicho péptido, modificación que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos del péptido por residuos de aminoácidos diferentes (en lo sucesivo, "péptido modificado"), siendo aún capaz dicho péptido modificado de reconocer el receptor de células T reconocido por el péptido parental, pero con menos afinidad;
- (viii) una secuencia de nucleótidos que codifica un autoantígeno patógeno de (vi) o un péptido o un péptido modificado de (vii);
- (ix) células T activadas por un agente de (i), (vi) o (vii); y
- (x) cualquier combinación de (i) - (ix).

Se da a conocer además la utilización de un agente, según se define en los puntos (i) - (x) anteriores, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las **figuras 1A-1D** demuestran que la IL-4 puede contrarrestar el efecto adverso de agregado A β sobre la toxicidad microglial y la promoción de la neurogénesis en células progenitoras neurales de ratón adulto. (**Figura 1A**) Paradigma de tratamiento *in vitro*. (**Figura 1B**) Imágenes de microscopio confocal representativas de células progenitoras neurales (NPC) que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) y β III-T (marcador neuronal), cocultivadas conjuntamente durante 10 días sin microglía (MG, control), o con microglía sin tratar, o con microglía que fue activada previamente mediante agregado A β ₍₁₋₄₀₎ (5 μ M) (MG_(A β 1-40)) durante 48 h y posteriormente activada con IFN- γ (10 ng/ml) (MG_{(A β 1-40)/IFN γ) o con IL-4 (10 ng/ml) (MG_(A β 1-40/IL-4)) o con ambos IFN- γ (10 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml) (MG_(A β 1-40)/IFN γ +IL-4)). Nota, el agregado A β indujo a la microglía a adoptar una morfología ameboide, pero después de que se añadiera IL-4 mostró una estructura ramificada. (**Figura 1C**) Imágenes confocales separadas de GFP que coexpresan NPC y β III-T adyacente a microglía CD11b⁺. (**Figura 1D**) Cuantificación de las células doblemente marcadas con GFP y β III-T (expresada como un porcentaje de células GFP⁺) obtenida a partir de imágenes confocales. Los resultados son de tres experimentos independientes en cultivos replicados; las barras representan las medias $\pm$ EEM. Los asteriscos sobre las barras indican la significación de las diferencias relativas a las NPC no tratadas (control) (*P < 0,05; ***P < 0,001; prueba t de Student de dos extremos). Las líneas horizontales con los valores de P encima de ellas mostraron diferencias entre los grupos indicados (ANOVA).}

Las **figuras 2A-2L** muestran que la vacunación con Cop-1 conduce a la reducción de amiloide β y contrarresta la pérdida de neuronas del hipocampo en el cerebro de ratones transgénicos con enfermedad de Alzheimer: papel clave de la microglía. (**Figura 2A**) Imágenes microscópicas confocales representativas de cortes de hipocampo de cerebro de ratones no transgénicos (Tg), Tg con enfermedad de Alzheimer (AD) no tratados y Tg-AD vacunados con Cop-1 teñidos para NeuN (neuronas maduras) y A β humano. Los ratones no-Tg no mostraron tinción para

A β humano. El ratón Tg-AD no tratado mostró una abundancia de placas de A β extracelulares, mientras que la inmunoreactividad a A β es baja en los ratones Tg-AD tratados con Cop-1. Se observa una débil tinción NeuN⁺ en las regiones del hipocampo CA1 y del giro dentado del ratón Tg-AD no tratado en relación con su compañero de camada no-Tg, mientras que la tinción NeuN⁺ en el ratón Tg-AD vacunado con Cop-1 es casi normal. **(Figura 2B)**

5 Tinción de microglía activada utilizando anticuerpos anti-CD11b. Imágenes en alta y baja magnificación muestran una incidencia elevada de la microglía doblemente teñida para A β y CD11b en las regiones de CA1 y giro dentado del hipocampo de un ratón Tg-AD no tratado, pero sólo una presencia menor de microglía CD11b⁺ en el ratón Tg-AD vacunado con Cop-1. Las flechas indican las zonas de alta magnificación, que se muestra a continuación. **(Figura 2C)** Microglía CD11b⁺, asociada con una placa A β , que expresa fuertemente TNF- α en un ratón Tg-AD no tratado. **(Figura 2D)** La tinción para MHC-II (un marcador de la presentación de antígenos) en una sección criogénica tomada de un ratón Tg-AD vacunado con Cop-1 en una zona que se teñía positivamente para A β , muestra una incidencia elevada de microglía MHC-II⁺ y casi ninguna de microglía de TNF- α ⁺. **(Figura 2E)** Toda la microglía MHC-II⁺ en un área del cerebro que se teñía positivamente para A β (puntas de flecha) en un ratón Tg-AD vacunado con Cop-1 coexpresa CD11c (un marcador de células dendríticas), pero sólo se ve algo de microglía CD11c⁺/MHC-II⁺ en un área correspondiente en el cerebro de un ratón Tg-AD no tratado. **(Figura 2F)** Microglía MHC-II⁺ en un ratón Tg-AD vacunado con Cop-1 coexpresa IGF-I. **(Figura 2G)** Se observan células T CD3⁺ en las proximidades de una placa A β y **(Figura 2H)** están asociadas con microglía del MHC-II⁺. El área encuadrada muestra una gran ampliación de una sinapsis inmunológica entre una célula T (CD3⁺) y una célula microglial que expresa MHC-II. **(Figura 2I)** Histograma que muestra el número total de placas A β (en un corte de hipocampo de 30

20 μ m). **(Figura 2J)** Histograma que muestra la tinción de inmunoreactividad A β . Obsérvense las diferencias significativas entre los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 y los Tg-AD no tratados, verificando la presencia reducida de placas A β en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1. **(Figura 2K)** Histograma que muestra una marcada reducción de las células teñidas para CD 1b, indicativa de microglía activada e inflamación, en ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 en relación con ratones Tg-AD no tratados. Obsérvense el aumento de la microglía CD11b⁺ con la edad en los compañeros de camada sin Tg. **(Figura 2L)** Histograma que muestra significativamente más células CD3⁺ asociadas con una placa A β en ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 que en los ratones Tg-AD no tratados. La cuantificación de células CD3⁺ se analizó a partir de 30-50 placas de cada ratón examinado en este estudio. Las barras de error indican la media $\pm$ EEM. * P < 0,05, *** P < 0,001 frente a compañeros de camada sin Tg (prueba t de Student). Los valores de P indicados en la figura representan una comparación de los grupos analizados en el ANOVA. Todos los ratones en este estudio se incluyeron en el análisis (6-8 secciones por ratón).

Las **figuras 3A-3C** muestran que la vacunación con Cop-1 induce a la microglía a expresar CD11c. **(Figura 3A)** Microglía CD11b⁺ que coexpresa CD11c rodea una placa A β en ratones Tg-AD vacunados con Cop-1. Toda la microglía que expresa CD11c se marca conjuntamente para CD11b. Se muestra el canal confocal separado en el panel derecho. **(Figura 3B)** Histogramas que muestran el número de células CD11b⁺ asociadas con una placa A β . **(Figura 3C)** Histogramas que muestran la cuantificación de células CD11c⁺ como un porcentaje del número total de células CD11b⁺ y CD11c⁺ asociadas con una placa A β . Para este análisis, se contaron las células que rodean 30-50 placas en cada ratón sometido a ensayo. Las barras de error representan las medias $\pm$ EEM. Los asteriscos sobre las barras indican la importancia de las diferencias entre los grupos (** P < 0,01; *** P < 0,001; prueba t de Student de dos extremos).

Las **figuras 4A-4D** muestran que la vacunación con Cop-1 induce a la microglía a expresar CD11c: papel de la IL-4. **(Figura 4A)** Microglía activada por IL-4 (MG_(IL-4)) induce la expresión de CD11c en un cultivo primario de microglía de ratón 5 días después de la activación. La microglía no tratada (MG₍₋₎) no expresa casi ningún CD11c. **(Figura 4B)** Efecto de la IL-4 (en términos de morfología y expresión de CD11c) sobre la microglía tratada previamente durante 3 días con agregada A β ₍₁₋₄₀₎ (MG_(A β)) y se evaluó 10 días más tarde en comparación con tratamiento con IL-4 durante 10 días sin exposición previa a A β . Téngase en cuenta que se adoptó una morfología de tipo dendrítica tras la adición de IL-4 a la microglía solamente pretratada con A β , mientras que la expresión de CD11c se indujo mediante la IL-4 con y sin un tratamiento previo con A β . **(Figura 4C)** El análisis cuantitativo de la expresión microglial de microglía CD11c⁺ (expresado como un porcentaje de microglía marcado con IB-4) y de la intensidad de CD11c por célula, ambos expresados como una función del tiempo en cultivo con o sin IL-4. **(Figura 4D)** Análisis cuantitativo de la expresión de CD11c (calculada como un porcentaje de microglía marcado con IB-4) por los cultivos que se muestran en la **(figura 4B)**. Los resultados son de tres experimentos independientes en cultivos replicados; las barras representan las medias $\pm$ EEM. Los asteriscos sobre las barras indican la importancia de las diferencias con respecto a microglía sin tratar en cada punto (** P < 0,001; prueba t de Student de dos extremos).

Las **figuras 5A-5B** muestran el englobamiento de los agregados A β por microglía activada. La microglía se trató con IL-4 (10 ng/ml) 24 horas después de la siembra (MG_(IL-40)) o se dejaron sin tratar durante 48 horas (MG₍₋₎). Los medios fueron posteriormente reemplazados por un medio de marcaje (DMEM que contiene 10 mg/ml de albúmina de suero bovino), y se añadió A β ₍₁₋₄₀₎ (5 μ g/ml) durante 1 h. Después de la incubación, los cultivos se fijaron y se inmunotiñeron con anticuerpos dirigidos a A β humano y se tiñeron conjuntamente para microglía (IB-4). **(Figura 5A)** Microfotografías confocales. **(Figura 5B)** Análisis cuantitativo expresado como intensidad por célula. Se presentan los resultados de uno de dos experimentos, cada uno con ocho replicados (20-30 células por replicado) por grupo (promedio $\pm$ SD).

Las **figuras 6A-6E** representan el aumento de la neurogénesis inducido por la vacunación con Cop-1 en el giro dentado del hipocampo de los ratones transgénicos AD adultos (Tg). Tres semanas después de la primera vacunación con Cop-1, los ratones de cada grupo experimental fueron inyectados intraperitonealmente con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) dos veces al día durante 2,5 días. Tres semanas después de la última inyección se les extirpó el cerebro y los hipocampos se analizaron para detectar BrdU, DCX (un marcador de diferenciación temprana del linaje neuronal), y NeuN (un marcador de neuronas maduras). (**Figuras 6A-6C**) Histogramas que muestran la cuantificación de las células en proliferación (BrdU⁺). (**Figura 6A**) Neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) (**figura 6B**), y todas las neuronas prematuras (teñidas con DCX⁺) (**figura 6C**). Números de células BrdU⁺, BrdU⁺/NeuN⁺ y DCX⁺ por giro dentado (DG), calculados a partir de seis secciones coronales igualmente espaciadas (30 µm) de ambos lados de los cerebros de todos los ratones sometidos a ensayo en este estudio. Las barras de error representan las medias ± EEM. Los asteriscos sobre las barras indican la importancia de las diferencias respecto a los compañeros de camada no-Tg (**P < 0,01; ***P < 0,001; prueba t de Student de dos extremos). Las líneas horizontales con los valores de P encima de ellos mostraron diferencias entre los grupos indicados (ANOVA). (**Figura 6D**) Imágenes microscópicas confocales representativas del giro dentado que muestran la inmunotinción para BrdU/DCX/NeuN en un ratón Tg-AD vacunado con Cop-1 y en un compañero de camada no-Tg respecto a la de un ratón Tg-AD no tratado. (**Figura 6E**) Células ramificadas DCX⁺ se encuentran cerca de microglía MHC-II⁺ situada en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo de un ratón Tg-AD vacunado con Cop-1.

Las **figuras 7A-7B** muestran que la vacunación con Cop-1 contrarresta el deterioro cognitivo en ratones transgénicos AD (Tg). La actividad cognitiva dependiente del hipocampo se evaluó en el laberinto de agua de Morris (MWM). (**Figuras 7A-7B**) Los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (rombo; n = 6) mostraron una capacidad significativamente mejor de aprendizaje/memoria que los ratones Tg-AD no tratados (cuadrado; n = 7) durante la adquisición y la inversión. Los ratones Tg-AD no tratados mostraron deficiencias constantes y duraderas en tareas de memoria espacial. Por el contrario, el rendimiento de la prueba MWM por los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 fue bastante similar, en promedio, a la de sus compañeros de camada nativos sin Tg emparejados por edad (triángulo; n = 6) (ANOVA 3 vías, medidas repetidas: grupos, df (2,16), F = 22,3, p < 0,0002; ensayos, df (3,48), F = 67,9, P < 0,0001; días, df (3,48), F = 3,1, P < 0,035, para la fase de adquisición, y grupos, df(2,16), F = 14,9, P < 0,0003; ensayos, df(3,48), F = 21,7, P < 0,0001; días, df (1,16), F = 16,9, P < 0,0008, para la fase de inversión).

Las **figuras 8A-8D** muestran la evolución temporal de la expresión de CD11c en microglía activada por IFN-γ e IL-4. (**Figura 8A**) La microglía se trató con IFN-γ (10 ng/ml; MG_(IFN-γ)) o IL-4 (10 ng/ml; MG_(IL-4)) durante 1, 3, 5, 10 y 18 días. La microglía sin tratar (MG₍₋₎) se utilizó como control. (**Figura 8B**) Las imágenes confocales de microglía, identificadas por tinción para IB4, inmunomarcada para βIII-T y CD11c después de 5 días de tratamiento. MG₍₋₎ no expresó CD11c. Después de la exposición a IFN-γ o IL-4, la microglía expresó CD11c y exhibió su morfología característica. (**Figura 8C**) La expresión conjunta de βIII-T y CD11c en microglía activada con IFN-γ (10 ng/ml) durante 5 días (IB4/βIII-T/CD11c). Nota, los canales confocales se presentan por separado. (**Figura 8D**) Análisis cuantitativo de la cantidad de microglía CD11c⁺ (expresada como porcentaje de células IB4⁺ (marcador de microglía)) se examinaron en todos los tratamientos en todos los puntos temporales. Los resultados son de cuatro experimentos independientes con pozos duplicados o triplicados; las barras representan las medias ± EEM. Los asteriscos encima de las barras indican la importancia de las diferencias relativas a MG₍₋₎ (*P < 0,05; *P < 0,01; ***P < 0,001; prueba t de Student de dos extremos)). Las líneas horizontales con los valores de P sobre ellos mostraron diferencias entre los grupos indicados (ANOVA).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la búsqueda de una futura vacunación a base de células T para el tratamiento de la AMD, las siguientes consideraciones pueden ser relevantes.

En general, se considera que el cerebro, como la retina, es inmunitariamente privilegiado, en el sentido de que la barrera hematoencefálica resiste la deposición pasiva de anticuerpos y reduce la incorporación de linfocitos específicos de antígeno (Streilein y otros, 1992). Paradójicamente, la inmunidad específica de antígeno en realidad podría funcionar para proteger contra las enfermedades degenerativas. Recientemente, se demostró en el modelo de ratón de la enfermedad de Alzheimer que la inmunización con el amiloide anormal, o la administración pasiva de anticuerpos contra la proteína anormal, redujo en gran medida la cantidad de deposición en el cerebro de los ratones modificados genéticamente y mejoró su rendimiento en las pruebas de laboratorio de la memoria y la función cognitiva (por ejemplo, Morgan y otros, 2000). Los mecanismos no están claros, pero pueden estar relacionados con un aumento de la fagocitosis, la neutralización de moléculas tóxicas o la interferencia con la agregación de fibrillas de amiloide. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer, los pacientes pueden ser inmunológicamente tolerantes a amiloide, lo que impide la autoinmunización de protección a la proteína anormalmente procesada y, de este modo, da lugar al desarrollo de la encefalomiелitis autoinmunitaria (Furlan y otros, 2003).

Algunos estudios de nuestro laboratorio durante los últimos años han demostrado que la recuperación de una lesión del CNS depende críticamente de la actividad bien controlada de las células T dirigidas a autoantígenos específicos

del CNS (Moalem y otros, 1999; Yoles y otros, 2001; Kipnis y otros, 2002). Después de migrar al sitio dañado, estas células T autorreactivas regulan evidentemente la microglía de una manera que la vuelven potenciadora de la supervivencia neuronal y la reparación del tejido neural (Butovsky y otros, 2005; Schwartz y otros, 2006; Butovsky y otros, 2001; Shaked y otros, 2005).

Nuestros resultados en el presente documento abogan por la utilización de un antígeno relacionado con la mielina, tal como Cop-1, pero no un péptido A β , como una terapia basada en células T para la AMD. Incluso si algunas de las células T que expresan receptores de células T para péptidos asociados a drusas, tales como A β , migraran hacia el sitio de una lesión del CNS (Monson y otros, 2006), es poco probable que encontraran sus APC pertinentes en él y, por lo tanto, no podrían llegar a activarse localmente.

Por otro lado, la microglía que presenta mielina, con la que las células T específicas para mielina fácilmente pueden mantener un diálogo, es probable que esté presente en los sitios dañados. Los antígenos relacionados con mielina, o antígenos que presentan reacción cruzada débil con la mielina (tales como Cop-1) son, por lo tanto, antígenos de elección probables para la vacunación terapéutica (Avidan y otros, 2004). Las células T activadas por estos antígenos migrarán entonces al CNS y, al encontrarse allí con sus APC pertinentes, se activarán localmente para suministrar las citocinas y factores de crecimiento con el fin de cambiar el fenotipo de la microglía perjudicial (activada por agregado A β ; Butovsky y otros, 2005) a microglía con características de tipo dendrítico. La sinapsis inmunológica resultante entre las células T y la microglía creará entonces un nicho de apoyo para la renovación de las células mediante la promoción de la neurogénesis de la agrupación de células madre adultas (Butovsky y otros, 2006a).

Nuestros resultados indican que las células T constituyen la terapia inmunológica de elección para la AMD. Esto no excluye el beneficio potencial de los anticuerpos como terapia complementaria, tal como se muestra en animales; modelo de la enfermedad de Alzheimer con anticuerpos contra un péptido β (Bard y otros, 2000). Además, las células T pueden funcionar como una minifábrica capaz de producir una variedad de compuestos, incluyendo citocinas y factores neurotróficos (Ziemssen y otros, 2002). Por encima de todo, representan un sistema fisiológico de mantenimiento y reparación que podría ayudar a contrarrestar los estados relacionados con la edad que conducen al envejecimiento cerebral.

En el desarrollo de la terapia inmunológica para la AMD, según la presente invención, tomamos en consideración de este modo las lecciones de enfermedades neurodegenerativas con una patogenicidad similar.

La formación de depósitos extracelulares que comprenden proteína mal plegada es la característica distintiva de numerosas enfermedades neurodegenerativas. La acumulación de amiloide en las drusas y la enfermedad de Alzheimer y la presencia de microglía activada como mediadores de la inflamación en ambos trastornos neurodegenerativos, sugiere una posible vía inflamatoria crónica común en la AMD y la enfermedad de Alzheimer. En el contexto de la enfermedad de Alzheimer hemos demostrado recientemente que el amiloide agregado β (A β) activa la microglía, que adquiere un fenotipo que recuerda al activado por microorganismos. Aunque esta microglía/macrófagos puede actuar como células fagocíticas, su actividad global es citotóxica y difícilmente puede ser tolerada por el cerebro. Como resultado, la microglía activada por A β , en lugar de ayudar al tejido afectado, contribuye al caos. En la presente invención, exploramos una posible terapia en base inmunológica para modular la actividad de la microglía en la enfermedad de Alzheimer y la AMD con el objetivo de mantener su actividad fagocítica, a la vez que se le confiere capacidad para apoyar la supervivencia y la renovación celular.

Tal como se muestra en el presente documento, el agregado A β induce que la microglía se vuelva citotóxica y bloquee la neurogénesis de células progenitoras neuronales (NPC) de roedores adultos. La adición de IL-4, una citocina derivada de células T auxiliares (Th)2, a la microglía activada por A β puede revertir el impedimento, la regulación a la baja de IGF-I, la regulación al alza de TNF- α , y la incapacidad de actuar como APC. Utilizando ratones doblemente transgénicos con la enfermedad de Alzheimer que expresan genes humanos mutantes que codifican la presenilina 1 y la proteína precursora de amiloide quimérica de ratón/humana, mostramos que el cambio del fenotipo de la microglía en APC profesionales que producen IGF-I, que se logra en el presente documento mediante una vacuna basada en células T con copolímero-1, dio como resultado una reducción de la carga de amiloides y la inducción de la supervivencia neuronal y la neurogénesis.

De este modo, la presente invención da a conocer un procedimiento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que comprende provocar que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo de un individuo, en necesidad de las mismas, para de este modo detener o retrasar el progreso de la degeneración macular. Este efecto se puede efectuar mediante diversos autoantígenos y células activadas con citocinas.

