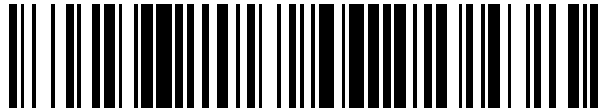


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 815**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/US2012/071253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13096773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12816202 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 2793930**

54 Título: **Procedimientos, sistemas y composiciones para estimular la recuperación de la neuropatía periférica**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161579951 P

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

22.05.2018

73 Titular/es:

HENRY FORD HEALTH SYSTEM (100.0%)

1 Ford Place

Detroit, MI 48202, US

72 Inventor/es:

CHOPP, MICHAEL;

ZHANG, ZHENGANG;

MORRIS, DANIEL, C. y

WANG, LEI

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 668 815 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

Procedimientos, sistemas y composiciones para estimular la recuperación de la neuropatía periférica

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se refiere al sector de la estimulación de la recuperación de la neuropatía periférica.

10 **ANTECEDENTES**

La neuropatía periférica es una de las complicaciones más frecuentes e incapacitantes de la diabetes mellitus. Sigue existiendo una necesidad en la técnica de procedimientos, sistemas y composiciones eficaces para estimular la recuperación de la neuropatía periférica.

15 **CARACTERÍSTICAS**

El objeto de la presente invención es una composición que comprende timosina $\beta 4$ para su utilización en el tratamiento para estimular la recuperación de neuropatía periférica en un sujeto y timosina $\beta 4$ para su utilización en el tratamiento para estimular la recuperación de neuropatía periférica en un sujeto, como se reivindica en las reivindicaciones independientes. En las respectivas reivindicaciones dependientes se reivindican realizaciones de la invención.

Los siguientes ejemplos de algunas realizaciones se dan a conocer sin limitar la invención a solo aquellas realizaciones descritas en el presente documento y sin negar ninguna realización u objeto.

Los procedimientos para estimular la recuperación de la neuropatía periférica comprenden administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende timosina $\beta 4$, y opcionalmente también, un agente peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, que incluye, pero no se limita a las mismas, la variante o variantes conservadoras de T $\beta 4$, o un agente estimulante que estimula la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT, o una variante conservadora del mismo.

25 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

A continuación se describirán algunas realizaciones, solo a modo de ejemplo y sin limitación de otras realizaciones, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 consiste en imágenes y representaciones de datos que muestran datos que indican que la T $\beta 4$ mejora la función vascular en el nervio ciático.

La figura 2 consiste en imágenes y representaciones de datos que muestran datos que indican que la T $\beta 4$ aumenta el área inmunorreactiva de la ocludina en las paredes del vaso.

Las figuras 3 y 4 son representaciones de datos que muestran datos que indican el efecto de la T $\beta 4$ sobre la función neurológica.

La figura 5 consiste en imágenes y representaciones de datos que muestran datos que indican que la T $\beta 4$ regula positivamente la expresión de Ang1 en células endoteliales y células de Schwann en un modelo en ratón diabético.

La figura 6 consiste en imágenes y representación de datos que muestran datos que indican que la vía de señalización de Ang/Tie2 media en el efecto de la T $\beta 4$ sobre la función endotelial.

La figura 7 consiste en imágenes y representación de datos que muestra datos que indican que Ang1 secretada por las células de Schwann tratadas con T $\beta 4$ mejora la función endotelial.

55 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Sin limitarse a solo las realizaciones expresamente dadas a conocer en el presente documento y sin negar ninguna realización u objeto, y sin estar sujeto a ninguna teoría específica, algunas realizaciones comprenden, además del péptido secuestrador de actina timosina beta 4 (también, "T $\beta 4$ " o "TB4"), otros agentes que comprenden péptidos secuestradores de actina o fragmentos peptídicos que contienen la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, o variantes conservadoras de los mismos, para estimular la recuperación de la neuropatía periférica en pacientes que la padecen, tales como pacientes diabéticos, por ejemplo, diabetes de tipo II, o aquellos que padecen diabetes mellitus.

La timosina beta 4 se identificó inicialmente como una proteína que está regulada positivamente durante la migración y diferenciación de las células endoteliales *in vitro*. La timosina beta 4 se aisló originalmente del timo y es

un polipéptido ubicuo de 43 aminoácidos y 4,9 kDa identificado en diversos tejidos. (Sin limitación, véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 1; puede existir alguna variación de especies en la secuencia precisa, y cualquiera y todas estas secuencias pueden utilizarse en algunas realizaciones, además de Tβ4. Algunas realizaciones pueden comprender la utilización de Tβ4, y la adición adicional de ciertos grupos químicos en un extremo o en ambos extremos de la secuencia o secuencias como un ejemplo solo y sin limitación, la SEQ ID NO: 2 enumerada más adelante). Se han atribuido varias funciones a la proteína Tβ4, incluyendo un papel en la diferenciación y migración de células endoteliales, diferenciación de células T, secuestro de actina, vascularización y cicatrización de heridas.

En el presente documento se describe un procedimiento para estimular la recuperación de la neuropatía periférica en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende timosina β4 y, opcionalmente, un agente peptídico, que puede ser un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT (respectivamente, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), o una variante conservadora de la misma, y/o isoformas, análogos o derivados de Tβ4, que incluyen, pero no se limitan a los mismos, KLKKTET (SEQ ID NO: 5), LKKTETQ (SEQ ID NO: 6), variantes en N-terminal de Tβ4, variantes en C-terminal de Tβ4 y antagonistas de Tβ4. También se puede utilizar Tβ4 oxidada además de Tβ4. En algunas realizaciones, Tβ4 se utiliza con un agente peptídico que puede ser un péptido recombinante o sintético, o un péptido aislado o purificado.

Las composiciones que pueden utilizarse de acuerdo con algunas realizaciones incluyen timosina beta 4 (Tβ4) y agentes peptídicos, tales como isoformas, análogos o derivados de Tβ4, incluyendo Tβ4 oxidado, variantes en N-terminal de Tβ4, variantes en C-terminal de Tβ4 y antagonistas de Tβ4, polipéptidos o fragmentos peptídicos que comprenden o consisten esencialmente en la secuencia de aminoácidos LKKTET o variantes conservadoras de las mismas. La solicitud internacional número de serie PCT/US99/17282 da a conocer isoformas de Tβ4 que pueden ser útiles de acuerdo con algunas realizaciones, así como también la secuencia de aminoácidos LKKTET y variantes conservadoras de la misma, que pueden utilizarse con algunas realizaciones, además de Tβ4. La solicitud internacional número de serie PCT/GB99/00833 (WO 99/49883) da a conocer timosina β4 oxidada que puede utilizarse de acuerdo con algunas realizaciones, además de Tβ4. Aunque algunas realizaciones se describen principalmente en lo sucesivo con respecto a Tβ4 y a las isoformas de Tβ4, debe entenderse que la siguiente descripción pretende ser igualmente aplicable a la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, péptidos y fragmentos que comprenden o consisten esencialmente en LKKTET o LKKTNT, variantes conservadoras de las mismas que tienen actividad inhibitoria de la enfermedad por neuropatía periférica, y/o isoformas, análogos o derivados de Tβ4, que incluyen variantes en N-terminal de Tβ4, variantes en C-terminal de de Tβ4 y antagonistas de Tβ4. Algunas realizaciones también pueden utilizar Tβ4 oxidada. Los agentes anteriores, cuando se utilizan, se utilizan además de Tβ4 en la composición de la presente invención.

Los procedimientos para estimular la recuperación de la neuropatía periférica en un sujeto comprenden administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende Tβ4 y, opcionalmente, un agente peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, una variante conservadora de la misma o un agente estimulante que estimula la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT, o una variante conservadora del mismo.

Un procedimiento para estimular la recuperación de la neuropatía periférica, en un sujeto, comprende poner en contacto el tejido afectado con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene Tβ4 y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento. Los ejemplos de administración directa incluyen, por ejemplo, poner en contacto el tejido, mediante aplicación directa o inhalación, con una solución, loción, bálsamo, gel, crema, pasta, pulverizador, suspensión, dispersión, hidrogel, pomada o aceite, que comprende Tβ4, y opcionalmente un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento. La administración sistémica incluye, por ejemplo, inyecciones intravenosas, intraperitoneales e intramusculares de una composición que contiene Tβ4, y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyectables.

La Tβ4 y otros agentes peptídicos para su utilización en algunas realizaciones, como se describen en el presente documento, se pueden administrar en cualquier cantidad efectiva. Por ejemplo, un agente peptídico como se describe en el presente documento puede administrarse en dosificaciones dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001-1.000.000 de microgramos, más preferentemente en cantidades dentro del intervalo de aproximadamente 0,1-5.000 microgramos, de la forma más preferente, dentro del intervalo de aproximadamente 1-100 microgramos.

Una composición de acuerdo con algunas realizaciones puede administrarse diariamente, cada dos días, cada dos semanas, cada dos meses, etc., con una sola aplicación o varias aplicaciones al día de administración, tales como aplicaciones 2, 3, 4 o más veces al día de administración.

Se han identificado muchas isoformas de la Tβ4 y tienen aproximadamente un 70%, o aproximadamente un 75%, o aproximadamente un 80% o más de homología con la secuencia de aminoácidos conocida de la Tβ4. Dichas isoformas incluyen, por ejemplo, Tβ4^{ala}, Tβ9, Tβ10, Tβ11, Tβ12, Tβ13, Tβ14 y Tβ15. Similar a la Tβ4, se ha demostrado que las isoformas Tβ10 y Tβ15 secuestran actina. Tβ4, Tβ10 y Tβ15, así como estas otras isoformas comparten una secuencia de aminoácidos, LKKTET o LKKTNT, que parece estar implicada en la mediación del

secuestro de la actina o unión a la actina. Aunque sin desear quedar ligado a teoría específica alguna, la actividad de los agentes peptídicos como se describe en el presente documento puede deberse, al menos en parte, a la actividad antiinflamatoria de dichos agentes. La Tβ4 también puede modular la polimerización de actina (por ejemplo, las β-timosinas parecen despolimerizar la F-actina secuestrando la G-actina libre). La capacidad de la Tβ4 para modular la polimerización de actina puede deberse a su capacidad para unirse o secuestrar actina a través de la secuencia LKKTET o LKKTNT. Por lo tanto, como con la Tβ4, otras proteínas que son antiinflamatorias y/o se unen a o secuestran actina, o modulan la polimerización de la actina, incluyendo las isoformas de Tβ4 que tienen la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT, es probable que sean eficaces, en una combinación con Tβ4, como se establece en el presente documento.

