

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 353**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2010 PCT/EP2010/058270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10142800**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10725159 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2440225**

54 Título: **Nuevas aplicaciones de HIP/PAP o derivados de la misma**

30 Prioridad:

**11.06.2009 EP 09290437**

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

**26.02.2018**

73 Titular/es:

**ALFACT INNOVATION (50.0%)**

**320 Rue Saint-Honoré**

**75001 Paris, FR y**

**BRECHOT, CHRISTIAN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FAIVRE, JAMILA;**

**GRESSENS, PIERRE;**

**AMOUYAL, GILLES;**

**AMOUYAL, PAUL;**

**BRECHOT, CHRISTIAN y**

**ROUGIER, ELODIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 656 353 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

Nuevas aplicaciones de HIP/PAP o derivados de la misma

### CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere al campo de la neurología, y más particularmente al campo de la lesión cerebral neonatal.

### 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La lesión cerebral neonatal constituye un campo específico de investigaciones médicas, ya que los procesos implicados en la lesión neuronal neonatal son distintos de los que conducen a la lesión neuronal en pacientes adultos.

10 A pesar de la mejora de la atención obstétrica y neonatal, dos grupos de recién nacidos todavía corren el riesgo de desarrollar una lesión cerebral perinatal con deterioro neurológico permanente, a saber, el bebé prematuro con daño predominante de la materia blanca y la expresión niño asfixiado con lesión cerebral hipóxico-isquémica. Además de la hipoxia-isquemia, una liberación potenciada de glutamato que conduce a la muerte celular excitotóxica y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) son importantes en el proceso de lesión cerebral en estos dos grupos.

15 La asfixia neonatal, también conocida como hipoxia-isquemia (HI), es una afección que surge de la ingesta inadecuada de oxígeno en un bebé durante el desarrollo del pretérmino, el trabajo de parto, el parto o el período posnatal inmediato. La asfixia neonatal sigue siendo una causa principal de morbilidad neurológica crónica y mortalidad aguda en el recién nacido y comúnmente conduce a encefalopatía hipóxico-isquémica. Los estudios existentes han demostrado que la hipoxia neonatal durante un tiempo tan corto como seis minutos puede conducir a un daño neurológico permanente. Aproximadamente el 14,6% de todas las muertes al nacer son causadas por hipoxia neonatal. En el mundo occidental, aproximadamente el 0,9% de los recién nacidos padece hipoxia neonatal. Alrededor del 15-20% mueren, y entre los supervivientes, el 25% tiene graves discapacidades debido a complicaciones a largo plazo tales como retraso mental, parálisis cerebral, espasticidad, dificultades de aprendizaje o epilepsia. Además, se reconoce cada vez más que niños con hipoxia más bien suave, quienes inicialmente parecen recuperarse sin complicaciones, tienen problemas de comportamiento en la niñez que pueden remontarse a este insulto neonatal.

20 En general, el inicio y el desarrollo de lesiones en el cerebro neonatal son procesos complejos, con múltiples mecanismos y vías de contribución que resultan en lesiones tempranas y tardías. Los estudios se han centrado en diversos aspectos de estos procesos, incluido el estrés oxidativo, la inflamación y la excitotoxicidad, que son muy diferentes en el cerebro maduro o inmaduro (Gonzalez et al., 2008, *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 120: 43-53).

25 Actualmente, no existen terapias aprobadas para el daño cerebral asociado con la HI neonatal más allá de las terapias de apoyo y las intervenciones proporcionadas como parte del cuidado intensivo. Sin embargo, hay muchas vías prometedoras de investigación para mejorar la intervención y descubrir nuevas estrategias a raíz de las terapias que han sido testadas para aplicaciones clínicas, y han fracasado. Ejemplos de terapias fallidas incluyen glucosa suplementaria durante la reanimación, hiperventilación, midazolam, barbitúricos, dexametasona y otros glucocorticoides, bloqueadores de los canales de calcio, sulfato de magnesio, indometacina, superóxido dismutasa/catalasa conjugada con inhibidores de polietilenglicol, MK-801, detrometorfano y caspasa. El tratamiento de HI cerebral neonatal incluye cuidados de apoyo para proporcionar una ventilación adecuada, administración meticulosa de fluidos, evitar la hipotensión y la hipoglucemia y el tratamiento de convulsiones. De hecho, se ha formulado la hipótesis de que mejorar la forma en que los bebés son reanimados después de la HI puede ser un primer paso crucial para mejorar los resultados y reducir la discapacidad. La concentración de oxígeno utilizada durante la reanimación puede afectar el daño cerebral después de la HI. El oxígeno hiperbárico se ha probado con algún éxito en neonatos con HI y en modelos de roedores con apoplejía isquémica focal. Se requieren estudios adicionales para aclarar el papel del oxígeno en los recién nacidos con apoplejía, que también están en riesgo de "enfermedad producida por radicales libres de oxígeno".

30 Más allá de mejorar los cuidados intensivos, se han realizado muchos estudios para identificar nuevas opciones de tratamiento e intervenciones potenciales para mejorar el proceso de lesión cerebral en curso. En síntesis, se han explorado diversas estrategias que incluyen el ensayo con antioxidantes, agentes antiinflamatorios, inhibidores de la muerte celular, factores de crecimiento, terapia con células madre o hipotermia. Se ha investigado una diversidad de compuestos antiinflamatorios. Varias intervenciones, tales como alopurinol/oxipurinol, desferoxamina y melatonina, que intentan reducir el daño cerebral inducido por HI que resulta de radicales libres no han logrado despertar interés clínico debido a sus perfiles de efectos secundarios y algunos ensayos fallidos. Recientes terapias prometedoras incluyen eritropoyetina y N-acetilcisteína. La eritropoyetina es un antioxidante que posee propiedades antiapoptóticas, antinitrosantes y angiogénicas. También se ha informado que la eritropoyetina fomenta la neuroprotección y la neurogénesis a través de la alteración de las decisiones sobre el destino de las células y mejora

- el resultado funcional después de apoplejía en ratas inmaduras. La *N*-acetilcisteína, un conocido agente antioxidante y depurador de radicales libres, puede atravesar la placenta y la barrera hematoencefálica (BBB por sus siglas en inglés) y tiene un buen perfil de seguridad durante el embarazo. La *N*-acetilcisteína ha demostrado reducir el estrés oxidativo, restablecer los niveles de glutatión intracelular, neutralizar los radicales libres de oxígeno, mejorar el potencial redox celular y reducir la apoptosis y la inflamación del cerebro neonatal, además de la recuperación cardio-renal mejorada observada después de la asfixia. La terapia con hidrógeno también podría representar una estrategia de tratamiento a explorar. Además, se han realizado intentos para reducir la lesión cerebral en ratas hipóxicas-isquémicas neonatales mediante inyección intra-cerebroventricular de células madre/progenitoras neuronales junto con condroitinasa ABC (Sato et al., 2008, *Reprod Sci.*, Vol. 15 (n° 6): 613-620).
- Entre los traumas cerebrales que provocan grandes preocupaciones médicas, la lesión cerebral traumática (TBI por sus siglas en inglés) se produce cuando una fuerza externa lesiona el cerebro. La TBI es una causa principal de muerte y discapacidad en todo el mundo, especialmente en niños y adultos jóvenes. La TBI se define como el daño al cerebro que resulta de la fuerza mecánica externa tal como una aceleración o desaceleración rápida, un impacto, ondas explosivas o la penetración de un proyectil. Los traumas cerebrales provocan una lesión secundaria, que incluye alteraciones en el flujo sanguíneo del cerebro y la presión dentro del cráneo. La TBI puede provocar una gran cantidad de efectos físicos, cognitivos, emocionales y de comportamiento. El resultado de la TBI puede variar desde la recuperación completa hasta la incapacidad permanente o la muerte. El siglo 20 ha visto desarrollos críticos en el diagnóstico y tratamiento que han disminuido las tasas de mortalidad y la mejora de los resultados. Estos incluyen técnicas de formación de imágenes tales como tomografía computarizada y resonancia magnética. Las personas afectadas con una TBI serán sometidas urgentemente a un tratamiento médico de emergencia dentro de la denominada "hora dorada" después de la lesión. Es probable que personas con lesiones moderadas a graves reciban tratamiento en una unidad de cuidados intensivos seguido de un servicio de neurocirugía. El tratamiento depende de la fase de recuperación del paciente. En la fase aguda, el objetivo principal es estabilizar al paciente y concentrarse en evitar lesiones adicionales, ya que se puede hacer muy poco para revertir el daño inicial provocado por el trauma. Las principales preocupaciones médicas son garantizar el suministro adecuado de oxígeno, mantener un flujo sanguíneo cerebral adecuado y controlar la presión intracraneal elevada. La investigación se realiza actualmente para diseñar tratamientos médicos potenciales que puedan ayudar en la neuroprotección del paciente. Sin embargo, los ensayos clínicos para testar agentes que podrían detener la lesión de las células cerebrales han topado en gran medida con el fracaso.
- Por ejemplo, existía interés en la hipotermia, enfriando el cerebro lesionado para limitar el daño de la TBI, pero los ensayos clínicos demostraron que no es útil en el tratamiento de la TBI. Estos fracasos podrían deberse a factores que incluyen fallos en el diseño de los ensayos o en la insuficiencia de un único agente para prevenir la variedad de procesos de lesiones implicados en la lesión secundaria.
- La terapia con oxígeno hiperbárico (HBO por sus siglas en inglés) ha sido evaluada como un tratamiento complementario después de una TBI, concluyendo una revisión Cochrane que su uso podría no justificar la HBO para la TBI, ha sido controvertido ya que los estudios han buscado mecanismos de mejora, y la evidencia adicional demuestra que puede tener potencial como un tratamiento.
- Las observaciones anteriores ilustran que, hasta la fecha, los avances médicos son muy necesarios para tratar a pacientes afectados por una lesión cerebral traumática.
- Existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos adicionales que puedan tratar eficazmente la lesión cerebral neonatal.
- También existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos que sean útiles para tratar la lesión cerebral traumática (TBI) que provoca la muerte celular neuronal, para la cual hay muy pocos métodos de tratamiento actualmente disponibles.
- También existe la necesidad en la técnica de identificar compuestos que sean útiles para tratar enfermedades del cerebelo, que abarcan enfermedades genéticas del cerebelo, así como enfermedades ambientales del cerebelo.
- También existe la necesidad en la técnica de identificar compuestos que sean útiles para tratar la enfermedad de Alzheimer, así como el deterioro cognitivo de la mente que precede a los síntomas específicos de la enfermedad de Alzheimer.
- SUMARIO DE LA INVENCION**
- La presente invención proporciona compuestos adicionales para prevenir o tratar diversos tipos de lesiones cerebrales.
- Esta invención se refiere, en particular, a la proteína HIP/PAP o a un derivado proteico de la misma para uso en la prevención o el tratamiento de una lesión cerebral neonatal, que incluye una lesión cerebral neonatal provocada por hipoxia cerebral, en donde la proteína "HIP/PAP" comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

90% de identidad de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID N° 1 a 3,

en donde el derivado proteico de la misma se selecciona del grupo que consiste en una porción biológicamente activa de una proteína "HIP/PAP" y proteínas quiméricas o de fusión "HIP/PAP",

5 y en donde dicha lesión cerebral neonatal abarca un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en hipoxemia fetal, hipoxemia perinatal, isquemia fetal, isquemia perinatal y una liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios.

Esta invención también se refiere a una proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para uso en la prevención o el tratamiento de una lesión cerebral neonatal que consiste en un accidente cerebrovascular, que  
10 abarca apoplejía, y en donde la apoplejía se selecciona preferiblemente del grupo que comprende apoplejía isquémica y apoplejía cerebrovascular hemorrágica.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** ilustra el efecto protector de HIP/PAP contra la apoptosis celular de células neuronales corticales de ratones GAP 43 +/+. Ordenadas: porcentaje de células TUNEL positivas; Abscisas: de izquierda a derecha, células  
15 incubadas con (1) Medio de cultivo control, (2) NMDA, (3) NMDA y HIP/PAP, y (4) NMDA solo. #: significativo en comparación con Control; "": significativo en comparación con NMDA.

La **Figura 2** ilustra el efecto de HIP/PAP sobre el número de neuritas primarias en células neuronales corticales de ratones GAP 43 +/+. Ordenadas: porcentaje de células que tienen un número específico de neuritas primarias. Abscisas: cuatro conjuntos de barras, de izquierda a derecha, respectivamente: (1) células con 0 neuritas primarias,  
20 (2) células con 1 neurita primaria, (3) células con 2 neuritas primarias, (4) células con 3 neuritas primarias o más; cada uno de los conjuntos de barras ilustra los resultados obtenidos con, de izquierda a derecha: (a) Medio de cultivo control, (b) NMDA, (c) NMDA y HIP/PAP y (d) HIP/PAP sola; #: significativo en comparación con Control; "": significativo en comparación con NMDA.

La **Figura 3** ilustra el efecto de HIP/PAP sobre el número de neuritas secundarias en células neuronales corticales de ratones. Ordenadas: porcentaje de células que tienen neuritas secundarias. Abscisas: cuatro conjuntos de barras, de izquierda a derecha, respectivamente: (1) Medio de cultivo control, (2) NMDA, (3) NMDA y HIP/PAP y (4)  
25 HIP/PAP sola; cada uno de los conjuntos de barras ilustra los resultados obtenidos con células corticales de ratones que proceden, de izquierda a derecha, de: (a) ratones GAP 43 +/+, (b) ratones GAP 43 +/- y (c) ratones GAP 43 -/-; #: significativo en comparación con Control; "": significativo en comparación con NMDA.

La **Figura 4** ilustra el efecto de HIP/PAP sobre el número de neuritas terciarias en células neuronales corticales de ratones. Ordenadas: porcentaje de células que tienen neuritas terciarias. Abscisas: cuatro conjuntos de barras, de izquierda a derecha, respectivamente: (1) Medio de cultivo control, (2) NMDA, (3) NMDA y HIP/PAP y (4) HIP/PAP  
30 sola; cada uno de los conjuntos de barras ilustra los resultados obtenidos con células corticales de ratones que proceden, de izquierda a derecha, de: (a) ratones GAP 43 +/+, (b) ratones GAP 43 +/- y (c) ratones GAP 43 -/-; #: significativo en comparación con Control; "": significativo en comparación con NMDA.

La **Figura 5** ilustra el efecto de HIP/PAP sobre el número de puntos de ramificación en células neuronales corticales de ratones GAP 43 +/+. Ordenadas: porcentaje de células que tienen un número específico de puntos de ramificación. Abscisas: tres grupos de conjuntos, de izquierda a derecha, respectivamente: (1) células con 1 punto  
40 de ramificación, (2) células con 2 puntos de ramificación, (3) células con 3 puntos de ramificación o más; cada uno de los conjuntos de barras ilustra los resultados obtenidos con, de izquierda a derecha: (a) Medio de cultivo control, (b) NMDA, (c) NMDA y HIP/PAP y (d) HIP/PAP sola; #: significativo en comparación con Control; "": significativo en comparación con NMDA.

La **Figura 6** ilustra el efecto de HIP/PAP sobre la longitud de las neuritas de células neuronales corticales de ratones GAP 43 +/+. Ordenadas: porcentaje de células que tienen un intervalo de longitud de neurita específico. Abscisas:  
45 cuatro conjuntos de barras, de izquierda a derecha, respectivamente: (1) células con una longitud de neurita que oscila entre 0 y 10  $\mu\text{m}$ , (2) células con una longitud de neurita que oscila entre 11 y 25  $\mu\text{m}$ , (3) células con una longitud de neurita que oscila entre 25 y 40  $\mu\text{m}$  y (4) células con una longitud de neurita de más de 40  $\mu\text{m}$ ; cada uno de los conjuntos de barras ilustra los resultados obtenidos con, de izquierda a derecha: (a) Medio de cultivo control, (b) NMDA, (c) NMDA y HIP/PAP y (d) HIP/PAP sola; #: significativo en comparación con Control; "": significativo en  
50 comparación con NMDA.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Se ha encontrado aquí que la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma es capaz de proteger frente a la muerte celular neuronal, especialmente contra la muerte celular neuronal que se produce en la lesión cerebral neonatal.