Se da a conocer que entre los agentes que pueden hacer que las células T productoras de IL-4 se acumulen en el ojo se incluyen, sin que constituyan limitación:

- (i) copolímero-1, un péptido relacionado con el copolímero-1 o un polipéptido relacionado con el copolímero-1;
- (ii) IL-4;

(iii) células dendríticas, monocitos, células mieloides derivadas de médula ósea o células mononucleares de sangre periférica activadas por IL-4;

(iv) células modificadas genéticamente que producen IL-4;

(v) células mieloides derivadas de médula ósea o células mieloides derivadas de sangre periférica activadas con IL-13 o con hasta 20 ng/ml de IFN- γ ;

(vi) un autoantígeno patógeno asociado con una enfermedad autoinmunitaria específica del ojo mediada por células T;

(vii) un péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de dicho autoantígeno patógeno de (vi) o un péptido obtenido mediante la modificación de dicho péptido, modificación que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos del péptido por residuos de aminoácidos diferentes (en lo sucesivo, "péptido modificado"), siendo aún capaz dicho péptido modificado de reconocer el receptor de células T reconocido por el péptido parental, pero con menos afinidad;

(viii) una secuencia de nucleótidos que codifica un autoantígeno patógeno de (vi) o un péptido o un péptido modificado de (vii);

(ix) células T activadas por un agente de (i), (vi) o (vii); y

(x) cualquier combinación de (i) - (ix).

Se da a conocer que el agente es copolímero-1, un péptido relacionado con el copolímero-1 o un polipéptido relacionado con el copolímero-1.

Tal como se da a conocer en el presente documento, "copolímero-1, un péptido o un polipéptido relacionados con el copolímero-1" se pretende que incluya cualquier péptido o polipéptido que incluyan un copolímero aleatorio que reaccione funcionalmente con MBP y pueda competir con MBP en el MHC de clase II en la presentación de antígenos.

El Cop-1 o un péptido o polipéptido relacionados con Cop-1 está representado por un copolímero aleatorio que comprende una relación adecuada de un aminoácido cargado positivamente, tal como lisina o arginina, en combinación con un aminoácido cargado negativamente (preferentemente en una cantidad menor), tal como ácido glutámico o ácido aspártico, opcionalmente en combinación con un aminoácido neutro no cargado, tal como alanina o glicina, que actúa como un material de carga y, opcionalmente, con un ácido amino adaptado para conferir al copolímero propiedades inmunogénicas, tal como un aminoácido aromático como tirosina o triptófano. Estos copolímeros se dan a conocer, por ejemplo, en el documento WO 00/05250.

Más específicamente, el copolímero-1 o un péptido o polipéptido relacionado con copolímero-1 es un copolímero seleccionado del grupo que comprende copolímeros aleatorios que comprenden un aminoácido seleccionado de cada uno de, como mínimo, tres de los siguientes grupos: (a) lisina y arginina; (b) ácido glutámico y ácido aspártico; (c) alanina y glicina; y (d) tirosina y triptófano. Los aminoácidos pueden ser L- o D-aminoácidos o mezclas de los mismos. La presente invención contempla la utilización de copolímeros que contienen tanto D- como L-aminoácidos, así como copolímeros que comprenden esencialmente L-aminoácidos o D-aminoácidos.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el copolímero contiene cuatro aminoácidos diferentes, cada uno de un grupo diferente de (a) a (d).

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es copolímero-1, compuesto de una mezcla de polipéptidos aleatorios que comprenden esencialmente los aminoácidos ácido L-glutámico (E), L-alanina (A), L-tirosina (Y) y L-lisina (K) en una proporción aproximada de 1,5:4,8:1:3,6, que tiene una carga eléctrica global neta positiva y un peso molecular de, aproximadamente, 2 kDa a, aproximadamente, 40 kDa.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el Cop-1 tiene un peso molecular promedio de, aproximadamente, 2 kDa a, aproximadamente, 20 kDa, más preferentemente de, aproximadamente, 4,7 kDa a, aproximadamente, 13 kDa, aún más preferentemente de, aproximadamente, 4 kDa a, aproximadamente, 8,6 kDa, de, aproximadamente, 5 kDa a 9 kDa, o de, aproximadamente, 6,25 kDa a 8,4 kDa. Tal como se da a conocer en el presente documento, el Cop-1 tiene un peso molecular promedio de, aproximadamente, 13 kDa a, aproximadamente, 20 kDa, más preferentemente de, aproximadamente, 13,5 kDa a, aproximadamente, 18 kDa, con un promedio de, aproximadamente, 15 kDa a, aproximadamente, 16 kDa, preferentemente de 16 kDa. Otros pesos moleculares promedio para Cop-1, inferiores a 40 kDa, quedan también incluidos en la presente invención. El copolímero-1 de dicho intervalo de pesos moleculares se puede preparar por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. No. 5.800.808, el contenido completo de la cual se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. El copolímero-1 puede ser un polipéptido que comprende de, aproximadamente, 15 a, aproximadamente, 100, preferentemente de, aproximadamente, 40 a, aproximadamente, 80, aminoácidos de longitud.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es Cop-1 en forma de su sal de acetato conocida con el nombre genérico de acetato de glatiramer o su nombre comercial Copaxone[®] (una marca comercial de Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Petach Tikva, Israel). Tal como se utiliza en la presente solicitud, los términos "Cop-1", "copolímero-1", "acetato de glatiramer" y "GA" se utilizan indistintamente.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el péptido relacionado con copolímero-1 es un copolímero aleatorio de 4 aminoácidos en el que se hace una o más de las siguientes sustituciones: ácido aspártico por ácido glutámico, glicina por alanina, arginina por lisina y triptófano por tirosina, que se espera que tenga la misma actividad del copolímero.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el péptido o polipéptido relacionado con el Cop-1 es un copolímero de tres aminoácidos diferentes, cada uno de un grupo diferente de tres grupos de los grupos (a) a (d). Estos copolímeros se denominan en el presente documento como terpolímeros. En una realización, el terpolímero contiene tirosina (Y), alanina (A) y lisina (K), designados en lo sucesivo como YAK, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: Y, A y K pueden estar presentes en una fracción molar de, aproximadamente, 0,05-0,250, 0,3-0,6; y 0,1-0,5, respectivamente, más preferentemente, las relaciones molares de Y, A y K son, aproximadamente, 0,10:0,54:0,35, respectivamente. Es posible sustituir la arginina por la lisina, la glicina por la alanina y/o el triptófano por la tirosina.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el terpolímero contiene tirosina (Y), ácido glutámico (E) y lisina (K), designados en lo sucesivo como YEK, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: E, Y y K pueden estar presentes en una fracción molar de, aproximadamente, 0,005-0,300, 0,005-0,250 y 0,3-0,7, respectivamente. Más preferentemente, las relaciones molares de E, Y y K son, aproximadamente, de 0,26:0,16:0,58, respectivamente. Es posible sustituir el ácido aspártico por el ácido glutámico, la arginina por la lisina y/o el triptófano por la tirosina.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el terpolímero contiene lisina (K), ácido glutámico (E) y alanina (A), designados en lo sucesivo como KEA, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: E, A y K pueden estar presentes en una fracción molar de, aproximadamente, 0,005-0,300, 0,005-0,600 y 0,2-0,7, respectivamente. Más preferentemente, las relaciones molares de E, A y K son, aproximadamente, 0,15:0,48:0,36, respectivamente. Es posible sustituir el ácido aspártico por el ácido glutámico, la glicina por alanina y/o la arginina por la lisina.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el terpolímero contiene tirosina (Y), ácido glutámico (E) y alanina (A), designados en lo sucesivo como YEA, en el que la fracción molar media de los aminoácidos puede variar: Y, E y A pueden estar presentes en una fracción molar de, aproximadamente, 0,005-0,250, 0,005-0,300, y 0,005-0,800, respectivamente. Más preferentemente, las relaciones molares de E, A e Y son, aproximadamente, 0,21:0,65:0,14, respectivamente. Es posible sustituir el triptófano por la tirosina, el ácido aspártico por el ácido glutámico y/o la glicina por la alanina.

El peso molecular promedio de los terpolímeros YAK, YEK, KEA y YEA puede variar entre, aproximadamente, 2 kDa y 40 kDa, preferentemente entre, aproximadamente, 3 kDa y 35 kDa, más preferentemente entre, aproximadamente, 5 kDa y 25 kDa.

El copolímero-1 y los péptidos y polipéptidos relacionados se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el procedimiento dado a conocer en la patente de EE.UU. No. 3.849.550. El peso molecular de los copolímeros se puede ajustar durante la síntesis de los polipéptidos o después de haber preparado los copolímeros. Para ajustar el peso molecular durante la síntesis del polipéptido, se ajustan las condiciones de síntesis o las cantidades de aminoácidos de manera que la síntesis se detiene cuando el polipéptido alcanza la longitud aproximada que se desea. Después de la síntesis, los polipéptidos con el peso molecular deseado se pueden obtener mediante cualquier procedimiento de selección de tamaño disponible, tal como la cromatografía de los polipéptidos en una columna de distribución de pesos moleculares o de gel y la recogida de los intervalos de peso molecular deseados. Los copolímeros se pueden también hidrolizar parcialmente para eliminar las especies de peso molecular elevado, por ejemplo, mediante hidrólisis ácida o enzimática, y posteriormente se purifican para eliminar el ácido o las enzimas.

Tal como se da a conocer en el presente documento, los copolímeros con un peso molecular deseado se pueden preparar mediante un procedimiento que incluye la reacción de un polipéptido protegido con ácido bromhídrico para formar un trifluoroacetil-polipéptido que tiene el perfil de peso molecular deseado. La reacción se realiza durante un tiempo y a una temperatura que está predeterminada por una o más reacciones de prueba. Durante la reacción de prueba, se varían el tiempo y la temperatura y se determina el intervalo de peso molecular de un lote dado de polipéptidos de prueba. Las condiciones de prueba que proporcionan el intervalo óptimo de pesos moleculares para ese lote de polipéptidos se utilizan para el lote. De este modo, se puede producir un trifluoroacetil-polipéptido que tiene el perfil de peso molecular deseado mediante un procedimiento, que incluye hacer reaccionar el polipéptido protegido con ácido bromhídrico durante un tiempo y a una temperatura predeterminados por la reacción de prueba. El trifluoroacetil-polipéptido, con el perfil de peso molecular deseado, se trata después adicionalmente con una solución de piperidina acuosa para formar un polipéptido de baja toxicidad que tiene el peso molecular deseado. Tal como se da a conocer en el presente documento, una muestra de prueba de polipéptido protegido de un lote dado se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante, aproximadamente, 10 a 50 horas a una temperatura de aproximadamente 20 a 28°C. Las mejores condiciones para ese lote se determinan mediante la ejecución de varias

reacciones de prueba. Por ejemplo, en una realización, el polipéptido protegido se hace reaccionar con ácido bromhídrico durante, aproximadamente, 17 horas a una temperatura de aproximadamente 26°C.

Dado que se conocen motivos de unión del Cop-1 a moléculas HLA-DR asociadas a MS (Fridkis-Hareli y otros, 1999), se pueden preparar fácilmente polipéptidos derivados de Cop-1 con una secuencia definida y probar su unión a la ranura de unión a péptidos de las moléculas de HLA-DR, tal como se describe en la publicación de Fridkis-Hareli y otros (1999). Ejemplos de estos péptidos son los dados a conocer en los documentos WO 00/05249 y WO 00/05250, e incluyen los péptidos de las SEQ ID NO. 1-32 siguientes.

10 SEQ ID NO: 1 AAAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 2 AEKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 3 AKEYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 4 AKKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 5 AEAYAAAAAAKAAAA
 15 SEQ ID NO: 6 KEAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 7 AEEYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 8 AAELYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 9 EKAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 10 AAKYEAAAAAAKAAAA
 20 SEQ ID NO: 11 AAKYAEAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 12 EAAAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 13 EKKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 14 EAKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 15 AEKYAAAAAAKAAAA
 25 SEQ ID NO: 16 AKEYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 17 AKKYEAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 18 AKKYAEAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 19 AEAYKAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 20 KEAYAAAAAAKAAAA
 30 SEQ ID NO: 21 AEEYKAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 22 AAELYKAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 23 EKAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 24 AAKYEAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 25 AAKYAEAAAAKAAAA
 35 SEQ ID NO: 26 EKKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 27 EAKYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 28 AEYAKAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 29 AEKAYAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 30 EKYAAAAAAKAAAA
 40 SEQ ID NO: 31 AYKAEAAAAAAKAAAA
 SEQ ID NO: 32 AKYAEAAAAAAKAAAA

Se espera que estos péptidos de SEQ ID No.: 1-32 y otros péptidos similares derivados de Cop-1 tengan una actividad similar a Cop-1. Estos péptidos, y otros péptidos similares, también se consideran dentro de la definición de péptidos o polipéptidos relacionados con Cop-1 y su utilización se incluye en la presente invención, así como otros copolímeros de aminoácidos sintéticos, tales como los copolímeros aleatorios de cuatro aminoácidos descritos por Fridkis-Hareli y otros, 2002 (como candidatos para el tratamiento de la esclerosis múltiple), es decir, copolímeros (14-, 35- y 50-meros) que contienen los aminoácidos fenilalanina, ácido glutámico, alanina y lisina (poli FEAK), o tirosina, fenilalanina, alanina y lisina (poli YFAK) y cualquier otro copolímero similar por descubrir que se pueda considerar un antígeno universal, similar a Cop-1.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo es IL-4, preferentemente IL-4 recombinante humano, que se puede administrar por vía nasal.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente son células dendríticas activadas por IL-4, monocitos activados por IL-4, células mieloides derivadas de médula ósea activadas por la IL-4 o células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) activadas por IL-4. A este respecto, la IL-13 tiene el mismo efecto que la IL-4, ya que está bien establecido en el sector de las citocinas que la IL-4 y la IL-13 pueden utilizar un receptor común y comparten muchas acciones, tales como la activación de las células B y la supresión de las células Th-1.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente son células mieloides derivadas de médula ósea o células mieloides derivadas de sangre periférica activadas con IL-13 o con un estrecho intervalo de concentración de IFN-γ, más preferentemente hasta 20 ng/ml de IFN-γ.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es un autoantígeno patógeno de mamífero asociado con una enfermedad del ojo autoinmunitaria específica mediada por células T, tal como, sin que constituyan

limitación, un antígeno patógeno uveitogénico seleccionado entre proteína de unión a retinoide interfotorreceptor (IRBP) de mamíferos, antígeno S (S-Ag) o rodopsina. El antígeno uveitogénico de mamífero es preferentemente una IRBP humana (SEQ ID NO: 33) o una IRBP bovina (SEQ ID NO: 34), un S-Ag humano (SEQ ID NO: 35) o un S-Ag bovino (SEQ ID NO: 36), o rodopsina humana (SEQ ID NO: 37).

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es un péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de dicho autoantígeno patógeno; un péptido obtenido mediante la modificación de dicho péptido, modificación que comprende la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos del péptido por diferentes residuos de aminoácidos (en lo sucesivo, "péptido modificado"), siendo aún dicho péptido modificado capaz de reconocer el receptor de célula T reconocido por el péptido parental, pero con menos afinidad; o una secuencia nucleotídica que codifica dicho autoantígeno patógeno, dicho péptido o dicho péptido modificado.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es: (a) un péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de IRBP bovina (SEQ ID NO: 34); (b) un péptido modificado, tal como se ha definido anteriormente, obtenido por modificación del péptido de (a); o (c) una secuencia de nucleótidos que codifica IRPB humana o bovina, un péptido de (a), o un péptido modificado de (b).

El péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de IRBP bovina (SEQ ID NO: 34) puede ser el péptido R16 (secuencia de 1177-1191 de IRBP), ADGSSWEGVGVVPDV (SEQ ID NO: 38); el péptido PTARSVGAADGSSWEGVGVVPDV (SEQ ID NO: 39); o el péptido HVDDTDLYLTPTARSVGAADGS (SEQ ID NO: 40).

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es: (a) un péptido cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de S-Ag bovina (SEQ ID NO: 36); (b) un péptido modificado, tal como se ha definido anteriormente, obtenido por modificación del péptido de (a); o (c) una secuencia de nucleótidos que codifica S-Ag humana o bovina, un péptido de (a), o un péptido modificado de (b).

El péptido (a) cuya secuencia está comprendida dentro de la secuencia de S-Ag bovina puede ser el péptido G-8 (secuencia 347-354 de S-Ag) de la secuencia TSSEVATE (SEQ ID NO: 41); el péptido M-8 (secuencia 307-314 de S-Ag), DTNLAASST (SEQ ID NO: 42, o los péptidos de las secuencias:

DTNLAASSTIIKEGIDKTV (SEQ ID NO: 43);
VPLLANNRERRGIALDGKIKHE (SEQ ID NO: 44);
TSSEVATEVPFRLMHPQPED (SEQ ID NO: 45);
SLTKTLTLVPLLANNRERRG (SEQ ID NO: 46);
SLTRTLTLLPLLANNRERAG (SEQ ID NO: 47);
KEGIDKTVMGILVSYQIKVKL (SEQ ID NO: 48); y
KEGIDRTVLGILVSYQIKVKL (SEQ ID NO: 49).

El péptido modificado (c) derivado de S-Ag bovino puede ser el análogo de G-8, TSSEAATE (SEQ ID NO: 50) o el análogo de M-8, DTALASST (SEQ ID NO: 51).

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es una secuencia de nucleótidos que codifica un autoantígeno patógeno asociado con una enfermedad autoinmunitaria mediada por células T específica del ojo, o un péptido o un péptido modificado derivado de la misma, tal como se ha definido en el presente documento.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente son células T activadas por copolímero-1, o por un autoantígeno patógeno asociado con una enfermedad autoinmunitaria mediada por células T específica del ojo, un péptido o un péptido modificado derivado del mismo, tal como se define en el presente documento.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente es cualquier combinación de los agentes definidos anteriormente.

Se da a conocer además la utilización de un agente seleccionado entre los agentes definidos en el presente documento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad.

Cuando el agente son células activadas, tal como se ha descrito anteriormente, las células pueden ser preferentemente autólogas o pueden ser de un donante compatible y se administran preferentemente por vía intravenosa.

Tal como se da a conocer en el presente documento, el agente son células T activadas por copolímero-1, que se pueden preparar cerca de la etapa de administración o se pueden establecer bancos de células para almacenar células T sensibilizadas con copolímero-1 para el tratamiento de individuos en un momento posterior, según sea necesario. Las células T autólogas pueden obtenerse del individuo, y las células T alogénicas o semialogénicas se pueden obtener a partir de un banco de células T almacenadas en el que están presentes cada uno de los tipos más

comunes de MHC de clase II. El paciente se trata preferentemente con sus células T autólogas almacenadas, pero si las células T autólogas no están disponibles, entonces se deben utilizar células que comparten una molécula de MHC de tipo II con el paciente, y se espera que estas sean operativas en ese paciente. Las células T se almacenan preferentemente en un estado activado después de la exposición a copolímero-1. Sin embargo, las células T también se pueden almacenar en un estado de reposo y activarse con copolímero-1 una vez que se descongelan y se preparan para su utilización.

Las líneas de células T se preparan de cualquiera de las maneras que son bien conocidas en la técnica. Preferentemente, las líneas celulares del banco se criopreservan. Una vez que se descongelan las células, se cultivan preferentemente antes de la inyección con el fin de eliminar las células no viables. Durante este cultivo, las células T se pueden activar o reactivar utilizando el antígeno copolímero-1 tal como se utilizó en la activación inicial. De manera alternativa, la activación puede lograrse mediante el cultivo en presencia de un mitógeno, tal como fitohemaglutinina (PHA) o concanavalina A (preferentemente la primera). Esto dispondrá a las células en un estado de activación aún más elevado.

Las células mieloides derivadas de médula ósea para su utilización en la presente invención se pueden obtener de sangre periférica o médula ósea autólogas o de donante, y procesarse por técnicas bien conocidas en la materia. El donante debe ser compatible, en particular, un donante compatible en HLA. Una vez obtenidas, las células mieloides pueden cultivarse hasta que se multiplican al nivel necesario para el trasplante en el paciente y posteriormente se activan con la citocina (IL-4, IL-13 o IFN- γ) durante el tiempo necesario para regular al alza la expresión de CD11c. Por ejemplo, la activación con un máximo de 20 ng/ml de IFN- γ puede tardar 2-3 días hasta que se alcanza el pico de expresión CD11c.

En los ejemplos, se describen células de microglía CD11c⁺. La microglía son células inmunitarias del CNS que se derivan de células mieloides progenitoras, que provienen de la médula ósea. Por lo tanto, la microglía son las células residentes del CNS, mientras que las células mieloides derivadas de médula ósea son las células infiltrantes.

Las composiciones/medicamentos farmacéuticos para su utilización según la presente invención pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes aceptables farmacéuticamente/fisiológicamente, dependiendo del agente utilizado. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para el receptor del mismo.

Los procedimientos de administración dados a conocer en el presente documento y las dosis dependerán del agente utilizado e incluyen, sin que constituyan limitación, las rutas parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mucosal, por ejemplo, oral, intranasal, bucal, vaginal, rectal o intraocular, intratecal, tópica e intradérmica, con o sin adyuvante.

La administración puede ser sistémica o local.