Por lo tanto, se contempla específicamente que los péptidos LKKTET o LKKTNT conocidos tal como se describen en el presente documento, que incluyendo las isoformas Tβ4, tales como Tβ4^{ala}, Tβ9, Tβ10, Tβ11, Tβ12, Tβ13, Tβ14 y Tβ15, así como las isoformas de Tβ4 aún no identificadas, serán útiles en los procedimientos descritos en el presente documento en combinación con Tβ4. Como tales péptidos LKKTET o LKKTNT como se describen en el presente documento, incluyendo las isoformas de Tβ4, son útiles en los procedimientos descritos en el presente documento, incluidos los procedimientos practicados en un sujeto. Algunas realizaciones dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden Tβ4, y que comprenden además péptidos LKKTET o LKKTNT como se describe en el presente documento, así como las isoformas de Tβ4, Tβ4^{ala}, Tβ9, Tβ10, Tβ11, Tβ12, Tβ13, Tβ14 y Tβ15, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, otros agentes o proteínas que tienen actividad antiinflamatoria y/o secuestradora de actina o capacidad de unión, o que pueden movilizar actina o modular la polimerización de actina, como se demuestra en un ensayo de secuestro, unión, movilización o polimerización apropiado, o identificados por la presencia de una secuencia de aminoácidos que media en la unión a actina, tal como LKKTET o LKKTNT, por ejemplo, puede emplearse de forma similar en los procedimientos descritos en el presente documento, en combinación con Tβ4. Tales proteínas pueden incluir gelsolina, proteína de unión a vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, ADNasal, vilina, fragmina, severina, proteína de protección, β-actinina y acumentina, por ejemplo. Dado que tales procedimientos incluyen los practicados en un sujeto, algunas realizaciones dan a conocer además composiciones farmacéuticas que comprenden gelsolina, proteína de unión a vitamina D (DBP), profilina, cofilina, depactina, ADNasal, vilina, fragmina, severina, proteína de protección, β-actinina y acumentina como se expone en el presente documento, en combinación con Tβ4. Algunas realizaciones incluyen la utilización de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos LKKTET o LKKTNT y variantes conservadoras de la misma, en combinación con Tβ4.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "variante conservadora" o variaciones gramaticales de la misma denota la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Ejemplos de variaciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina, y similares.

La Tβ4 se ha localizado en varios tipos de tejidos y células y, por lo tanto, pueden añadirse agentes que estimulan la producción de un péptido LKKTET o LKKTNT, tal como Tβ4 u otro agente peptídico como se describe en el presente documento, a una composición que comprende Tβ4, para producir un agente peptídico a partir de un tejido y/o una célula. Tales agentes estimulantes pueden incluir miembros de la familia de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), timosina α1 (Tα1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Más preferentemente, el agente estimulante es el factor transformante beta de crecimiento (TGF-β) u otros miembros de la superfamilia de TGF-β.

De acuerdo con algunas realizaciones, los sujetos se tratan con Tβ4 y un agente estimulante que estimula la producción en el sujeto de un agente peptídico, como se define en el presente documento.

Adicionalmente, se pueden añadir otros agentes que ayudan a estimular la recuperación de la neuropatía periférica a una composición, junto con Tβ4, y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento. Por ejemplo, y no a modo de limitación, se puede añadir un agente peptídico como se describe en el presente documento solo o en combinación con uno o más de los siguientes agentes: antibióticos, VEGF, KGF, FGF, PDGF, TGFβ, IGF-1, IGF-2, IL-1, protimosina α y/o timosina α en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Algunas realizaciones comprenden una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Tβ4, y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La dosis real o reactivo, formulación o composición real que proporciona el tratamiento puede depender de muchos factores, incluido el tamaño y la salud de un sujeto. Sin embargo, los expertos en la materia pueden utilizar enseñanzas que describen los procedimientos y técnicas para determinar las dosis clínicas como se da a conocer en el documento PCT/US99/17282, citado anteriormente, y las referencias citadas en el presente documento, para

determinar la dosificación apropiada a utilizar.

Las formulaciones adecuadas pueden incluir timosina $\beta 4$ y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento a una concentración dentro del intervalo de aproximadamente el 0,001 - 50% en peso, más preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente el 0,01 - 0,1% en peso, de la forma más preferente aproximadamente el 0,05% en peso.

Los enfoques terapéuticos descritos en el presente documento con respecto a algunas realizaciones implican diversas vías de administración o liberación de T $\beta 4$, y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento, incluyendo cualquier técnica de administración convencional (por ejemplo, pero sin limitaciones a las mismas, administración directa, inyección local, inhalación o administración sistémica) a un sujeto. Los procedimientos y composiciones que utilizan o que contienen T $\beta 4$ y, opcionalmente, un agente peptídico adicional como se describe en el presente documento pueden formularse en composiciones farmacéuticas mediante mezcla con excipientes o vehículos no tóxicos farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan a conocer, sin limitar la invención a solo aquellas realizaciones descritas en el presente documento y sin negar ninguna otra realización u objeto.

Ejemplo 1

Antecedentes: La neuropatía periférica es una de las complicaciones más frecuentes e incapacitantes de la diabetes mellitus. Los inventores evaluaron si la timosina $\beta 4$ ("T $\beta 4$ ") mejora la disfunción neurovascular inducida por diabetes en el nervio ciático y estimula la recuperación de la función neurológica de la neuropatía diabética periférica. Los resultados de la evaluación de los autores muestran que la timosina beta 4 estimula la recuperación de la neuropatía periférica en ratones diabéticos de tipo II.

Procedimientos y resultados: El tratamiento con T $\beta 4$ de ratones db/db que tenían neuropatía periférica aumentó sustancialmente la densidad vascular funcional y el flujo sanguíneo regional en el nervio ciático, y mejoró la función nerviosa. La T $\beta 4$ reguló positivamente la angiopoyetina-1 (Ang1), pero suprimió la expresión de Ang2 en células endoteliales y de Schwann en el nervio ciático diabético. La incubación *in vitro* de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con T $\beta 4$ en condiciones de glucosa alta anuló completamente la expresión de Ang1 regulada negativamente por niveles altos de glucosa y la formación de tubos capilares reducida por niveles altos de glucosa. Además, la incubación de HUVEC con niveles altos de glucosa con medio acondicionado recogido de células de Schwann humanas (HSC) tratadas con T $\beta 4$ revirtió significativamente la formación de tubo capilar reducida por niveles altos de glucosa. Un anticuerpo neutralizado contra Tie2 suprimió el efecto de T $\beta 4$ y el medio acondicionado en HUVEC. La T $\beta 4$ activó Akt en HSC, mientras que el bloqueo de PI3K/Akt con un inhibidor de PI3K, LY294003, inactivó Akt y suprimió el efecto de T $\beta 4$ sobre la regulación positiva de Ang1.

Los resultados de los inventores demuestran que T $\beta 4$ mejoró notable e inesperadamente la función vascular en el nervio ciático y la función del nervio periférico en un modelo en ratón de neuropatía periférica diabética. Sin estar ligado a teoría específica alguna, la T $\beta 4$ puede actuar sobre las células endoteliales y las células de Schwann para preservar y/o restaurar la función vascular en el nervio ciático, lo que facilita la mejora de la función del nervio periférico bajo neuropatía diabética.

La neuropatía periférica es una de las complicaciones más frecuentes e incapacitantes de la diabetes mellitus. Los estudios de neuropatía periférica diabética de animales de experimentación y seres humanos indican que el desarrollo de la neuropatía diabética está estrechamente relacionado con una disfunción neurovascular marcada¹⁻³. La disfunción vascular precede a la aparición de déficit de velocidad de la conducción nerviosa, lo que lleva a daño nervioso³⁻⁵.

La timosina beta 4 (T $\beta 4$), un pequeño polipéptido de 4,9 kDa de 43 aminoácidos, es un importante péptido secuestrador de la actina G intracelular⁹. Entre sus múltiples funciones biológicas, la T $\beta 4$ estimula la angiogénesis después del infarto de miocardio y la vasculogénesis durante el desarrollo^{10,11}. La T $\beta 4$ se encuentra actualmente en un ensayo clínico de fase II para el tratamiento de pacientes con infarto agudo de miocardio¹². Antes del trabajo de los inventores no se sabía si la T $\beta 4$ tiene un efecto terapéutico sobre la neuropatía diabética o no.

Las angiopoyetinas (Ang1 y Ang2) y su receptor Tie-2 regulan el desarrollo vascular y la homeostasis^{17,18}. La Ang-1 estimula la estabilización vascular y la maduración, mientras que la Ang2 actúa como un agonista parcial o antagonista de la señalización de Ang1, dependiendo de la biodisponibilidad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)^{17,19,20}. La vía de señalización de Ang/Tie2 desempeña un papel importante en la mediación de la función vascular bajo diabetes^{21,22}. La hiperglucemia regula negativamente la Ang1 y regula positivamente la Ang2^{21,23}. Los aumentos en los niveles de Ang1 normalizan la vasculatura inmadura inducida por la diabetes²⁴. La Ang1, aumentando la angiogénesis, reduce el infarto de miocardio, mientras que una elevación de los niveles de Ang2 agrava el infarto en ratas diabéticas²¹. Los pacientes con neuropatía diabética periférica tienen niveles elevados de

Ang2 circulante²⁵. Sin embargo, el efecto de la vía de señalización Ang/Tie2 sobre la neuropatía diabética periférica no se ha estudiado extensamente.

5 Utilizando un modelo en ratón de diabetes de tipo II, los inventores evaluaron si el tratamiento de la neuropatía diabética periférica con Tβ4 mejora la disfunción neurovascular y mejora la función nerviosa periférica. Además, los inventores evaluaron el efecto de Tβ4 sobre la vía de señalización Ang/Tie2 bajo neuropatía diabética periférica.

Procedimiento:

10 **Animales** - Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la guía del NIH, NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, y fueron aprobados por el Comité institucional para el cuidado de animales del Henry Ford Hospital. Se utilizaron ratones macho BKS.Cg-*m+/+Lep^{db}/J*(db/db) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) de 20 semanas de edad. Como animales de control se utilizaron ratones heterocigotos de edad compatible (db/m), un genotipo no penetrante (Jackson Laboratories).

15 **Tratamiento con Tβ4** - Se trataron ratones db/db a las 20 semanas de edad con Tβ4 a una dosis de 6 mg/kg o 24 mg/kg (RegeneRx, Inc, inyección intraperitoneal, i.p.), cada 3 días durante 4 semanas (n = 10/grupo). Como grupo de control se utilizaron ratones db/db (n = 10/grupo) a la misma edad tratados con el mismo volumen de solución salina. Como grupos de control adicionales se utilizaron ratones db/m de edad compatible con Tβ4 (6 mg/kg i.p. cada 3 días, n = 10/grupo) o solución salina (n = 10/grupo). Se sacrificó a todos los ratones 8 semanas después del tratamiento inicial. Las dosis de Tβ4 se seleccionaron basándose en estudios publicados¹³.