Se recuerda aquí que la proteína HIP/PAP se conocía previamente en la técnica como un factor mitogénico para hepatocitos. El gen HIP/PAP (Reg IIIa) también se conocía previamente por estar regulado al alza en un modelo experimental con ratones de una enfermedad cerebral inflamatoria, a saber, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE por sus siglas en inglés), y se demostró que la proteína HIP/PAP ejerce potencialmente un efecto preventivo sobre la EAE en ratones. Estos datos preliminares habían conducido a autores anteriores a alegar un efecto beneficioso de la proteína Reg III para tratar un gran número de enfermedades inflamatorias o neurológicas de los pacientes adultos, incluyendo esclerosis múltiple, neuritis óptica, neuromielitis óptica, adrenoleucodistrofia, adrenomiелoneuropatía, lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad inflamatoria del intestino o también sepsis (véase la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º US 2005/0277593). Se recuerda en esta memoria que la EAE consiste en un modelo animal de inflamación cerebral que imita una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central tal como la esclerosis múltiple y la encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM por sus siglas en inglés). La EAE también es el prototipo de enfermedad autoinmune mediada por células T en general. También se recuerda que la mielina consiste en un crecimiento de células gliales y que las células de Schwann suministran la mielina a las neuronas periféricas, mientras que los oligodendrocitos, específicamente del tipo intrafascicular, mielinizan los axones del sistema nervioso central. Enfermedades desmielinizantes abarcan esencialmente esclerosis múltiple, encefalomiелitis diseminada aguda, miелitis transversal, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barré, miелinolisis pontina central, enfermedad de Tay-Sachs, así como enfermedades desmielinizantes heredadas tales como leucodistrofia y Charcot-Marie-Tooth. No es necesario decir que las enfermedades tales como la sepsis, la esclerosis lateral amiotrófica, la lesión de la médula espinal, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad de Alzheimer, la demencia, la vasculitis o el insulto isquémico no consisten en enfermedades que inicialmente son provocadas por la desmielinización. Por consiguiente, la prevención o terapia de estas últimas enfermedades mediante una sustancia que inhibiría los síntomas de EAE carece de credibilidad técnica para un experto en la técnica.

También se demostró en la técnica que existe una correlación entre los polimorfismos alélicos en la secuencia genómica del gen HIP/PAP y la aparición de esclerosis múltiple (véase la Solicitud PCT n.º WO 2007/071437). Finalmente, también se demostró en la técnica que miembros de la familia Reg serían mediadores entre neuronas lesionadas y células gliales y jugarían potencialmente un papel durante la regeneración nerviosa (véase Namikawa et al., 2005, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 332 (n.º 1):126-134).

Se ha encontrado de acuerdo con la invención que la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma, posee propiedades neuroprotectoras durante una lesión cerebral. Se ha encontrado que la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma posee propiedades neuroprotectoras durante la lesión cerebral neonatal, por lo tanto durante un daño cerebral que se produce en el desarrollo temprano, daño cerebral que es completamente distinto de la lesión cerebral que ocurre en el cerebro desarrollado de los adultos.

Más precisamente, se ha encontrado aquí que HIP/PAP posee efectos neuroprotectores *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales de lesión cerebral neonatal.

Esta invención se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para proteger las células neuronales de la apoptosis celular o muerte celular.

Esta invención también se refiere a la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma, para su uso para prevenir o tratar lesiones cerebrales neonatales.

Generalmente, cuando en esta memoria se especifican usos de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar estados patológicos, incluyendo traumas, enfermedades y trastornos, esto también significa aspectos de la invención relacionados con la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para uso en la prevención o tratamiento de dichos estados patológicos.

Generalmente, cuando en esta memoria se especifican usos de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar estados patológicos, incluyendo traumas, enfermedades y trastornos, esto también significa aspectos de la invención relacionados con el uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para fabricar un medicamento para prevenir o tratar dichos estados patológicos.

Generalmente, cuando en esta memoria se especifican usos de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar estados patológicos, incluyendo traumas, enfermedades y trastornos, esto también significa aspectos de la invención relacionados con métodos para prevenir o tratar dichos estados patológicos que comprenden una etapa de administrar a un paciente que lo necesita la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma.

Tal como se utiliza en esta memoria, una lesión cerebral traumática se determina médicamente y se clasifica de acuerdo con la Escala de Coma de Glasgow (GCS), según la cual el nivel de conciencia de una persona se clasifica en una escala de 3 a 15 basada en reacciones verbales, motoras y de apertura de ojos a estímulos (véase Marion DW (1999). "Introduction" en Marion DW. *Traumatic Brain Injury*. Stuttgart: Thieme).

La presente invención se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal, que incluye una lesión cerebral neonatal provocada por una hipoxia cerebral.

5 Por lo tanto, se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para fabricar un medicamento para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal, que incluye una lesión cerebral neonatal provocada por una hipoxia cerebral.

Esta divulgación se refiere a métodos para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal, y especialmente en modelos experimentales de lesión cerebral neonatal, en donde dicho método comprende una etapa de administrar, al paciente que lo necesite, una cantidad adecuada de una proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma.

10 Esta divulgación también proporciona métodos para prevenir o tratar lesiones cerebrales traumáticas y neonatales (TBI), en donde dicho método comprende una etapa de administrar, al paciente que lo necesite, una cantidad adecuada de una proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma.

También se refiere a un método para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal, que incluye una lesión cerebral neonatal provocada por una hipoxia cerebral, en donde dicho método comprende una etapa de administrar, al paciente que lo necesite, una cantidad adecuada de proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma.

15 Esta divulgación también se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar la lesión cerebral traumática (TBI) del recién nacido.

Esta divulgación abarca el uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar la lesión cerebral neonatal.

20 Esta divulgación también se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para fabricar un medicamento para prevenir o tratar lesión cerebral traumática (TBI) fetal, neonatal, infantil y adulta.

Por lo tanto, pertenece al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para fabricar un medicamento para prevenir o tratar la lesión cerebral neonatal.

25 También se refiere a un método para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal, en donde dicho método comprende una etapa de administrar, al paciente que lo necesite, una cantidad adecuada de una proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma.

En la mayoría de las realizaciones de los métodos preventivos o terapéuticos descritos en la presente memoria descriptiva, dicha proteína HIP/PAP o dicho derivado proteico de la misma se combinan con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para formar una composición farmacéutica.

30 Excipientes farmacéuticamente aceptables consisten preferiblemente en los que están acordados o enumerados en la Farmacopea de EE. UU. o en la Farmacopea Europea.

Esta invención proporciona nuevas pistas sobre la protección neuronal contra la lesión/trauma/degeneración cerebral neonatal proporcionando nuevas composiciones protectoras.

35 Por "proteína HIP/PAP" se pretende en esta memoria una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1. Realizaciones específicas de una proteína HIP/PAP abarcan proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N° 3. La proteína HIP/PAP de SEQ ID N° 3 consiste en la proteína HIP/PAP que se ilustra más específicamente en los ejemplos de esta memoria, en donde también se puede denominar "ALF5755". Tal como se ilustra en los ejemplos en esta memoria, la proteína HIP/PAP de SEQ ID N° 3 puede producirse de forma recombinante en *E. coli*. La proteína HIP/PAP de SEQ ID N° 3 comprende una porción de propéptido N-terminal de 12 aminoácidos que se escinde *in vivo* para liberar la porción biológicamente activa de dicha proteína HIP/PAP. Dicha porción biológicamente activa de dicha proteína HIP/PAP se localiza desde el residuo Isoleucina en la posición 13 hasta el residuo ácido aspártico localizado en la posición 150 de SEQ ID N° 3. De forma similar, dicha porción biológicamente activa de dicha proteína HIP/PAP se localiza desde el residuo triptófano en la posición 12 hasta el residuo ácido aspártico localizado en la posición 149 de SEQ ID N° 2.

45 Preferiblemente, cualquier realización de una proteína HIP/PAP, así como cualquier realización de un derivado de la misma consiste en una proteína recombinante, p. ej., una proteína que se produce de forma recombinante en células bacterianas o animales, que incluyen células de insectos y células de mamíferos.

Los autores de la invención han demostrado que la proteína HIP/PAP reduce significativamente la muerte neuronal o la apoptosis en un modelo de ratón neonatal de lesiones cerebrales excitotóxicas.

5 La invención también proporciona herramientas terapéuticas contra el estrés oxidativo, que es un factor principal de anomalías y degeneración neuronales, a través del poder antioxidante de HIP/PAP, tal como se detalla más adelante. Además, y curiosamente, el efecto de la proteína HIP/PAP también se observa cuando se administra en la periferia, en lugar de administrarse directamente al SNC. Finalmente, los efectos protectores de la proteína HIP/PAP abarcan la prevención de la muerte neuronal y la inducción de la plasticidad neuronal.

Esta patente también se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma para modular la remodelación estructural o la plasticidad de células neuronales.

10 Tal como se muestra en los ejemplos en esta memoria, una proteína HIP/PAP evita *in vitro* la muerte de células neuronales inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos primarios neuronales de ratones. También se muestra en esta memoria que una proteína HIP/PAP rescata *in vitro* la muerte de células neuronales inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos primarios neuronales de ratones.

Además, se demuestra que una proteína HIP/PAP previene *in vivo* las lesiones excitotóxicas provocadas por el análogo glutamatergico ibotenato en el cerebro de ratón en desarrollo.

15 Adicionalmente, los resultados presentados en los ejemplos revelan que una proteína HIP/PAP posee un efecto de rescate *in vivo* sobre las lesiones excitotóxicas provocadas por el análogo glutamatergico ibotenato en el cerebro de ratón en desarrollo.

Aún además se ha encontrado de acuerdo con la invención que los efectos preventivos y curativos *in vivo* de la proteína HIP/PAP sobre la lesión cerebral neonatal podrían ser el resultado de actividades pleiotrópicas de HIP/PAP, es decir, de la participación de HIP/PAP en una pluralidad de vías fisiológicas de rescate neuronal.

20 Como una ilustración de las actividades pleiotrópicas de HIP/PAP en la prevención o el tratamiento de la lesión cerebral neonatal, también se muestra aquí que HIP/PAP ejerce una neuroprotección contra la muerte de células neuronales neonatales inducida por una especie de oxígeno reactivo tal como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

25 Como una ilustración adicional de las actividades pleiotrópicas de HIP/PAP en la prevención o el tratamiento de la lesión cerebral neonatal, también se demuestra en esta memoria que, en los modelos *in vitro* e *in vivo* de lesión cerebral neonatal, HIP/PAP induce cambios en el producción, fosforilación y distribución de GAP-43 o GAP-43 fosforilada, que es una proteína conocida en la técnica que está implicada en el crecimiento axonal y la plasticidad neuronal.

De manera notable, HIP/PAP induce una distribución fascicular de procesos neuronales marcados con GAP-43.

30 También, HIP/PAP induce una expresión incrementada de la forma fosforilada de la proteína GAP-43, es decir, una expresión incrementada de la forma de GAP-43 que está fosforilada en el residuo serina localizado en la posición 41 (S41) de la secuencia de aminoácidos de GAP-43. Más bien, HIP/PAP induce una disminución en la cantidad celular total de GAP-43 mientras que, al mismo tiempo, induce un aumento en la fosfo(S41)-GAP-43.

35 Sin desear estar ligado a teoría particular alguna, los autores de la invención creen que los efectos biológicos de HIP/PAP en GAP-43 son importantes para prevenir o tratar una lesión cerebral provocada por una hipoxia cerebral, y especialmente para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal. En este contexto, los autores de la invención creen que los efectos de HIP/PAP sobre la producción y el metabolismo de GAP-43 moderan las consecuencias de la muerte o de la apoptosis de determinadas células neuronales.

40 No obstante, se ha demostrado en los ejemplos en esta memoria que el efecto protector de HIP/PAP contra la muerte celular neuronal o la apoptosis de células neuronales no está mediado obligatoriamente por una acción de HIP/PAP sobre GAP43, ya que dicho efecto protector de HIP/PAP es retenido en mamíferos que no producen la proteína GAP43 (GAP43 <sup>-/-</sup>).

Adicionalmente, se demuestra en los ejemplos en esta memoria que HIP/PAP induce o aumenta la neuroplasticidad, incluso en mamíferos que no producen GAP43 (GAP43 <sup>-/-</sup>).

45 La plasticidad neuronal incrementada que es provocada por HIP/PAP se ilustra en los ejemplos en esta memoria a través de la capacidad de HIP/PAP de generar un número incrementado de neuritas, así como de generar neuritas que tienen una alta complejidad (presencia de neuritas primarias, secundarias y terciarias, así como de neuritas que tienen un número incrementado de puntos de ramificación).

50 La plasticidad neuronal incrementada que es provocada por HIP/PAP también se ilustra en los ejemplos de esta memoria a través de la capacidad de HIP/PAP de revertir el efecto perjudicial de agentes tóxicos, tales como NMDA, sobre el crecimiento de neuritas.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "neuroplasticidad", que puede utilizarse indistintamente con la expresión "plasticidad cerebral" en esta memoria, se refiere a la capacidad del cerebro de cambiar su estructura y función durante la maduración, el aprendizaje, desafíos ambientales o la patología, incluidos eventos traumáticos tales como lesión cerebral traumática (TBI) que también se puede denominar lesión intracraneal.

- 5 La neuroplasticidad incrementada, que es provocada por HIP/PAP encuentra su utilidad terapéutica de manera notable en los métodos para tratar pacientes que han sufrido un evento adverso que provoca una interrupción en el suministro de sangre al cerebro, que incluye lesión cerebral traumática y apoplejía. De hecho, los fenómenos plásticos que ocurren en la corteza cerebral y en las estructuras subcorticales después de lesiones isquémicas están bien documentados a nivel sináptico, celular y de la red. Trabajos previos demuestran que la neuroplasticidad juega un papel clave durante la neurorrehabilitación del cerebro post-isquémico, en supervivientes humanos de apoplejía.

Los resultados experimentales anteriores apoyan la utilidad de una proteína HIP/PAP, tanto *in vitro* como *in vivo*, para modular, potenciar o mejorar el crecimiento neuronal o la plasticidad neuronal, estando dicha modulación o dicha mejora del crecimiento neuronal o plasticidad neuronal mediada por Gap-43 o no estando mediada por Gap-43.

- 15 Además de ello, como se describe en los ejemplos en esta memoria, una proteína HIP/PAP evita tanto la muerte celular inducida por excitotoxicidad *in vitro* como la muerte celular oxidativa en cultivo primario de células granulares de cerebelo de ratones. Estos resultados apoyan la utilidad de una proteína HIP/PAP para prevenir y tratar afecciones cerebelosas tales como la ataxia espinocerebelosa.

- 20 Estos resultados experimentales también apoyan la actividad neuroprotectora de una proteína HIP/PAP hacia una pluralidad de tipos de células neuronales, en particular las presentes en la corteza y el cerebelo.

- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, una hipoxia cerebral abarca situaciones en las que una lesión cerebral es causada por un suministro reducido de oxígeno al cerebro, y especialmente a células neuronales, y en las que la hipoxia cerebral provoca la muerte de células neuronales o la apoptosis. Se considera que la hipoxia cerebral se produce cuando se obstruyen los vasos sanguíneos y/o cuando se produce cualquier otra causa de agotamiento de oxígeno en los tejidos del cerebro, especialmente la asfixia.

- 30 Tal como se utiliza en esta memoria, una lesión cerebral "neonatal" abarca cualquier lesión que es provocada al cerebro del feto (también denominada lesión cerebral fetal), neonatos prematuros, recién nacidos a término y después del término, así como a los niños menores de un año de edad. Por lo tanto, la lesión cerebral neonatal abarca lo que convencionalmente se denomina lesión cerebral "perinatal" que se produce inmediatamente antes y después del parto, así como lo que convencionalmente se denomina lesión cerebral neonatal, que se produce durante el período perinatal hasta las cuatro semanas de edad. La lesión cerebral neonatal incluye apoplejía, trauma en el nacimiento, trastornos metabólicos o genéticos, estado epiléptico y una diversidad de eventos de asfixia que resultan en hipoxia e isquemia (HI). La HI conduce a menudo a lesión de la materia blanca periventricular en bebés prematuros, mientras que los bebés a término desarrollan lesiones corticales/subcorticales. En general, en la técnica se admite que la lesión cerebral neonatal se reconoce sobre la base de una forma única de encefalopatía que evoluciona desde el letargo a la hiperexcitabilidad al estupor durante los primeros tres días de vida. Una revisión de los métodos disponibles para diagnosticar la lesión cerebral neonatal es revelada por Ferriero, a la que puede referirse el experto en la técnica, cuyo contenido completo se incluye en esta memoria (Ferriero, 204, New England Journal of Medicine, Vol. 351 (n° 19): 1985-1995).