La dosificación del agente a administrar será determinada por el médico según el agente, la edad del paciente y el estadio de la enfermedad. Por ejemplo, para el Cop-1 la dosis se puede seleccionar de un intervalo de 1 a 80 mg, preferentemente 20 mg, aunque cualquier otra dosificación adecuada entra dentro del alcance de la presente invención. El tratamiento puede llevarse a cabo mediante la administración de dosis repetidas a intervalos de tiempo adecuados, según la etapa de la enfermedad, la edad y estado del paciente. En una realización, el Cop-1 puede administrarse diariamente. En otra realización preferente, la administración puede hacerse según un régimen adecuado para la inmunización, por ejemplo, al menos una vez a la semana, una vez al mes o, como mínimo, una vez cada 2 o 3 meses, o menos frecuentemente, pero cualquier otro intervalo adecuado entre las inmunizaciones está previsto por la presente invención según el estado del paciente.

Cuando el agente son células modificadas genéticamente que producen IL-4, las células son preferentemente células dendríticas (DC) derivadas de la médula ósea modificadas genéticamente que expresan IL-4, que se pueden obtener como tal se describe en Morita y otros, 2001. Dado que las DC son APC especializadas que migran desde la periferia a los tejidos linfoides, en los que activan y regulan las células T, la modificación genética de las DC para expresar citocinas inmunorreguladoras, tales como IL-4, proporciona una nueva estrategia inmunoterapéutica para el tratamiento de la AMD y otras enfermedades.

La presente invención se ilustrará a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

(i) Animales. Ratones recién nacidos (P0-P1), ratones C57B1/6J consanguíneos machos adultos (8-10 semanas) fueron suministrados por el Centro de Cría de Animales, Instituto de Ciencia Weizmann, Rehovot, Israel.

(ii) Cultivo de células progenitoras neurales. Se obtuvieron secciones coronales (2 mm de espesor) de tejido que contiene la zona subventricular del ventrículo lateral de los cerebros de ratones C57B1/6J adultos. El tejido se picó y después se incubó para la digestión a 37°C, 5% de CO₂ durante 45 min en solución salina equilibrada de Earle que contenía 0,94 mg/ml de papaína (Worthington, Lakewood, Nueva Jersey) y 0,18 mg/ml de L-cisteína y EDTA. Después de centrifugación a 110 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente, el tejido se disoció mecánicamente mediante trituración con pipeta. Las células obtenidas a partir de suspensiones de célula única se sembraron (3.500 células/cm²) en frascos de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences, San Diego, California), en medio de cultivo de células madre/células progenitoras neurales (NPC) [medio de Eagles modificado de Dulbecco (DMEM)/medio F12 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, California) que contiene 2 mM de L-glutamina, 0,6% de glucosa, 9,6 µg/ml de putrescina, 6,3 ng/ml de progesterona, 5,2 ng/ml de selenito de sodio, 0,02 mg/ml de insulina, 0,1 mg/ml de transferrina, 2 µg/ml de heparina (todos de Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel), factor 2 de crecimiento fibroblástico (humano recombinante, 20 ng/ml), y factor de crecimiento epidérmico (humano recombinante, 20 ng/ml; ambos de Peprotech, Rocky Hill, Nueva Jersey)]. Las esferas se pasaron cada 4-6 días y se volvieron a sembrar como células individuales. Se obtuvieron NPC que expresan proteína verde fluorescente (GFP) tal como se ha descrito anteriormente (Pluchino y otros, 2003).

(iii) Cultivo microglial primario. Los cerebros de los ratones recién nacidos (P0-P1) C57B1/6J fueron despojados de sus meninges y picados con tijeras bajo un microscopio de disección (Zeiss, Stemi DV4, Alemania) en medio Leibovitz-15 (Biological Industries, Kibbutz Beit Ha-Emek, Israel). Después de la tripsinización (tripsina al 0,5%, 10 min, 37°C/5% de CO₂), se trituró el tejido. La suspensión de células se lavó en medio de cultivo para las células gliales [DMEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS; Sigma-Aldrich, Rehovot), L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)] y se cultivó a 37°C/5% de CO₂ en frascos de cultivo de tejidos Falcon de 75 cm² (BD Biosciences) recubiertos con poli-D-lisina (PDL) (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Rehovot) en tampón de borato (2,37 g bórax y 1,55 g de ácido bórico en 500 ml de agua estéril, pH 8,4) durante 1 h, después se enjuagaron a fondo con agua estéril destilada en vidrio. La mitad del medio se cambió después de 6 h en cultivo y cada 2º día a partir de entonces, comenzando el 2º día, durante un tiempo de cultivo total de 10-14 días. La microglía se extrajo fuera de los cultivos primarios de células gliales cerebrales (150 rpm, 37°C, 6 h) con rendimiento máximo entre los días 10 y 14, se sembró (10⁵ células/ml) en placas de 24 pocillos pretratadas con PDL (1 ml/pocillo; Corning, Nueva York, Nueva York) y se cultivaron en medio de cultivo para microglía [medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Rehovot) suplementado con 10% de FCS, L-glutamina (1 mM), piruvato de sodio (1 mM), β-mercaptoetanol (50 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml)]. Se dejó que las células se adhirieran a la superficie de un matraz de cultivo recubierto de PDL (30 min, 37°C/5% CO₂) y las células no adherentes se enjuagaron.

(iv) Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Anticuerpos primarios:

Isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* (IB-4; 1:50; Sigma-Aldrich, Rehovot); anticuerpos de isoformas C-terminales anti-β-tubulina (anti-βIII-T) de ratón (1:500; Chemicon, Temecula, California), anti-CD11b de rata (MAC1; 1:50; BD Pharmingen, Franklin Lakes, Nueva Jersey), anti-CD11c de hámster (1:100; eBioscience, San Diego, California), anticuerpos anti-MHC-II de rata (clon IBL-5/22; 1:50), anti-Aβ de ratón (residuos humanos de aminoácidos 1-17; clon 6E10; Chemicon), anti-BrdU de rata (1:200; Oxford Biotechnology, Kidlington, Oxfordshire, Reino Unido), antidoblecortina de cabra (anti-DCX) (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), proteína nuclear antineuronal de ratón (NeuN; 1:200; Chemicon), anticuerpos anti-IGF-I de cabra (1:20; R&D Systems), anticuerpos anti-TNF-α de cabra (1:100; R&D Systems), anticuerpos policlonales anti-CD3 de conejo (1:100; DakoCytomation, California). Anticuerpos secundarios: anticuerpo anti-cabra conjugado con FITC de burro, anti-ratón conjugado con Cy-3 de burro, y anti-rata conjugado con Cy-3 o Cy-5 de burro, anti-hámster conjugado con biotina y anticuerpo con estreptavidina conjugado con Cy-3 o Cy-5 (todos de Jackson ImmunoResearch).

Se lavaron cubreobjetos de cultivos conjuntos de NPC y microglía de ratón con PBS, se fijaron tal como se ha descrito anteriormente, se trataron con una solución de permeabilización/bloqueo que contenía el 10% de FCS, el 2% de albúmina de suero bovino, el 1% de glicina, y el 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Rehovot) y se tiñeron con una combinación de anticuerpos de isoformas C-terminales de anti-β-tubulina (anti-βIII-T) de ratón (1:500; Chemicon, Temecula, California), anti-CD11b de rata (MAC1; 1:50; BD-Pharmingen, Franklin Lakes, Nueva Jersey) y anti-CD11c de hámster (1:100; eBioscience, San Diego, California). Para capturar la microglía se utilizó isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada con FITC o Cy3 (IB-4; 1:50; Sigma-Aldrich, Rehovot). Para detectar la expresión de Aβ humano se utilizó anti-Aβ (residuos de aminoácidos humanos 1-17) (ratón, clon 6E10; Chemicon).

Para la tinción de BrdU, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron en HCl 2 N a 37°C durante 30 min. Las secciones se bloquearon durante 1 h con solución de bloqueo [PBS que contenía el 20% de suero normal de caballo y 0,1% de Triton X-100, o PBS que contenía reactivo de bloqueo de inmunoglobulina de ratón obtenido de Vector Laboratories (Burlingame, California)].

Para la inmunohistoquímica, las secciones de tejido se trataron con una solución de permeabilización/bloqueo que contenía el 10% de FCS, el 2% de albúmina de suero bovino, el 1% de glicina, y el 0,05% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis). Las secciones de tejido se tiñeron durante la noche a 4°C con combinaciones específicas

- de los siguientes anticuerpos primarios: anti-BrdU de rata (1:200; Oxford Biotechnology, Kidlington, Oxfordshire, Reino Unido), anti-doblecortina de cabra (anti-DCX) (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), y la proteína nuclear anti-neuronal de ratón (anti-NeuN) (1:200; Chemicon). Los anticuerpos secundarios fueron anti-cabra conjugado con FITC de burro, anti-ratón conjugado con Cy-3 de burro, y anti-rata conjugado con Cy-3 o Cy-5 de burro (1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania). Se utilizó IB-4 CD11b (MAC1; 1:50; BD-Pharmingen) o conjugado con FITC para el etiquetado de la microglía. Se utilizaron anticuerpos anti-MHC-II (rata, clon IBL 5/22; 1:50) para detectar la expresión de proteínas MHC-II de la superficie celular. Para detectar la expresión de CD11c se utilizó anti-CD11c de hámster (1:100; eBioscience, San Diego, California). Se utilizó Anti-A β (residuos humanos de aminoácidos 1-17) (ratón, clon 6E10; Chemicon) para detectar la expresión de A β humano.
- La expresión de IGF-I se detectó mediante anticuerpos anti-IGF-I de cabra (1:20; R&D Systems). La expresión de TNF- α se detectó mediante anticuerpos anti-TNF α de cabra (1:100; R&D Systems). Las células T se detectaron con anticuerpos policlonales anti-CD3 (conejo, 1:100; DakoCytomation, California). Se utilizó yoduro de propidio (1 μ g/ml; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, California), para la tinción nuclear.
- Se utilizaron secciones de control (no tratadas con el anticuerpo primario) para distinguir la tinción específica de la tinción de anticuerpos no específicos o componentes autofluorescentes. A continuación, las secciones se lavaron con PBS y los cubreobjetos se cubrieron con alcohol de polivinilo con diazabicio-octano como agente protector de la fluorescencia.
- (v) Ratones transgénicos.** Diecinueve ratones adultos doblemente transgénicos APP_{K59SN, M596L} + PS1 _{Δ E9} de la cepa B6C3-Tg (APP_{swe}, PSEN1 Δ E9) 85Dbo/J (Borchelt y otros, 1997) fueron adquiridos del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine) y se criaron y mantuvieron en el Centro de Cría de Animales del Instituto de Ciencia Weizmann. Todos los animales se manipularon de acuerdo con las regulaciones formuladas por el Comité de Cuidado y Utilización de Animales del Instituto Weizmann y todos los experimentos y los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Utilización de Animales del Instituto Weizmann.
- (vi) Genotipado.** Todos los ratones utilizados en este experimento se genotiparon para detectar la presencia de los transgenes mediante PCR tal como se ha descrito previamente (Jankowsky y otros, 2004).
- (vii) Reactivos.** Se obtuvieron IFN- γ e IL-4 recombinantes de ratón de R&D Systems (Minneapolis, Minnesota). Se adquirió el péptido amiloide β [fragmento 1-40 (A β ₁₋₄₀)] de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri. El péptido A β se disolvió en agua sin endotoxina, y se formaron los agregados A β por incubación de A β , tal como se ha descrito (Butovsky y otros, 2005).
- (viii) Vacunación con copolímero-1.** Cada ratón se inyectó por vía subcutánea cinco veces con un total de 100 μ g de alto peso molecular (TV-5010 DS, del lote no. 486220205; Teva Pharmaceutical Industries, Petach Tikva, Israel) emulsionados en 200 μ l de PBS, desde el día experimental 0 hasta el día 24, dos veces durante la primera semana y una vez por semana a partir de entonces.
- (ix) Pruebas de comportamiento.** Se evaluó el aprendizaje/memoria espacial mediante el rendimiento en una tarea de aprendizaje visual/espacial dependiente del hipocampo en el laberinto de agua de Morris (MWM) y se llevó a cabo tal como se ha descrito (Lichtenwalner y otros, 2001).
- (x) Administración de la 5-bromo-2'-desoxiuridina y preparación del tejido.** Se disolvió el marcador de proliferación celular 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) mediante sonicación en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se inyectó por vía intraperitoneal (ip) en cada ratón (50 mg/kg peso corporal; 1,25 mg de BrdU en 200 μ l de PBS). A partir del día experimental 22 después de la primera vacunación con Cop-1, se inyectó BrdU por vía intraperitoneal dos veces al día, cada 12 h durante 2,5 días, para marcar las células proliferantes. Tres semanas después de la primera inyección de BrdU los ratones fueron profundamente anestesiados y se les practicó una perfusión transcardíaca, primero con PBS y después con 4% de paraformaldehído. Se retiró el cerebro completo, se fijó posteriormente durante la noche, y después se equilibró en sacarosa al 30% tamponada con fosfato. Se recogieron secciones de 30 μ m de flotación libre en un micrótopo de congelación (Leica SM2000R) y se almacenaron a 4°C antes de la inmunohistoquímica.
- (xi) Cultivo conjunto de células progenitoras neurales y microglía.** Los cultivos de microglía tratados o no tratados se lavaron dos veces con medio de diferenciación de NPC fresco (igual que el medio de cultivo para los NPC pero sin factores de crecimiento, a excepción de 0,02 mg/ml de insulina y con el 2,5% de FCS) para eliminar todos los rastros de los reactivos ensayados, a continuación se incubaron en hielo durante 15 min y se agitaron a 350 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. La microglía se retiró de los frascos y se cultivó de inmediato conjuntamente (5 x 10⁴ células/pocillo) con NPC (5 x 10⁴ células/pocillo) durante 10 días sobre cubreobjetos revestidos con Matrigel® (BD Biosciences) en placas de 24 pocillos, en presencia de medio de diferenciación de NPC. Los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 2,5% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se tiñeron para los marcadores neuronales y gliales.

(xii) Procedimiento de cuantificación y recuento estereológico. Se utilizó un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss LSM 510 (aumento x40) para el análisis microscópico. Para los experimentos *in vitro* se analizaron campos de 0,053 mm² (n= 8-16 de, como mínimo, dos cubreobjetos diferentes) para cada grupo experimental. Para cada marcador, se tomaron muestras de 500-1.000 células. Se contaron las células que coexpresan GFP y β III-T.

Para los experimentos *in vivo*, se contaron los números de placas A β y microglía CD11b⁺ en el hipocampo a intervalos de 300 μ m en 6-8 secciones coronales (30 μ m) de cada ratón. La neurogénesis en el giro dentado se evaluó por recuento de neuronas premaduras (DCX⁺), células en proliferación (BrdU⁺) y neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) en seis secciones coronales (a 370 μ m de distancia) por cerebro de ratón. Para obtener una estimación del número total de células marcadas por giro dentado, se multiplicó el número total de células contadas en secciones coronales seleccionadas de cada cerebro por el índice de volumen (la relación entre el volumen del giro dentado y el volumen total combinado de las secciones seleccionadas). La especificidad de la expresión conjunta de BrdU⁺/NeuN⁺ se analizó utilizando el microscopio confocal (LSM 510) en secciones ópticas a intervalos de 1 μ m. La cuantificación de células CD3⁺, CD11b⁺ y CD11c⁺ se analizó de 30-50 placas A β de cada ratón a ensayo en este estudio. Se evaluaron los recuentos de células, el número de placas A β , las áreas de placa y la intensidad de la tinción de NeuN por unidad de superficie en el giro dentado de forma automática utilizando el software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Carlsbad, California).

(xiii) Análisis estadístico. Las puntuaciones de comportamiento MWM se analizaron mediante ANOVA de 3 vías. El grupo de tratamiento y el bloque de ensayo se utilizaron como fuentes de variación para evaluar la significación de las diferencias entre las puntuaciones promedio durante bloques de ensayo de adquisición en el MWM. Cuando el valor P obtenido fue significativo, se llevó a cabo el test de comparaciones múltiples de la diferencia significativa mínima de Fisher (LSD) para determinar qué grupos fueron significativamente diferentes.

Los resultados *in vitro* se analizaron por la prueba t de Student de dos extremos para datos independientes y por el test de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples (ANOVA) y se expresan como medias $\pm$ EEM. Los resultados *in vivo* se analizaron por la prueba t de Student de dos extremos para datos independientes o ANOVA de 1 vía y se expresan como medias $\pm$ EEM.

Ejemplo 1. El amiloide agregado β induce a la microglía a expresar un fenotipo que bloquea la neurogénesis y el bloqueo es contrarrestado por IL-4.

Los descubrimientos anteriores *in vitro* de nuestro laboratorio han sugerido que la microglía que se encuentra en asociación con enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (por ejemplo, microglía activada por LPS o agregado A β ₍₁₋₄₀₎) tiene un deterioro en la capacidad para presentar antígenos, mientras que la microglía activada por IL-4, que ha demostrado estar asociada con la supervivencia del tejido neural, expresa MHC-II, produce IGF-I y disminuye la expresión de TNF- α (Butovsky y otros, 2005). En el presente documento examinamos en primer lugar si la microglía activada por A β bloquea la neurogénesis y, si es así, si las citocinas derivadas de células T pueden contrarrestar el efecto inhibitor. Para este fin, cultivamos conjuntamente células madre/progenitoras neurales (NPC) que expresan proteína verde fluorescente (GFP) con microglía que había sido preincubada durante 48 h en su medio de crecimiento óptimo (Butovsky y otros, 2005) en presencia o ausencia del péptido agregado A β 1-40 (A β ₍₁₋₄₀₎; 5 μ M) y, posteriormente, tratada durante 48 h adicionales con IFN- γ (10 ng/ml) o IL-4 (10 ng/ml) o IL-4 junto con IFN- γ (10 ng/ml). La elección de A β ₍₁₋₄₀₎ en lugar de A β ₍₁₋₄₂₎ y su concentración se basan en nuestra demostración anterior de que este compuesto induce la actividad citotóxica en microglía (Butovsky y otros, 2005). A continuación, se lavaron los medios de cultivo y residuos de citocinas de la microglía cultivada conjuntamente, y cada una de las preparaciones microgliales tratadas se cultivó conjuntamente con esferas NPC derivadas de la zona subventricular disociada de adultos (Butovsky y otros, 2006a) sobre cubreobjetos recubiertos con Matrigel[®] en presencia de medio de diferenciación (Butovsky y otros, 2006a) (**figura 1A**). La expresión de GFP por parte de las NPC confirmó que todas las neuronas diferenciadas en los cultivos procedían de las NPC y no de la contaminación del cultivo microglial primario. Después de 10 días, pudimos distinguir algunas NPC positivas a GFP que expresan el marcador neuronal β III-T en cultivos sin microglía (control). En cultivos conjuntos de NPC con microglía activada previamente por incubación con IFN- γ (10 ng/ml; MG_(IFN- γ)) se observó un aumento considerable en el número de células GFP⁺/ β III-T⁺. Por el contrario, la microglía activada por A β ₍₁₋₄₀₎ (MG_(A β 1-40)) bloqueó la neurogénesis y disminuyó el número de NPC. La adición de IFN- γ a la microglía activada por A β (MG_(A β 1-40/IFN- γ)), no fue capaz de revertir su efecto negativo sobre la neurogénesis. En contraste, la adición de IL-4 (10 ng/ml) a microglía tratada previamente con agregado A β ₍₁₋₄₀₎ (MG_(A β 1-40/IL-4)) contrarrestó parcialmente el efecto adverso del agregado A β en la supervivencia y la diferenciación de las NPC, con el resultado de que esta microglía pudo inducir a las NPC a diferenciarse en neuronas. Sin embargo, cuando se añadió IFN- γ en combinación con IL-4 (MG_(A β 1-40/IFN- γ +IL-4)), su efecto para contrarrestar la actividad negativa de la microglía activada por A β en la supervivencia y la diferenciación de las NPC era más fuerte que el efecto de IL-4 por sí solo (**figura 1B**). Hemos comprobado que en todos los casos las células β III-T⁺ también expresan GFP (**figura 1C**). Este descubrimiento es particularmente interesante en vista de nuestra demostración anterior de que el orden en el que los estímulos amenazantes se presentan a la microglía afecta críticamente a la capacidad de estas células para soportarlos (Butovsky y otros, 2005). El análisis cuantitativo presentado en la **figura 1D** resume los datos mostrados en la **figura 1B** y, además, muestra que la diferenciación en

presencia de microglía no tratada sólo se produjo en una pequeña medida. En particular, no se observaron células β III-T⁺ en microglía cultivada sin NPC (Butovsky y otros, 2006a).

Ejemplo 2. La vacunación basada en células T con copolímero-1 modula la actividad inmunitaria de la microglía, elimina la formación de placa amiloide β e induce la neurogénesis.