Medición del flujo sanguíneo del nervio ciático regional mediante flujometría de láser Doppler -

25 El flujo sanguíneo regional del nervio ciático se midió al final de los experimentos (8 semanas después del tratamiento inicial) utilizando flujometría de láser Doppler (LDF PeriFlux PF4, Perimed AB, Järfälla, Suecia).²⁶ Brevemente, con anestesia, el ratón se montó en un marco estereotáctico bajo anestesia. El nervio ciático izquierdo se expuso en la región media del muslo y la temperatura rectal de los animales se mantuvo a $37 \pm 1,0$ °C durante el período de medición utilizando un baño de agua controlado por realimentación. Utilizando un micromanipulador, se colocó una sonda de LDF en la superficie del nervio ciático y se registraron los valores de flujo relativo expresados como unidades de perfusión cada 5 minutos durante un total de 3 veces. Los valores de flujo sanguíneo del nervio ciático regional de ratones db/m se utilizaron como valores iniciales y los datos se presentan como un porcentaje de los valores iniciales.

35 Mediciones neurofisiológicas -

La velocidad de conducción del nervio ciático se evaluó con técnicas de registro ortodrómico, como se ha descrito anteriormente²⁷. Brevemente, se administraron pulsos de corriente de onda cuadrada simples activados utilizando un estimulador de pulso aislado (Modelo 2100, A-M Systems, Everett, WA). Las electromiografías simultáneas se registraron mediante dos electrodos esterilizados colocados en los músculos intrínsecos del pie con un amplificador Grass (modelo P5, Grass Instruments, Quincy, MA). Durante las mediciones, la temperatura rectal del animal se mantuvo a $37 \pm 1,0$ °C utilizando un baño de agua controlado por realimentación. La velocidad de conducción nerviosa motora (VCM) y la velocidad de conducción nerviosa sensorial (VCS) se calcularon de acuerdo con un estudio publicado⁷.

45 **Pruebas de retirada de la cola y de placas calientes** - Para examinar la hiperalgesia térmica, se emplearon pruebas de retirada de la cola y de placas caliente según los procedimientos publicados²⁷⁻²⁹. En pocas palabras, para la prueba de retirada de la cola, un ratón se contuvo en un tubo de polipropileno cónico con una abertura a través del cual se expuso su cola. Aproximadamente 2 cm de la cola del ratón se sumergieron en un baño de agua a $52 \text{ °C} \pm 0,2$ y se registró el tiempo hasta que el roedor mueve o retira su cola²⁸. Para la prueba de placa caliente, se colocó un ratón dentro de una cámara de plexiglás sobre una superficie de vidrio transparente y se dejó aclimatar durante al menos 20 minutos. Se utilizó un medidor de estimulación térmica (IITC Model 39 Hot Plate Analgesia Meter, IITC Life Science, CA) con temperatura del suelo a 55 °C (configuración del fabricante). Se registró la latencia de la retirada de la pata en respuesta al calor radiante²⁹. Se emplearon períodos de corte de 10 y 15 segundos para evitar el daño tisular para las pruebas de retirada de la cola y de placas calientes, respectivamente. En ambas pruebas, se tomaron al menos tres lecturas por animal a intervalos de 15 minutos, y se calculó el promedio.

60 **Inmunohistoquímica** - Los nervios ciáticos del lado izquierdo y derecho se aislaron a nivel de la mitad del muslo, se fijaron en paraformaldehído al 4% y se incluyeron en parafina según el protocolo publicado²⁷. Se utilizaron tres secciones transversales (6 μm de grosor) o tres secciones longitudinales (6 μm de grosor) en una de cada diez series (separadas por 60 μm) para cada animal para inmunotinción de acuerdo con los protocolos publicados de los inventores²⁷. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal anti-Ang1 de conejo (1:2.000; Abcam, Cambridge, MA), anticuerpo monoclonal anti-CD31 de ratón (1:500, BD Biosciences, San Jose, CA), anticuerpo policlonal anti-factor de Von Willebrand de conejo (vWF) (1:300, Dako, Carpintería, CA), anticuerpo monoclonal anti-occludina de ratón (1:200, Zymed, San Francisco, CA) y anticuerpo monoclonal anti-S100 de conejo (1:400, Abcam). Se utilizó IgG de conejo o cabra como control negativo. Se realizó contratinción de las secciones

con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1:5.000).

Análisis y cuantificación de imágenes - Para examinar la perfusión microvascular en el nervio ciático, a los ratones se les administró por vía intravenosa isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano (2×10^6 de peso molecular, Sigma; 0,2 ml de 50 mg/ml) 10 minutos antes del sacrificio³⁰. Se extirparon rápidamente los nervios ciáticos y se introdujeron en paraformaldehído al 2% durante 2 horas. Y a continuación, los nervios se incluyeron en el compuesto OCT para secciones transversales congeladas. Se utilizaron tres secciones transversales congeladas (20 μ m/sección de grosor) a intervalos de 60 μ m de cada ratón para el análisis de imágenes. Se digitalizaron las secciones bajo un objetivo de microscopio 20x (Zeiss Axiophot) a través de un sistema de Dispositivo de Imágenes de microcomputador (MCID) (Imaging Research Inc, St. Catharines, ON, Canadá)³⁰. Se contó el número total de vasos perfundidos con FITC-dextrano y se dividió por el área total del tejido para determinar la densidad vascular.

Para el análisis de la morfología y densidad vascular inmunorreactiva del vWF, se utilizaron tres secciones espaciadas a intervalos de 60 μ m de cada ratón. Aleatoriamente se formaron tres campos de la vista por sección bajo un objetivo 20x y se midieron el perímetro vascular inmunorreactivo del vWF y el número total de vasos positivos para vWF utilizando MCID.

Todos los análisis se realizaron con el examinador desconociendo la identidad de las muestras que se están estudiando.

Cultivo celular-

Los inventores definieron un medio de glucosa normal (GN) como medio que contiene glucosa 5 mM, mientras que un medio con niveles altos de glucosa (GA) se denomina medio que contiene glucosa 30 mM, que se eligió para que coincidiera con los niveles de glucosa prevalentes en pacientes diabéticos no controlados³¹. Otros investigadores han utilizado estas concentraciones de glucosa para los experimentos de hiperglucemia *in vitro*^{32, 33}.

Se cultivaron células humanas de Schwann (HSC, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) derivadas de cultivo primario y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC, Manassas, VA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ScienCell Research Laboratories y ATCC). Para examinar el efecto de la T β 4 sobre las HSC, se cultivaron HSC en condiciones de GN o GA en presencia de diferentes concentraciones de T β 4 (0, 25, 50 y 100 ng/ml) durante 24 o 72 horas. Las células se recogieron para la RT-PCR en tiempo real y el análisis de transferencia de tipo Western. Para recolectar el medio acondicionado de las HSC, se sembraron en placas $2,5 \times 10^6$ HSC en placas de 35 mm de diámetro en 1,2 ml de medio definido. Las células se cultivaron en condiciones de GN y GA en presencia o ausencia de T β 4 (100 ng/ml) durante 24 horas. Las HSC se lavaron tres veces con PBS y se añadió un medio libre de suero fresco para evitar la contaminación excesiva por T β 4. Las células se cultivaron durante 48 horas adicionales, el sobrenadante (medio acondicionado) se recogió, se centrifugó durante 10 minutos a 1.000 rpm y se almacenó a -80 °C.

Para evaluar el efecto de la T β 4 en la angiogénesis *in vitro*, se utilizó un ensayo de tubo de tipo capilar³⁴⁻³⁶. En pocas palabras, se cultivaron las HUVEC (2×10^4 células) en placas de 96 pocillos revestidas con Matrigel (BD Biosciences, Rockville, MD) en el medio acondicionado o Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en presencia o ausencia de T β 4 (0, 25, 50 y 100 ng/ml) durante 5 horas. La longitud total de los tubos se midió en 3 campos aleatorios de cada pocillo utilizando MCID³⁷.

RT-PCR en tiempo real -

Las muestras de ARN total de las células se aislaron utilizando el kit de aislamiento Stratagene Absolutely RNA MicroRNA (Stratagene, La Jolla, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (ADNc) se transcribió de forma inversa a partir de las mismas concentraciones de productos de ARN total utilizando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA). Utilizando el procedimiento de PCR en tiempo real con verde SYBR³⁸, se realizó la PCR cuantitativa en un instrumento de PCR ABI 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) mediante parámetros de programa de tres etapas proporcionados por el fabricante, de la siguiente manera; 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C y, a continuación, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. La especificidad del producto de amplificación producido se confirmó mediante el examen de los diagramas de la reacción de disociación. Cada muestra se analizó por triplicado y las muestras obtenidas de tres experimentos independientes se utilizaron para el análisis de la expresión génica relativa utilizando el procedimiento $2^{-\Delta\Delta CT}$ ³⁹. Se diseñaron los siguientes cebadores para la PCR en tiempo real utilizando el software Primer Express (ABI): gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (DIR, AGA ACA TCA TCC CTG CAT CC (SEQ ID NO: 7); INV, CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC (SEQ ID NO: 8)) y Ang1 (DIR, GAA GGG AAC CGA GCC TAT TC (SEQ ID NO: 9); INV, GCT GAA ATC AGC ACC GTG TA (SEQ ID NO: 10)), Ang2 (DIR, CAG ATC CGG GCT CTA GAC AG (SEQ ID NO: 11); INV, TCC GGA AAT CGT TCT TCA TC (SEQ ID NO: 12)).

Análisis de transferencia de tipo Western-

Se realizó el análisis de transferencia de tipo Western según los procedimientos publicados³⁸. Brevemente, se

cargaron cantidades iguales de proteínas en gel de SDS-poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y, a continuación, se aplicaron las sondas a las transferencias con los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal anti-Ang1 de conejo (1:1.000; Abcam, Cambridge, MA), anticuerpo policlonal anti-Ang2 de conejo (1:1.000; Abcam), fosfo-Akt (1:1.000, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA) y Akt (1:1.000, Cell Signaling Technology). Para la detección, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:2.000) seguido de desarrollo de quimioluminiscencia potenciado (Pierce, Rockford, IL). La normalización de los resultados se garantizó mediante la realización en paralelo de transferencia de tipo Western con anticuerpos contra β -actina. La densidad óptica se cuantificó utilizando un programa de procesamiento y análisis de imágenes (Scion Image, Ederick, MA).