- 40 En la vida fetal, la lesión cerebral neonatal puede ser provocada (i) por alteraciones hipóxico-isquémicas debidas a hipoperfusión inducida por presión arterial parcial baja de oxígeno o (ii) por hipoxemia severa que conduce a disfunción miocárdica con hipoperfusión cerebral posterior que conduce a isquemia neuronal.

La lesión cerebral neonatal abarca la hipoxemia fetal que generalmente es el resultado de la insuficiencia placentaria.

- 45 La lesión cerebral neonatal también abarca la hipoxemia perinatal, que es una hipoxemia post-natal que generalmente resulta en insuficiencia respiratoria o cardíaca, sola o en combinación.

La lesión cerebral neonatal abarca la isquemia fetal.

- 50 La lesión cerebral neonatal abarca la isquemia perinatal, que es una isquemia post-natal, que puede deberse a una disfunción contráctil cardíaca grave que conduce a la hipoperfusión cerebral y la pérdida de la regulación cerebrovascular. La insuficiencia circulatoria puede ser consecuencia de una hemorragia prenatal o post-natal grave o sepsis neonatal.

La lesión cerebral neonatal también abarca la lesión que es provocada por la circulación cerebral pasiva a presión, en donde se altera la autorregulación de la circulación cerebral y se induce hipoxemia.

La lesión cerebral neonatal también abarca la hipoxia neonatal que se debe a una sub-perfusión que afecta a la profundidad de los surcos y genera una mayor susceptibilidad a los insultos hipotensivos.

De hecho, la lesión neonatal abarca un exceso de liberación o neurotransmisores excitadores durante la hipoxia cerebral neonatal.

5 De acuerdo con la presente invención, una proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma se puede utilizar para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal con una clasificación graduada que varía desde la fase 1 hasta la fase 3, de acuerdo con el sistema de clasificación convencional de Sarnat utilizado para clasificar encefalopatía hipóxico-isquémica (HIE por sus siglas en inglés).

10 La fase 1 del sistema de clasificación de Sarnat se basa en el hallazgo de un síndrome temprano caracterizado por hiperalerta y activación simpática, reacción excesiva a estímulos, succión débil con tono normal y hallazgos de electroencefalograma (EEG). Esta fase dura menos de 24 horas, y los pacientes que permanecen en la fase 1 tienen resultados neurológicos normales.

15 Los pacientes que progresan a la fase 2 del sistema de clasificación de Sarnat tienen hipotonía leve, son letárgicos u obnubilados (p. ej., tienen una respuesta tardía e incompleta a los estímulos sensoriales), crisis clínicas, activación parasimpática con miosis (incluso con poca luz), frecuencia cardíaca ralentizada (<120 lpm), peristalsis incrementada y copiosas secreciones. Al principio, el EEG muestra una amplitud de voltaje relativamente bajo (<25 µV en el intervalo lento theta y delta). El segundo día, el EEG muestra un patrón de ruptura durante la vigilia u obnubilación (que empeora durante el sueño) y convulsiones de EEG multifocales de baja frecuencia (de 1 a 1,5 Hz) con un predominio central o temporal. Si el EEG se recupera en 5 días, vuelve a ser completamente normal. Si la  
20 recuperación dura más de 5 días, se observa una disminución de baja amplitud. La fase 2 dura de 2 a 14 días. La recuperación clínica y del EEG en el espacio de 5 días se asocia con un buen pronóstico. El EEG periódico puede indicar un mal pronóstico si los intervalos entre estallidos son totalmente isoeletricos o si la frecuencia de estallido es inferior a cada 6 segundos, con un patrón de estallido (cada 3-6 segundos) que dure más de 7 días.

25 La fase 3 del sistema de clasificación de Sarnat se caracteriza por estupor con respuesta sólo a estímulos fuertes, con postura retraída o descerebrada, hipotonía severa (p. ej., flacidez) y supresión de reflejos tendinosos profundos, reflejos primitivos (p. ej., Moro, cuello tónico, succión) y reflejos del tronco encefálico (p. ej., corneales, oculocefálicos, nauseoseos). Las convulsiones clínicas son menos frecuentes en la fase 3 que en la fase 2. El paciente tiene una disfunción autonómica simpática o parasimpática generalizada con respiración anormal y pupilas pequeñas o en posición media que son poco reactivas a la luz. El EEG muestra un patrón periódico profundo con  
30 amplitud incrementada y frecuencia disminuida de estallidos (cada 6-12 segundos). El empeoramiento adicional de la imagen conduce a un EEG de tensión muy baja o isoeletrico.

Tal como se utiliza en esta memoria, una lesión cerebral "infantil", especialmente una lesión cerebral traumática infantil, incluye o consiste en una lesión cerebral, especialmente una lesión cerebral traumática, que es provocada a un individuo humano que oscila entre más de un año y doce años de edad.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, una lesión cerebral "adulta", especialmente una lesión cerebral traumática en adultos, abarca o consiste en una lesión cerebral, especialmente una lesión cerebral traumática, que es provocada a un individuo humano que oscila entre doce años y la edad de la muerte.

40 Tal como se utiliza en esta memoria, un "derivado" de una proteína HIP/PAP abarca polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID N° 1 a 3.

Comprende/que comprende y variaciones gramaticales de los mismos cuando se utilizan en esta memoria descriptiva se deben tomar para especificar la presencia de las características establecidas, números enteros, etapas o componentes o grupos de los mismos, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos.

45 Un derivado proteico HIP/PAP abarca proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 90%, y preferiblemente de al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID N° 1 a 3.

50 En algunas realizaciones, un derivado de proteína HIP/PAP abarca una proteína que tiene una fuerte identidad de aminoácidos con una proteína HIP/PAP seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 1-3, y que posee, en comparación con la proteína HIP/PAP de referencia, una o más adiciones, sustituciones o deleciones de un residuo de aminoácido. De acuerdo con estas realizaciones, dicho derivado proteico HIP/PAP puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más adiciones, sustituciones o deleciones de un residuo de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP de referencia. De acuerdo con estas realizaciones, dicha proteína HIP/PAP puede poseer no más de 25 adiciones, sustituciones o deleciones

de un residuo de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP de referencia.

5 Tal como se pretende en esta memoria, un derivado proteico HIP/PAP es biológicamente activo. Tal como se pretende en esta memoria, un derivado proteico HIP/PAP abarca una porción biológicamente activa de una proteína HIP/PAP.

Un derivado "biológicamente activo" de una proteína HIP/PAP incluye un péptido derivado de HIP/PAP que posee una o más de las siguientes actividades biológicas:

- 10 - (i) prevenir *in vitro* la muerte de células neuronales inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA) en cultivos neuronales primarios de ratones, particularmente en cultivo primario de neuronas corticales de ratones y en cultivo primario de células granulares de cerebelo de ratones;
- (ii) prevenir *in vivo* las lesiones excitotóxicas provocadas por el análogo glutamanérgico ibotenato en el cerebro en desarrollo, por ejemplo, el cerebro en desarrollo de ratones;
- 15 - (iii) poseer un efecto de rescate *in vivo* sobre las lesiones excitotóxicas provocadas por el análogo glutamanérgico ibotenato en el cerebro en desarrollo, p. ej., el cerebro en desarrollo de ratones;
- (iv) afectar la neuroprotección contra la muerte de células neuronales neonatales inducida por una especie de oxígeno reactivo tal como peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).
- (v) prevenir *in vitro* los daños inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células granulares primarias del cerebelo de ratones y
- (vi) inducir cambios en la producción, fosforilación y distribución de Gap-43.

20 Un derivado "biológicamente activo" de una proteína HIP/PAP con una actividad biológica seleccionada entre (i) - (v) anterior, no está necesariamente dotado del mismo orden de magnitud de dicha o dichas actividades biológicas, con la condición de que dicho derivado de proteína HIP/PAP posea una o más de las actividades biológicas (i) - (iv) anteriores a un nivel detectable, utilizando los ensayos descritos en los ejemplos de esta memoria.

25 En algunas realizaciones, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma, incluyendo una porción biológicamente activa de HIP/PAP tal como se describe arriba, puede aislarse de fuentes celulares o tisulares mediante un esquema de purificación apropiado utilizando técnicas de purificación de proteínas convencionales.

En otras realizaciones, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma, incluyendo una porción biológicamente activa de HIP/PAP tal como se describe arriba, puede producirse por técnicas de ADN recombinante que son familiares para un experto en la técnica.

30 De acuerdo con realizaciones adicionales, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma, incluyendo una porción biológicamente activa de HIP/PAP tal como se describe arriba, puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos convencionales.

35 Una proteína HIP/PAP aislada o purificada o un derivado de la misma, incluyendo una porción biológicamente activa de HIP/PAP tal como se describe arriba, está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de contaminación de la fuente celular o tisular de la que se deriva dicha proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos cuando se sintetiza químicamente.

40 Derivados de proteína HIP/PAP también abarcan proteínas HIP/PAP quiméricas o de fusión. Tal como se utiliza en esta memoria, una proteína quimérica o una proteína de fusión comprenden los polipéptidos citados anteriormente que están condensados a un polipéptido que no es HIP/PAP. Dentro de la proteína de fusión, el polipéptido HIP/PAP y el polipéptido no HIP/PAP están condensados entre sí. El polipéptido no HIP/PAP puede fusionarse al extremo N o al extremo C del polipéptido HIP/PAP.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST-HIP/PAP en la que la secuencia de HIP/PAP se fusiona con el extremo C de la secuencia de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de HIP/PAP recombinante.

45 En todos los casos, las proteínas de fusión de la invención son "biológicamente activas" de acuerdo con la definición anterior de esta expresión en esta memoria, que incluye que dichas proteínas de fusión poseen la misma actividad biológica que la HIP/PAP de SEQ ID N° 3.

50 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos para los fines de la presente invención, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos. Por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o en ambas de una primera y una segunda secuencias de aminoácidos para una alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden despreciarse para fines de comparación.

Para fines de comparación óptimos, el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede lograr con CLUSTAL W (versión 1.82) con los siguientes parámetros: (1) MODO CPU = ClustalW mp; (2) ALINEACIÓN = «lleno»; (3) FORMATO DE SALIDA = «aln w/números»; (4) ORDEN DE SALIDA = «alineado»; (5) ALINEACIÓN DE COLOR = «no»; (6) KTUP (tamaño de palabra) = «por defecto»; (7) LONGITUD DE VENTANA = «por defecto»; (8)

TIPO DE PUNTUACIÓN = «porcentaje»; (9) TOPDIAG = «por defecto»; (10) PAIRGAP = «por defecto»; (11) ÁRBOL FLOLOGENÉTICO/TIPO DE ÁRBOL = «ninguno»; (12) MATRIZ = «por defecto»; (13) HUECO ABIERTO = «por defecto»; (14) HUECOS EXTREMOS = «por defecto»; (15) EXTENSIÓN DE HUECO = «por defecto»; (16) DISTANCIAS DE HUECO = «por defecto»; (17) TIPO DE ÁRBOL = «cladograma» y (18) DISTANCIAS DE GRAPS DE ÁRBOL = «ocultar».

5 Porciones biológicamente activas de HIP/PAP incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de HIP/PAP de cualquiera de las SEQ ID N° 1 a 3, que incluyen el mismo número de aminoácidos que la correspondiente HIP/PAP de longitud completa, y exhiben al menos la misma actividad biológica que HIP/PAP.

10 Porciones biológicamente activas de HIP/PAP incluyen péptidos adicionales que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente homólogas a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de HIP/PAP de una cualquiera de las SEQ ID N° 1 a 3, que incluyen más aminoácidos que la correspondiente HIP/PAP de longitud completa, y exhiben al menos la misma actividad biológica que HIP/PAP.

15 Además de variantes alélicas que se producen de forma natural de la porción biológicamente activa de secuencias de HIP/PAP que existen en mamíferos, la persona experta en la técnica apreciará además que pueden introducirse cambios por mutación en la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID N° 1 a 3, lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de HIP/PAP sin alterar la actividad biológica de HIP/PAP.

20 Además, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos no esenciales en las secuencias correspondientes a una proteína HIP/PAP. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo de aminoácido que puede alterarse a partir de la secuencia de tipo salvaje de HIP/PAP sin alterar la actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para la actividad biológica.

Generalmente, los derivados de proteínas HIP/PAP abarcan sustancias que comprenden una proteína HIP/PAP o una porción biológicamente activa de HIP/PAP de la misma.

25 En determinadas realizaciones de estos derivados proteicos HIP/PAP, la proteína HIP/PAP de la porción biológicamente activa de HIP/PAP de la misma puede combinarse o asociarse con la porción no HIP/PAP de la misma a través de enlaces no covalentes. Realizaciones ilustrativas abarcan liposomas que comprenden una proteína HIP/PAP o una porción biológicamente activa de HIP/PAP de la misma, en donde la parte no HIP/PAP de la misma consiste en las partículas de liposomas en sí mismas. Dependiendo del tipo de liposomas que se consideren o, alternativamente, dependiendo del procedimiento utilizado para fabricar dichos liposomas, la proteína HIP/PAP o la porción biológicamente activa de la misma, puede estar localizada en la superficie del liposoma (p. ej., expuesta al entorno externo del liposoma) o alternativamente encapsulado en el mismo.

30 En determinadas otras realizaciones de estos derivados de proteína HIP/PAP, la proteína HIP/PAP de la porción biológicamente activa de HIP/PAP de la misma puede combinarse o asociarse con la porción no HIP/PAP de la misma a través de enlaces no covalentes. De forma ilustrativa, la proteína HIP/PAP, o la porción biológicamente activa de la misma, puede unirse covalentemente a una porción no HIP/PAP seleccionada de una proteína o a un compuesto no proteína tal como una molécula de polietilenglicol, en donde el derivado de HIP/PAP final consiste en una HIP/PAP pegilada o una porción biológicamente activa pegilada de la misma.

35 En un derivado de proteína HIP/PAP que se considera en su estado antes de su administración a un paciente que lo necesite, dicho derivado de proteína puede no ser "biológicamente activo", con la condición de que dicha proteína HIP/PAP sea biológicamente activa una vez administrada a dicho paciente.

40 Además, en un derivado de proteína HIP/PAP que se considera en su estado anterior a su administración a un paciente que lo necesite, dicho derivado de proteína puede ser ya "biológicamente activo".

45 Generalmente, cuando se utiliza para prevenir o tratar una lesión cerebral, o para cualquier otro uso de HIP/PAP descrito en esta memoria, una proteína HIP/PAP o un derivado de proteína de la misma está comprendido en una composición farmacéutica en una cantidad efectiva, en combinación con uno o más excipientes fisiológicamente aceptables.

50 Sin desear estar ligados a teoría particular alguna, los autores de la invención creen que la proteína HIP/PAP completa de la secuencia SEQ ID N° 2, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia CRD, y un pro-péptido, conduce a un mejor plegamiento de dicha proteína, particularmente cuando dicha proteína se produce a través de técnicas recombinantes de ADN en células eucariotas que han sido transfectadas con un casete de expresión que lo codifica. Incidentalmente, un plegamiento correcto de la HIP/PAP terapéuticamente activa puede mejorar la eficacia biológica de la composición farmacéutica que comprende dicha proteína, para prevenir o tratar una lesión cerebral provocada por hipoxia, en comparación con una composición que comprende sólo una parte de la proteína.