Los resultados anteriores nos llevaron a examinar si una vacunación basada en células T alteraría el fenotipo microglial por defecto en la enfermedad de Alzheimer y, por lo tanto, daría lugar a la eliminación de placa y la neurogénesis. El antígeno que elegimos para la vacunación fue Cop-1 (Teitelbaum y otros, 1996), que nosotros mostramos que presentaba débilmente reacción cruzada con una amplia variedad de autoantígenos del CNS y, en función del régimen, era neuroprotector en condiciones de neurodegeneración tanto aguda como crónica (Kipnis y otros, 2000; Schori y otros, 2001; Angelov y otros, 2003). Examinamos el efecto de Cop-1 en ratones Tg-AD afectados por un deterioro de aprendizaje/memoria y una acumulación de placas agregadas A β depositadas principalmente en la corteza y el hipocampo, los dos rasgos característicos de la enfermedad de Alzheimer familiar de aparición temprana (Borchelt y otros, 1997). El régimen de administración de Cop-1 fue similar al utilizado para suscitar la neuroprotección en un modelo de elevación crónica de la presión intraocular (Bakalash y otros, 2005).

Verificamos la presencia de ambos transgenes en cada ratón mediante amplificación por PCR del ADN genómico. A continuación, ratones Tg-AD de, aproximadamente, 8 meses de edad se vacunaron por vía subcutánea con Cop-1 (n = 6), dos veces durante la primera semana y una vez a la semana a partir de entonces. Ratones Tg-AD no tratados (n = 7) y compañeros de camada sin Tg emparejados por edad (n = 6) sirvieron, respectivamente, como controles Tg no tratados y de tipo salvaje. Siete semanas después de la primera inyección de Cop-1 todos los ratones fueron sacrificados y analizados. La tinción de criosecciones de cerebro de los ratones Tg-AD con anticuerpos específicos a β humano reveló numerosas placas en los ratones Tg-AD no tratados, pero muy pocas en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 2A**). No se observaron placas en sus respectivos compañeros de camada sin Tg (**figura 2A**).

Los resultados anteriores, junto con los descubrimientos *in vitro*, nos llevaron a buscar cambios en las características de la microglía en los ratones Tg-AD vacunados. Se encontró que las placas en los ratones Tg-AD no tratados estaban asociadas con la aparición abundante de microglía CD11b⁺ (**figura 2A** y **figura 2B**) que expresa TNF- α (**figura 2C**). Menos microglía CD11b⁺ fue detectable en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 2A**). Es importante tener en cuenta que la microglía CD11b⁺ en los ratones Tg-AD no tratados mostró relativamente pocos procesos ramificados (**figura 2C**). La tinción con anticuerpos anti-MHC-II reveló que en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 la mayor parte de la microglía adyacente a las placas A β residuales expresaban MHC-II, y casi ninguno de ellos expresó TNF- α (**figura 2D**), mientras que en los ratones Tg-AD no tratados casi ninguna microglía expresaba MHC-II (**figura 2E**), lo que sugiere que su capacidad de actuar como APC es limitada. Todas las células MHC-II⁺ se etiquetaron conjuntamente con IB-4 (datos no mostrados), verificando su identificación como microglía. La morfología de tipo dendrítica (**figura 2D**) de la microglía MHC-II⁺ que se observaba en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 nos animó a examinar si expresaban el marcador característico de las células dendríticas, es decir, CD11c. Sólo en raras ocasiones se había encontrado microglía CD11c⁺ en ratones Tg-AD no tratados en asociación con placas A β ⁺, mientras que las placas A β residuales teñidas observadas en los ratones vacunados con Cop-1 estaban rodeadas por microglía MHC-II⁺/CD11c⁺ (**figura 2E**). Cabe destacar que esta microglía CD11c⁺ también se tiñó positivamente para CD11b (**figura 3A**); además, estaba cargada de A β , indicativo de su atrapamiento en este péptido (**figura 2E**). El análisis cuantitativo reveló que el número de células CD11b⁺ asociadas con placas A β disminuyó significativamente en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 3B**) y que, como resultado de la vacunación, el 87% del CD11b⁺ se convirtió en células CD11b⁺/CD11c⁺ en relación al 25% en los ratones Tg-AD no tratados (**figura 3C**).

En vista de nuestro reciente descubrimiento de que la microglía MHC-II⁺ (que está activada por IL-4) expresa abundantemente IGF-I (Butovsky y otros, 2005; Butovsky y otros, 2006a; b), hemos examinado la expresión de IGF-I en los ratones Tg-AD vacunados. De hecho, se descubrió que la microglía MHC-II⁺ en estos ratones expresaba IGF-I (**figura 2F**). La tinción para detectar la presencia de células T, identificadas por anticuerpos anti-CD3, reveló que, a diferencia de los ratones Tg-AD no tratados, en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 había numerosas células T asociadas con placas A β (**figura 2G**). Por otra parte, se descubrió que la mayoría de las células T en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 se encontraban cerca de microglía MHC-II⁺. Cualquier inmunoreactividad a A β detectada en aquellos ratones parece estar asociada con la microglía MHC-II⁺, lo que sugiere la presencia de una sinapsis inmunitaria entre esta microglía y las células T CD3⁺ (**figura 2H**). El análisis cuantitativo confirmó la presencia de una cantidad significativamente menor de placas en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 que en los ratones Tg-AD no tratados (**figura 2I**), y demostró que el área ocupada por las placas fue significativamente menor en los ratones Tg-AD vacunados que en sus homólogos no tratados de edad similar (**figura 2J**). Además, se observó significativamente menos microglía CD11b⁺ (**figura 2K**) y significativamente más células T asociadas con placas A β en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 que en los correspondientes grupos de ratones Tg-AD no tratados (**figura 2L**).

Sobre la base de nuestros resultados anteriores, sospechamos que el cambio de un fenotipo microglial CD11b⁺/CD11c⁻/IGF-1⁻ a uno CD11b⁺/CD11c⁺/IGF-1⁺ en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 podría ser atribuible a la IL-4. Examinamos esta posibilidad *in vitro*. La tinción de cultivos de microglía de 5 días con el marcador de CD11c mostró que CD11c no se expresó en absoluto en la no tratada, pero se expresó abundantemente en microglía activada por IL-4 (**figura 4A**). Por otra parte, la IL-4, aunque sólo se añadiera 3 días después de que la microglía se expusiera a Aβ, fue capaz de inducir la expresión de CD11c (**figura 4B**). La activación diferencial de la microglía también se reflejó en diferencias morfológicas: la microglía activada por Aβ exhibió una morfología ameboide, mientras que la forma redondeada de la microglía CD11c⁺ recordaba a las células dendríticas (**figura 4B**). Lo más importante, la morfología ameboide de la microglía Aβ teñida fue reversible con la adición de IL-4, cuando de nuevo tomó la apariencia morfológica de las células de tipo dendríticas (**figura 4B**). Los diversos tratamientos aplicados a la microglía no afectaron a su expresión de CD11b, lo que sugiere que no pierden sus características CD11b cuando toman la expresión de CD11c (**figura 4B**). El análisis cuantitativo de la expresión de CD11c, evaluada mediante el número de células CD11c⁺ y la intensidad de su coloración como una función del tiempo en cultivo, reveló que pronto después de la siembra (día 0) la microglía no tratada expresó niveles bajos de CD11c, que desaparecieron gradualmente (**figura 4C**). En contraste, la expresión de CD11c inducida por IL-4 no fue transitoria. La cuantificación de la capacidad de la IL-4 para inducir la expresión de CD11c incluso después de que la microglía se tratara previamente con Aβ se muestra en la **figura 4D**.

La correlación entre el fenotipo que se encontró que estaba inducido por la vacunación con Cop-1 y el efecto de IL-4 en microglía *in vitro* nos llevó a examinar la capacidad de la microglía activada por IL-4 para fagocitar agregado Aβ₍₁₋₄₀₎. La comparación cuantitativa (por tinción intracelular) de Aβ inmunorreactivo engullido por microglía tratada y no tratada con IL-4 indica que IL-4 no interfiere con la capacidad de microglía para engullir Aβ (**figura 5**).

Los efectos de la IL-4 sobre la expresión de CD11c, MHC-II, y TNF-α observados nos llevó a examinar si los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 mostrarían una mayor neurogénesis *in vivo*. Tres semanas antes de la escisión de tejido, todos los ratones habían sido inyectados con el marcador BrdU de células en proliferación, haciendo posible la detección de nuevas neuronas. El análisis cuantitativo de secciones adicionales de las mismas áreas del giro dentado del hipocampo reveló un número significativamente mayor de células BrdU⁺ en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 6A**) que en sus homólogos Tg no tratados. Además, en comparación con el número de neuronas maduras recién formadas (BrdU⁺/NeuN⁺) en sus respectivos compañeros de camada no Tg, los números fueron significativamente inferiores en el grupo Tg-AD no tratado, pero fueron similares en el grupo Tg-AD vacunado con Cop-1; lo que indica que la capacidad de neurogénesis había sido, como mínimo, parcialmente restaurada mediante la vacunación con Cop-1 (**figura 6B**). El análisis de secciones correspondientes para DCX, un marcador útil para analizar el número absoluto de neuronas prematuras recién generadas en el giro dentado adulto (Rao y otros, 2004), reveló que, en relación con compañeros de camada no Tg, hubo significativamente menos células DCX⁺ en el giro dentado de ratones Tg-AD no tratados, y ligera pero significativamente más en el giro dentado de los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 6C**). Las micrografías confocales ilustran las diferencias en el número de células BrdU⁺/NeuN⁺, y en el número de células DCX⁺ y sus procesos dendríticos, entre compañeros de camada no Tg, los ratones Tg-AD no tratados y los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 (**figura 6D**). Los resultados mostraron que la neurogénesis era de hecho significativamente más abundante en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 que en los ratones Tg-AD no tratados. Curiosamente, sin embargo, tanto en ratones Tg-AD no tratados como en los vacunados con Cop-1, los procesos de las neuronas teñidas con DCX en la zona subgranular del giro dentado eran cortos, excepto en los de los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1, en los que las células DCX⁺ se encontraban adyacentes a la microglía MHC-II⁺ (**figura 6E**).

Discusión

Mostramos en el presente documento que la vacunación de los ratones Tg-AD con Cop-1 redujo la formación de placas y atenuó el deterioro cognitivo. El marcaje de microglía activada con anticuerpos anti-CD11b reveló que la tinción fue intensa en los ratones Tg-AD no tratados y significativamente menos intensa en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 emparejados por edad. La disminución en el número de microglía CD11b⁺ en ratones vacunados con Cop-1 podría ser el resultado de una reducción de placas Aβ, cuya deposición en el cerebro había conducido inicialmente a la activación de la microglía.

El papel de la microglía en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas se ha investigado intensamente durante los últimos años, con resultados aparentemente contradictorios (Streit, 2004). La detección de cierta cantidad de microglía CD11b⁺ en ratones mayores de tipo salvaje sanos es coherente con el aumento relacionado con la edad descrito en la microglía activada en el cerebro humano normal (Streit, 2004). Es posible que esta microglía sea la que contribuye tanto a la pérdida cognitiva relacionada con la edad como a la neurogénesis deteriorada (Monje y otros, 2003). Se ha encontrado también CD11b en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Akiyama y McGeer, 1990). Aunque esta microglía es fagocítica (Frenkel y otros, 2005), al parecer no es lo suficientemente eficiente para combatir los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, y en la línea de nuestro estudio, la microglía derivada de médula ósea de ratones de tipo salvaje emparejados puede eliminar eficazmente las placas (Simard y otros, 2006). Esta microglía expresa niveles más elevados de proteína que los que son necesarios para la presentación del antígeno y, por lo tanto, podrían ser fagocitos más eficaces que la microglía

residente. Sobre la base de nuestros resultados actuales, sugerimos que la microglía, que es necesaria para apoyar el mantenimiento del cerebro y luchar contra la enfermedad de Alzheimer, son células de tipo dendrítico (CD11b⁺/CD11c⁺). La microglía CD11c⁺ podría entablar un diálogo con las células T que puede ayudar a combatir las condiciones adversas mediante la promoción de la amortiguación del exceso de Aβ y el apoyo tanto a la supervivencia neuronal (Butovsky y otros, 2005) como a la renovación neural (Butovsky y otros, 2006b). En vista de nuestra anterior conclusión de que la IL-4, pero no el IFN-γ, puede alterar el fenotipo de una microglía comprometida con Aβ (Butovsky y otros, 2005), parece probable que la microglía MHC-II⁺ que se encontraba adyacente a las placas Aβ en el presente estudio se activara por la IL-4. Esta probabilidad se ve apoyada por dos de los descubrimientos *in vitro* del presente estudio: en primer lugar, que la obstrucción de la neurogénesis inducida por Aβ fue parcialmente contrarrestada por la IL-4, ya sea sola o en combinación con el IFN-γ, pero no por el IFN-γ solo; y en segundo lugar, que la microglía MHC-II⁺/CD11c⁺ que se ve en las proximidades de las placas Aβ residuales en los ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 también expresó IGF-I. Tomados en conjunto, estos descubrimientos refuerzan el argumento de que los términos "beneficiosa" y "perjudicial" no se pueden aplicar de manera generalizada a la actividad microglial (Schwartz y otros, 2006).

La IL-4 ha sido descrita a menudo como una citocina antiinflamatoria (Chao y otros, 1993). Nuestros resultados apuntan fuertemente en contra de esta percepción y sugieren que, en cambio, la IL-4 activa la microglía para adoptar un fenotipo que parece adquirir una morfología diferente y una actividad diferente de las de la microglía innata activada o de la microglía activada observada de forma habitual en la enfermedad de Alzheimer o en la MS. En esta última enfermedad, a diferencia de la enfermedad de Alzheimer, la microglía parece estar sobrepasada por una avalancha de inmunidad adaptativa (Butovsky y otros, 2006a). Curiosamente, parece que la IL-4 es capaz de restaurar un fenotipo activado favorable, incluso después de que la microglía ya haya expuesto características fenotípicas de agregados Aβ ((Butovsky y otros, 2005), y el presente estudio) o haya sido sobrepasada por IFN-γ (Butovsky y otros, 2006a). Otro descubrimiento interesante es que los LPS y Aβ muestran patrones similares de activación de MAPK en la microglía (Pyo y otros, 1998). La IL-4 puede atenuar una vía MAPK activada por LPS, un efecto evidentemente asociado con la actividad de la fosfatasa de serina/treonina (Iribarren y otros, 2003). Este último fenómeno podría de hecho servir como un mecanismo molecular subyacente al presente descubrimiento de que la IL-4 atenúa el efecto perjudicial de la microglía activada por Aβ. En consecuencia, sugerimos que la actividad de la IL-4 no debe ser considerada como antiinflamatoria, sino como inmunomoduladora.

Basándonos en los descubrimientos *in vitro* en relación con el efecto de la IL-4 en el fenotipo microglial y la capacidad del régimen elegido en el presente estudio para suscitar una respuesta de células T con un sesgo de IL-4, sugerimos que el efecto beneficioso observado de la vacunación con Cop-1 en los ratones Tg-AD en este estudio fue el resultado del efecto suscitado de las células T en su fenotipo microglial.

Ejemplo 3. La vacunación con copolímero-1 contrarresta el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer.

Dos semanas antes del final del experimento, se evaluó la actividad cognitiva de todos los ratones en un laberinto de agua de Morris (MWM), tal como se refleja por su rendimiento en una tarea de aprendizaje/memoria espacial dependiente del hipocampo. El rendimiento MWM de los ratones Tg-AD no tratados fue significativamente peor, en promedio, que el de sus compañeros de camada no Tg emparejados por edad (**figuras 7A-7B**). Sin embargo, el rendimiento de ratones Tg-AD vacunados con Cop-1 fue superior al de los ratones Tg-AD no tratados y no difirió significativamente del de los ratones no Tg-AD, lo que sugiere que la vacunación con Cop-1 había impedido una mayor pérdida cognitiva. Las diferencias en el rendimiento cognitivo se manifiestan tanto en la adquisición (**figura 7A**) como en las tareas de inversión (**figura 7B**).

Los ratones vacunados en este estudio mostraron una pérdida cognitiva atenuada (evaluada en un laberinto de agua de Morris) y un aumento de la neurogénesis. Estos dos aspectos de la plasticidad del hipocampo están aparentemente relacionados con la presencia de IGF-I y la actividad cognitiva y la renovación celular (Butovsky y otros, 2006a; b). Las observaciones documentadas en los ratones Tg-AD alojados en un ambiente enriquecido sostienen también un vínculo entre los mecanismos asociados con la neurogénesis (Ziv y otros, 2006) y con la reducción de la placa (Lazarov y otros, 2005).

Debido a que, evidentemente, el agregado Aβ interfiere con la capacidad de la microglía para entablar un diálogo con las células T, se puede prever que su presencia en el cerebro provocará la pérdida de la capacidad cognitiva y el deterioro de la neurogénesis. En estos casos, la migración de las células T autorreactivas del CNS al sitio de la enfermedad o el daño es crítica, pero sólo será eficaz si esas células T pueden neutralizar la actividad destructiva del agregado Aβ. Tal como se muestra en el presente documento, el IFN-γ por sí solo es impotente frente a la actividad de la microglía que ya está comprometida con un fenotipo agregado Aβ, pero es eficaz cuando se añade junto con la IL-4. De este modo, los resultados de este estudio sugieren fuertemente que la existencia de la neurogénesis en el hipocampo adulto depende de una actividad inmunitaria local bien controlada asociada con la producción microglial de factores de crecimiento tales como el IGF-I y el BDNF (Ziv y otros, 2006). En línea con esta idea está el descubrimiento descrito de que la neurogénesis se ve afectada en los animales tratados con LPS (Monje

y otros, 2003), han mostrado su capacidad de dificultar la producción microglial del IGF-I e inducir la secreción microglial de TNF- α (Butovsky y otros, 2005).

Ejemplo 4. Células mieloides activadas por IFN- γ y sus aplicaciones para la promoción de la reparación de tejidos, la detección de un tejido dañado y la administración de fármacos al mismo.

Hemos demostrado que, cuando se añadió IFN- γ en combinación con IL-4, su efecto para contrarrestar la actividad negativa de la microglía activada por A β en la supervivencia y la diferenciación de NPC era más fuerte que el efecto de la IL-4 por sí sola (**figura 1B**). Sin embargo, nuestros datos demuestran que el IFN- γ solo, de manera similar a la IL-4 pero de forma transitoria, induce CD11c si las células se tratan con IFN- γ en un estrecho intervalo de concentraciones de hasta 20 ng/ml, induce neuroprotección (Butovsky y otros, 2005) y puede apoyar la neurogénesis de células madre/progenitoras neurales (Butovsky y otros, 2006b). La CD11c se regula al alza y alcanza el pico 2-3 días después de la activación por el IFN- γ en la microglía (**figuras 8A-8D**) o en células mieloides derivadas de médula ósea (datos no mostrados). De este modo, la regulación al alza de CD11c en células mieloides derivadas de médula ósea por IFN- γ permitirá que las células alcancen los sitios lesionados e induzcan el efecto beneficioso.

Ejemplo 5. Vacunación semanal con Copaxone como terapia potencial para la degeneración macular seca relacionada con la edad

Los resultados de los ejemplos anteriores mostraron que la vacunación de ratones Tg-AD con Cop-1, en un régimen que se ha determinado previamente que da lugar a neuroprotección, dio como resultado un cambio en el fenotipo microglial de CD11b⁺ a CD11b⁺/CD11c⁺, y que esto se correlacionó con la eliminación de placas, la neurogénesis y la pérdida cognitiva atenuada. El efecto beneficioso se atribuyó a un cambio de fenotipo de la microglía infiltrante, así como a la captación de monocitos de transmisión sanguínea.

Sobre la base de estos resultados y de las muchas características comunes entre la enfermedad de Alzheimer y la AMD, planteamos la hipótesis de que en la AMD, de forma similar a la enfermedad de Alzheimer, el tratamiento semanal con Cop-1 daría lugar probablemente a la eliminación de las drusas y esto, posteriormente, podía frenar la progresión de la AMD seca a húmeda. Debe hacerse hincapié en que el Cop-1 administrado en diferentes regímenes da como resultado diferentes terapias; el tratamiento diario no tiene efectos beneficiosos en paradigmas de enfermedades neurodegenerativas, pero es eficaz en la supresión de enfermedades inflamatorias en pacientes, tal como la esclerosis múltiple. Por lo tanto, decidimos iniciar un ensayo clínico con pacientes con AMD en un protocolo de administración semanal.

El destino natural de las drusas en nuestra población de pacientes fue examinado por análisis de fotografías del fondo de ojo de los pacientes con AMD seca no inscritos y no tratados. Estos pacientes conformaron un grupo de observación.

El efecto del Cop-1 (Copaxone®, Teva) en las drusas se examinó durante un estudio comparativo, prospectivo, piloto, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. Se inscribieron pacientes mayores de 50 años de edad con AMD seca intermedia en ambos ojos.

Los pacientes reclutados fueron tratados al azar (relación de 2 a 1) ya sea con inyecciones subcutáneas de Copaxone (20 mg) o con inyecciones de placebo semanalmente durante un período de 12 semanas. Se realizó un examen ocular completo, junto con la fotografía del fondo, al inicio, y en visitas a las 6 y a las 12 semanas. El resultado primario fue el cambio en el área total de drusas y se calculó utilizando el software Image-Pro. El análisis de los pacientes del grupo de observación (17 ojos) mostró un incremento del 25,2% del área total de drusas.

A las 12 semanas, 8 ojos tratados con Copaxone mostraron una reducción de la superficie total de drusas respecto al valor basal del 53,6% (intervalo, 5-89%). Dos ojos que recibieron inyecciones de placebo, mostraron un descenso del 0,6% de la superficie total de drusas.