10 **Análisis estadístico-**

Los datos se evaluaron para determinar normalidad. Se consideró la transformación de datos si los datos no eran normales. Como resultado, se utilizaron para el análisis los datos clasificados. Se implementó la prueba global que utiliza la ecuación de estimación generalizada (GEE) para analizar la diferencia de grupo en la recuperación funcional medida. El análisis comenzó ensayando el efecto de grupo general del tratamiento, seguido de un análisis por subgrupos al nivel de 0,05, si el efecto de grupo general se detectó a nivel de 0,05. La prueba global de resultados múltiples es más eficiente que un solo resultado, cuando los efectos de la dosis son congruentes en todos los resultados (por ejemplo, la correlación positiva). Un efecto de dosis significativo en la recuperación funcional ($p < 0,05$ basado en la prueba global) se analizará adicionalmente en el resultado individual a 0,05. Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar el efecto general del grupo. Los datos se presentan en forma de la media \pm SE. Se tomó un valor de $P < 0,05$ como significativo.

25 **Resultados:**

Los datos de los inventores indicaron que la T β 4 mejora la disfunción vascular inducida por la diabetes en el nervio ciático.

Para examinar si los ratones db/db desarrollan una alteración de la neurovasculatura, los inventores examinaron los microvasos de los vasos de los nervios en el nervio ciático de los ratones a la edad de 28 semanas. El análisis de los vasos inmunorreactivos frente al vWF de los vasos de los nervios reveló que el perímetro de los vasos sanguíneos en los ratones db/db se había reducido significativamente en comparación con los de los ratones db/m de la misma edad, aunque la densidad vascular no era significativamente diferente entre estos dos grupos ($73,5 \pm 10,5$ frente a $56,9 \pm 6,4$ en ratones db/m, $p > 0,05$) (figura 1). La figura 1 contiene datos que muestran que la T β 4 mejora la función vascular en el nervio ciático. Los paneles A a C muestran vasos sanguíneos inmunorreactivos frente a vWF en la sección transversal del nervio ciático de un ratón db/m representativo (A), un ratón db/db tratado con solución salina (B) y un ratón db/db tratado con T β 4 (24 mg/kg, C). Los paneles D a F muestran vasos perfundidos con FITC-dextrano en la sección transversal del nervio ciático de un ratón db/m representativo (D), un ratón db/db tratado con solución salina (E) y un ratón db/db tratado con T β 4 (24 mg/kg, F). Los paneles G e I muestran datos cuantitativos de los perímetros vasculares inmunorreactivos frente a vWF (G, $n = 6/\text{grupo}$) y la densidad de los vasos perfundidos con FITC-dextrano (H, $n = 4/\text{grupo}$), los vasos inmunorreactivos frente a ocludina (I, $n = 6/\text{grupo}$) y los cambios en porcentaje del flujo sanguíneo del nervio ciático con una referencia de ratones db/m al 100% (J, $n = 4/\text{grupo}$). dm = ratón db/m; db = ratón db/db. Además, los ratones db/db exhibieron una reducción sustancial de ocludina, una proteína de la unión estrecha, vasos inmunorreactivos (figura 1). Para examinar si el perímetro reducido en los ratones db/db afecta a la función vascular, los inventores midieron los microvasos perfundidos con plasma, que representan vasos funcionales^{7, 26} y el flujo sanguíneo regional. Para medir los vasos perfundidos con plasma, los inventores inyectaron por vía intravenosa FITC-dextrano en los ratones y, a continuación, sacrificaron a los ratones 10 minutos después de la inyección, lo que proporcionó suficiente tiempo para que el FITC-dextrano circule por todo el sistema vascular en condiciones fisiológicas. El análisis cuantitativo de los vasos perfundidos con FITC-dextrano en las secciones transversales de los nervios ciáticos reveló que los ratones db/db presentaban una reducción significativa en las densidades microvasculares perfundidas por FITC-dextrano en comparación con los ratones db/m (figura 1). En paralelo, el flujo sanguíneo del nervio ciático medido por LDF se redujo significativamente en los ratones db/db en comparación con el de los ratones db/m (figura 1). En conjunto, estos datos indican que la diabetes induce disfunción vascular en el nervio ciático, lo cual es coherente con los estudios publicados^{6, 7, 40}. Sin embargo, los ratones db/db tratados con T β 4 a dosis de 6 y 24 mg/kg durante 4 semanas a partir de la edad del animal de 20 semanas exhibieron aumentos significativos en el perímetro vascular, vasos inmunorreactivos a ocludina, la densidad de vasos perfundidos con FITC-dextrano y ciático flujo sanguíneo del nervio a la edad de 28 semanas en comparación con los ratones db/db tratados con solución salina, que estaban cerca de los niveles medidos en los ratones db/m (figura 1). De forma similar, los datos de la figura 2 muestran que la T β 4 aumenta el área inmunorreactiva a ocludina en las paredes del vaso. Los paneles A a L muestran que los vasos inmunorreactivos a CD31 (verde) eran positivos para ocludina (color rojo) de un ratón db/m representativo (A-D, dm), una ratón db/db tratado con solución salina (E-H, db) y un ratón db/db tratado con T β 4 (24 mg/kg, I-L). El panel M muestra datos cuantitativos del porcentaje del área inmunorreactiva a ocludina. $\#p < 0,05$ frente a los ratones db/db tratados con solución salina, $n = 6/\text{grupo}$. Estos datos indican que la T β 4 mejora la disfunción vascular inducida por la diabetes en el nervio ciático.

Los datos de los inventores indicaron que la Tβ4 mejora la función neurológica en el ratón diabético.

La alteración de la conducción nerviosa periférica es un indicador clave para pacientes diabéticos con neuropatía periférica^{41,42} y la disfunción vascular afecta a la conducción nerviosa^{4,5}. Por lo tanto, los inventores evaluaron si el aumento del flujo sanguíneo regional por Tβ4 afecta a la velocidad de conducción motora y sensorial (VCM y VCS) en el nervio ciático. Los registros electrofisiológicos mostraron que la VCM y la VCS se ralentizaron significativamente en ratones db/db en comparación con las de los ratones db/m de la misma edad (figura 3), que son comparables con los valores notificados por otros^{7,43}. La figura 3 muestra datos relacionados con el efecto de la Tβ4 sobre la función neurológica. El tratamiento de ratones db/db con Tβ4 mejora la función neurológica medida mediante la VCM (A), la VCS (B), la prueba de la retirada de la cola (C) y la prueba de la placa caliente (D). *P < 0,05 y #P < 0,05 frente a ratones db/m y ratones db/db tratado con solución salina, respectivamente. n = 10/grupo. dm = ratón db/m; db = ratón db/db. El tratamiento de los ratones db/db con Tβ4 a dosis de 6 y 24 mg/kg durante 4 semanas mostró una mejora notable tanto en la VCM como en la VCS al final del tratamiento con Tβ4 y a las 4 semanas de la finalización del tratamiento en comparación con los ratones db/db tratados con solución salina (figura 3). A continuación, los inventores examinaron el efecto del tratamiento con Tβ4 sobre la función sensorial midiendo la latencia térmica con las pruebas de retirada de la cola y en placa caliente. El tratamiento de los ratones db/db con Tβ4 mejoró notablemente la latencia térmica comenzando al final del tratamiento con Tβ4, que persistió durante al menos 4 semanas después de la finalización del tratamiento (el final del período experimental) (figura 4). Para examinar el efecto de la Tβ4 en ratones no diabéticos, los inventores trataron a los ratones db/m con Tβ4 a una dosis de 6 mg/kg y no detectaron ningún cambio funcional medido por los procedimientos enumerados anteriormente. Véase la figura 4. El tratamiento de ratones db/m con Tβ4 a 6 mg/kg no modificó la función neurológica medida por la VCM (A), la VCS (B), la prueba de retirada de la cola (C) y la prueba de placas calientes (D). n = 10 ratones/grupo. dm = ratón db/m. Estos datos indican que la Tβ4 mejora la función nerviosa periférica en el ratón diabético.

El tratamiento del ratón db/db con Tβ4 no alteró significativamente los niveles de glucemia y el peso corporal del animal (Tabla 1 y 2).

Los datos de los inventores indicaron que la Tβ4 regula los genes proangiogénicos en el nervio ciático.

Se han detectado alteraciones de los niveles de Ang1 y Ang2 en pacientes diabéticos y diabetes experimental^{21, 25}. Para examinar el efecto de Tβ4 en estos genes angiogénicos, los inventores midieron los niveles proteicos de Ang1 y Ang2. La figura 5 muestra datos que indican que la Tβ4 regula positivamente la expresión de Ang1 en células endoteliales y células de Schwann en ratones diabéticos. El análisis por transferencia de Western (A y B) de los niveles de Ang1 y Ang2 en el tejido del nervio ciático y β-actina se utilizó como control interno. Imágenes representativas de doble tinción inmunofluorescente muestran que la inmunoreactividad de Ang1 (C, F, G, J, color rojo, flechas) se colocó en los vasos positivos para CD31 (D, F, color verde) y células de Schwann positivas para S100 (H, J, color verde, flechas). *P < 0,05 y #P < 0,05 frente a ratones db/m y ratones db/db tratados con solución salina, respectivamente. n = 6/grupo. dm = ratón db/m; db = ratón db/db. El análisis por transferencia de tipo Western del nervio ciático mostró una reducción sustancial de los niveles de Ang1 y un aumento de los niveles de Ang2 en ratones db/db (figura 5), mientras que el tratamiento de los ratones db/db con Tβ4 aumentó significativamente la expresión de Ang1, pero disminuyó la expresión de Ang2 (figura 5). La inmunotinción doble reveló que las células inmunorreactivas a Ang1 eran positivas para CD31 (un marcador de células endoteliales) y S100 (un marcador de células de Schwann) (figura 5). En conjunto, estos datos indican que la Tβ4 regula la expresión de Ang1 en células endoteliales y células de Schwann en ratones diabéticos.

Los datos de los inventores indicaron que la vía de señalización de Ang/Tie2 media el efecto de la Tβ4 sobre la función endotelial.