Sin embargo, otras formas de una proteína HIP/PAP que incluyen las formas polipeptídicas de SEQ ID N° 1 y 2, así como uno cualquiera de los derivados de HIP/PAP descritos en la presente memoria descriptiva, pueden utilizarse *in vitro* e *in vivo*, incluso si estos polipéptidos no consisten necesariamente en las realizaciones más preferidas de la presente invención.

5 En un aspecto más general, la presente divulgación se refiere al uso de una proteína HIP/PAP en un método para tratar la lesión cerebral neonatal provocada por una hipoxia cerebral. Sin desear estar ligado a teoría particular alguna, los autores de la invención creen que los diversos efectos de la proteína HIP/PAP sobre la lesión cerebral neonatal *in vitro* e *in vivo* que se describen en esta memoria también pueden ser útiles en situaciones patofisiológicas muy específicas del cerebro adulto o infantil, seleccionadas del grupo que consiste en accidentes cerebrovasculares.

10 Por lo tanto, dicha lesión cerebral en adultos o niños consiste en un accidente cerebrovascular, que también puede denominarse apoplejía.

15 Un accidente cerebrovascular o apoplejía consiste en una pérdida rápida de funciones del cerebro debida a una alteración en los vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro. Un accidente cerebrovascular abarca (i) una isquemia provocada por trombosis o embolia, que también puede denominarse "apoplejía isquémica" y (ii) una isquemia debido a una hemorragia, que también puede denominarse "apoplejía hemorrágica". Al igual que la lesión cerebral neonatal, un accidente cerebrovascular o apoplejía puede provocar daño neurológico permanente y puede conducir a la muerte. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, un accidente cerebrovascular o apoplejía consiste en un déficit neurológico de causa cerebrovascular que persiste más allá de las 24 horas o se interrumpe por la muerte en el espacio de 24 horas.

20 Un accidente cerebrovascular o apoplejía abarca apoplejía trombótica, apoplejía embólica, isquemia provocada por una disfunción cardíaca, hipoperfusión sistémica, trombosis venosa y hemorragia intracerebral.

Las lesiones cerebrales traumáticas provocan generalmente un deterioro del flujo de oxígeno en el cerebro como resultado de hemorragias cerebrales, hematomas o edema.

25 En algunas realizaciones, la lesión traumática cerebral en adultos o niños pertenece a lesiones cerebrales provocadas por hipoxia.

30 La lesión cerebral traumática (TBI) se produce cuando un trauma físico lesiona el cerebro y generalmente se clasifica como leve, moderada o grave, dependiendo del grado de pérdida de conciencia, pérdida de memoria y puntuación en una escala neurológica después de la lesión. El diagnóstico y la escala de la lesión cerebral traumática se realizan de forma convencional mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la Escala de Coma de Glasgow (GCS) (Arlinghaus et al., 2005, *Textbook of Traumatic Brain Injury*, Washington, DC: American Psychiatric Association, págs.: 59 -62), un método de determinación de la duración de la amnesia post-traumática (PTA por sus siglas en inglés) y un método para determinar a escala la pérdida de conciencia (LOC por sus siglas en inglés) (Rao et al., 2000, *Psychosomatics*, Vol. 41 (n° 2) : 95-103). En general, se acepta que una TBI con una GCS de 13 o más es leve, mientras que una GCS de 9 a 12 es moderada y una GCS de 8 o menos es grave. De forma ilustrativa, se determina una puntuación de GCS de 13 a 15 para una persona cuya duración de amnesia post-traumática (PTA) es inferior a 24 horas y cuya duración de la pérdida de conciencia (LOC) oscila entre 0 y 30 minutos. Todavía ilustrativamente, se determina una puntuación GCS de 9 a 12 para una persona cuya duración de amnesia post-traumática (PTA) oscila entre 1 y 7 días y cuya duración de la pérdida de conciencia (LOC) oscila entre 30 minutos y 24 horas. Aún ilustrativamente, se determina una puntuación de GCS de 3 a 8 para una persona cuya duración de amnesia post-traumática (PTA) es de más de 7 días y cuya duración de la pérdida de conciencia (LOC) es de más de 24 horas.

Entre las similitudes fisiológicas entre la lesión cerebral traumática y la lesión cerebral neonatal, la lesión cerebral traumática TBI va acompañada de hemorragias debido a la ruptura de los vasos sanguíneos la cual provoca hipoxia.

45 La proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma pueden utilizarse para prevenir o tratar lesiones cerebrales traumáticas que tienen puntuaciones de clasificación GCS que varían de 3 a 15. Por lo tanto, la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma se puede utilizar para prevenir o tratar lesiones cerebrales traumáticas seleccionadas del grupo que consiste en TBI "leve" (puntuación GSC que varía de 13 a 15), TBI moderada (puntuación GCS que varía de 9 a 12) y TBI grave (puntuación GSC que varía de 3 a 8). Típicamente, las TBI leves tienen una puntuación GCS que varía de 13 a 15, una puntuación PTA de menos de una hora y una puntuación LOC inferior a 30 minutos. Típicamente, las TBI moderadas tienen una puntuación GCS que varía de 9 a 12, una puntuación PTA que varía de 30 minutos a 24 horas y una puntuación LOC que varía de 1 a 24 horas. Típicamente, las TBI graves tienen una puntuación GCS que varía de 3 a 8, una puntuación PTA de más de un día y una puntuación LOC de más de un día.

55 Se cree que una proteína HIP/PAP demostrará ser terapéuticamente útil en métodos para tratar la TBI en general, independientemente de la puntuación de GCS que se haya determinado para el paciente a tratar.

- La utilidad terapéutica de HIP/PAP para tratar la TBI abarca el tratamiento de la lesión cerebelosa traumática directa es mucho menos común que las TBIs frontales o temporales. Sin embargo, el cerebelo se ve afectado a menudo, incluso cuando la lesión inicial no implica directamente a esta estructura. Dicha lesión indirecta puede inducir una pluralidad de trastornos neurológicos que incluyen inestabilidad postural, temblor, alteraciones en el equilibrio y habilidades motoras finas y déficits cognitivos. Incluso si las causas del daño indirecto al cerebelo que resultan de un trauma supratentorial no se comprenden completamente, varios estudios sugieren la implicación de excitotoxicidad (liberación excesiva del neurotransmisor glutamato) en la transmisión del daño al cerebelo (Potts et al., *Cerebellum*, 2009, (8), 211-221).
- Sin desear estar ligados a teoría particular alguna, los autores de la invención creen que una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma puede proteger las neuronas del cerebelo del daño indirecto del cerebelo que resulta de la TBI en pacientes infantiles o adultos al proteger a la célula cerebelosa de la excitotoxicidad.
- Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente memoria descriptiva también se refiere al uso de una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma para tratar o prevenir la lesión del cerebelo traumática indirecta que resulta de la TBI.
- Se cree que la proteína HIP/PAP debe administrarse a los pacientes afectados con TBI durante la fase aguda, aunque también se puede administrar durante la fase crónica.
- La TBI abarca TBI focal o difusa. La TBI difusa incluye edema y lesión axonal difusa, que es un daño generalizado a los axones, incluidos los tractos de materia blanca y la proyección a la corteza. La TBI difusa también abarca una conmoción cerebral y una lesión axonal difusa, un daño generalizado a los axones en zonas que incluyen la materia blanca y los hemisferios cerebrales.
- Para la TBI focal, las zonas más comunes para tener lesiones focales en TBI penetrante son la corteza orbitofrontal y los lóbulos temporales anteriores, que consisten en zonas que están implicadas en el comportamiento social, la regulación de emociones, el olfato y la toma de decisiones. Un tipo de lesión focal, laceración cerebral, se produce cuando el tejido cerebral se corta o se desgarrar.
- Lesiones cerebrales traumáticas incluyen, sin limitación, TBI frontal, TBI temporal, TBI cerebelosa directa y TBI cerebelosa indirecta.
- Como ya se mencionó en la presente memoria descriptiva, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma puede proteger a las neuronas cerebelosas *in vitro* de la muerte oxidativa y excitotóxica.
- Sin desear estar ligado por teoría particular alguna, los autores de la invención creen que una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma puede proteger a las neuronas cerebelosas de la muerte que se produce en diversos trastornos cerebelosos tales como las ataxias cerebelosas.
- En tales condiciones, se puede observar una atrofia cerebelosa.
- Por lo tanto, la presente memoria descriptiva también se refiere al uso de una proteína HIP/PAP o a un derivado de la misma para tratar o prevenir una ataxia cerebelosa.
- Tal como se utiliza en esta memoria, la ataxia cerebelosa se refiere a la disfunción del cerebelo. Las ataxias cerebelosas pueden provocar una diversidad de déficits neurológicos elementales tales como hipotonía antagonista, asinergia, dismetría, discronometría y disdiadococinesia.
- Las ataxias cerebelosas abarcan ataxias espinocerebelosas heredadas y ataxias cerebelosas adquiridas.
- En alguna realización, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma para tratar ataxias espinocerebelosas inherentes.
- Las ataxias espinocerebelosas inherentes incluyen, sin limitación, ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes (SCA por sus siglas en inglés) y ataxias espinocerebelosas autosómicas recesivas.
- Ejemplos de ataxias espinocerebelosas autosómicas dominantes incluyen SCA1 (autosómica dominante tipo 1), SCA2, SCA3, SCA4, SCA6, SCA7, SCA8, SCA9, SCA10, SCA11, SCA12, SCA13, ataxia episódica tipo 1 (EA-1) y ataxia episódica tipo 2 (EA-2).
- Las ataxias espinocerebelosas autosómicas recesivas incluyen, sin limitación, ataxia de Friedreich, ataxia telangiectasia y ataxia espinocerebelosa de aparición infantil.
- En algunas realizaciones, la presente memoria descriptiva se refiere al uso de una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma para tratar y prevenir las ataxias cerebelosas adquiridas.

Las ataxias cerebelosas adquiridas incluyen, sin limitación, el síndrome paraneoplásico, las ataxias cerebelosas inducidas por intoxicación, las ataxias infecciosas y las ataxias cerebelosas vasculares.

5 La ataxia cerebelosa inducida por intoxicación puede ser provocada por la exposición a tóxicos tales como disolventes, gasolina y metales pesados, la ingesta de productos tales como alcohol, barbitúricos o litio y fármacos quimioterapéuticos citotóxicos.

Las ataxias infecciosas abarcan ataxias provocadas por infecciones virales, bacterianas o priónicas.

Por ejemplo, las ataxias cerebelosas infecciosas virales pueden ser el resultado de encefalopatías virales y post-virales.

10 Las ataxias cerebelosas infecciosas bacterianas incluyen, sin limitación, ataxias resultantes de la sífilis meningovascular o la enfermedad de Lyme.

Las ataxias vasculares incluyen, sin limitación, ataxias provocadas por accidente cerebrovascular isquémico, incluyendo infarto cerebeloso, hemorragia o hematoma subdural.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, "lesión cerebral", independientemente de si dicha lesión cerebral consiste en una lesión cerebral neonatal, una lesión cerebral infantil o una lesión cerebral en adultos, no abarca lesiones cerebrales que son provocadas inicialmente por una desmielinización de células neuronales. En otras palabras, "lesión cerebral" no abarca las lesiones provocadas al cerebro por una enfermedad desmielinizante, independientemente del tipo de enfermedad desmielinizante, p. ej., enfermedad autoinmune o hereditaria. Por lo tanto, como se pretende en esta memoria, "lesión cerebral" no abarca una lesión cerebral provocada por una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, encefalomiелitis diseminada aguda, miелitis transversa, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barré, mielinosiс central pontina, enfermedad de Tay-Sachs, así como enfermedades desmielinizantes heredadas tales como enfermedades por leucodistrofia y de Charcot Marie Tooth. Tal como se utiliza en esta memoria, las enfermedades de leucodistrofia abarcan adrenoleucodistrofia (clasificación de la OMS n° E71.3), adrenomiелoneuropatía (clasificación de la OMS n° E71.3), leucodistrofia metacromática (clasificación de la OMS n° E75.2), enfermedad de Krabbe (clasificación de la OMS n° E75.2), enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (clasificación de la OMS n° E75.2), enfermedad de Canavan, ataxia infantil con hipomelinación central (CACH por sus siglas en inglés), leucoencefalopatía con materia blanca que se desvanece, enfermedad de Alexander, enfermedad de Refsum (clasificación de la OMS n° G60.1), enfermedad de Zellweger, síndrome de Aicardi-Goutieres, leucodistrofia megalocéfálica y xantomatosis cerebrotendinosa.

30 Como ya se mencionó en la presente memoria descriptiva, debido a la actividad de HIP/PAP en la producción o fosforilación de Gap-43 que se ha mostrado aquí, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma también se puede utilizar *in vitro* e *in vivo* para la modulación, potenciación o mejora del crecimiento neuronal o la plasticidad mediada por Gap-43, una proteína neuronal relacionada con el crecimiento.

35 Por lo tanto, esta invención también concierne al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar un trastorno o una enfermedad que implica un defecto o una desregulación de la producción de Gap-43 o un defecto o una desregulación de la fosforilación de Gap-43. que incluye la enfermedad de Alzheimer.

Merece la pena mencionar que ya se ha alegado en la técnica que las proteínas relacionadas con HIP/PAP son útiles para actuar sobre la enfermedad de Alzheimer, pero sin ningún resultado experimental de partida que respalde técnicamente tales alegaciones de actividad.

40 En contraposición, la actividad biológica de una proteína HIP/PAP en la producción o en la fosforilación de la proteína Gap-43 sustenta por primera vez la utilidad de dicha proteína HIP/PAP para prevenir o tratar la enfermedad de Alzheimer.

45 De hecho, es bien sabido por el experto en la técnica que en la enfermedad de Alzheimer se produce un defecto en la producción o en la fosforilación de la proteína Gap-43. De manera notable, se ha demostrado en la técnica que la producción de una proteína Gap-43 inactiva está implicada en pacientes afectados con una enfermedad de Alzheimer. Además, una fosforilación alterada de Gap-43 se ha mostrado previamente en la técnica en pacientes afectados con una enfermedad de Alzheimer.

Por lo tanto, esta memoria descriptiva también se refiere al uso de una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma para prevenir o tratar una enfermedad de Alzheimer.

50 La presente memoria descriptiva también concierne a un método para prevenir o tratar una enfermedad de Alzheimer que comprende una etapa de administrar, a un paciente que lo necesita, una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma.

Esta memoria descriptiva también se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado de proteico de la misma para prevenir o tratar estados patológicos que preceden a la aparición de la enfermedad de Alzheimer *per se*, que incluye deterioro cognitivo mental.

5 En otras palabras, esta memoria descriptiva también se refiere al uso de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma para prevenir o tratar deficiencias cognitivas mentales que se producen antes de la enfermedad de Alzheimer *per se*.

Debido a que se ha demostrado en los ejemplos en esta memoria que una proteína HIP/PAP tiene la capacidad de rescatar células neuronales *in vitro*, entonces también se ha demostrado que una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma es útil como agente para mantener o mejorar la viabilidad o el crecimiento de células neuronales cultivadas. Entonces, los resultados de los ejemplos de esta memoria respaldan la utilidad de una proteína HIP/PAP o de un derivado de la misma como un agente de cultivo de células neuronales que puede añadirse a un medio de cultivo de células neuronales.

Esta memoria descriptiva también abarca el uso de una proteína HIP/PAP para el cultivo *in vitro* de células neuronales, incluyendo cultivos primarios de células neuronales y cultivos de líneas celulares neuronales.

15 La presente memoria descriptiva también pertenece a un medio de cultivo para células neuronales que comprende una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma. Aparte de la presencia de una proteína HIP/PAP o de un derivado de la misma, la constitución cualitativa y cuantitativa de un medio de cultivo apropiado se determina fácilmente por un experto en la técnica. De forma ilustrativa, la proteína HIP/PAP o el derivado de la misma se pueden añadir simplemente a un medio de cultivo conocido, adecuado para células neuronales, p. ej., en un medio de cultivo RPMI 20 199.

Dicho medio de cultivo comprende una cantidad efectiva de dicha proteína HIP/PAP o de dicho derivado de la misma. La concentración final de una proteína HIP/PAP o un derivado de la misma en un medio de cultivo de arriba oscila preferiblemente entre 1 ng/mL y 10 mg/ml.