Por lo tanto, este estudio muestra un efecto beneficioso potencial del Copaxone para el tratamiento de la AMD. Debido al limitado número de los pacientes que participaron, no se puede extraer ninguna conclusión estadística significativa. Sin embargo, los resultados justifican y alientan el extender y continuar este estudio para combatir las drusas. A la luz de los mecanismos subyacentes del tratamiento semanal con Copaxone en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas, su efecto sobre la AMD podría ir más allá de la eliminación de las drusas en la protección de las neuronas y la promoción de la reparación.

REFERENCIAS

Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, GM., Cooper, NR, Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, BL., Finch, CE, Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M. y otros, Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21, 383-421 (2000).

- Akiyama, H. y McGeer, P. L. Brain microglia constitutively express beta-2 integrins. *J Neuroimmunol* 30, 81-93 (1990).
- Ambati, J. y otros, An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat Med* 9, 1390-7 (2003).
- Angelov, D. N., Waibel, S., Guntinas-Lichius, O., Lenzen, M., Neiss, W. F., Tomov, T. L., Yoles, E., Kipnis, J., Schori, H., Reuter, A., Ludolph A., and Schwartz, M. Therapeutic vaccine for acute and chronic motor neuron diseases: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4790-5 (2003).
- Avidan, H., Kipnis, J., Butovsky, O., Caspi, R. R. y Schwartz, M. Vaccination with autoantigen protects against aggregated beta-amyloid and glutamate toxicity by controlling microglia: effect of CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 34, 3434-45 (2004).
- Bakalash, S., Shlomo, G. B., Aloni, E., Shaked, I., Wheeler, L., Ofri, R. y Schwartz, M. T cell-based vaccination for morphological and functional neuroprotection in a rat model of chronically elevated intraocular pressure. *J Mol Med* 83, 904-16 (2005).
- Bakalash, S., Kessler, A., Mizrahi, T., Nussenblatt, R. y Schwartz, M. Antigenic specificity of immunoprotective therapeutic vaccination for glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3374-81 (2003).
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K. y otros, Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6, 916-9 (2000).
- Barouch, R. y Schwartz, M. Autoreactive T cells induce neurotrophin production by immune and neural cells in injured rat optic nerve: implications for protective autoimmunity. *Faseb J* 16, 1304-6 (2002).
- Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. y Sisodia, S. S. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice co-expressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19, 939-45 (1997).
- Butovsky, O., M. Koronyo-Hamaoui, G. Kunis, E. Ophir, G. Landa, H. Cohen y M. Schwartz. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor-1. 24 de Julio 2006 [publicación electrónica adelantada] (2006a)
- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A. E., Pluchino, S., Martino, G. y Schwartz, M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 31, 149-60 (2006b).
- Butovsky, O., Landa, G., Kunis, G., Ziv, Y., Avidan, H., Greenberg, N., Schwartz, A., Smirnov, I., Pollack, A., Jung, S. y Schwartz, M. Induction and blockage of oligodendrogenesis by differently activated microglia in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116: 905-15 (2006c).
- Butovsky, O., Talpalar, A. E., Ben-Yaakov, K. y Schwartz, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 29, 381-93 (2005).
- Butovsky, O., Hauben, E. y Schwartz, M. Morphological aspects of spinal cord autoimmune neuroprotection: colocalization of T cells with B7-2 (CD86) and prevention of cyst formation. *Faseb J.* 15, 1065-7 (2001).
- Chao, C. C., Molitor, T. W. y Hu, S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J Immunol* 151, 1473-81 (1993).
- Frenkel, D., Maron, R., Burt, D. S. y Weiner, H. L. Nasal vaccination with a proteosome-based adjuvant and glatiramer acetate clears beta-amyloid in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 115, 2423-2433 (2005).
- Furlan, R. y otros, Vaccination with amyloid-beta peptide induces autoimmune encephalomyelitis in C57/BL6 mice. *Brain* 126, 285-91 (2003).
- Gupta, N., Brown, K. E. y Milam, A. H. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76, 463-71 (2003).
- Hageman, G. S. y Mullins, R. F. Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Mol Vis* 5, 28 (1999).

- Hageman, G. S. y otros, An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20, 705-32 (2001).
- 5 Hardy, J. y Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-6 (2002).
- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S. y Mattson, M. P. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's. *J Neurochem* 83, 1509-24 (2002).
- 10 Holz, F. G. y otros, Bilateral macular drusen in age-related macular degeneration. Prognosis and risk factors. *Ophthalmology* 101, 1522-8 (1994).
- 15 Iribarren, P, Cui, Y. H., Le, Y., Ying, G., Zhang, X., Gong, W. y Wang, J. M. *J Immunol* 171, 5482-8 (2003).
- Jankowsky, J. L., Fadale, D. J., Anderson, J., Xu, G. M., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Lee, M. K., Younkin, L. H., Wagner, S. L. y otros, Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet* 13, 159-70 (2004).
- 20 Jin, K, Galvan, V., Xie, L., Mao, X. O., Gorostiza, O. F., Bredesen, D. E. y Greenberg, D. A. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPSw,Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 13363-7 (2004a).
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C. y Greenberg, D. A. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 343-7 (2004b).
- 25 Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, W., Misgeld, T., Klinkert, W. E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R. L., Bartke, I. y otros, Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865-70 (1999).
- 30 Kipnis, J. y Schwartz, M. Dual action of glatiramer acetate (Cop-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends Mol Med* 8, 319-23 (2002).
- 35 Kipnis, J., Avidan, H., Caspi, R. R. y Schwartz, M. Dual effect of CD4+CD25+ regulatory T cells in neurodegeneration: Pro- and anti-inflammatory cytokines determine microglial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 Suppl 2, 14663-14669 (2004a).
- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y. y Schwartz, M. (2004b) *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8180-5.
- 40 Kipnis, J., Mizrahi, T., Hauben, E., Shaked, I., Shevach, E. y Schwartz, M. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15620-5 (2002).
- 45 Kipnis, J., Yoles, E., Porat, Z., Cohen, A., Mor, F., Sela, M., Cohen, I. R. y Schwartz, M. T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7446-51 (2000).
- 50 Klaver, C. C. y otros, Is age-related maculopathy associated with Alzheimer's Disease? The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 150, 963-8 (1999).
- Klein R., Klein B. E., Linton K. L. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99: 933-43 (1992).
- 55 Kliffen, M., de Jong, P. T. y Luiders, TM. Protein analysis of human maculae in relation to age-related maculopathy. *Lab Invest* 73, 267-72 (1995).
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M., Hersch, L. B., Sapolsky, R. M., Mimics, K. y Sisodia, S. S. *Cell* 120, 701-13 (2005).
- 60 Lichtenwalner, R. J., Forbes, M. E., Bennett, S. A., Lynch, C. D., Sonntag, W. E. y Riddle, D. R. (2001) *Neuroscience* 107, 603-13.
- 65 Luebl, V. y otros, Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. *J Clin Invest* 116, 378-85 (2006).

- Mitchell P., Smith W., Attebo K., Wang J. J. Prevalence of age-related maculopathy in Australia. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 102: 1450-60 (1995).
- 5 Mizrahi, T., Hauben, E y Schwartz, M. The tissue-specific self-pathogen is the protective self-antigen: the case of uveitis. *J. Immunol.* 169, 5971-7 (2002).
- Moalem, G. y otros Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J. Autoimmun.* 15, 331-45 (2000).
- 10 Moalem, G, Leibowitz-Amit, R., Yoles, E., Mor, F., Cohen, I. R. y Schwartz, M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat. Med.* 5, 49-55 (1999).
- Monje, M. L., Toda, H. y Palmer, T. D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760-5 (2003).
- 15 Monsonego, A., Imitola, J., Petrovic, S., Zota, V., Nemirovsky, A., Baron, R., Fisher, Y., Owens, T. y Weiner, H. L. A{beta}-induced meningoencephalitis is IFN- γ -dependent and is associated with T cell-dependent clearance of A{beta} in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 5048-53 (2006).
- 20 Morgan, D. y otros, A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982-5 (2000).
- 25 Morita Y., Yang J., Gupta R., Shimizu K., Shelden E. A., Endres J., Mulé J. J., McDonagh K. T., Fox D. A. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 107(10): 1275-84.(2001)
- Mullins, R. F., Russell, S. R., Anderson, D. H. y Hageman, G. S. Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *Faseb J* 14, 835-46 (2000).
- 30 Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. y Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-8 (2005).
- 35 Penfold, P. L., Madigan, M. C. y Provis, J. M. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci* 7, 383-8(1991).
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A. y otros, Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422, 688-94 (2003).
- 40 Provis, J. M. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20, 799-821 (2001).
- Pyo, H., Jou, I., Jung, S., Hong, S. y Joe, E H *Neuroreport* 9, 871-4 (1998). Rao, M. S. y Shetty, A. K. *Eur JNeurosci* 19, 234-46 (2004).
- 45 Roque, R. S., Rosales, A. A., Jingjing, L., Agarwal, N. y Al-Ubaidi, M. R. Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res* 836, 110-9(1999).
- 50 Schori, H., Kipnis, J., Yoles, E., WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wheeler, L. A. y Schwartz, M. Vaccination for protection of retinal ganglion cells against death from glutamate cytotoxicity and ocular hypertension: implications for glaucoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3398-403 (2001).
- Schwartz, M., Butovsky, O., Bruck, W. y Hanisch, U. K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29, 68-74 (2006).
- 55 Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487-98(1991).
- Shaked, I., Porat, Z., Gersner, R., Kipnis, J. y Schwartz, M. Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *J Neuroimmunol* 146, 84-93 (2004).
- 60 Shaked, I., Tchoresh, D., Gersner, R., Meiri, G., Mordechai, S., Xiao, X., Hart, R. P. y Schwartz, M. Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92, 997-1009 (2005).
- 65

Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P. y Rivest, S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49, 489-502 (2006).

Streilein, J. W., Wilbanks, G. A. y Cousins, S. W. Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J Neuroimmunol* 39, 185-200 (1992).

Streit, W. J. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res* 77, 1-8 (2004).

Teitelbaum, D., Fridkis-Hareli, M., Arnon, R. y Sela, M. *J Neuroimmunol* 64,209-17 (1996).

Yin, Y. y otros Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J. Neurosci.* 23, 2284-93 (2003).

Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, I. R., Weiner, H. y Schwartz, M. Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *JNeurosci* 21, 3740-8 (2001).

Yoshida, T. y otros, The potential role of amyloid beta in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 115, 2793-800 (2005).

Ziemssen, T., Kumpfel, T., Klinkert, W. E., Neuhaus, O. y Hohlfeld, R. Glatiramer acetate-specific T auxiliares 1- and 2-type cell lines produce BDNF: Implication for multiple sclerosis therapy. *Brain-derived neurotropic factor. Brain* 125, 2381-91 (2002).

Ziv, Y, Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J. y Schwartz, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* 9, 268-75 (2006).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD

Eisenbach-schwartz, Michal

Butovsky, oleg

<120> PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO DE LA DEGENERACIÓN MACULAR RELACIONADA CON LA EDAD

<130> R1078 EP S3

<140> EP 07 76 6829.1

<141> 2007-06-28

<150> US 60/806,041

<151> 2006-06-28

<160> 51

<170> Patente Internacional versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 1

Ala Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 2.

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 2

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 3

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 4

Ala Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 5

Ala Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 6

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 7

Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 8

Ala Ala Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 9

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 10

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 11

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 12

Glu Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 13

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 14

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 15

Ala Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 16

Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 17

Ala Lys Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 18

Ala Lys Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 19

Ala Glu Ala Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 20

Lys Glu Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 21

Ala Glu Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 22

Ala Ala Glu Tyr Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 23

Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 24

Ala Ala Lys Tyr Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 25

Ala Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 26

Glu Lys Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 27

Glu Ala Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 28

Ala Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 29

Ala Glu Lys Ala Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 30

Glu Lys Tyr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 31

Ala Tyr Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 32

Ala Lys Tyr Ala Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

<210> 33

<211> 1247

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Met Met Arg Glu Trp Val Leu Leu Met Ser Val Leu Leu Cys Gly Leu
1 5 10 15

Ala Gly Pro Thr His Leu Phe Gln Pro Ser Leu Val Leu Asp Met Ala
20 25 30

Lys Val Leu Leu Asp Asn Tyr Cys Phe Pro Glu Asn Leu Gly Met
35 40 45

Gln Glu Ala Ile Gln Gln Ala Ile Lys Ser His Glu Ile Leu Ser Ile
50 55 60

Ser Asp Pro Gln Thr Leu Ala Ser Val Leu Thr Ala Gly Val Gln Ser
65 70 75 80

Ser Leu Asn Asp Pro Arg Leu Val Ile Ser Tyr Glu Pro Ser Thr Pro
85 90 95

Glu Pro Pro Pro Gln Val Pro Ala Leu Thr Ser Leu Ser Glu Glu Glu
100 105 110

Leu Leu Ala Trp Leu Gln Arg Gly Leu Arg His Glu Val Leu Gly Gly
115 120 125

Asn Val Gly Tyr Leu Arg Val Asp Ser Val Pro Gly Gln Glu Val Leu
130 135 140

Ser Met Met Gly Glu Phe Leu Val Ala His Val Trp Gly Asn Leu Met
145 150 155 160

Gly Thr Ser Ala Leu Val Leu Asp Leu Arg His Cys Thr Gly Gly Gln
165 170 175

Val Ser Gly Ile Pro Tyr Ile Ile Ser Tyr Leu His Pro Gly Asn Thr

180										185										190									
Ile	Leu	His	Val	Asp	Thr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr														
		195					200					205																	
Glu	Ile	Trp	Thr	Leu	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ala	Asp														
	210					215					220																		
Lys	Asp	Val	Val	Val	Leu	Thr	Ser	Ser	Gln	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Glu														
225					230					235					240														
Asp	Ile	Ala	His	Ile	Leu	Lys	Gln	Met	Arg	Arg	Ala	Ile	Val	Val	Gly														
				245					250					255															
Glu	Arg	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Arg	Lys	Leu	Arg	Ile	Gly														
			260					265					270																
Glu	Ser	Asp	Phe	Phe	Phe	Thr	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Gly	Pro														
		275					280					285																	
Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Thr	Trp	Glu	Gly	Ser	Gly	Val	Leu	Pro	Cys														
	290					295					300																		
Val	Gly	Thr	Pro	Ala	Glu	Gln	Ala	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Ala	Ile	Leu														
305					310					315					320														
Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Val	Val	His	Cys	Leu	Gln	Glu	Val														
				325					330					335															
Leu	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Leu	Val	Asp	Arg	Val	Pro	Thr	Leu	Leu	Gln														
			340					345					350																
His	Leu	Ala	Ser	Met	Asp	Phe	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu														
		355					360					365																	
Val	Thr	Lys	Leu	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Glu	Asp	Pro	Arg														
	370					375					380																		
Leu	Leu	Val	Arg	Ala	Ile	Gly	Pro	Thr	Glu	Thr	Pro	Ser	Trp	Pro	Ala														
385					390				395					400															
Pro	Asp	Ala	Ala	Ala	Glu	Asp	Ser	Pro	Gly	Val	Ala	Pro	Glu	Leu	Pro														
				405					410					415															
Glu	Asp	Glu	Ala	Ile	Arg	Gln	Ala	Leu	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Gln	Val														
			420					425					430																
Ser	Val	Leu	Pro	Gly	Asn	Val	Gly	Tyr	Leu	Arg	Phe	Asp	Ser	Phe	Ala														
		435					440					445																	
Asp	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Val	Leu	Ala	Pro	Tyr	Val	Leu	Arg	Gln	Val														
	450				455						460																		

Trp Glu Pro Leu Gln Asp Thr Glu His Leu Ile Met Asp Leu Arg His
 465 470 475 480
 Asn Pro Gly Gly Pro Ser Ser Ala Val Pro Leu Leu Leu Ser Tyr Phe
 485 490 495
 Gln Gly Pro Glu Ala Gly Pro Val His Leu Phe Thr Thr Tyr Asp Arg
 500 505 510
 Arg Thr Asn Ile Thr Gln Glu His Phe Ser His Met Glu Leu Pro Gly
 515 520 525
 Pro Arg Tyr Ser Thr Gln Arg Gly Val Tyr Leu Leu Thr Ser His Arg
 530 535 540
 Thr Ala Thr Ala Ala Glu Glu Phe Ala Phe Leu Met Gln Ser Leu Gly
 545 550 555 560
 Trp Ala Thr Leu Val Gly Glu Ile Thr Ala Gly Asn Leu Leu His Thr
 565 570 575
 Arg Thr Val Pro Leu Leu Asp Thr Pro Glu Gly Ser Leu Ala Leu Thr
 580 585 590
 Val Pro Val Leu Thr Phe Ile Asp Asn His Gly Glu Ala Trp Leu Gly
 595 600 605
 Gly Gly Val Val Pro Asp Ala Ile Val Leu Ala Glu Glu Ala Leu Asp
 610 615 620
 Lys Ala Gln Glu Val Leu Glu Phe His Gln Ser Leu Gly Ala Leu Val
 625 630 635 640
 Glu Gly Thr Gly His Leu Leu Glu Ala His Tyr Ala Arg Pro Glu Val
 645 650 655
 Val Gly Gln Thr Ser Ala Leu Leu Arg Ala Lys Leu Ala Gln Gly Ala
 660 665 670
 Tyr Arg Thr Ala Val Asp Leu Glu Ser Leu Ala Ser Gln Leu Thr Ala
 675 680 685
 Asp Leu Gln Glu Val Ser Gly Asp His Arg Leu Leu Val Phe His Ser
 690 695 700
 Pro Gly Glu Leu Val Val Glu Glu Ala Pro Pro Pro Pro Ala Val
 705 710 715 720
 Pro Ser Pro Glu Glu Leu Thr Tyr Leu Ile Glu Ala Leu Phe Lys Thr
 725 730 735

Glu Val Leu Pro Gly Gln Leu Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Ala Met Ala
 740 745 750
 Glu Leu Glu Thr Val Lys Ala Val Gly Pro Gln Leu Val Arg Leu Val
 755 760 765
 Trp Gln Gln Leu Val Asp Thr Ala Ala Leu Val Ile Asp Leu Arg Tyr
 770 775 780
 Asn Pro Gly Ser Tyr Ser Thr Ala Ile Pro Leu Leu Cys Ser Tyr Phe
 785 790 795 800
 Phe Glu Ala Glu Pro Arg Gln His Leu Tyr Ser Val Phe Asp Arg Ala
 805 810 815
 Thr Ser Lys Val Thr Glu Val Trp Thr Leu Pro Gln Val Ala Gly Gln
 820 825 830
 Arg Tyr Gly Ser His Lys Asp Leu Tyr Ile Leu Met Ser His Thr Ser
 835 840 845
 Gly Ser Ala Ala Glu Ala Phe Ala His Thr Met Gln Asp Leu Gln Arg
 850 855 860
 Ala Thr Val Ile Gly Glu Pro Thr Ala Gly Gly Ala Leu Ser Val Gly
 865 870 875 880
 Ile Tyr Gln Val Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Ala Ser Met Pro Thr Gln
 885 890 895
 Met Ala Met Ser Ala Thr Thr Gly Lys Ala Trp Asp Leu Ala Gly Val
 900 905 910
 Glu Pro Asp Ile Thr Val Pro Met Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ala Gln
 915 920 925
 Asp Ile Val Ala Leu Arg Ala Lys Val Pro Thr Val Leu Gln Thr Ala
 930 935 940
 Gly Lys Leu Val Ala Asp Asn Tyr Ala Ser Ala Glu Leu Gly Ala Lys
 945 950 955 960
 Met Ala Thr Lys Leu Ser Gly Leu Gln Ser Arg Tyr Ser Arg Val Thr
 965 970 975
 Ser Glu Val Ala Leu Ala Glu Ile Leu Gly Ala Asp Leu Gln Met Leu
 980 985 990
 Ser Gly Asp Pro His Leu Lys Ala Ala His Ile Pro Glu Asn Ala Lys
 995 1000 1005

Asp Arg Ile Pro Gly Ile Val Pro Met Gln Ile Pro Ser Pro Glu
 1010 1015 1020
 Val Phe Glu Glu Leu Ile Lys Phe Ser Phe His Thr Asn Val Leu
 1025 1030 1035
 Glu Asp Asn Ile Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Met Phe Gly Asp Gly
 1040 1045 1050
 Glu Leu Leu Thr Gln Val Ser Arg Leu Leu Val Glu His Ile Trp
 1055 1060 1065
 Lys Lys Ile Met His Thr Asp Ala Met Ile Ile Asp Met Arg Phe
 1070 1075 1080
 Asn Ile Gly Gly Pro Thr Ser Ser Ile Pro Ile Leu Cys Ser Tyr
 1085 1090 1095
 Phe Phe Asp Glu Gly Pro Pro Val Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Ser
 1100 1105 1110
 Arg Pro Asp Asp Ser Val Ser Glu Leu Trp Thr His Ala Gln Val
 1115 1120 1125
 Val Gly Glu Arg Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Met Val Ile Leu Thr
 1130 1135 1140
 Ser Ser Val Thr Ala Gly Thr Ala Glu Glu Phe Thr Tyr Ile Met
 1145 1150 1155
 Lys Arg Leu Gly Arg Ala Leu Val Ile Gly Glu Val Thr Ser Gly
 1160 1165 1170
 Gly Cys Gln Pro Pro Gln Thr Tyr His Val Asp Asp Thr Asn Leu
 1175 1180 1185
 Tyr Leu Thr Ile Pro Thr Ala Arg Ser Val Gly Ala Ser Asp Gly
 1190 1195 1200
 Ser Ser Trp Glu Gly Val Gly Val Thr Pro His Val Val Val Pro
 1205 1210 1215
 Ala Glu Glu Ala Leu Ala Arg Ala Lys Glu Met Leu Gln His Asn
 1220 1225 1230
 Gln Leu Arg Val Lys Arg Ser Pro Gly Leu Gln Asp His Leu
 1235 1240 1245