Los datos *in vivo* mencionados anteriormente sugieren que los genes Ang1 y Ang2 median la función vascular mejorada con Tβ4 en ratones diabéticos. Para examinar una causa-efecto de estos genes sobre las células endoteliales en condiciones de hiperglucemia, los inventores realizaron experimentos *in vitro* que utilizan un ensayo de formación de tubo de tipo capilar, que se utiliza ampliamente para examinar la función endotelial *in vitro*^{34,35,37,44}. La figura 6 muestra datos que indican que la vía de señalización de Ang/Tie2 media el efecto de la Tβ4 sobre la función endotelial. Imágenes microscópicas representativas (A) y datos cuantitativos (B) muestran la formación de tubo de tipo capilar en HUVEC cultivadas en niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H), niveles de glucosa altos con Tβ4 (A + TB4, 100 ng/ml), y niveles de glucosa altos con Tβ4 en presencia de un anticuerpo neutralizante contra Tie2 (+ Tie2, 5 µg/ml). Los datos de RT-PCR en tiempo real (C) y transferencia de tipo Western (D) muestran niveles de ARNm y de proteínas de Ang1 y Ang2 en células HUVEC cultivadas con niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H), niveles de glucosa altos con Tβ4 (+ TB4) y niveles de glucosa altos con Tβ4 en presencia de LY294003 (+ LY, 10 µM). El panel E muestra un análisis por transferencia de tipo Western de pAkt y Akt total en células HUVEC cultivadas en diferentes condiciones enumeradas anteriormente. Se utilizaron GAPDH y β-actina como controles internos para ARNm y proteínas, respectivamente. *P < 0,05, #P < 0,05 y \$P < 0,05 frente a los grupos de niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H) y niveles de glucosa altos con Tβ4 (100 ng/ml), respectivamente. n = 6/grupo. La incubación de HUVEC en condiciones de niveles de glucosa altos disminuyó la formación de tubos de tipo capilar en comparación con las HUVEC cultivadas en condiciones de

glucosa normales (figura 6). Sin embargo, T β 4 suprimió el efecto de los niveles de glucosa altos sobre la reducción de la formación de tubo de tipo capilar (figura 6). La RT-PCR cuantitativa y el análisis por transferencia de tipo Western demostraron que la incubación de HUVEC con niveles de glucosa altos disminuyó sustancialmente y aumentó la expresión de Ang1 y Ang2, respectivamente (figura 6), mientras que la T β 4 suprimía la expresión de Ang1 y Ang2 inducida por niveles de glucosa altos (figura 6). El bloqueo de Tie2, un receptor de Ang1 y Ang2, con un anticuerpo de naturalización contra Tie2 inhibió la formación de tubo de tipo capilar aumentado por T β 4 (figura 6). Estos datos indican que la vía de señalización de Ang/Tie2 desempeña un papel importante en la mediación de la función endotelial mejorada por T β 4 en condiciones de hiperglucemia.

Los datos de los inventores indicaron que la Ang1 secretada por células de Schwann tratadas con T β 4 mejoraba la función endotelial.

Además de las células endoteliales, los datos de inmunotinción doble *in vivo* de los inventores mostraron que las células de Schwann expresaban Ang1. Por lo tanto, los inventores examinaron el efecto de la T β 4 sobre la expresión de angiopoyetina en las células de Schwann. La figura 7 muestra datos que indican que Ang1 secretada por las células de Schwann tratadas con T β 4 mejora la función endotelial. Los datos de RT-PCR en tiempo real (C) y transferencia de tipo Western (B) muestran niveles de ARNm y de proteínas de Ang1 y Ang2 en células HSC cultivadas con niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H), niveles de glucosa altos con T β 4 (+ TB4), y niveles de glucosa altos con T β 4 en presencia de LY294003 (+ LY). El panel C muestra un análisis por transferencia de tipo Western de pAkt y Akt total en células HSC cultivadas en diferentes condiciones enumeradas anteriormente. Se utilizaron GAPDH y β -actina como controles internos para ARNm y proteínas, respectivamente. El panel D muestra los datos de ELISA de los niveles de Ang1 en sobrenadantes cosechados de HSC cultivadas con niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H), niveles de glucosa altos y T β 4 (+ TB4, 100 ng/ml) y niveles de glucosa altos y T β 4 en presencia de LY294003 (+ LY). Imágenes microscópicas representativas (E) y datos cuantitativos (F) muestran la formación de tubo de tipo capilar en HUVEC cultivadas con el medio acondicionado recogido de las HSC en condiciones de niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H), niveles de glucosa altos con T β 4 (+ TB4, 100 ng/ml), y niveles de glucosa altos y T β 4 en presencia del anticuerpo contra Tie2 (+ Tie2). *P < 0,05, #P < 0,05 y \$P < 0,05 frente a los grupos de niveles de glucosa normales (N), niveles de glucosa altos (H) y niveles de glucosa altos con T β 4 (100 ng/ml), respectivamente. n = 6/grupo. Los niveles de glucosa altos regularon negativamente sustancialmente la Ang1 y regularon positivamente la Ang2, mientras que la T β 4 a una dosis de 100 ng/ml suprimió el efecto de niveles de glucosa altos sobre la expresión de angiopoyetina en HSC (figura 7, lo que sugiere que la T β 4 también regula la expresión de angiopoyetina en células de Schwann. A continuación, los inventores investigaron si células de Schwann secretaban Ang1 regulada positivamente por T β 4 que mejora, en consecuencia, la función vascular en condiciones de niveles altos de glucosa. Utilizando un ELISA específico para detectar Ang1 de ratón, los inventores midieron los niveles de Ang1 en sobrenadantes cosechados de HSC cultivadas durante 48 horas. El ELISA demostró que los sobrenadantes de HSC cultivados con niveles de glucosa altos presentaban una reducción significativa de los niveles de Ang1 en comparación con los niveles en los sobrenadantes recogidos de la condición de niveles de glucosa normales, mientras que la T β 4 invirtió el efecto de la niveles de glucosa altos en los niveles de Ang1 (figura 7).

A continuación, los inventores examinaron el efecto de los sobrenadantes sobre la formación de tubos de tipo capilar mediante el cultivo de HUVEC con medio acondicionado cosechado de HSC. En comparación con el medio acondicionado recogido de HSC cultivadas con niveles de glucosa normales, el medio acondicionado de HSC cultivadas en condiciones de niveles de glucosa altos dio como resultado una disminución significativa de la formación de tubo de tipo capilar (figura 7). Por el contrario, el medio acondicionado recogido de las HSC tratadas con T β 4 en condiciones de niveles de glucosa altos aumentó significativamente la formación de tubos de tipo capilar. En presencia del anticuerpo neutralizante contra Tie2, se inhibió el efecto del medio acondicionado con T β 4 sobre la formación de tubo de tipo capilar (figura 7). En conjunto, estos datos indican que, además de Ang1 endotelial, la Ang1 soluble secretada por las células de Schwann tratadas con T β 4 mejora la función de las células endoteliales.

Los datos de los inventores indicaron que la vía de señalización de PI3K/Akt media el efecto de la T β 4 sobre la expresión de Ang1.

Para evaluar además si las vías de señalización intracelular están involucradas en Ang1/Ang2 regulada positivamente por T β 4 en células endoteliales y células de Schwann, los inventores examinaron la vía de señalización PI3K/Akt que se ha indicado que participa en el efecto de la T β 4 en la migración de células progenitoras endoteliales⁴⁵. El análisis por transferencia de tipo Western de HUVEC y HSC mostró que la condición de niveles de glucosa altos disminuyó marcadamente los niveles de pAkt en comparación con los niveles de glucosa normales (figuras 6 y 7). El tratamiento de las células HUVEC y HSC con T β 4 en condiciones de niveles de glucosa altos aumentó significativamente los niveles de pAkt, que se bloquearon completamente con un inhibidor de PI3K, LY294002 (figuras 6 y 7), lo que indica que la T β 4 activa la vía de señalización de PI3K/Akt. Además, LY294002 suprimió por completo el efecto de la T β 4 sobre la expresión de Ang1, pero no de Ang2 en las células HUVEC y HSC en condiciones de niveles de glucosa altos (figuras 6 y 7). Estos datos sugieren que la vía de señalización de PI3K/Akt está implicada en la expresión de Ang1 regulada por T β 4 en las células endoteliales y de Schwann.

El trabajo de los inventores por primera vez demuestra que la T β 4 mejoraba notable e inesperadamente la función

vascular en el nervio ciático y la función del nervio periférico en un modelo en ratón de neuropatía periférica diabética. Sin desear estar ligados a teoría específica alguna, la vía de señalización de Ang/Tie2 puede participar en el efecto de la Tβ4 sobre la función vascular mejorada. El efecto de la Tβ4 sobre la neuropatía periférica diabética no se ha investigado previamente. Utilizando un modelo en ratón bien establecido de diabetes de tipo II, el trabajo de los inventores indica que la Tβ4 mejora la neuropatía periférica diabética, evidenciada por la reducción de los déficit de la velocidad de conducción del nervio ciático, un parámetro clave para la neuropatía diabética periférica y la mejora de las respuestas a estímulos térmicos y mecánicos. Los datos de los inventores indican que, en algunas realizaciones, sin limitación a las mismas, se puede utilizar Tβ4 para el tratamiento de la neuropatía periférica diabética.

Los estudios de neuropatía periférica diabética de animales de experimentación y seres humanos indican que el desarrollo de la neuropatía diabética está estrechamente relacionado con una disfunción neurovascular marcada¹⁻³. La disfunción vascular precede a la aparición de déficit de la velocidad de conducción nerviosa, lo que produce daños nerviosos³⁻⁵. Los datos de los inventores demostraron que la Tβ4 aumentaba sustancialmente los vasos perfundidos con plasma y el flujo sanguíneo regional en el nervio ciático, junto con la mejora de la función neurológica de la neuropatía diabética, lo que sugiere que la normalización de la función vascular por Tβ4 puede contribuir a la reducción observada de los déficit de la velocidad de conducción nerviosa.

La vía de señalización de Ang/Tie2 regula la homeostasis vascular^{17,18}. Ang1 estimula la maduración vascular, mientras que Ang2 actúa como un inhibidor competitivo de Ang1 por la unión de Tie2 y desestabiliza los vasos sanguíneos^{17,19,20}. La hiperglucemia regula negativamente la Ang1 y regula positivamente la Ang2²¹. Los aumentos en los niveles de Ang1 normalizan la vasculatura inmadura inducida por la diabetes²⁴. La Ang1, al aumentar la angiogénesis, reduce el infarto de miocardio, mientras que una elevación de los niveles de Ang2 agrava el infarto en ratas diabéticas²¹. Los pacientes con neuropatía periférica diabética tienen niveles significativamente elevados de Ang2 circulante²⁵. Los datos de los inventores muestran que la hiperglucemia regulaba negativamente la Ang1 y regulaba positivamente la Ang2 en las células endoteliales y las células de Schwann, mientras que la Tβ4 invirtió la expresión de Ang1 y Ang2. La Tβ4 es un potente factor angiogénico y regula la angiogénesis y la vasculogénesis durante el desarrollo estimulando la diferenciación de células progenitoras y dirigiendo la migración de células endoteliales^{10, 46, 47}.