25 Con respecto a los usos *in vivo*, la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma está preferiblemente comprendida como un ingrediente activo en una composición farmacéutica.

Dicha composición farmacéutica comprende la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Dicha composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma.

30 Habitualmente, una composición farmacéutica que se puede utilizar de acuerdo con la invención comprende de 0,1% en peso a 99,9% en peso de la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma, basado en el peso total de la composición farmacéutica. Por lo tanto, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender al menos 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30 %, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 35 90% en peso o más de la proteína HIP/PAP, o un derivado proteico de la misma, basado en el peso total de la composición farmacéutica. También, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender hasta 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% en peso o menos de uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, basado en el peso total de la composición farmacéutica.

40 La dosis terapéuticamente eficaz de la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma variará, por supuesto, dependiendo de factores tales como la afección patológica a tratar (incluida la prevención), el método de administración, el tipo de compuesto que se esté utilizando para el tratamiento, cualquier co-terapia implicada, la edad del paciente, el peso, la condición médica general, el historial médico, etc., y su determinación está dentro de las habilidades de un médico en ejercicio. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta valore la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el máximo efecto terapéutico. El médico 45 administrará la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado para el tratamiento de la afección en cuestión.

La afección a tratar se refiere a una de las afecciones patológicas que se describen en la presente solicitud tales como una lesión cerebral neonatal provocada por hipoxia, una lesión cerebral en adultos o niños provocada por hipoxia tal como accidente cerebrovascular, TBIs y trastornos cerebelosos.

50 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "paciente" se refiere a un paciente recién nacido, un paciente infantil o un paciente adulto, incluyendo este último a una paciente embarazada.

Tal como se utiliza en esta memoria más particularmente, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma consiste en la cantidad de proteína HIP/PAP o derivado de la misma que puede revertir, al

menos parcialmente, los daños físicos provocados al cerebro durante una lesión del cerebro de un recién nacido. Particularmente, una cantidad eficaz de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma consiste en la cantidad de proteína HIP/PAP o derivado de la misma que reduce o bloquea la muerte de células neuronales que se produce durante la lesión cerebral neonatal.

5 Partiendo de los resultados mostrados en los ejemplos de esta memoria, la cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg de peso corporal y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma abarca cantidades de al menos 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4  
10 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 20 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 50 µg/kg, 60 µg/kg, 70 µg/kg, 80 µg/kg, 90 µg/kg, 100 µg/kg, 200 µg/kg, 300 µg/kg, 400 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1 mg/kg o más de peso corporal del paciente.

En el caso de una lesión neonatal, el término "paciente" se refiere al paciente recién nacido, incluido el feto, así como a la paciente embarazada.

15 Para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal en el cuerpo del feto, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra preferiblemente al cuerpo adulto gestante. Sin embargo, en algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica puede administrarse directamente al cuerpo del feto, utilizando instrumentación médica de endoscopia específica.

20 Para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal del neonato durante el parto o posterior al parto, así como para prevenir o tratar una lesión cerebral del adulto, se administra una composición farmacéutica de acuerdo con la invención al cuerpo neonato o al cuerpo del adulto, respectivamente.

En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra sistémicamente.

25 En otras determinadas realizaciones, una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra localmente a través de una ruta intracraneal, especialmente al cuerpo del feto o al cuerpo del recién nacido en el que la formación del hueso del cráneo no está terminada.

La ruta de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma está de acuerdo con métodos conocidos, p. ej., mediante inyección o infusión por vía intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, oral, tópica o rutas de inhalación, o mediante sistemas de liberación sostenida tal como se indica más adelante.

30 En algunas realizaciones, la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma o, alternativamente, la composición farmacéutica que la contiene, se administra como una dosis única.

35 En algunas otras realizaciones, la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma o, alternativamente, la composición farmacéutica que la contiene, se administra como una pluralidad de dosis a intervalos de tiempo determinados, p. ej., comenzando desde el momento del diagnóstico de lesión cerebral o desde el momento en que se diagnostica la expectativa de lesión cerebral, y hasta el momento en que el cuerpo tratado está fuera de peligro.

En determinadas realizaciones de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención, la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma se puede combinar con uno o más de otros ingredientes activos útiles para prevenir o tratar una lesión cerebral provocada por una hipoxia cerebral, incluyendo uno o más ingredientes activos ya conocidos en la técnica por ser útiles para prevenir o tratar una lesión cerebral neonatal.

40 Composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención pueden prepararse para el almacenamiento mezclando la molécula deseada que tiene el grado apropiado de pureza con soportes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. comp. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Soportes, excipientes o estabilizadores  
45 aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico, alquil-parabenos tales como metil- o propil-parabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros  
50 hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN.TM., PLURONICS.TM. o polietilenglicol (PEG).

Ejemplos adicionales de soportes de este tipo incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrógeno-fosfato disódico, hidrógeno-fosfato de potasio, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa y polietilenglicol. Soportes para formas tópicas o basadas en gel de la HIP/PAP o sustancias derivadas de la misma de acuerdo con la invención incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan adecuadamente formas de depósito convencionales. Tales formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, emplastos, formas de inhalación, aerosoles nasales, tabletas sublinguales y preparaciones de liberación sostenida. La proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma se formulará típicamente en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

La proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma a utilizar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. La proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma se almacenará habitualmente en forma liofilizada o en solución si se administra por vía sistémica. Si está en forma liofilizada, la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma se formula típicamente en combinación con otros ingredientes para la reconstitución con un diluyente apropiado en el momento del uso. Un ejemplo de una formulación líquida de la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma es una solución no conservada estéril, transparente e incolora, cargada en un vial de dosis única para inyección subcutánea. Composiciones farmacéuticas conservadas adecuadas para uso repetido pueden contener, por ejemplo, dependiendo principalmente de la indicación y del tipo de polipéptido:

- a) la proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma;
- b) un tampón capaz de mantener el pH en un intervalo de estabilidad máxima del polipéptido u otra molécula en solución, preferiblemente alrededor de 4-8;
- c) un detergente/tensioactivo, principalmente para estabilizar el polipéptido o la molécula contra la agregación inducida por la agitación;
- d) un isotonicador;
- e) un conservante seleccionado del grupo de fenol, alcohol bencílico y un haluro de bencetonio, p. ej., cloruro; y
- f) agua.

Si el detergente empleado es no iónico, puede ser, por ejemplo, polisorbatos (p. ej., Polysorbate®, Tween®) 20,80, etc.) o poloxámeros (p. ej., Poloxamer®. 188). El uso de tensioactivos no iónicos permite que la formulación se exponga a tensiones superficiales de cizallamiento sin provocar la desnaturalización del polipéptido. Además, tales formulaciones que contienen tensioactivo se pueden emplear en dispositivos de aerosol tales como los utilizados en una dosificación pulmonar, y pistolas de inyección de chorro sin aguja (véase, p. ej., el documento EP 257.956).

Puede estar presente un isotonicador para asegurar la isotonicidad de una composición líquida de la proteína HIP/PAP o del derivado proteico de la misma, e incluye alcoholes de azúcar polihídricos, preferiblemente alcoholes trihídricos o de azúcar superiores, tales como glicerol, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol. Estos alcoholes de azúcar se pueden utilizar solos o en combinación. Alternativamente, se puede utilizar cloruro sódico u otras sales inorgánicas apropiadas para hacer que las soluciones sean isotónicas.

El tampón puede ser, por ejemplo, un tampón acetato, citrato, succinato o fosfato, dependiendo del pH deseado. El pH de un tipo de formulación líquida de esta invención está tamponado en el intervalo de aproximadamente 4 a 8, de preferencia aproximadamente pH fisiológico.

Los conservantes fenol, alcohol bencílico y haluros de bencetonio, p. ej., cloruro, son agentes antimicrobianos conocidos que se pueden emplear.

Las composiciones de la proteína terapéutica HIP/PAP o derivado proteico de la misma se colocan generalmente en un recipiente que tiene una lumbrera de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Las formulaciones se administran preferentemente como inyecciones intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.) o intramusculares (i.m.) repetidas, o como formulaciones en aerosol adecuadas para la administración intranasal o intrapulmonar (para la administración intrapulmonar, véase, p. ej., el documento EP 257.956).

La proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma también se puede administrar en forma de preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices

semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) tal como se describe por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Pat. de EE.UU. N° 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al., supra), copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot.T.M. (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxitubirico (documento EP 133.988).

10 Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

20 La proteína HIP/PAP de liberación prolongada o el derivado proteico de la misma también incluye polipéptidos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen el polipéptido de interés se preparan por métodos conocidos per se: documento DE 3.218.121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; Pat. de EE.UU. N°s 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 25 102.324. Normalmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido de lípidos es mayor que aproximadamente 30% en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima.

La dosis terapéuticamente eficaz de una proteína HIP/PAP o de un derivado proteico de la misma variará, por supuesto, dependiendo de factores tales como la afección patológica a tratar (incluida la prevención), el método de administración, el tipo de compuesto que se utilice para el tratamiento, cualquier co-terapia involucrada, la edad del paciente, el peso, el estado médico general, el historial médico, etc., y su determinación está dentro de las habilidades de un médico en ejercicio. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta valore la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el máximo efecto terapéutico. El médico administrará la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado para el tratamiento de la afección en cuestión.

La vía de administración está de acuerdo con métodos conocidos, p. ej., administración por inyección o infusión por vía intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraocular, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o rutas de inhalación, o administración por sistemas de liberación sostenida tal como se indica más adelante. La HIP/PAP o un derivado proteico de la misma también se administran adecuadamente mediante rutas intralesionales o perilesionales, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Ejemplos de sales farmacológicamente aceptables de moléculas que forman sales y son útiles a continuación incluyen sales de metales alcalinos (p. ej., sal de sodio, sal de potasio), sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sal de calcio, sal de magnesio), sales de amonio, sales de bases orgánicas (p. ej., sal de piridina, sal de trietilamina), sales de ácidos inorgánicos (p. ej., hidrocloreuro, sulfato, nitrato) y sales de ácidos orgánicos (p. ej., acetato, oxalato, p-toluenosulfonato).

La proteína HIP/PAP o el derivado proteico de la misma también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Técnicas de este tipo se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína HIP/PAP o un derivado proteico de la misma, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Pat. de EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT.TM. (microesferas inyectables compuestas de copolímero de

- ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-D(-)-ácido 3-hidroxitútrico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y. Se pueden idear diversas estrategias racionales de estabilización, dependiendo del mecanismo de desnaturalización implicado. Estas estrategias pueden lograrse modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones de carácter ácido, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.
- 10 La presente invención se ilustra adicionalmente, sin limitación, por los siguientes ejemplos.

### **EJEMPLOS**

Se produjo una proteína HIP/PAP humana recombinante en un sistema bacteriano de *E. coli*, y luego se purificó. El producto resultante se denominó ALF-5755. En comparación con HIP/PAP SEQ ID N° 2, ALF-5755 de SEQ ID N° 3 tiene un solo aminoácido extra, una metionina, en el extremo terminal NH<sub>2</sub>.

#### **15 Ejemplo 1: Efectos *in vitro* de una proteína HIP/PAP en un modelo de lesión cerebral neonatal**

##### **A. Materiales y métodos**

###### *Cultivo de Neuronas Corticales.*

- Se prepararon cultivos primarios de neuronas corticales a partir de ratones embrionarios E14.5. En síntesis, los fetos se retiraron del útero y se colocaron en una placa de Petri estéril. Los cerebros se cortaron y se colocaron en HBSS 1x con HEPES 1 M (Invitrogen). Utilizando un microscopio de disección, se diseccionaron cerebros, meninges, ganglios basales e hipocampo y las neocortezas se colocaron en medio Neurobasal que contenía suplemento B27 (Invitrogen). Luego, la neocorteza se disoció con tripsina al 0,25% - EDTA al 0,02% y se incubó con DNasa 1 (Sigma St-Quentin Fallavier, Francia). Las células se sembraron con MEM1X y suero de caballo al 10% a una densidad de 80000 células/pocillo en placas de 96 pocillos recubiertas con poli-DL-ornitina (Sigma St-Quentin Fallavier, Francia).
- 25 Dos a cuatro horas después de la siembra, el medio se retiró y se sustituyó con Neurobasal plus B27. Tres días más tarde, las células se trataron con 5 µM de AraC (citosina arabinósido) para frenar la proliferación glial. Entre DIV10 y DIV12, las neuronas fueron tratadas durante 8 horas con uno u otro producto:

- (i): PBS;
- (ii): 3 µg/ml o 5 µg/ml de ALF-5755;
- 30 (iii): 300 µM de NMDA;
- (iv): 300 µM de NMDA más 10 µM de MK801 o
- (v): 300 µM de NMDA y 3 µg/ml o 5 µg/ml de ALF-5755.

###### Medición de la viabilidad Celular

- La viabilidad celular se controló utilizando el ensayo MTS/Formazan (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Charbonnières, Francia).

###### *Análisis de Transferencia Western.*

- Se extrajeron proteínas totales de cultivos neuronales tratados (véase más adelante) y del neopalo derecho de crías que habían recibido inyecciones intraparenquimales P5 de PBS, 10 µg de ibotenate, 0,3 µg de ALF-5755 (que se ha determinado como la mejor concentración de ALF-5755) o 10 µg de ibotenate con 0,3 µg de ALF-5755. Se mató a las crías 4, 24, 48 o 120 horas después de la administración de los fármacos. Las proteínas se extrajeron de acuerdo con el protocolo de un kit disponible comercialmente (Cell Signaling Technology).
- 40 Anti-Total-Gap43 y anti-Ser41-fosfo-Gap43 se utilizaron a una concentración de 1/1000. Para estandarizar la expresión de la proteína entre las muestras, los autores de la invención utilizaron un anticuerpo anti-b-tubulina de cabra (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1/10000. Los experimentos de transferencia Western se realizaron por duplicado. Las diferencias en las concentraciones de proteínas entre las muestras se estimaron utilizando ImageJ.

###### *Inmunocitoquímica.*

5 Para Total Gap-43, FosfoGap43 y las detecciones del cono de crecimiento (2G13), los cultivos celulares tratados se fijaron en PFA al 4% y reaccionaron con anticuerpo anti-Total-Gap43 de pollo (Interchim; 1/200), anticuerpo anti-Ser41-FosfoGap43 de conejo (Novus Biologicals 1/200), anticuerpo anti-Cono de Crecimiento 2G13 de ratón (Novus Biologicals 1/200). La detección de antígenos marcados se realizó con un anticuerpo anti-pollo de burro conjugado con Cy3, anticuerpo anti-conejo de burro conjugado con AMCA y anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con Alexa 488 (Jackson Immunoresearch).

#### *Análisis estadístico*

Para estudiar el efecto de cada uno de los tratamientos, los datos se analizaron con un test de Kruskal-Wallis.

#### **B. Resultados**

10 Se produjo una proteína HIP/PAP humana recombinante en un sistema bacteriano de *E. coli*, y luego se purificó. El producto resultante se denominó ALF-5755. En comparación con HIP/PAP SEQ ID N° 2, ALF-5755 de SEQ ID N°3 tiene un único aminoácido extra, una metionina, en el extremo terminal NH2.

15 Se han realizado estudios bioquímicos, biológicos y funcionales de ALF-5755. Estos establecieron que ALF-5755 exhibía las mismas actividades biológicas, especialmente actividades mitogénicas y antiapoptóticas, como las que se habían demostrado previamente que pertenecían a HIP/PAP en varios modelos animales diferentes.

La eficacia neuroprotectora de ALF-5755, *in vitro* contra la muerte celular inducida por N-metil-D-aspartato (NMDA), se ha estudiado en cultivos neuronales corticales de ratones primarios.

20 Las propiedades de neuroprotección *in vitro* de ALF-5755 han sido evaluadas utilizando un modelo bien establecido de cultivos neuronales primarios (neuronas del hemisferio cerebral de ratones E14 Swiss expuestos a NMDA). Los experimentos se realizaron entre el día 8 y el día 12 desde el inicio del cultivo. Se añadieron dosis de HIP/PAP (que oscilaban entre 150 ng/ml y 10 µg/ml) al medio de cultivo inmediatamente después o 3 horas después del comienzo de una intoxicación de 8 horas por 300 µM de NMDA o por 10, 30, 100 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La viabilidad celular se midió luego utilizando un ensayo de MTT.