<210> 34

<211> 551

<212> PRT

<213> BosTaurus

<400> 34

Val Leu Pro Gly Gln Leu Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Ala Met Ala Glu
 1 5 10 15
 Leu Glu Thr Val Lys Ala Val Gly Pro Gln Leu Val Gln Leu Val Trp
 20 25 30
 Gln Lys Leu Val Asp Thr Ala Ala Leu Val Val Asp Leu Arg Tyr Asn
 35 40 45
 Pro Gly Ser Tyr Ser Thr Ala Val Pro Leu Leu Cys Ser Tyr Phe Phe
 50 55 60
 Glu Ala Glu Pro Arg Arg His Leu Tyr Ser Val Phe Asp Arg Ala Thr
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Thr Glu Val Trp Thr Leu Pro His Val Thr Gly Gln Arg
 85 90 95
 Tyr Gly Ser His Lys Asp Leu Tyr Val Leu Val Ser His Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Ala Ala Glu Ala Phe Ala His Thr Met Gln Asp Leu Gln Arg Ala
 115 120 125
 Thr Ile Ile Gly Glu Pro Thr Ala Gly Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile
 130 135 140
 Tyr Gln Val Gly Ser Ser Ala Leu Tyr Ala Ser Met Pro Thr Gln Met
 145 150 155 160
 Ala Met Ser Ala Ser Thr Gly Glu Ala Trp Asp Leu Ala Gly Val Glu
 165 170 175
 Pro Asp Ile Thr Val Pro Met Ser Val Ala Leu Ser Thr Ala Arg Asp
 180 185 190
 Ile Val Thr Leu Arg Ala Lys Val Pro Thr Val Leu Gln Thr Ala Gly
 195 200 205
 Lys Leu Val Ala Asp Asn Tyr Ala Ser Pro Glu Leu Gly Val Lys Met
 210 215 220
 Ala Ala Glu Leu Ser Gly Leu Gln Ser Arg Tyr Ala Arg Val Thr Ser
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Leu Ala Glu Leu Leu Gln Ala Asp Leu Gln Val Leu Ser
 245 250 255
 Gly Asp Pro His Leu Lys Thr Ala His Ile Pro Glu Asp Ala Lys Asp
 260 265 270

Arg Ile Pro Gly Ile Val Pro Met Gln Ile Pro Ser Pro Glu Val Phe
 275 280 285
 Glu Asp Leu Ile Lys Phe Ser Phe His Thr Asn Val Leu Glu Gly Asn
 290 295 300
 Val Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Met Phe Gly Asp Cys Glu Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Gln Val Ser Glu Leu Leu Val Glu His Val Trp Lys Lys Ile Val His
 325 330 335
 Thr Asp Ala Leu Ile Val Asp Met Arg Phe Asn Ile Gly Gly Pro Thr
 340 345 350
 Ser Ser Ile Ser Ala Leu Cys Ser Tyr Phe Phe Asp Glu Gly Pro Pro
 355 360 365
 Ile Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Asn Arg Pro Asn Asp Ser Val Ser Glu
 370 375 380
 Leu Trp Thr Leu Ser Gln Leu Glu Gly Glu Arg Tyr Gly Ser Lys Lys
 385 390 395 400
 Ser Met Val Ile Leu Thr Ser Thr Leu Thr Ala Gly Ala Ala Glu Glu
 405 410 415
 Phe Thr Tyr Ile Met Lys Arg Leu Gly Arg Ala Leu Val Ile Gly Glu
 420 425 430
 Val Thr Ser Gly Gly Cys Gln Pro Pro Gln Thr Tyr His Val Asp Asp
 435 440 445
 Thr Asp Leu Tyr Leu Thr Ile Pro Thr Ala Arg Ser Val Gly Ala Ala
 450 455 460
 Asp Gly Ser Ser Trp Glu Gly Val Gly Val Val Pro Asp Val Ala Val
 465 470 475 480
 Pro Ala Glu Ala Ala Leu Thr Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln His Thr
 485 490 495
 Pro Leu Arg Ala Arg Arg Ser Pro Arg Leu His Gly Arg Arg Lys Gly
 500 505 510
 His Gln Gln Gln Ser Gln Gly Arg Ala Gly Ser Leu Gly Arg Asn Gln
 515 520 525
 Gly Val Val Arg Pro Glu Val Leu Thr Glu Ala Pro Ser Gly Gln Lys
 530 535 540

Arg Gly Leu Leu Gln Cys Gly
545 550

<210> 35
<211> 405
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Met Ala Ala Ser Gly Lys Thr Ser Lys Ser Glu Pro Asn His Val Ile
1 5 10 15

Phe Lys Lys Ile Ser Arg Asp Lys Ser Val Thr Ile Tyr Leu Gly Asn
20 25 30

Arg Asp Tyr Ile Asp His Val Ser Gln Val Gln Pro Val Asp Gly Val
35 40 45

Val Leu Val Asp Pro Asp Leu Val Lys Gly Lys Lys Val Tyr Val Thr
50 55 60

Leu Thr Cys Ala Phe Arg Tyr Gly Gln Glu Asp Ile Asp Val Ile Gly
65 70 75 80

Leu Thr Phe Arg Arg Asp Leu Tyr Phe Ser Arg Val Gln Val Tyr Pro
85 90 95

Pro Val Gly Ala Ala Ser Thr Pro Thr Lys Leu Gln Glu Ser Leu Leu
100 105 110

Lys Lys Leu Gly Ser Asn Thr Tyr Pro Phe Leu Leu Thr Phe Pro Asp
115 120 125

Tyr Leu Pro Cys Ser Val Met Leu Gln Pro Ala Pro Gln Asp Ser Gly
130 135 140

Lys Ser Cys Gly Val Asp Phe Glu Val Lys Ala Phe Ala Thr Asp Ser
145 150 155 160

Thr Asp Ala Glu Glu Asp Lys Ile Pro Lys Lys Ser Ser Val Arg Leu
165 170 175

Leu Ile Arg Lys Val Gln His Ala Pro Leu Glu Met Gly Pro Gln Pro
180 185 190

Arg Ala Glu Ala Ala Trp Gln Phe Phe Met Ser Asp Lys Pro Leu His
195 200 205

Leu Ala Val Ser Leu Asn Lys Glu Ile Tyr Phe His Gly Glu Pro Ile
210 215 220

Pro Val Thr Val Thr Val Thr Asn Asn Thr Glu Lys Thr Val Lys Lys
225 230 235 240

ES 2 605 154 T3

Ile Lys Ala Phe Val Glu Gln Val Ala Asn Val Val Leu Tyr Ser Ser
245 250 255

Asp Tyr Tyr Val Lys Pro Val Ala Met Glu Glu Ala Gln Glu Lys Val
260 265 270

Pro Pro Asn Ser Thr Leu Thr Lys Thr Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu
275 280 285

Ala Asn Asn Arg Glu Arg Arg Gly Ile Ala Leu Asp Gly Lys Ile Lys
290 295 300

His Glu Asp Thr Asn Leu Ala Ser Ser Thr Ile Ile Lys Glu Gly Ile
305 310 315 320

Asp Arg Thr Val Leu Gly Ile Leu Val Ser Tyr Gln Ile Lys Val Lys
325 330 335

Leu Thr Val Ser Gly Phe Leu Gly Glu Leu Thr Ser Ser Glu Val Ala
340 345 350

Thr Glu Val Pro Phe Arg Leu Met His Pro Gln Pro Glu Asp Pro Ala
355 360 365

Lys Glu Ser Tyr Gln Asp Ala Asn Leu Val Phe Glu Glu Phe Ala Arg
370 375 380

His Asn Leu Lys Asp Ala Gly Glu Ala Glu Glu Gly Lys Arg Asp Lys
385 390 395 400

Asn Asp Val Asp Glu
405

<210> 36
<211> 404
<212> PRT
<213> BosTaurus

<400> 36

Met Lys Ala Asn Lys Pro Ala Pro Asn His Val Ile Phe Lys Lys Ile
1 5 10 15

Ser Arg Asp Lys Ser Val Thr Ile Tyr Leu Gly Lys Arg Asp Tyr Ile
20 25 30

Asp His Val Glu Arg Val Glu Pro Val Asp Gly Val Val Leu Val Asp
35 40 45

Pro Glu Leu Val Lys Gly Lys Arg Val Tyr Val Ser Leu Thr Cys Ala
50 55 60

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

ES 2 605 154 T3

340 345 350
 Phe Arg Leu Met His Pro Gln Pro Glu Asp Pro Asp Thr Ala Lys Glu
 355 360 365
 Ser Phe Gln Asp Glu Asn Phe Val Phe Glu Glu Phe Ala Arg Gln Asn
 370 375 380
 Leu Lys Asp Ala Gly Glu Tyr Lys Glu Glu Lys Thr Asp Gln Glu Ala
 385 390 395 400
 Ala Met Asp Glu

<210> 37
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

Arg Tyr Ile Pro Glu Gly Leu Gln Cys Ser Cys Gly Ile Asp Tyr Tyr
180 185 190

Thr Leu Lys Pro Glu Val Asn Asn Glu Ser Phe Val Ile Tyr Met Phe
195 200 205

Val Val His Phe Thr Ile Pro Met Ile Ile Ile Phe Phe Cys Tyr Gly
210 215 220

Gln Leu Val Phe Thr Val Lys Glu Ala Ala Ala Gln Gln Gln Glu Ser
225 230 235 240

Ala Thr Thr Gln Lys Ala Glu Lys Glu Val Thr Arg Met Val Ile Ile
245 250 255

Met Val Ile Ala Phe Leu Ile Cys Trp Val Pro Tyr Ala Ser Val Ala
260 265 270

Phe Tyr Ile Phe Thr His Gln Gly Ser Asn Phe Gly Pro Ile Phe Met
275 280 285

Thr Ile Pro Ala Phe Phe Ala Lys Ser Ala Ala Ile Tyr Asn Pro Val
290 295 300

Ile Tyr Ile Met Met Asn Lys Gln Phe Arg Asn Cys Met Leu Thr Thr
305 310 315 320

Ile Cys Cys Gly Lys Asn Pro Leu Gly Asp Asp Glu Ala Ser Ala Thr
325 330 335

Val Ser Lys Thr Glu Thr Ser Gln Val Ala Pro Ala
340 345

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 38

Ala Asp Gly Ser Ser Trp Glu Gly Val Gly Val Val Pro Asp Val
1 5 10 15

<210> 39

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 605 154 T3

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 39

Pro Thr Ala Arg Ser Val Gly Ala Ala Asp Gly Ser Ser Trp Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gly Val Val Pro Asp Val
 20

<210> 40

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 40

His Val Asp Asp Thr Asp Leu Tyr Leu Thr Ile Pro Thr Ala Arg Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Ala Ala Asp Gly Ser
 20

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 41

Thr Ser Ser Glu Val Ala Thr Glu
 1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 42

ES 2 605 154 T3

Asp Thr Asn Leu Ala Ser Ser Thr
1 5

<210> 43
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 43

Asp Thr Asn Leu Ala Ser Ser Thr Ile Ile Lys Glu Gly Ile Asp Lys
1 5 10 15

Thr Val

<210> 44
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 44

Val Pro Leu Leu Ala Asn Asn Arg Glu Arg Arg Gly Ile Ala Leu Asp
1 5 10 15

Gly Lys Ile Lys His Glu
20

<210> 45
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <221> Fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 45

Thr Ser Ser Glu Val Ala Thr Glu Val Pro Phe Arg Leu Met His Pro
1 5 10 15

Gln Pro Glu Asp
20

<210> 46

ES 2 605 154 T3

<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 46

Ser Leu Thr Lys Thr Leu Thr Leu Val Pro Leu Leu Ala Asn Asn Arg
1 5 10 15

Glu Arg Arg Gly
20

<210> 47
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 47

Ser Leu Thr Arg Thr Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Asn Asn Arg
1 5 10 15

Glu Arg Ala Gly
20

<210> 48
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<221> Fuente
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 48

Lys Glu Gly Ile Asp Lys Thr Val Met Gly Ile Leu Val Ser Tyr Gln
1 5 10 15

Ile Lys Val Lys Leu
20

<210> 49
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 605 154 T3

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 49

Lys Glu Gly Ile Asp Arg Thr Val Leu Gly Ile Leu Val Ser Tyr Gln
1 5 10 15

Ile Lys Val Lys Leu
20

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: Análogo al péptido 8"

<400> 50

Thr Ser Ser Glu Ala Ala Thr Glu
1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> Fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 51

Asp Thr Ala Leu Ala Ser Ser Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo, para su utilización en el tratamiento de la degeneración macular seca relacionada con la edad, en el que dicho agente es el copolímero-1.
- 10 2. Agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo para su utilización en la reducción de la zona de drusas, en un individuo con degeneración macular relacionada con la edad, en el que dicho agente es el copolímero-1.
3. Agente para su utilización, según la reivindicación 2, en el que dicha degeneración macular relacionada con la edad es degeneración macular seca relacionada con la edad.
- 15 4. Agente para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente se administra semanalmente.
5. Agente para su utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho agente se administra por inyección subcutánea.
- 20 6. Utilización de un agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la degeneración macular seca relacionada con la edad, en la que dicho agente es el copolímero-1.
- 25 7. Utilización de un agente que provoca que las células T que producen IL-4 se acumulen en el ojo, en la preparación de un medicamento para la reducción del área de drusas en un individuo con degeneración macular relacionada con la edad, en el que dicho agente es el copolímero-1.
- 30 8. Utilización, según la reivindicación 7, en la que dicha degeneración macular relacionada con la edad es degeneración macular seca relacionada con la edad.
9. Utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que dicho agente se administra semanalmente.
- 35 10. Utilización, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que dicho agente se administra por inyección subcutánea.