Los datos de los inventores muestran que el bloqueo de Tie2 con un anticuerpo neutralizante suprimía el efecto de Tβ4 en la angiogénesis *in vitro* implica la participación de la vía de señalización de Ang/Tie2 en la función vascular mejorada de Tβ4 observada *in vivo*. Sin desear quedar ligado a teoría específica alguna, los datos de los inventores sugieren además que la Tβ4 regula la Ang1 a través de la activación de la vía PI3K/Akt.

Las células de Schwann secretan numerosos factores que regulan la degeneración y la regeneración de los nervios periféricos⁴⁸⁻⁵⁰. El trabajo de los inventores demostró que Ang1 y Ang2 secretadas por las células de Schwann afectaban a la función endotelial en condiciones de hiperglucemia, mientras que los niveles de Ang1 elevados por Tβ4 en las células de Schwann conducen a la mejora de la angiogénesis *in vitro*. Por tanto, sin desear quedar ligado a teoría específica alguna, la Tβ4 puede actuar sobre las células endoteliales y las células de Schwann para preservar y/o restaurar la función vascular en el nervio ciático, lo que facilita la mejora de la función del nervio periférico en condiciones de neuropatía diabética.

Sin limitación a solo aquellas realizaciones dadas a conocer en el presente documento y sin limitación de otras realizaciones u objeto, las composiciones que comprenden algunas realizaciones se administran y dosifican de acuerdo con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el procedimiento de administración, la pauta posológica, la edad del paciente, el sexo, el peso corporal y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" para los fines del presente documento se determina de este modo mediante consideraciones tales como las conocidas en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para conseguir una mejora incluyendo, pero sin limitaciones, los indicadores de enfermedad disminuidos, frecuencia o gravedad de la enfermedad disminuida, o la mejora o eliminación de los síntomas y otros indicadores como se seleccionan como medidas apropiadas por los expertos en la materia.

La administración puede realizarse de diversas maneras. Se puede administrar de forma individual como principio activo en combinación con excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. La administración puede ser oral, subcutánea o parenteral, incluyendo la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal e intranasal, así como las técnicas de administración intratecal y de infusión, o mediante administración local o inyección directa al sitio de la enfermedad o afección patológica. Los implantes de los compuestos son también útiles. El paciente que se está tratando puede ser un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos, incluyendo el ser humano. Los excipientes, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables, así como los vehículos de implantes, se refieren, generalmente, a cargas, diluyentes o material de encapsulación sólidos o líquidos inertes y no tóxicos que no reaccionan con los principios activos de algunas realizaciones.

Se observa que los seres humanos se tratan, generalmente, más tiempo que los animales experimentales ilustrados como ejemplos en la presente invención, cuyo tratamiento tiene una duración proporcional a la duración del proceso

de la enfermedad y la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples durante periodos de tiempo. El tratamiento generalmente tiene una longitud proporcional a la longitud del proceso de la enfermedad y la eficacia del fármaco y la especie del paciente que se está tratando.

5 Cuando se administra en algunas realizaciones por vía parenteral, generalmente se formulará en una forma inyectable de monodosis (solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

10 Cuando sea necesario, se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por la utilización de surfactantes. También se pueden utilizar vehículos no acuosos, tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol o aceite de cacahuete, y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas de disolventes para realizaciones seleccionadas. Además, se pueden añadir diversos aditivos que aumenten la estabilidad, la esterilidad y la isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de los microorganismos se puede garantizar mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede efectuar mediante la utilización de agentes retardantes de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina. Cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado debería ser compatible con la realización seleccionada.

25 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de la realización deseada en la cantidad requerida del disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes, según se desee.

30 Una formulación farmacológica que comprende algunas realizaciones puede administrarse al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier excipiente compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o las realizaciones pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de administración dirigida. Los expertos en la materia conocen bien muchos otros implantes, sistemas de liberación y módulos de este tipo.

35 Las composiciones que comprenden algunas realizaciones pueden estar en cualquier forma adecuada y para utilización interna o externa. Las preparaciones para utilización interna incluyen polvos, comprimidos, cápsulas de gránulos dispersables, soluciones, suspensiones y emulsiones adecuadas para ingestión o inyección oral.

40 Las composiciones tópicas también se pueden administrar en forma de apósitos para heridas, parches transdérmicos y similares.

45 En algunas realizaciones, sin limitación a solo las dadas a conocer en el presente documento y sin limitación de otras realizaciones u objeto, la dosificación terapéuticamente eficaz puede determinarse de acuerdo con la afección del sujeto, el nivel de sintomatología observado, la vía y/o frecuencia de administración, y otras consideraciones y técnicas conocidas o disponibles para el experto en la materia y aplicadas de acuerdo con los las buenas normas y prácticas científicas o médicas.

50 Sin limitación, algunas realizaciones se pueden utilizar junto con cualquier tipo de animal, incluyendo, aunque sin limitaciones a los mismos, seres humanos y otros mamíferos.

55 Se apreciará que se pueden realizar diversos cambios o modificaciones en las realizaciones, tal como se describen y reivindican en el presente documento sin apartarse del alcance de las mismas. Aunque la presente invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencia a las realizaciones preferentes y alternativas anteriores, los expertos en la materia deben entender que se pueden emplear diversas alternativas a las realizaciones de la invención descritas en el presente documento para poner en práctica la invención sin apartarse del alcance de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los equivalentes se cubran de ese modo. Debe entenderse que esta descripción de la invención incluye todas las combinaciones novedosas y no obvias de elementos descritos en el presente documento.

60 Las realizaciones anteriores son ilustrativas y no restrictivas. Muchas realizaciones y aplicaciones además de los ejemplos dados a conocer serán evidentes para los expertos en la materia a la luz de la lectura de la descripción anterior. El alcance de la presente invención deberá determinarse, no con referencia a la descripción anterior, sino, en su lugar, determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes a los que tienen derecho dichas reivindicaciones. En resumen, debe entenderse que la invención es susceptible de modificación y variación, y está limitada únicamente por las reivindicaciones siguientes.

Se pretende que todos los términos utilizados en las reivindicaciones tengan sus construcciones más amplias razonables y sus significados ordinarios, tal como lo entienden los expertos en la materia a menos que se haga una indicación explícita en sentido contrario. En particular, la utilización de los artículos en singular tales como "un/una", "el/la", "dicho/dicha", etc. debe leerse para citar uno o más de los elementos indicados, a menos que una reivindicación cite una limitación explícita en sentido contrario. Cuando las reivindicaciones citen "un" o "un primer" elemento del equivalente del mismo, debe entenderse que dichas reivindicaciones incluyen la incorporación de uno o más de dichos elementos, sin requerir ni excluir dos o más de dichos elementos.

10 Referencias

1. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2001; 44: 1973-1988
- 15 2. Tesfaye S, Harris N, Jakubowski JJ, Mody C, Wilson RM, Rennie IG, y otros, Impaired blood flow and arterio-venous shunting in human diabetic neuropathy: A novel technique of nerve photography and fluorescein angiography. *Diabetologia*. 1993; 36: 1266-1274
- 20 3. Ebenezer GJ, O'Donnell R, Hauer P, Cimino NP, McArthur JC, Polydefkis M. Impaired neurovascular repair in subjects with diabetes following experimental intracutaneous axotomy. *Brain*. 2011; 134: 1853-1863
4. Cameron NE, Cotter MA. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999; 45: 137-146
- 25 5. Cameron NE, Gibson TM, Nangle MR, Cotter MA. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043: 784-792
- 30 6. Kusano KF, Allendoerfer KL, Munger W, Pola R, Bosch-Marce M, Kirchmair R, y otros, Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 2102-2107
7. Li M, Nishimura H, Kusano KF, Qin G, Yoon YS, Wecker A, y otros. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation*. 2005; 112: 93-102
- 35 8. Schratzberger P, Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Pola R, Curry C, y otros. Reversal of experimental diabetic neuropathy by vegf gene transfer. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1083-1092
9. Goldstein AL, Slater FD, White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966; 56: 1010-1017
- 40 10. Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, y otros. Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature*. 2007; 445: 177-182
- 45 11. Crockford D. Development of thymosin beta4 for treatment of patients with ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1112: 385-395
12. ClinicalTrials.gov. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01311518>
- 50 13. Morris DC, Chopp M, Zhang L, Lu M, Zhang ZG. Thymosin beta4 improves functional neurological outcome in a rat model of embolic stroke. *Neuroscience*. 2010; 169: 674-682
14. Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Zhang Y, Zhang ZG, Morris DC, y otros. Treatment of traumatic brain injury with thymosin beta in rats. *J Neurosurg*. 2011; 114: 102-115
- 55 15. Zhang J, Zhang ZG, Morris D, Li Y, Roberts C, Elias SB, y otros. Neurological functional recovery after thymosin beta4 treatment in mice with experimental auto encephalomyelitis. *Neuroscience*. 2009; 164: 1887-1893
- 60 16. Philp D, Badamchian M, Scheremeta B, Nguyen M, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen*. 2003; 11: 19-24
17. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, y otros. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996; 87: 1171-1180
- 65 18. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendek MP, y otros. Biological

- action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of tie2. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 659-670
- 5 19. Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, y otros. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: Evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation.* 2005; 112: 2477-2486
- 10 20. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, y otros. Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997; 277: 55-60
- 15 21. Tuo QH, Zeng H, Stinnett A, Yu H, Aschner JL, Liao DF, y otros. Critical role of angiopoietins/tie-2 in hyperglycemic exacerbation of myocardial infarction and impaired angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294: H2547-2557
22. Chen JX, Stinnett A. Disruption of ang-1/tie-2 signaling contributes to the impaired myocardial vascular maturation and angiogenesis in type ii diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1606-1613
- 20 23. Kim HW, Kim JL, Lee HK, Hur DY, Yun IH, Kim SD. Enalapril alters expression of key growth factors in experimental diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2009; 34: 976-987
- 25 24. Chen JX, Stinnett A. Ang-1 gene therapy inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha (hif-1alpha)-prolyl-4-hydroxylase-2, stabilizes hif-1alpha expression, and normalizes immature vasculature in db/db mice. *Diabetes.* 2008; 57: 3335-3343
- 25 25. Rasul S, Reiter MH, Ilhan A, Lampichler K, Wagner L, Kautzky-Willer A. Circulating angiopoietin-2 and soluble tie-2 in type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2011; 10: 55
- 30 26. Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M. A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 123-135
27. Wang L, Chopp M, Szalad A, Liu Z, Bolz M, Alvarez FM, y otros. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience.* 2011; 193: 399-410
- 35 28. Vanderah TW, Suenaga NM, Ossipov MH, Malan TP, Jr., Lai J, Porreca F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* 2001; 21: 279-286
- 40 29. South SM, Smith MT. Apparent insensitivity of the hotplate latency test for detection of antinociception following intraperitoneal, intravenous or intracerebroventricular m6g administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286: 1326-1332
- 45 30. Zhang Z, Davies K, Probst J, Fenstermacher J, Chopp M. Quantitation of microvascular plasma perfusion and neuronal microtubule-associated protein in ischemic mouse brain by laser-scanning confocal microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 68-78
31. Wu QD, Wang JH, Fennessy F, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol.* 1999; 277: C1229-1238
- 50 32. Kim HK, Kim YJ, Kim JT, Kwon CH, Kim YK, Bae YC, y otros. Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats. *Stem Cells Dev.* 2008; 17: 669-680
33. Perrone L, Peluso G, Melone MA. Rage recycles at the plasma membrane in s100b secretory vesicles and promotes schwann cells morphological changes. *J Cell Physiol.* 2008; 217: 60-71
- 55 34. Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, y otros. Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: Its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 264: 743-750
- 60 35. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, y otros. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cgmp after stroke in the rat. *Circ Res.* 2003; 92: 308-313
- 65 36. Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, y otros. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004; 24: 441-448

37. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004; 35: 1732-1737

5 38. Wang L, Gang Zhang Z, Lan Zhang R, Chopp M. Activation of the pi3-k/akt pathway mediates cgrp enhanced-neurogenesis in the adult progenitor cells derived from the subventricular zone. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25: 1150-1158

10 39. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001; 25: 402-408

15 40. Jeong JO, Kim MO, Kim H, Lee MY, Kim SW, li M, y otros. Dual angiogenic and neurotrophic effects of bone marrow-derived endothelial progenitor cells on diabetic neuropathy. *Circulation*. 2009; 119: 699-708

20 41. Said G. Diabetic neuropathy--a review. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3: 331-340

25 42. Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempner P, y otros. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care*. 2010; 33: 2285-2293

30 43. Pande M, Hur J, Hong Y, Backus C, Hayes JM, Oh SS, y otros. Transcriptional profiling of diabetic neuropathy in the bks db/db mouse: A model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60: 1981-1989

35 44. Grant DS, Kinsella JL, Kibbey MC, LaFlamme S, Burbelo PD, Goldstein AL, y otros. Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci*. 1995; 108 (Pt 12): 3685-3694

40 45. Qiu FY, Song XX, Zheng H, Zhao YB, Fu GS. Thymosin beta4 induces endothelial progenitor cell migration via pi3k/akt/enos signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009; 53: 209-214

45 46. Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature*. 2004; 432: 466-472

50 47. Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, y otros. Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1112: 171-188

55 48. Campana WM. Schwann cells: Activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun*. 2007; 21: 522-527

60 49. Sobue G. [the role of schwann cells in peripheral nerve degeneration and regeneration--ngf-ngf receptor system]. *Rinsho Shinkeigaku*. 1990; 30: 1358-1360

65 50. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998; 18: 397-405

45 **TABLAS**

Tabla 1. Efecto de TB4 sobre el peso corporal

Grupos	Peso, g				
	0 s	2 s	4 s	6 s	8 s
dm-solución salina	30,3 ± 0,8*	30,8 ± 0,7*	30,4 ± 0,9*	30,1 ± 0,7*	30,9 ± 0,8*
db-solución salina	61,0 ± 0,8	61,2 ± 0,7	59,3 ± 1,2	57,6 ± 2,2	57,1 ± 2,8
db-TB4 (6mg/kg)	59,5 ± 0,9	57,1 ± 1,1	56,2 ± 1,2	53,7 ± 1,5	53,0 ± 1,7
db-TB4 (24mg/kg)	58,9 ± 1,1	58,1 ± 1,2	55,7 ± 1,5	56,0 ± 1,4	54,8 ± 1,6

50 Los valores son la media ± SEM. *P < 0,01 frente al grupo de db+solución salina. n = 10/grupo. S = semana, 0 representa antes del tratamiento, mientras que las otras cifras indican después del tratamiento. dm = ratones db/m; db = ratones db/db.

Tabla 2. Efecto de TB4 sobre la glucemia

Grupos	Glucemia (g/dl)				
	0 s	2 s	4 s	6 s	8 s
Dm-solución salina	141,6 ± 14,5*	138,6 ± 6,4*	141,4 ± 7,7*	140,1 ± 8,0*	141,3 ± 4,6*
db-solución salina	513,8 ± 14,0	516,6 ± 18,6	517,6 ± 10,7	516,4 ± 32,3	524,2 ± 23,3
db-TB4 (6mg/kg)	503,4 ± 24,0	513,4 ± 17,5	512,8 ± 24,8	517,6 ± 21,4	503,3 ± 18,0
db-TB4 (24mg/kg)	517,6 ± 15,0	515,9 ± 13,1	504,7 ± 16,5	521,6 ± 16,0	515,8 ± 19,3

Los valores son la media ± SEM. *P < 0,01 frente al grupo de db+solución salina. n = 10/grupo. S = semana, 0 s representa antes del tratamiento, mientras que las otras cifras indican después del tratamiento. dm = ratones db/m; db = ratones db/db.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 -

SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPLPSKETIEQEKGAGES

Ser - Asp - Lys - Pro - Asp - Met - Ala - Glu - Ile - Glu - Lys - Phe - Asp - Lys - Ser -
 Lys - Leu - Lys - Lys - Thr - Glu - Thr - Gln - Glu - Lys - Asn - Pro - Leu - Pro - Ser -
 Lys - Glu - Thr - Ile - Glu - Gln - Glu - Lys - Gln - Ala - Gly - Glu - Ser

SEQ ID NO: 2 -

Ac - Ser - Asp - Lys - Pro - Asp - Met - Ala - Glu - Ile - Glu - Lys - Phe - Asp - Lys -
 Ser - Lys - Leu - Lys - Lys - Thr - Glu - Thr - Gln - Glu - Lys - Asn - Pro - Leu - Pro -
 Ser - Lys - Glu - Thr - Ile - Glu - Gln - Glu - Lys - Gln - Ala - Gly - Glu - Ser

SEQ ID NO: 3 -

LKKTET

SEQ ID NO: 4 -

LKKTNT

SEQ ID NO: 5 -

KLKKTET

SEQ ID NO: 6 -

LKKTNTQ

SEQ ID NO: 7 -

AGA ACA TCA TCC CTG CAT CC

SEQ ID NO: 8 -

CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC

SEQ ID NO: 9 -

GAA GGG AAC CGA GCC TAT TC

SEQ ID NO: 10 -

GCT GAA ATC AGC ACC GTG TA

SEQ ID NO: 11 -

CAG ATC CGG GCT CTA GAC AG

5 **SEQ ID NO: 12 -**

TCC GGA AAT CGT TCT TCA TC.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende timosina $\beta 4$ para su utilización en el tratamiento para estimular la recuperación de la neuropatía periférica en un sujeto, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición.
- 10 2. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha neuropatía está asociada con la diabetes en dicho sujeto.
- 10 3. Composición, para la utilización según la reivindicación 2, en la que dicha diabetes es diabetes mellitus.
- 15 4. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra a dicho sujeto a una dosificación dentro de un intervalo de aproximadamente 1-100 microgramos de timosina $\beta 4$.
- 15 5. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra mediante administración directa a dicho tejido, o mediante administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, por inhalación, transdérmica u oral, a dicho sujeto.
- 20 6. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra por vía sistémica.
- 25 7. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición se administra directamente.
- 25 8. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición está en forma de una formulación en solución, gel, crema, pasta, loción, pulverización, suspensión, dispersión, bálsamo, hidrogel o pomada.
- 30 9. Composición, para la utilización según la reivindicación 1, en la que la secuencia de la timosina $\beta 4$ es un péptido recombinante o sintético.
- 35 10. Timosina $\beta 4$, para su utilización en el tratamiento para estimular la recuperación de la neuropatía periférica en un sujeto.
- 35 11. Timosina $\beta 4$, para la utilización según la reivindicación 10, en la que dicha neuropatía está asociada con diabetes.
- 40 12. Timosina $\beta 4$, para la utilización según la reivindicación 11, en la que dicha diabetes es diabetes mellitus.

FIG. 1

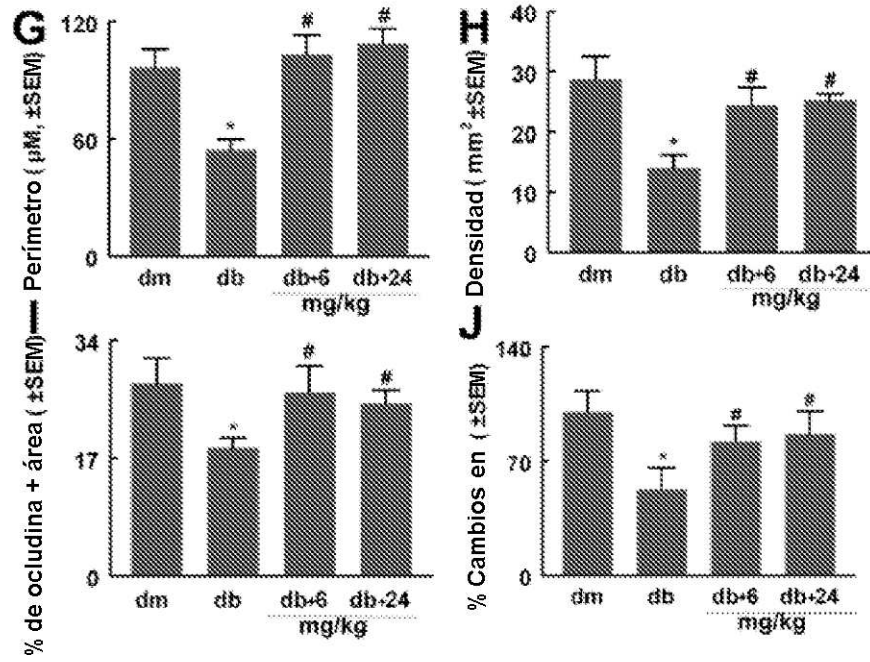
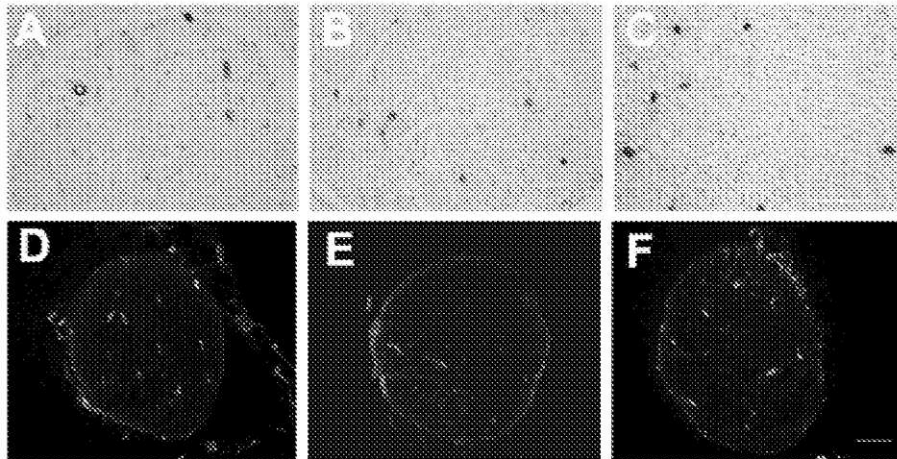