25 La muerte neuronal después de la exposición a NMDA solo (sin tratamiento con ALF-5755) fue del 60% de las neuronas. El tratamiento con ALF-5755 provocó una disminución significativa, dependiente de la dosis, de la proporción de muerte neuronal. La disminución en la muerte neuronal fue máxima (35% de muerte neuronal frente al 45% sin ALF-5755) a 5 µg/ml de ALF-5755 cuando se añadió inmediatamente después del comienzo del insulto. También se observó un efecto neuroprotector de ALF-5755 cuando se añadió 3 horas después del comienzo del insulto.

30 La exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo induce una disminución dependiente de la dosis de la supervivencia celular por daño oxidativo, que es máxima a 100 µM de exposición (64% de la muerte neuronal). El tratamiento con ALF-5755 revierte total o parcialmente la toxicidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este efecto protector es máximo para 3 µg/ml de ALF-5755. Los efectos protectores de ALF-5755 fueron equiparables a los observados con catalasa. Los efectos protectores de ALF-5755 se observan si el fármaco se agrega inmediatamente después de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 3 horas después del insulto.  
35 ALF-5755 muestra propiedades antioxidantes. Estudios de inmunocitoquímica (ICC por sus siglas en inglés) y Transferencia Western (WB por sus siglas en inglés) se realizaron en cultivos neuronales para determinar los efectos de ALF-5755 en la producción, el estado de fosforilación en serina 41 (S41) y la distribución de GAP-43, una proteína implicada en el crecimiento axonal y la plasticidad neuronal.

40 Cuando se añade inmediatamente después de NMDA, ICC demuestra que ALF-5755 induce una distribución fascicular de procesos neuronales marcados con GAP-43. Este efecto es óptimo a 5 µg/ml y no se observa en los cultivos de control, en cultivos tratados con NMDA o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o en los cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ALF-5755. Además, ICC demuestra que ALF-5755 induce una expresión incrementada de fosfo-GAP-43 en procesos neuronales, cuando se compara con cultivos de control o con cultivos tratados con NMDA o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo.

45 Los análisis de transferencia Western de extractos de neuronas cultivadas permitieron cuantificar los cambios de los niveles totales de GAP-43 y fosfo-GAP-43. NMDA no indujo cambio significativo alguno en la cantidad de GAP-43. Por el contrario, ALF-5755 solo indujo una disminución dependiente de la dosis de GAP-43 total, pero un aumento significativo de la proporción de GAP-43 fosforilada (fosfo GAP-43/Gap-43 total). El efecto de ALF-5755 en GAP-43 fue aún más pronunciado en cultivos expuestos a NMDA. Estos cambios en el estado de fosforilación de GAP-43 inducidos por ALF-5755 podrían explicar la fasciculación observada en cultivos expuestos a ALF-5755.

En conjunto, estos datos sustentan la hipótesis de que ALF-5755 evita la muerte neuronal excitotóxica y oxidativa *in vitro*. Además de ello, ALF-5755 induce cambios similares a la plasticidad, incluida la fosforilación y fasciculación GAP-43.

## **Ejemplo 2: Efectos *in vivo* de una proteína HIP/PAP en un modelo de lesión cerebral neonatal**

### **5 A. Materiales y Métodos**

#### *Animales*

En este estudio se utilizaron ratones suizos de ambos sexos. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de revisión institucional y cumplen las directrices del 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale'.

### **10 *Fármacos***

Ibotenato (Sigma, St-Quentin Fallavier, Francia), ALF-5755, NMDA (Tocris, Bristol, Reino Unido) y MK801 (Sigma, St-Quentin Fallavier, Francia) se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

#### *Administración de Fármacos Excitotóxicos*

15 Se indujeron lesiones cerebrales excitotóxicas inyectando ibotenoato en cerebros de ratón en desarrollo tal como se describió previamente (Marret et al., 1995, Gressens et al., 1997, 1998, Bac et al., 1998; Dommergues et al., 2000; Tahraoui et al., 2001; Laudénbach et al., 2001, 2002; Husson et al., 2002). En síntesis, crías de ratón fueron inyectadas intracerebralmente (en el parénquima neopallial) el día P5. Las inyecciones intraparenquimatosas se realizaron con una aguja de calibre 25 en una jeringuilla Hamilton de 50 µl montada en un microdispensador calibrado. La aguja se insertó 2 mm por debajo de la superficie externa de la piel del cuero cabelludo en el área frontoparietal del hemisferio derecho, a 2 mm de la línea media en el plano lateral medial y 3 mm anterior a la bregma en el plano rostro-caudal. Se inyectaron dos dosis de 1 µl de ibotenoato o ibotenoato más ALF-5755 o PBS a intervalos de 20 s. El primer bolo corresponde a una inyección localizada en la materia blanca y el segundo bolo representa la inyección cortical. Se administraron 10 µg de ibotenoato o 10 µg de ibotenoato más ALF-5755 (intervalo: 0,0015 µg-0,15 µg) o PBS a cada una de las crías.

25 Para algunas crías, se ha inyectado ALF-5755 por vía intraperitoneal inmediatamente o 3 horas después de la inyección de ibotenoato en diferentes concentraciones (de 0,0015 µg a 1,5 µg).

#### *Grupos Experimentales*

Se utilizaron crías de al menos dos camadas diferentes en cada uno de los grupos experimentales, y los datos se obtuvieron a partir de dos o más experimentos sucesivos.

30 Se constituyeron tres grupos diferentes dependiendo de cómo se inyectó ALF-5755 (co-administrado por vía intraperitoneal con ibotenoato, inyectado por vía intraperitoneal de forma inmediata o 1 a 5 horas después de la inyección de ibotenoato).

El primer grupo de crías P5 recibió una inyección intraparenquimatosas de ibotenoato con PBS (vehículo control) o con 0,003, 0,015, 0,03 o 0,3 µg de ALF-5755.

35 En el segundo conjunto de experimentos diseñados para comparar la inyección intraparenquimatosas con la inyección intraperitoneal de ALF-5755, las crías P5 recibieron una inyección intraparenquimatosas de ibotenoato con PBS y luego una inyección intraperitoneal de ALF-5755 a varias concentraciones (0,0015, 0,0075, 0,015, 0,075, 0,15, 0,75 o 1,5 µg de ALF-5755).

40 Para saber si ALF-5755 puede reparar, en lugar de prevenir, las lesiones de ibotenoato, el tercer grupo de crías de ratón P5 recibió una inyección intraperitoneal retrasada de 0,75 o 1,5 µg de ALF-5755 3 horas después de la inyección intraparenquimatosas de ibotenoato. Una o cinco horas después de la inyección de ibotenoato se analizó una sola concentración de ALF-5755 por vía intraperitoneal (1,5 µg).

#### *Determinación del Tamaño de la Lesión*

45 Se utilizaron 12 crías de ratón en cada uno de los grupos experimentales. Las crías de ratón fueron sacrificadas por decapitación 120 h después del enfrentamiento excitotóxico. Los cerebros se fijaron inmediatamente en formalina al 4% durante al menos 4 días. Después de la inclusión en parafina, los autores de la invención cortaron secciones coronales de 20 µm de espesor. Cada tercera sección se tiñó con cresil-violeta. Estudios previos (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1997; Husson et al., 2002) han demostrado una excelente correlación entre el tamaño máximo de la lesión en los ejes lateral-medial y fronto-occipital de las lesiones excitotóxicas. Esto permitió una determinación

precisa y reproducible de los diámetros fronto-occipitales máximos de las lesiones, que es igual al número de secciones en donde la lesión estaba presente, multiplicada por 20  $\mu\text{m}$ .

## B. Resultados

5 El potencial neuroprotector de ALF-5755 *in vivo* se evaluó mediante un modelo de ratón de lesiones cerebrales excitotóxicas neonatales que imitaban el daño cerebral asociado con la parálisis cerebral.

10 El daño cerebral fue inducido por ibotenato, un agonista glutamanérgico que actúa sobre NMDA y receptores metabotrópicos de glutamato. Cuando se inyectó en el neopallio murino en el día postnatal (P) 5, el ibotenato produjo una drástica pérdida neuronal en las capas neocorticales y grandes quistes de la materia blanca periventriculares similares a los observados en la leucomalacia periventricular, que es una lesión que aparece en numerosos recién nacidos prematuros humanos.

ALF-5755 se co-inyectó con ibotenato intracerebralmente en P5, o se inyectó ALF-5755 por vía intraperitoneal inmediatamente o 3 horas después de ibotenato. El análisis de las lesiones cerebrales se realizó en P10.

15 La co-inyección de ALF-5755 con ibotenato redujo las lesiones de materia blanca y materia gris cortical en un 37% y 67%, respectivamente, para una dosis de 150 ng de ALF-5755 (en comparación con las crías tratadas con ibotenato solo). También se observó una buena neuroprotección (50% de disminución del tamaño de las lesiones cerebrales) cuando la inyección de ALF-5755 se realizó por vía intraperitoneal inmediatamente, o 3 horas después del insulto. Esto establece la eficacia de una única inyección de ALF-5755, incluso retardada, a través de la ruta sistémica. Esto también indica que ALF5755, administrado intracranalmente o en la periferia, puede exhibir un efecto terapéutico en enfermedades neurológicas y enfermedades relacionadas tal como se definió anteriormente.

20 Confirmando adicionalmente los datos *in vitro*, el análisis de transferencia western demostró que ALF-5755, solo o en combinación con ibotenato, induce una disminución significativa en GAP-43 total, pero un aumento significativo y muy importante en la proporción de GAP-43 fosforilada en comparación con los controles o animales a los que inyectó ibotenato solo.

### Ejemplo 3: Expresión *in vivo* de una proteína HIP/PAP en el desarrollo de cerebelo de crías de ratón y efectos *in vitro* de la proteína ALF-5755 en un modelo de lesión cerebelosa

#### A. Materiales y Métodos

##### *RT PCR cuantitativa*

30 ARNs de cerebelos de ratones suizos P0, P5-7 y P60, cortezas de P5 y úteros de adultos se extrajeron utilizando el mini kit RNeasy (Quiagen). La transcripción inversa se realizó con 600 ng de ARNs totales para obtener ADNcs de HIP/PAP y HPRT. A continuación, se suscitó la PCR cuantitativa de transcripciones de HIP/PAP y HPRT (45 ciclos de 30" de desnaturalización a 94°C, 30" de hibridación a 58°C y 30" de polimerización a 72°C con cebadores apropiados) con el sistema Biorad. La cuantificación de la expresión de HIP/PAP en el cerebelo de crías de diversas edades se obtuvo racionalizando HIP/PAP frente a transcripciones de HPRT (software Biorad asociado) para calibrar la RT PCR y comparar los niveles de expresión de HIP/PAP a lo largo del tiempo.

##### *Cultivo de Neuronas Granulares Cerebelosas.*

40 Las células granulares representan la gran mayoría de las neuronas cerebelosas. Se prepararon cultivos de neuronas granulares primarias a partir de crías de ratones P7. En síntesis, los cerebros se diseccionaron y se colocaron en HHGN (HBSS 1x con HEPES 1 M y glucosa al 4,45%; Invitrogen). Las meninges se retiraron para evitar la contaminación masiva por astrocitos. Después del aislamiento, los cerebelos se lavaron en HHGN, se redujeron en trozos pequeños y las células se disociaron con tripsina al 0,25% - EDTA al 0,02% y se incubaron con DNasa 1 (Sigma St-Quentin Fallavier, Francia). Las células se sembraron en MEM1X y suero de caballo al 10% a una densidad de 22 millones de células/pocillo en placas de 24 pocillos recubiertas con poli-L-ornitina (Sigma). Veinticuatro horas después de la siembra, se añadieron 10  $\mu\text{M}$  de AraC (citosina arabinósido) a medio de cultivo para frenar la proliferación glial. Después de 7 días *in vitro* (DIV7), la muerte neural se indujo tratando células durante 1 hora y permitiendo un período de recuperación posterior de 8, 16 o 24 horas con los siguientes inductores: 45 (i):  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,01 a 1 mM para inducir estrés oxidativo y lograr una muerte celular posterior del 60%, (ii): NMDA 0,3 a 3 mM para inducir excito-toxicidad y lograr una muerte celular posterior de aproximadamente el 40%.

50 En ambas condiciones, el efecto neuro-protector de ALF-5755 se evaluó a 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en presencia de una concentración 0,3 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o en presencia de NMDA1 mM.

##### *Inmunocitoquímica.*

5 Para la tinción de GFAP (detección de astrocitos), NeuN (detección de neuronas), Zic1 (detección de células granulares maduras), MAP2 (detección de neuronas) y de caspasa 3 (detección de caspasa 3 activa), los cultivos celulares tratados se fijaron en PFA al 4% y reaccionaron con anticuerpos anti-GFAP (Dako, 1/500), anti-NeuN (Millipore, 1/100), anti-Zic1 (Abcam 1/100), anti-MAP2 (Abcam, 1/2000) y caspasa 3 anti-clived (Cell Signaling Technology, 1/100). La detección de antígenos marcados se realizó con anticuerpos secundarios fluorescentes a diversas longitudes de onda dependiendo del experimento, respectivamente anticuerpo anti-ratón de burro conjugado con Cy3 (1/1000, Jackson Immunoresearch) y anticuerpo anti-conejo de burro conjugado con 488 (1/1000, Molecular Probes). Los núcleos fueron luego contra-teñidos con Dapi (1/1000).

#### *Análisis Estadístico*

10 Los análisis estadísticos se realizaron con el software Graphpad.

### **B. Resultados**

#### *Expresión cerebelosa de HIP/PAP durante el desarrollo postnatal:*

15 Hasta el momento, la expresión de HIP/PAP en la corteza y el cerebelo de ratones en desarrollo postnatal nunca se ha documentado. Aquí los autores de la invención informan que HIP/PAP se expresa en ambas áreas con niveles en P5 que son bajos pero equiparables. El nivel de HIP/PAP aumenta a lo largo del tiempo en el cerebelo para alcanzar una magnitud de 20 veces en adultos en comparación con los ratones P5. La expresión en otras estructuras está bajo investigación.

#### *Evaluación del efecto protector de ALF-5755 sobre la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:*

20 Una hora de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 0,3 mM y el tiempo de recuperación subsiguiente de 16 h demostró inducir aproximadamente el 61% de muerte celular.

Se observó que la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las células no provocó la escisión de caspasa 3. Por consiguiente, la célula inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue independiente de la vía de caspasa 3.

25 El tratamiento con ALF-5755 a 5 o 10 µg/mL µM no afectó ni a los niveles de caspasa 3 escindida ni a la localización de AIF. Sin embargo, las células expuestas a ALF-5755 a 5 o 10 µg/ml exhiben una morfología mejorada en comparación con las células control. Las células tratadas con ALF-5755 tienen un aspecto picnótico menos avanzado que el de las células control, ya que la compactación de la cromatina es menos importante.

Por lo tanto, este resultado demuestra que la proteína ALF5755 puede preservar las células granulares del cerebelo de la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### *Evaluación del efecto protector de ALF-5755 sobre la muerte celular inducida por NMDA:*

30 NMDA a una concentración de 1 mM durante 1 hora y un tiempo de recuperación de 16 horas indujo aproximadamente el 34% de la muerte celular. Se observó que la exposición celular a NMDA provocó la escisión de caspasa 3. Por consiguiente, la muerte celular inducida por NMDA se señaló por la activación de la ruta de caspasas.

35 El tratamiento con ALF-5755 a 5 o 10 µM redujo significativamente la aparición de células picnóticas: en la muestra control, aproximadamente el 80% de las células presentaba un aspecto picnótico, mientras que en presencia de ALF-5755 a 5 µM o a 10 µM, el porcentaje de células picnóticas no excedió del 40%. Por lo tanto, se demostró que ALF-5755 protege las neuronas de células granulares de la muerte celular inducida por NMDA.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que ALF-5755 puede prevenir a las células granulares del cerebelo tanto de la muerte excitotóxica como oxidativa.