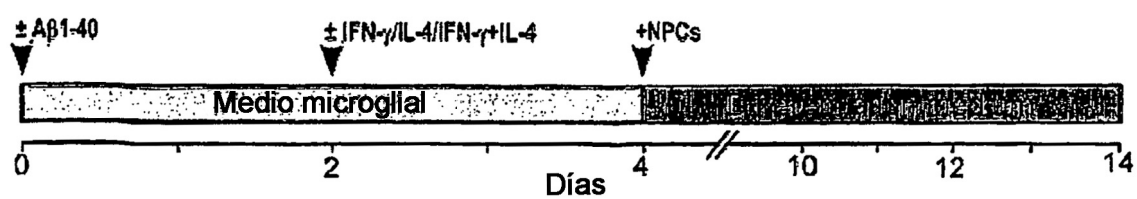


Fig. 1A

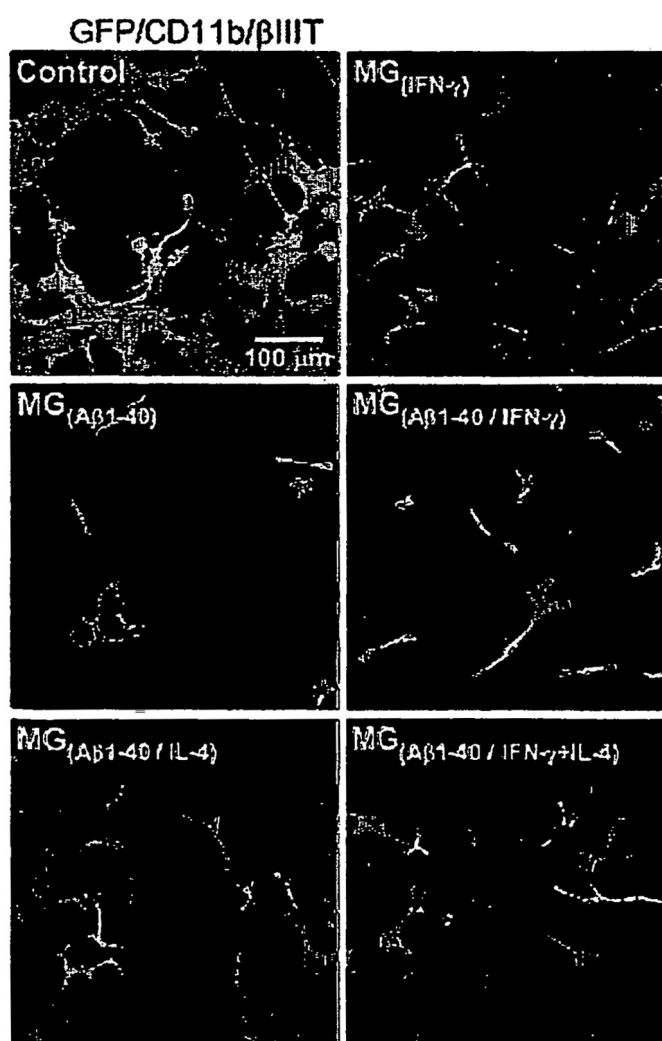


Fig. 1B

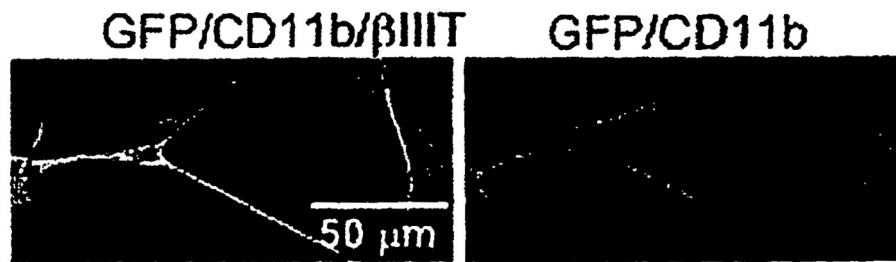


Fig. 1C

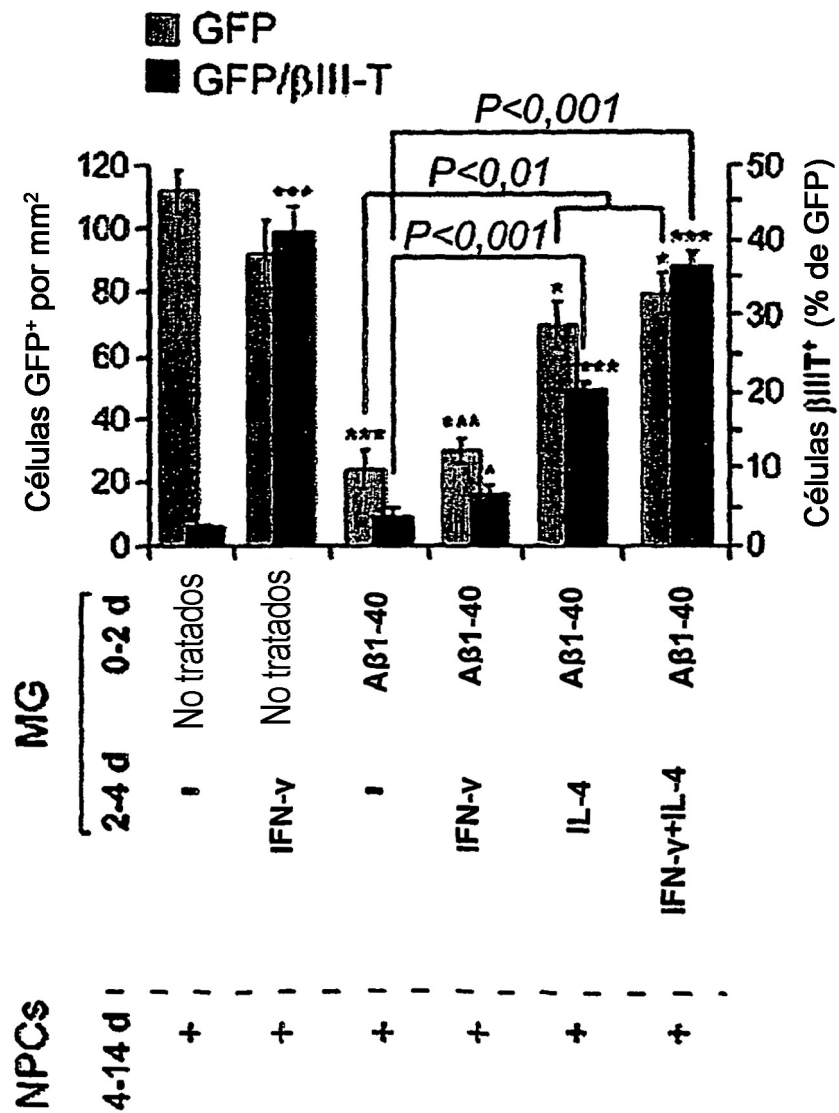


Fig. 1D

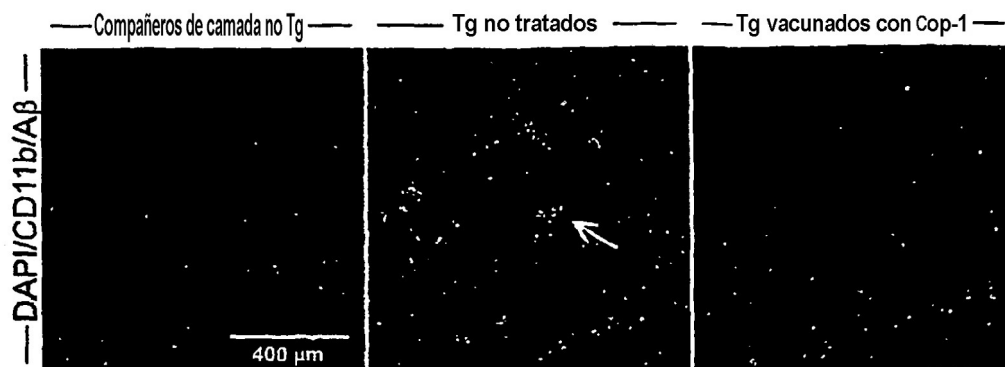


Fig. 2A

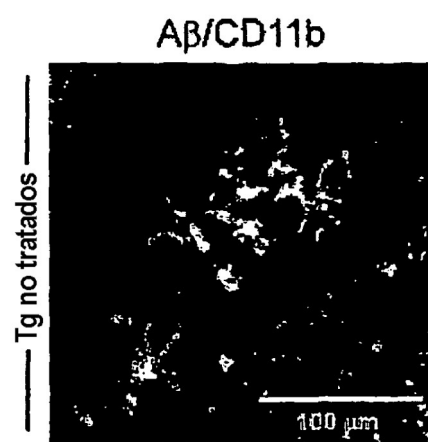


Fig. 2B

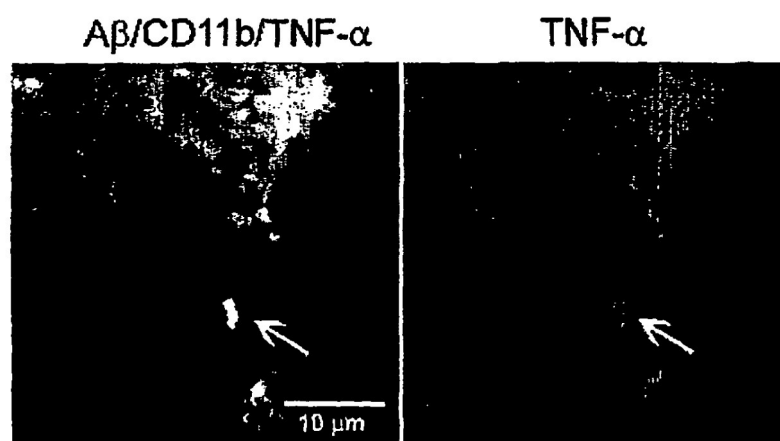


Fig. 2C

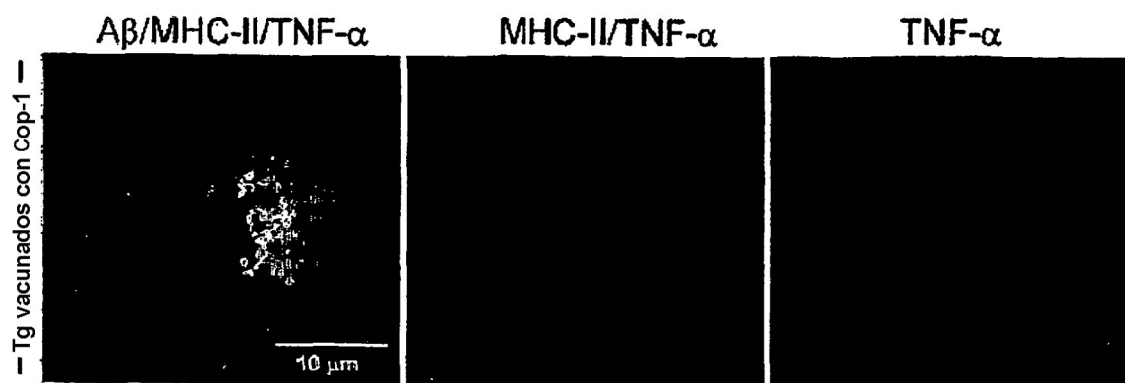


Fig. 2D

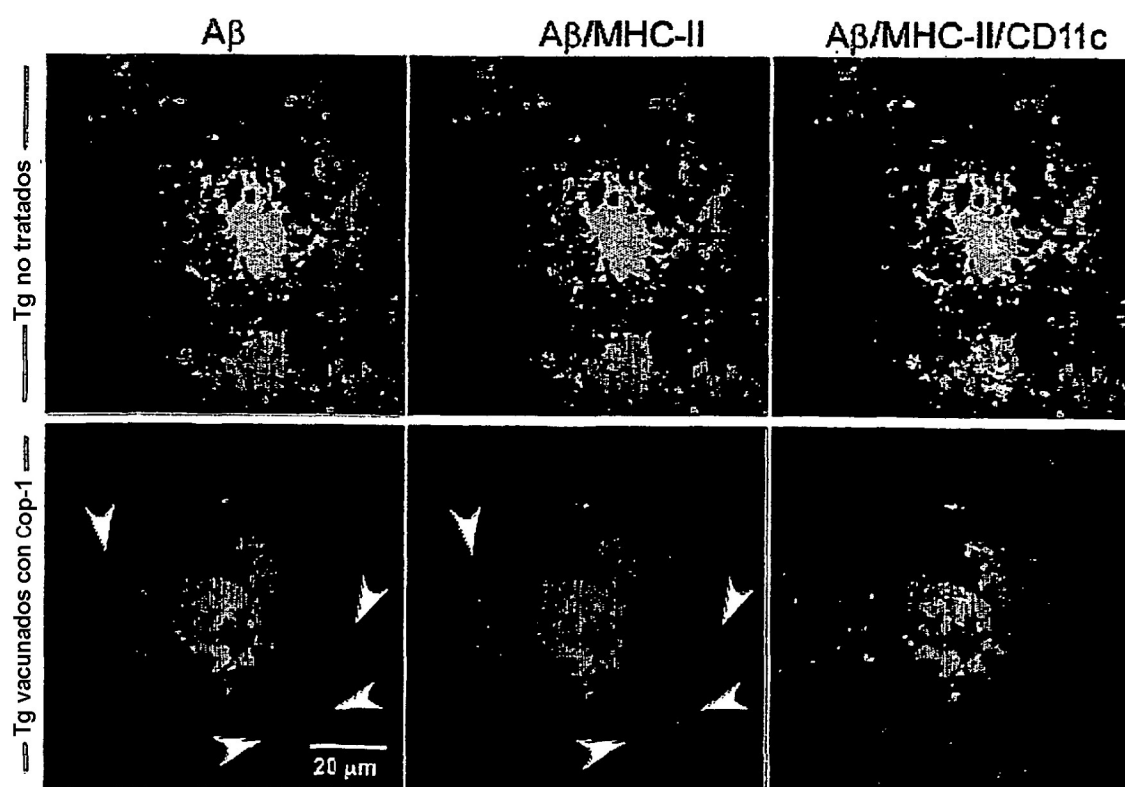


Fig. 2E

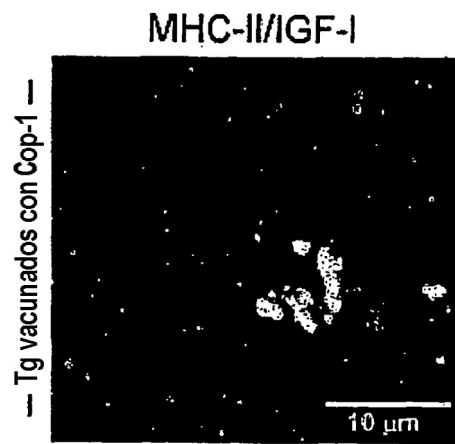


Fig. 2F

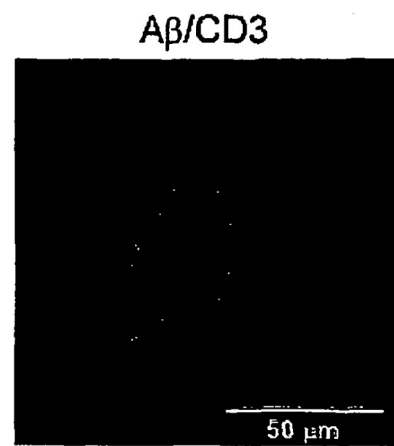


Fig. 2G

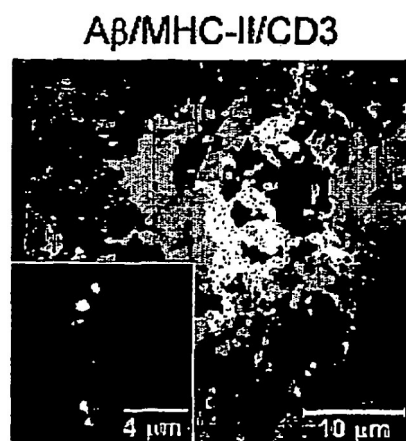


Fig. 2H

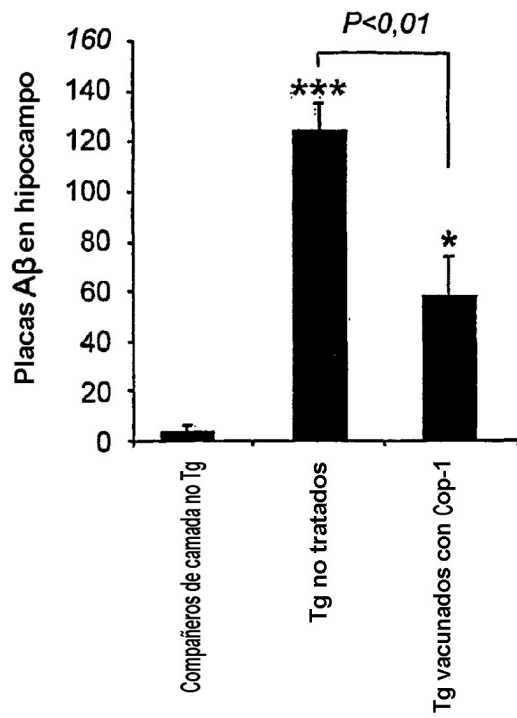


Fig. 2I

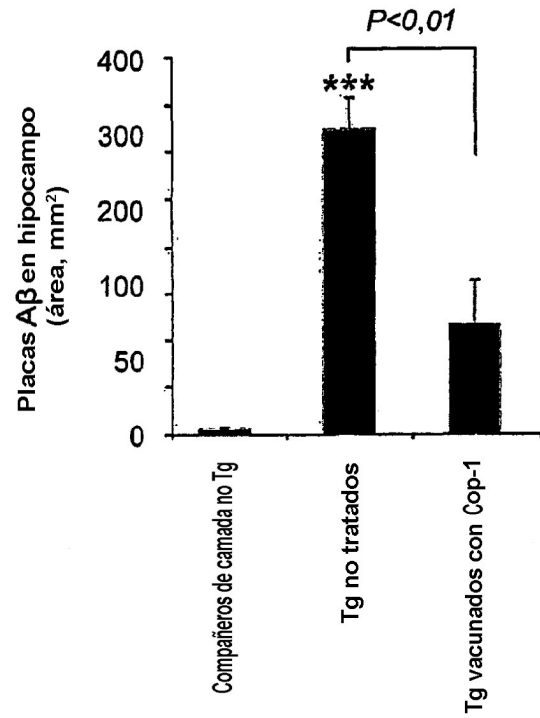


Fig. 2J

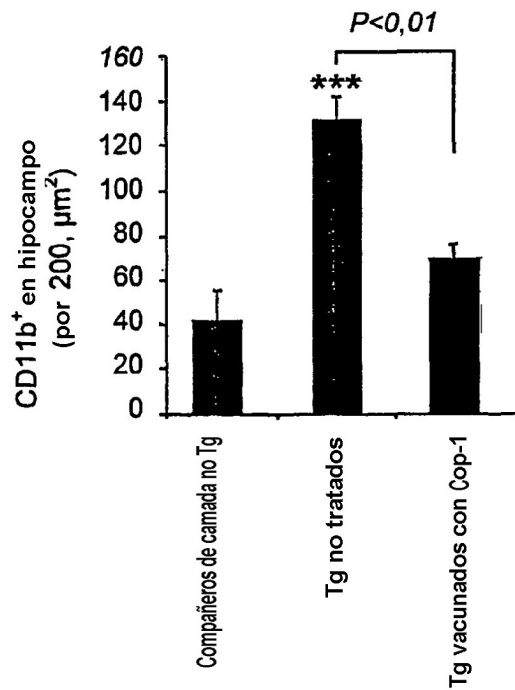


Fig. 2K

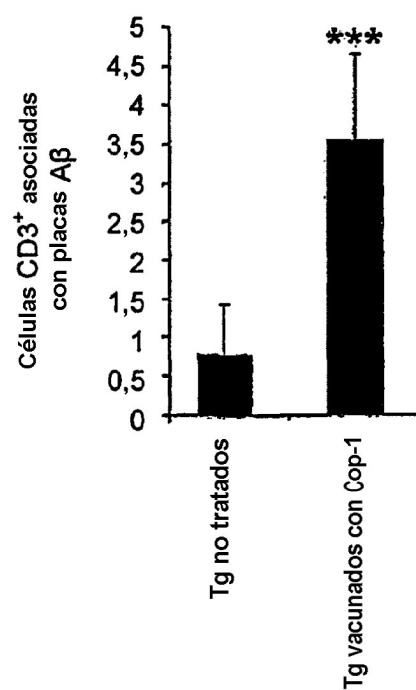


Fig. 2L

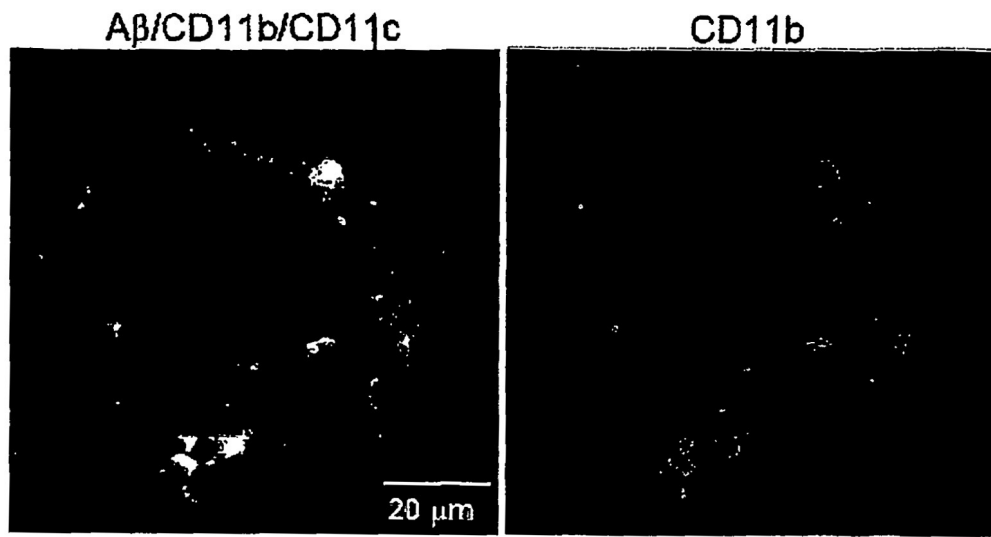


Fig. 3A

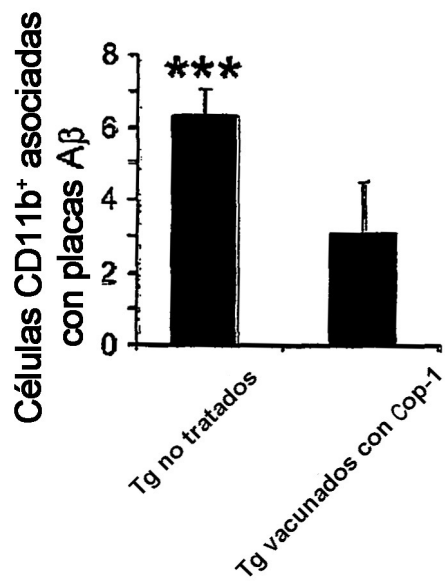


Fig. 3B