40 **Ejemplo 4: Efectos protectores de una proteína HIP/PAP contra la apoptosis de células neuronales corticales.**

### **A. Materiales y Métodos**

#### A.1. Cultivo cortical

45 Crías P0 fueron sacrificadas por hipotermia; su corteza se diseccionó en condiciones asépticas en solución de CMF-Tyrode. Se extrajeron las meninges, se cortaron los tejidos en trozos más pequeños y se recogieron en CMF-Tyrode. Estos se trataron con tripsina-ADNasa y luego se disociaron en la misma solución mediante trituración para formar una suspensión de células individuales, se sedimentaron y resuspendieron en medio de Eagle modificado por

Dulbecco-F-12 (DMEM-F-12) que contenía HEPES 15 mM, L-glutamina, hidrocloreuro de piroxidina (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplemento de N2 (Invitrogen), suero de ternero fetal al 10%, KCl 25 mM y penicilina-estreptomina.

- 5 Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en cámara de Labtek recubierta con poli-D-lisina (Nunc, Roskilde, DK). Después de 24 h de incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el medio que contenía suero. Las células se cultivaron luego en medio libre de suero durante 12 horas, después de lo cual se inició el tratamiento con NMDA (concentración final de 0,3 mM) y HIP (concentración final de 18,3 ng). El tratamiento continuó durante las siguientes 24 horas, después de lo cual las células se lavaron con 1X PBS y luego se fijaron en PFA al 4%.

#### A.2. Ensayo TUNEL

- 10 El kit TUNEL se adquirió de Roche y el ensayo se realizó de acuerdo con las sugerencias del fabricante. En síntesis, las células se permeabilizaron durante 30 min en Triton-X al 0,02% y se incubaron en una mezcla de marcaje que consistía en nucleotidil-transferasa terminal y se marcaron con una mezcla de nucleótidos durante 1 h a 37°C en una cámara humidificada. La cuantificación de células TUNEL-positivas en cultivos se realizó contando células TUNEL-positivas de un total de 10 campos aleatorios de dos pocillos cada uno.

### B. Resultados

- 15 Los resultados se resumen en la Figura 1, en donde se evalúa el nivel de apoptosis de células corticales midiendo el porcentaje de células TUNEL-positivas.

- 20 Tal como se muestra en la Figura 1, la proteína HIP/PAP ejerce un efecto protector de las células neuronales corticales, incluso cuando se usa sola (véase la barra "HIP" en la parte extrema derecha de la Figura 1). Estos resultados significan que la proteína HIP/PAP sola induce un efecto protector contra los efectos iniciales del cultivo *in vitro* de las células.

Mayormente, la Figura 1 muestra que la proteína HIP/PAP ejerce un fuerte efecto protector contra la apoptosis de células neuronales corticales que es inducida por NMDA (compárese la barra "NMDA" con la barra "NMDA + HIP").

Los resultados mostrados en la Figura 1 se obtuvieron a partir de cultivos *in vitro* de células corticales procedentes de ratones que son homocigotos para el gen GAP 43 de tipo salvaje (GAP43 +/+).

- 25 Aunque no se muestra, los mismos resultados se obtuvieron utilizando cultivos *in vitro* de células corticales que proceden (i) de ratones GAP43 +/- o (ii) de ratones GAP43 -/-.

Los últimos resultados sugieren que el efecto protector de la proteína HIP/PAP que se observó no requirió la presencia de la proteína GAP43.

### Ejemplo 5: Efectos de una proteína HIP/PAP sobre la plasticidad de células neuronales

- 30 **A. Materiales y Métodos**

#### A.1. Cultivo cortical

- 35 Crías P0 fueron sacrificadas por hipotermia; su corteza se diseccionó en condiciones asépticas en solución de CMF-Tyrode. Se extrajeron las meninges, se cortaron los tejidos en trozos más pequeños y se recogieron en CMF-Tyrode. Estos se trataron con tripsina-ADNasa y luego se disociaron en la misma solución mediante trituración para formar una suspensión de células individuales, se sedimentaron y resuspendieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco-F-12 (DMEM-F-12) que contenía HEPES 15 mM, L-glutamina, hidrocloreuro de piroxidina (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplemento de N2 (Invitrogen), suero de ternero fetal al 10%, KCl 25 mM y penicilina-estreptomina.

- 40 Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en cámara de Labtek recubierta con poli-D-lisina (Nunc, Roskilde, DK). Después de 24 h de incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se retiró el medio que contenía suero. Las células se cultivaron luego en medio libre de suero durante 12 horas, después de lo cual se inició el tratamiento con NMDA (concentración final de 0,3 mM) y HIP (concentración final de 18,3 ng). El tratamiento continuó durante las siguientes 24 horas, después de lo cual las células se lavaron con 1X PBS y luego se fijaron en PFA al 4%.

#### A.2. Microscopía

- 45 Las imágenes se capturaron en un microscopio Zeiss Axioplan 2 utilizando una cámara Axio Cam HRC CCD y el análisis se realizó utilizando el software Zeiss KS 400 3.0. Las imágenes requirieron un ajuste menor de contraste y brillo. No fue necesaria alteración adicional alguna de la imagen.

#### A.3. Análisis de longitud de neuritas

Se examinó el número de neuritas primarias, secundarias y terciarias, además de examinar el número de puntos de ramificación. Se utilizó tubulina beta III como marcador (datos no mostrados en el ejemplo). Las imágenes fueron capturadas en un Zeiss Axioplan II. La longitud de la neurita se obtuvo utilizando el software IM50.

## **B. Resultados**

5 Los resultados están representados en las Figuras 2 a 6, respectivamente.

Los resultados de las Figuras 2 a 5 demuestran que la proteína HIP/PAP, incluso cuando se utiliza sola, ejerce un incremento en la neuroplasticidad, ya que la proteína HIP/PAP (i) aumenta el número de neuritas primarias (Fig. 2), así como el número de células que tienen neuritas secundarias y terciarias (Véanse las Figuras 3 y 4, respectivamente).

10 Los resultados representados en la Figura 6 demuestran que la proteína HIP/PAP tiene la capacidad de proteger las células neuronales contra los efectos adversos provocados por NMDA sobre el crecimiento de neuritas. Más precisamente, los resultados presentados en la Figura 6 demuestran que HIP/PAP, cuando se añade a las células neuronales incubadas con NMDA, restaura el nivel de crecimiento de neuritas que se mide en los cultivos de células neuronales de control incubados con medio de cultivo solo.

15 Además, se ha demostrado que la proteína HIP/PAP tiene la capacidad de restaurar la neuroplasticidad de las células neuronales corticales sometidas a una incubación con una cantidad citotóxica de NMDA.

Los resultados mostrados en las Figuras 2, 5 y 6 se obtuvieron a partir de cultivos *in vitro* de células corticales procedentes de ratones que son homocigotos para el gen GAP 43 de tipo salvaje (GAP43 +/+).

20 Aunque no se muestra, los mismos resultados se obtuvieron utilizando cultivos *in vitro* de células corticales que se originaron (i) a partir de ratones GAP43 +/- o (ii) a partir de ratones GAP43 -/-.

Los últimos resultados sugieren que el efecto positivo de la proteína HIP/PAP sobre la neuroplasticidad que se observó no requirió la presencia de la proteína GAP43.

# ES 2 656 353 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALFACT INNOVATION

<120> Nuevas aplicaciones de HIP/PAP o sus derivados

<130> W224FR

5 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```
Ile Arg Cys Pro Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala
1          5          10          15

Leu Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln
          20          25          30

Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly
          35          40          45

Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr
          50          55          60

Val Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly
65          70          75          80

Glu Gly Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp
          85          90          95

Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu
          100          105          110

Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val
          115          120          125

Arg Leu Pro Tyr Val Cys Lys Phe Thr Asp
130          135
```

<210> 2

<211> 149

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 656 353 T3

Glu Glu Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro Lys  
 1                    5                    10                    15

Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro  
           20                    25                    30

Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly  
           35                    40                    45

Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser  
           50                    55                    60

Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu  
           65                    70                    75                    80

His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu Trp  
           85                    90                    95

Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro Ser  
           100                    105                    110

Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala  
           115                    120                    125

Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val  
           130                    135                    140

Cys Lys Phe Thr Asp  
 145

<210> 3

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 656 353 T3

Met Glu Glu Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro  
1 5 10 15

Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu Phe Leu Ser  
20 25 30

Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala Cys Gln Lys Arg Pro Ser  
35 40 45

Gly Asn Leu Val Ser Val Leu Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser  
50 55 60

Ser Leu Val Lys Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly  
65 70 75 80

Leu His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly Trp Glu  
85 90 95

Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala Trp Glu Arg Asn Pro  
100 105 110

Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr  
115 120 125

Ala Phe Leu Arg Trp Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr  
130 135 140

Val Cys Lys Phe Thr Asp  
145 150

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. La proteína "HIP/PAP" o un derivado proteico de la misma para uso en la prevención o el tratamiento de una lesión cerebral neonatal, que incluye una lesión cerebral neonatal provocada por hipoxia cerebral, en donde la proteína "HIP/PAP" comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de SEQ ID N° 1 a 3,
- en donde el derivado proteico de la misma se selecciona del grupo que consiste en una porción biológicamente activa de una proteína "HIP/PAP" y proteínas quiméricas o de fusión "HIP/PAP",
- 10 y en donde dicha lesión cerebral neonatal abarca un estado patológico seleccionado del grupo que consiste en hipoxemia fetal, hipoxemia perinatal, isquemia fetal, isquemia perinatal y una liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios.
2. La proteína "HIP/PAP" o un derivado proteico de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha lesión cerebral neonatal consiste en un accidente cerebrovascular, que incluye apoplejía.
3. La proteína "HIP/PAP" o un derivado proteico de la misma para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha lesión cerebral neonatal se selecciona del grupo que consiste en apoplejía isquémica y apoplejía hemorrágica.

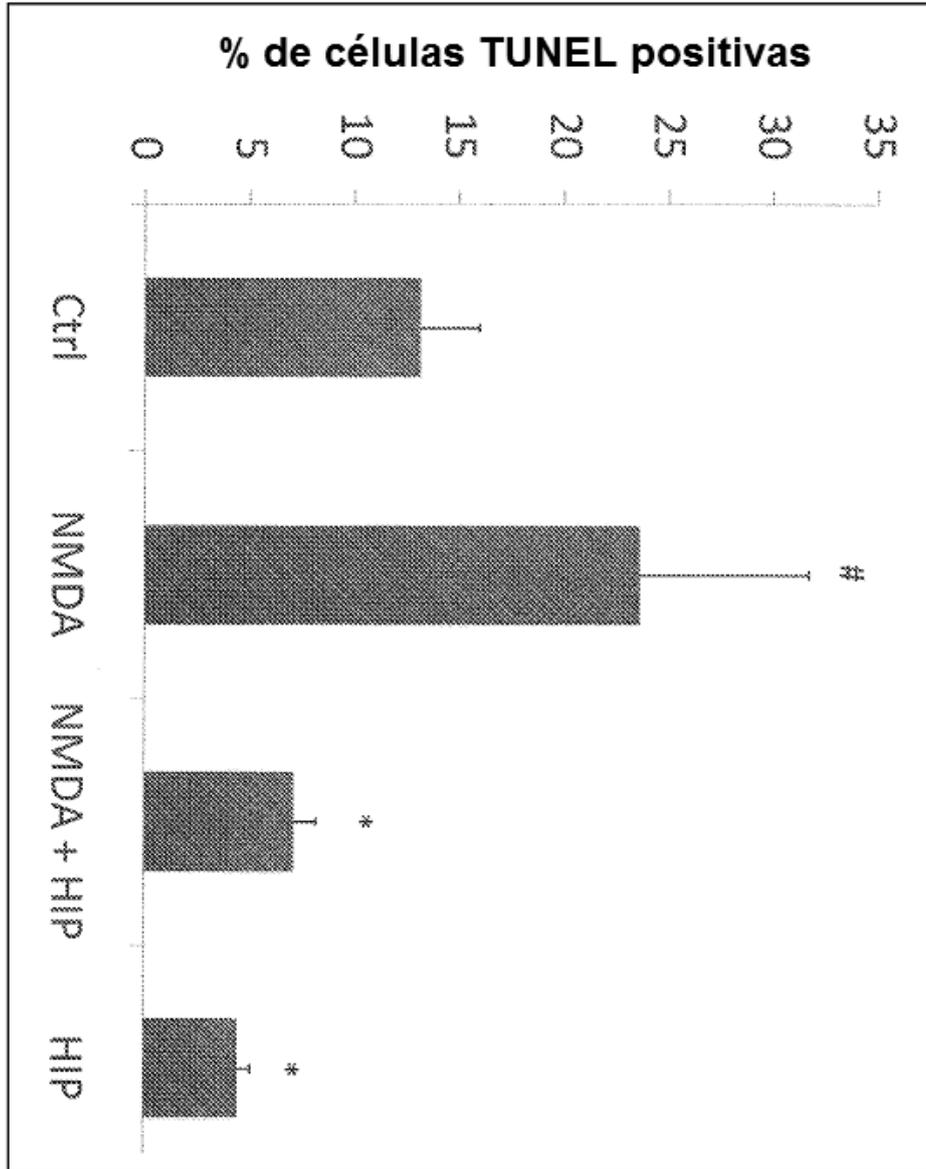


Figura 1

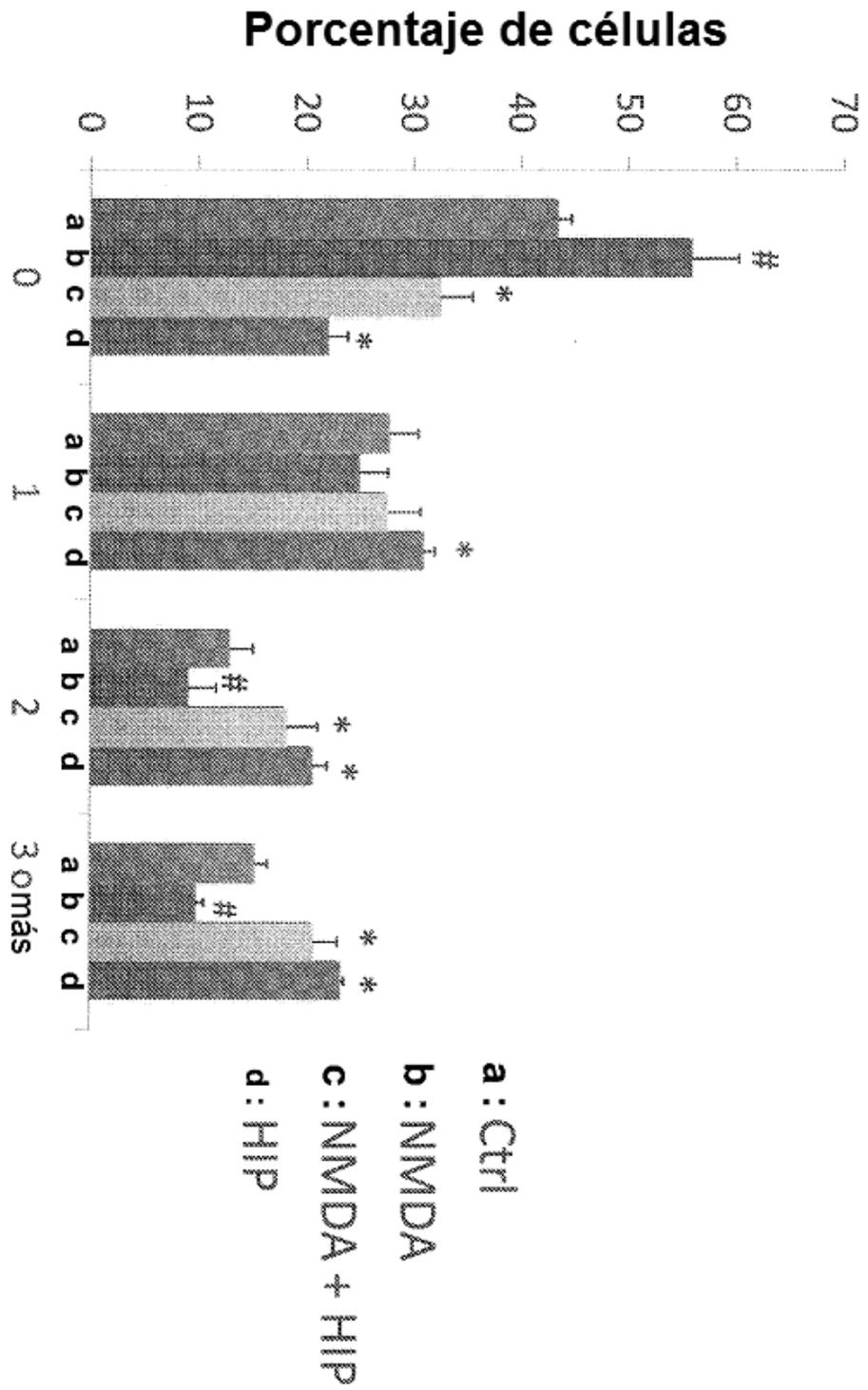
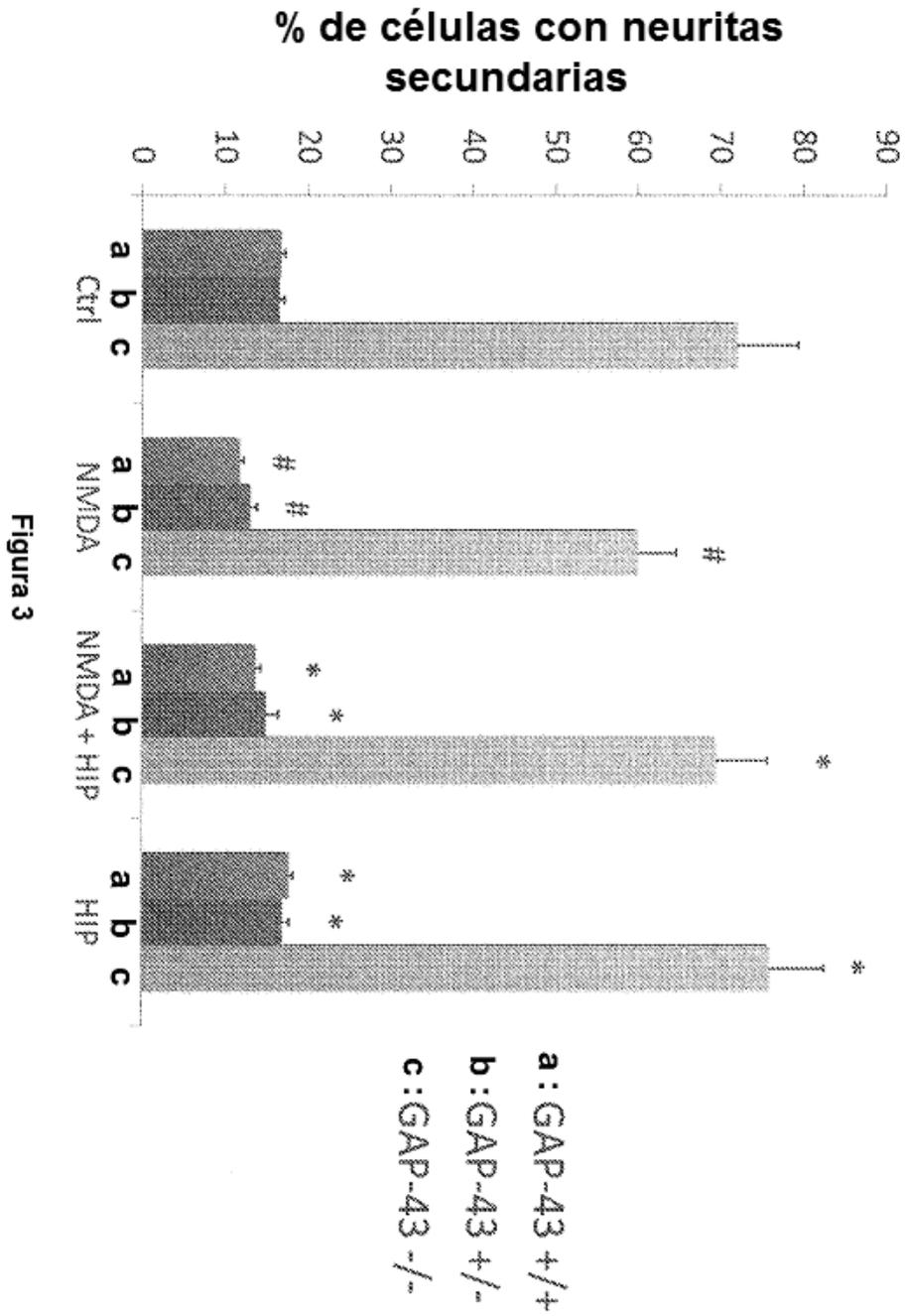
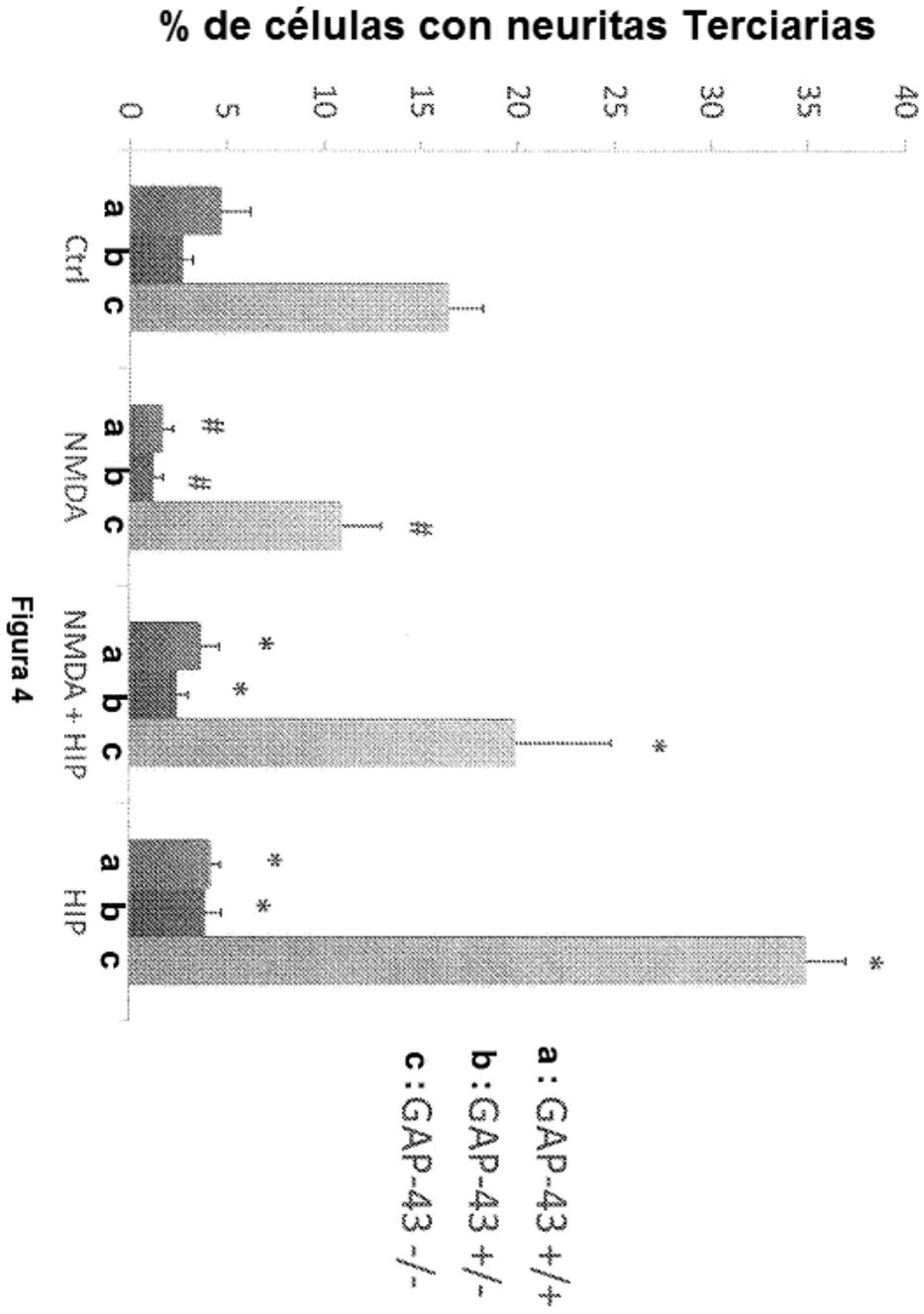


Figura 2





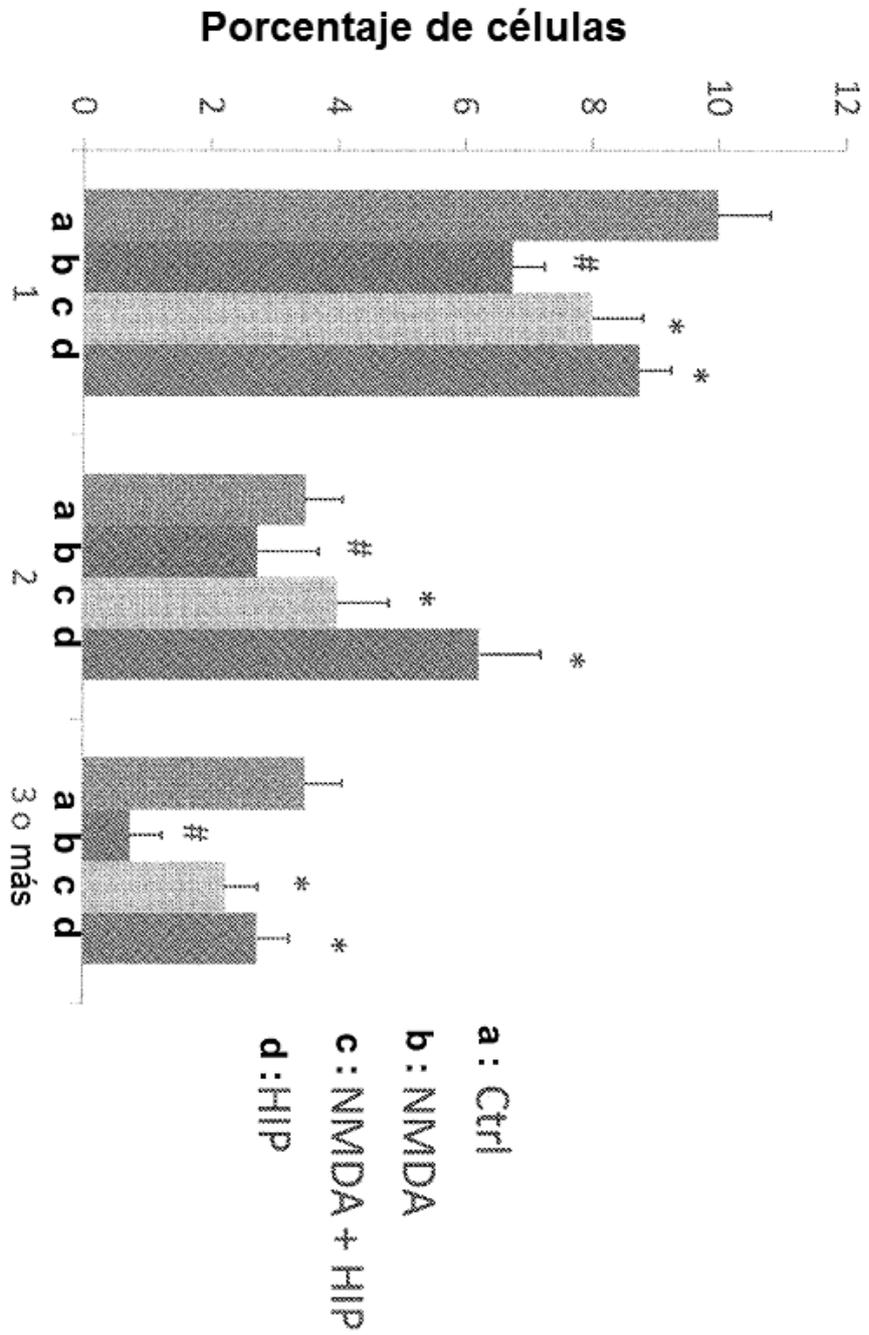


Figura 5

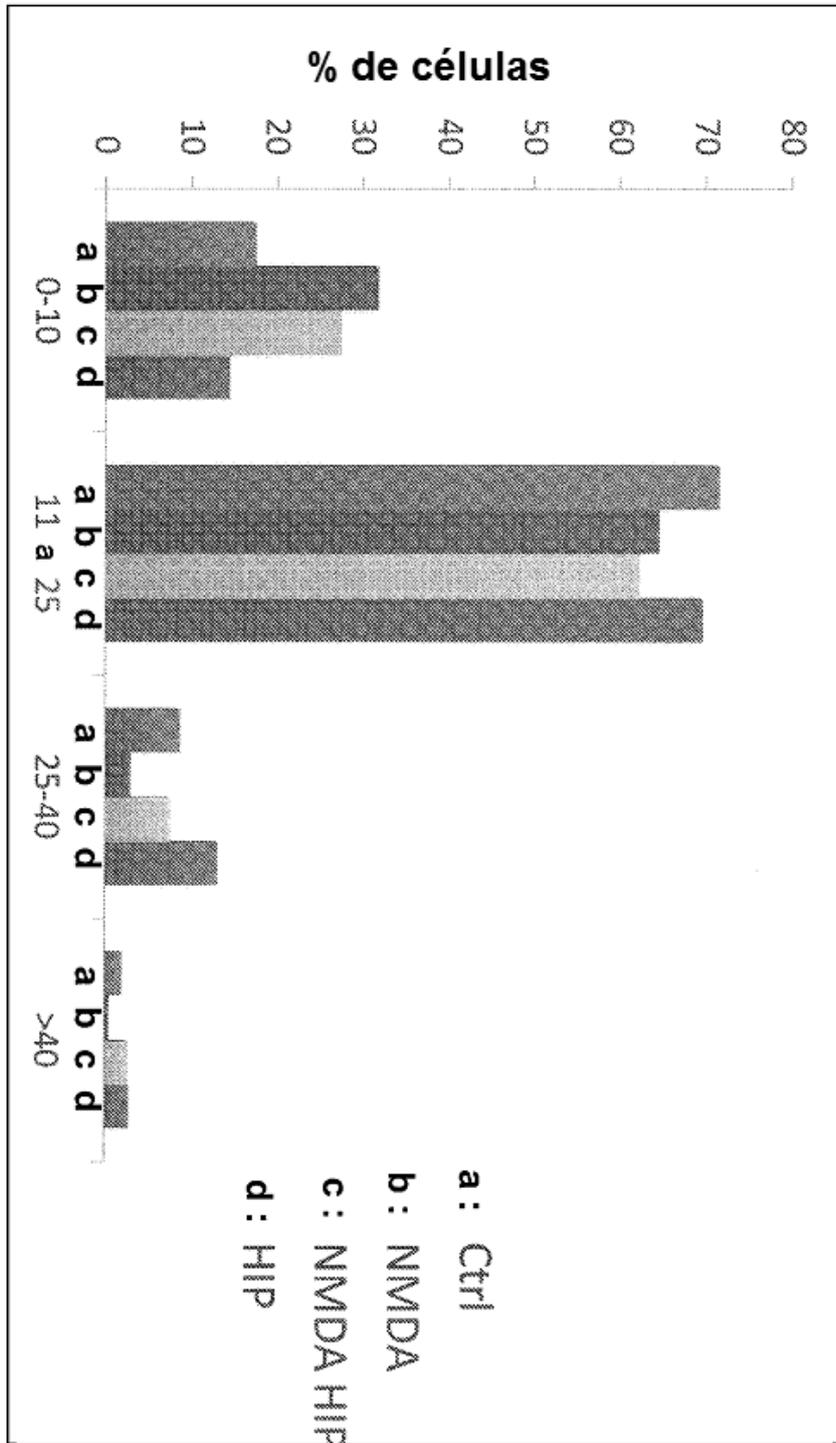


Figura 6