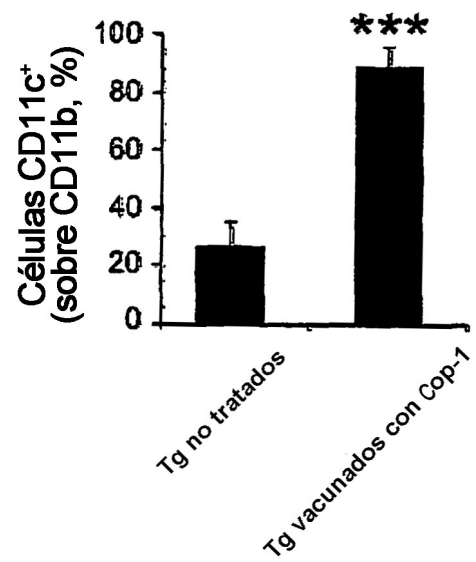


Fig. 3C

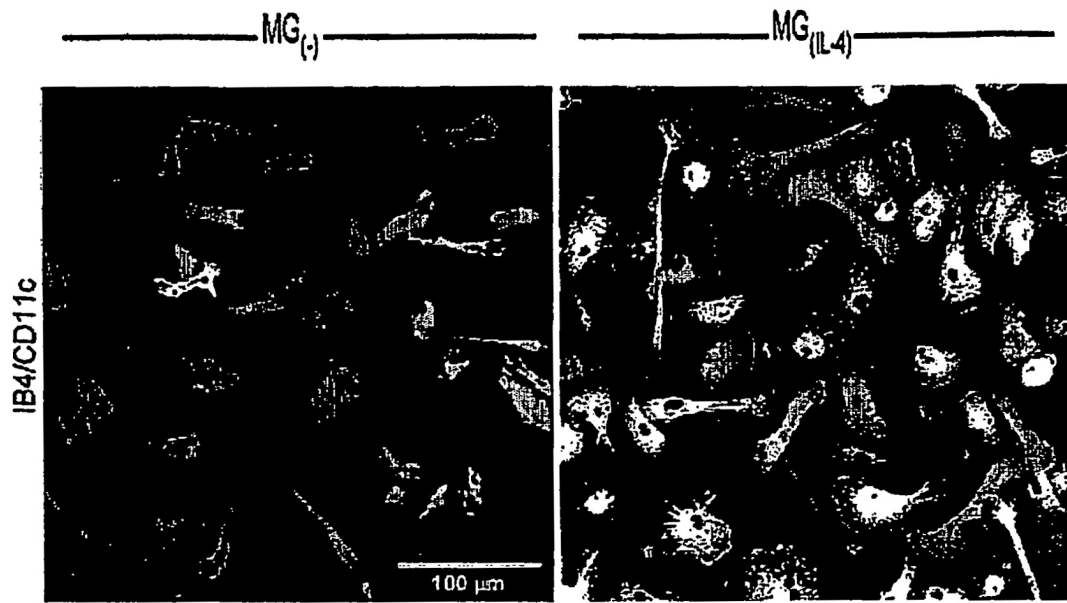


Fig. 4A

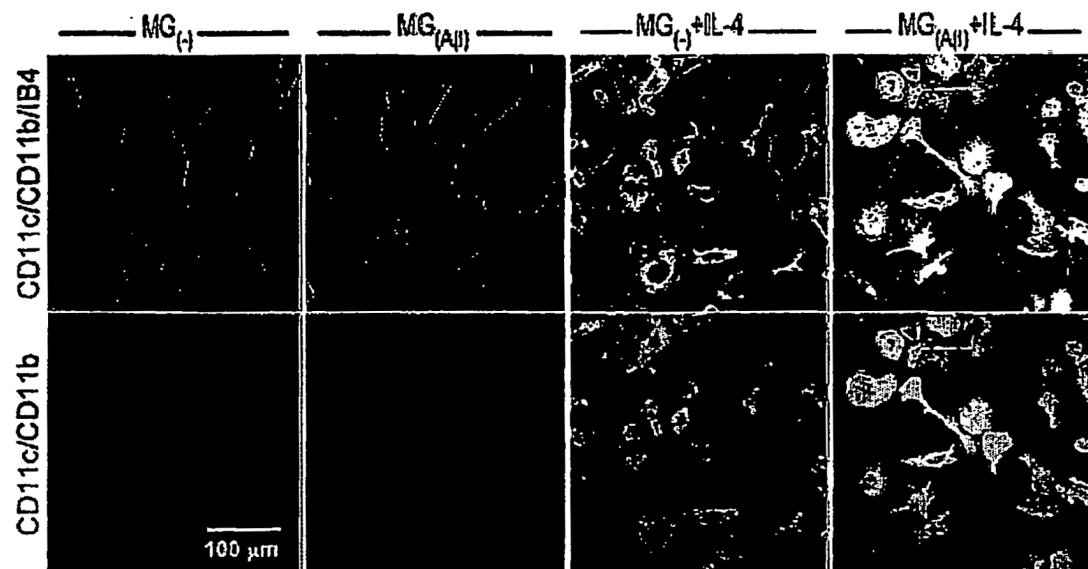


Fig. 4B

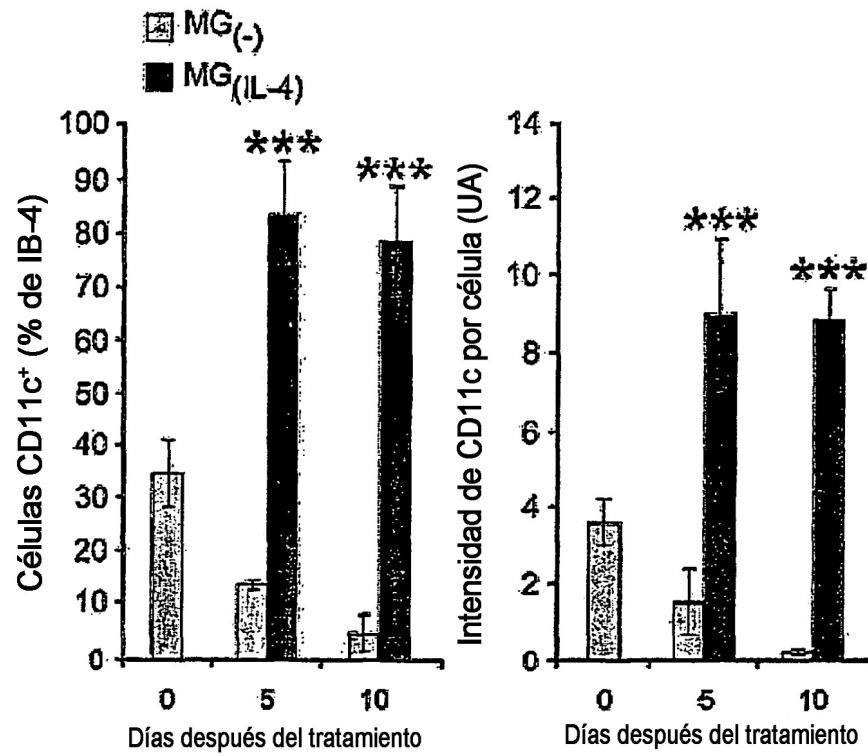


Fig. 4C

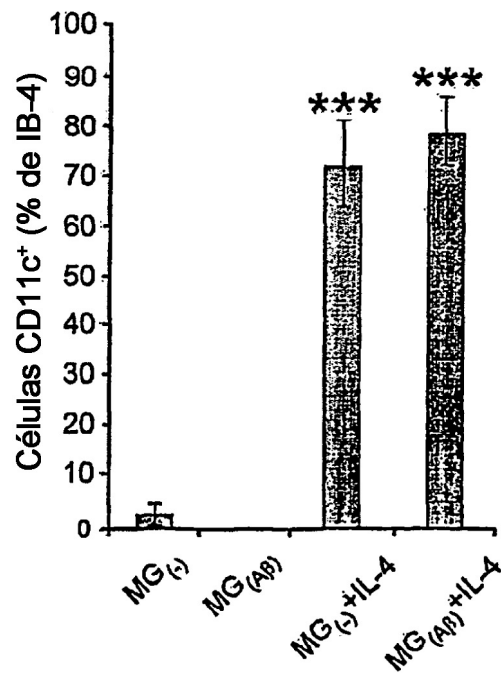


Fig. 4D

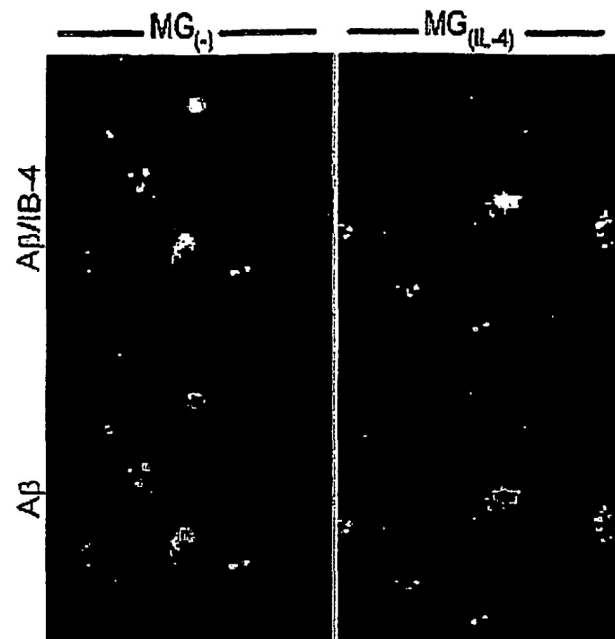


Fig. 5A

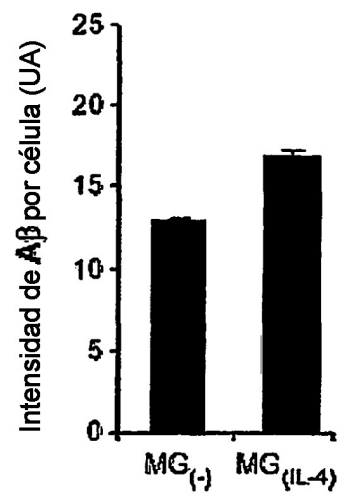


Fig. 5B

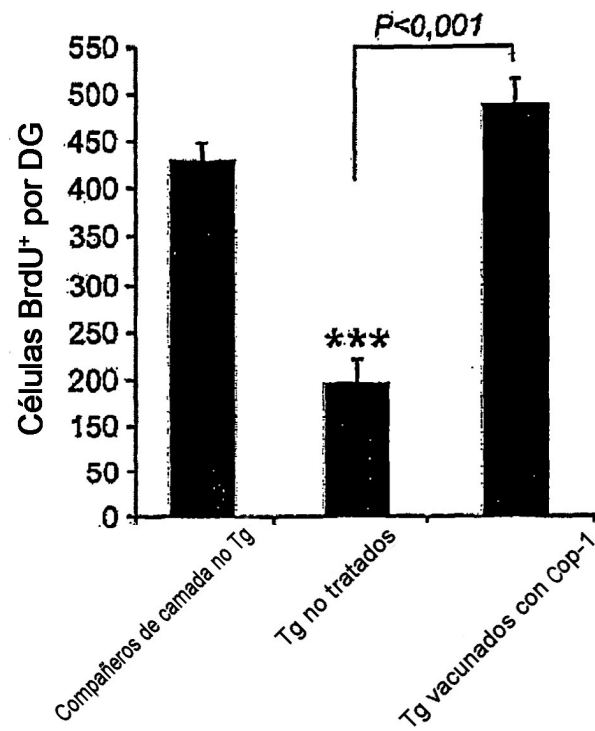


Fig. 6A

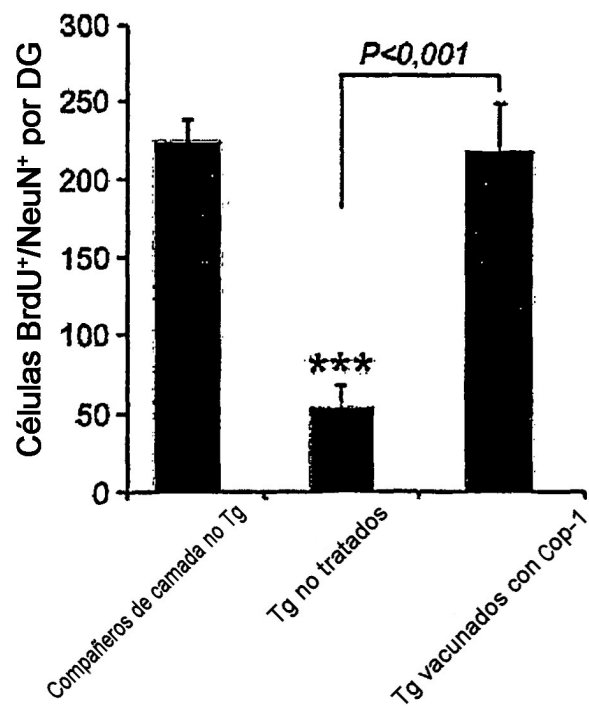


Fig. 6B

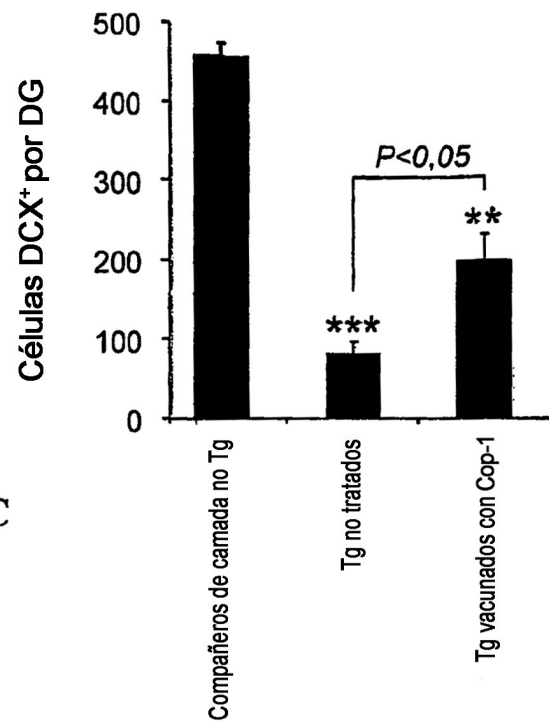


Fig. 6C

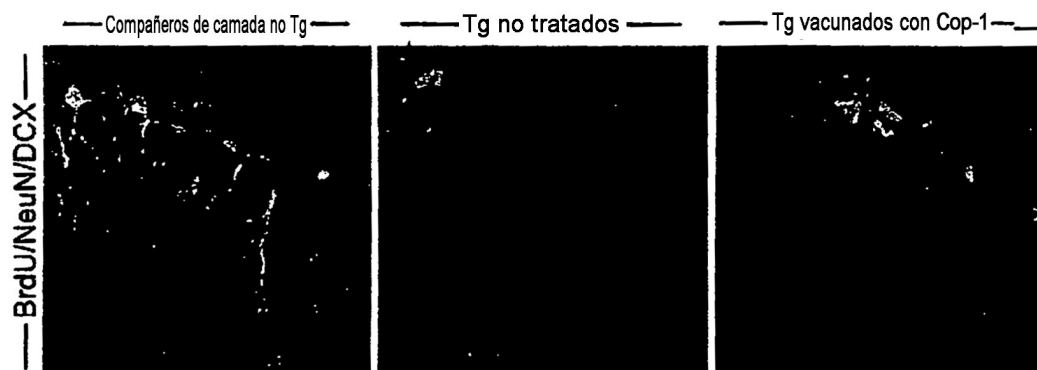


Fig. 6D

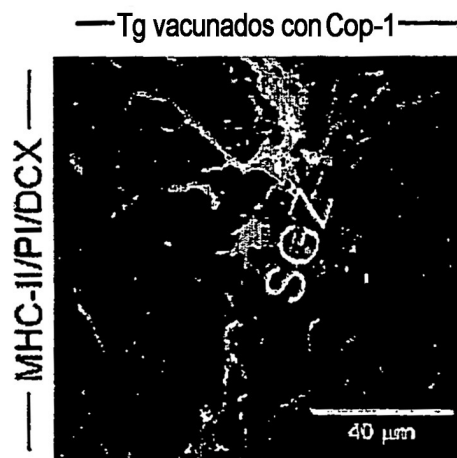


Fig. 6E

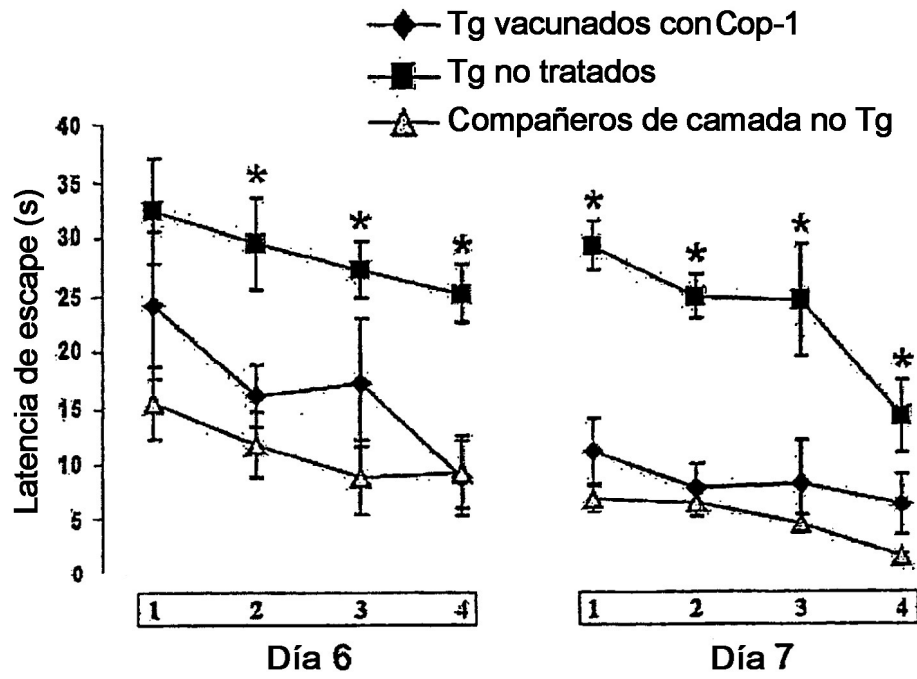


Fig. 7A

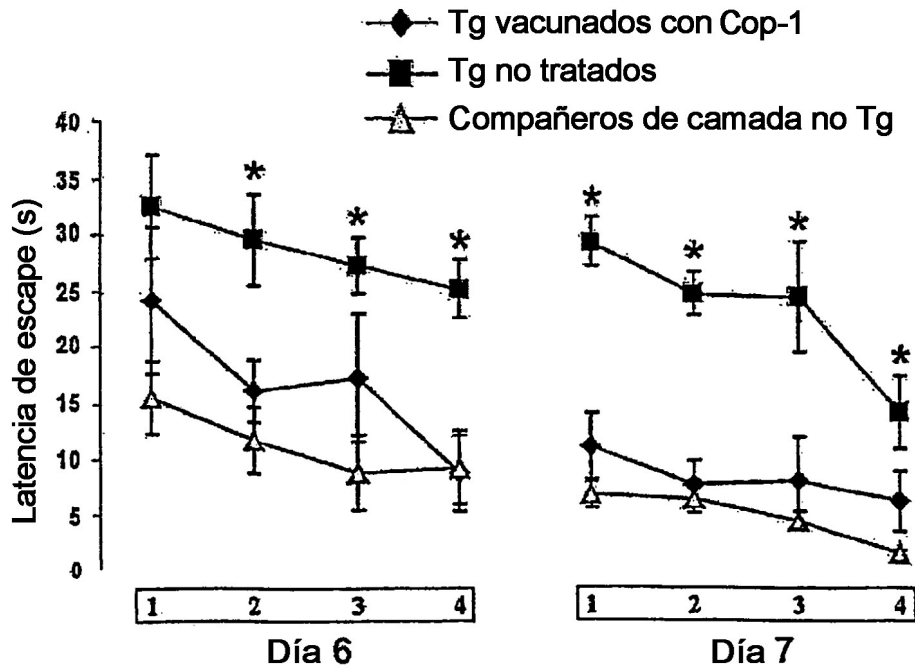


Fig. 7B

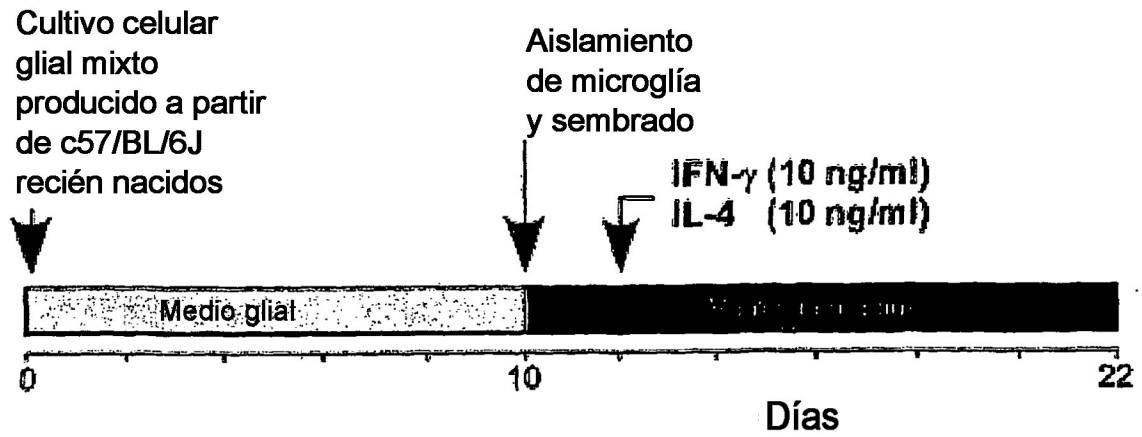


Fig. 8A

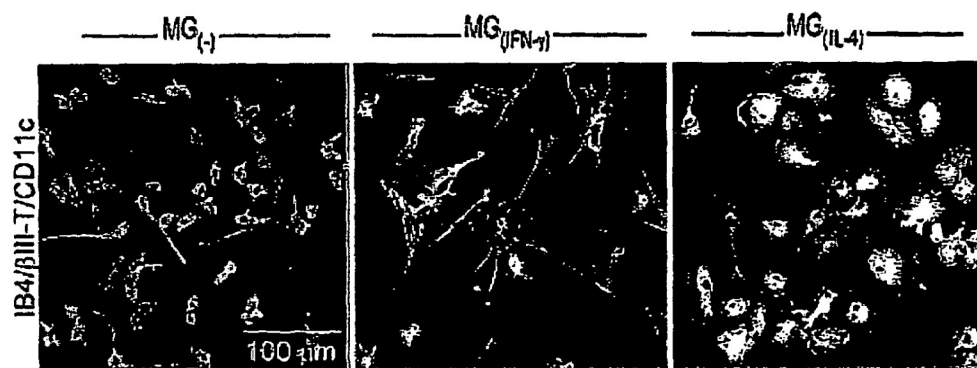


Fig. 8B

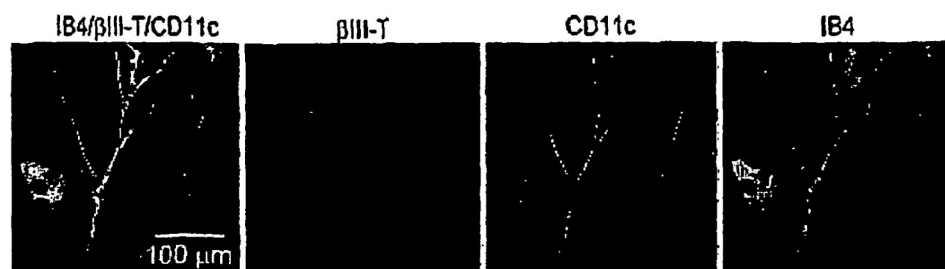


Fig. 8C

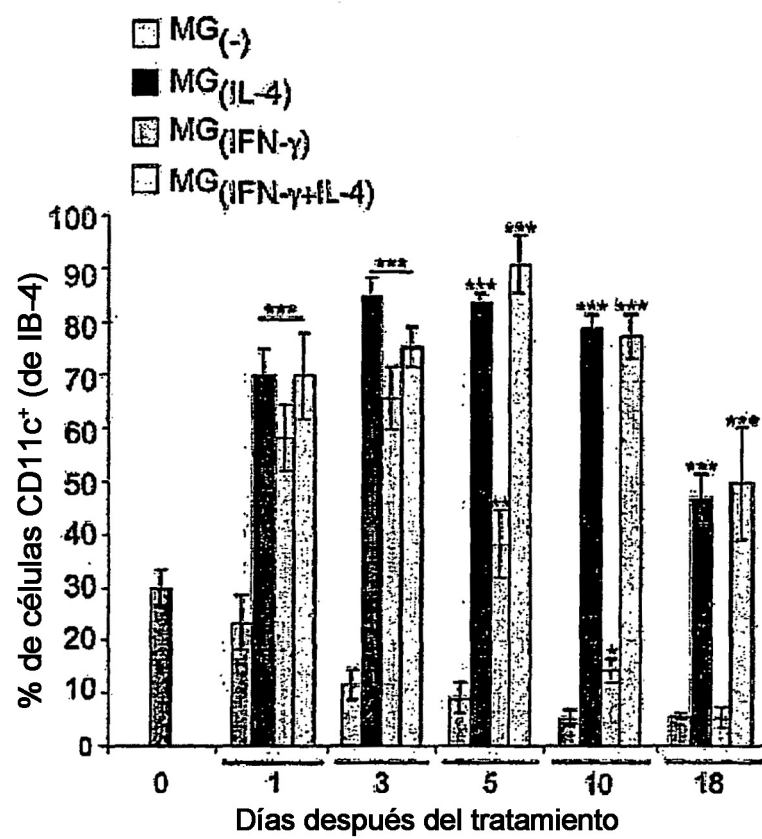


Fig. 8D