FIG. 2

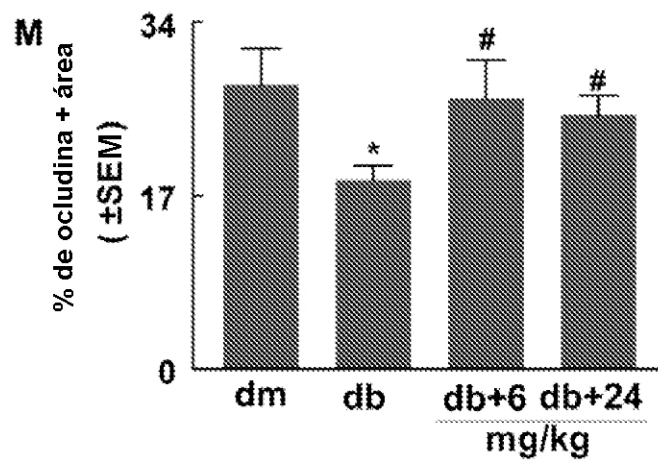
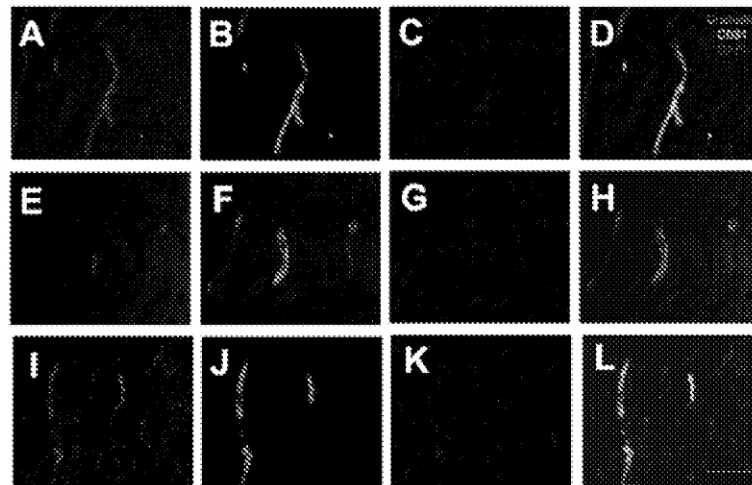


FIG. 3

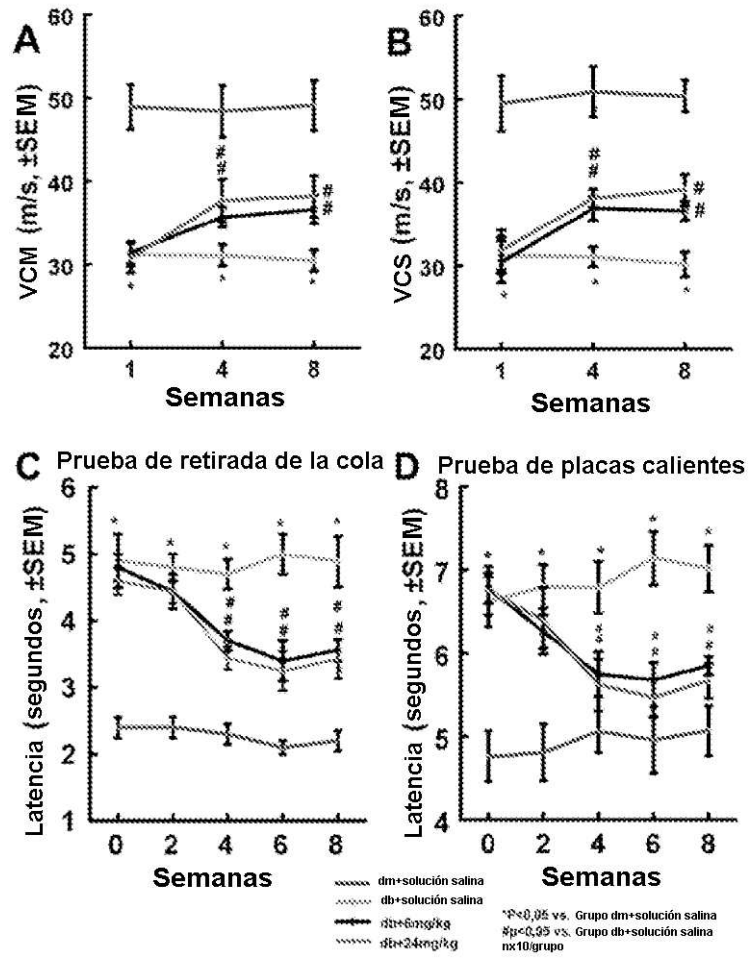


FIG. 4

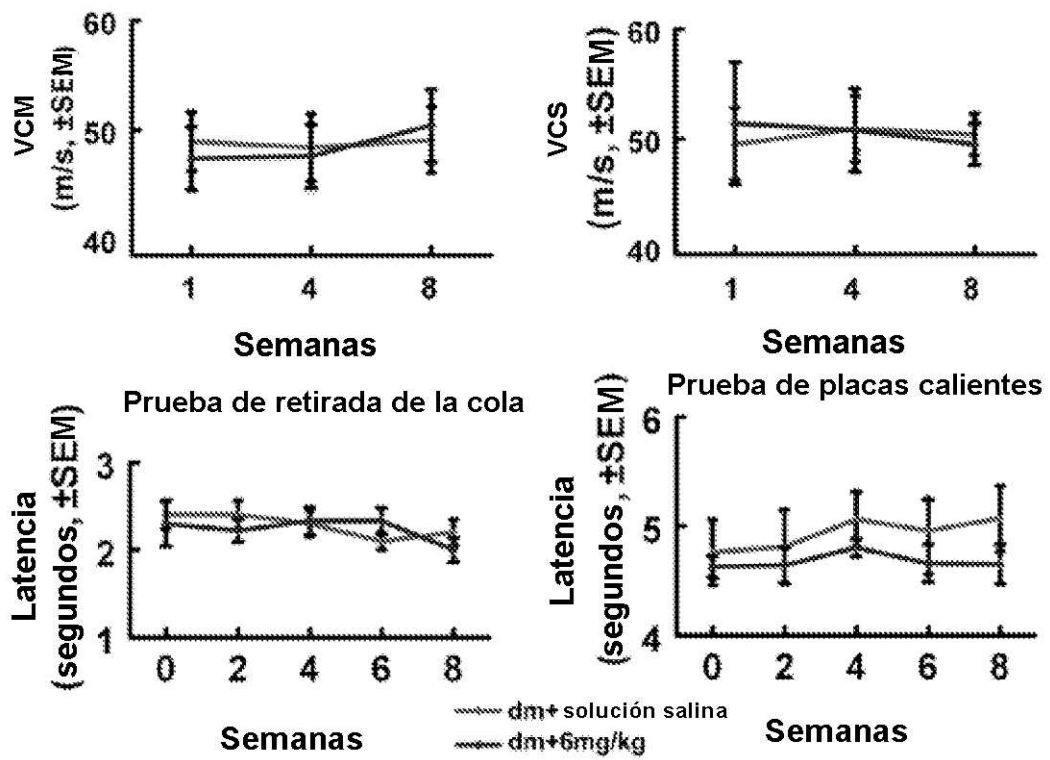


FIG. 5

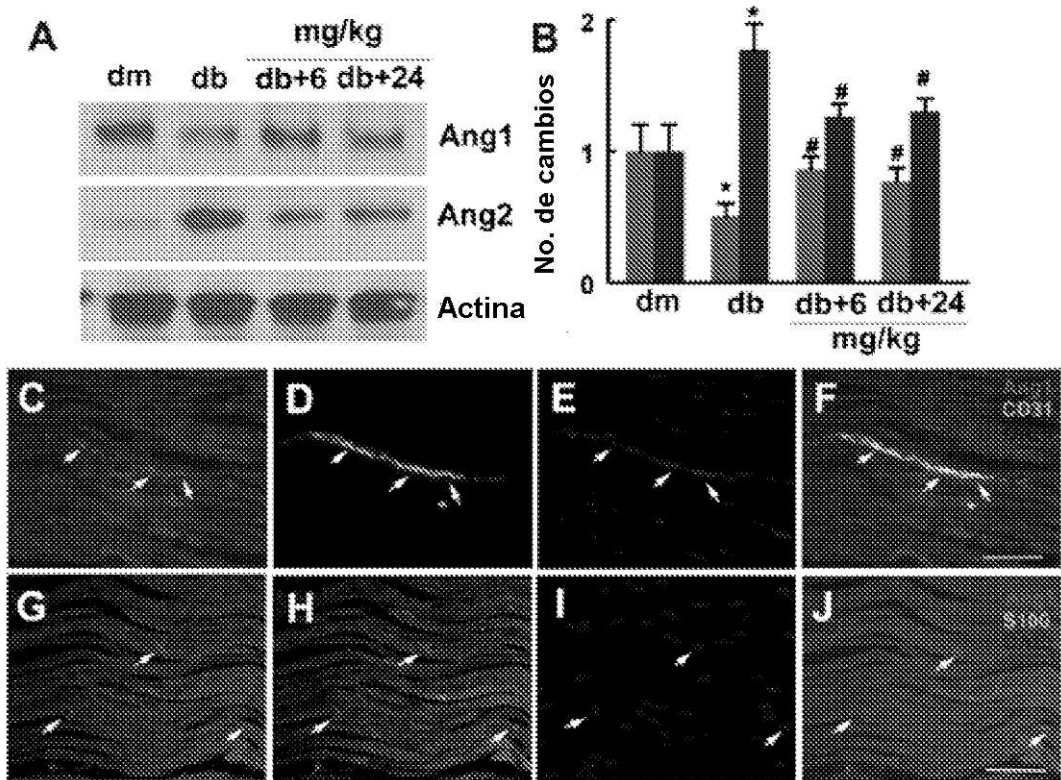


FIG. 6

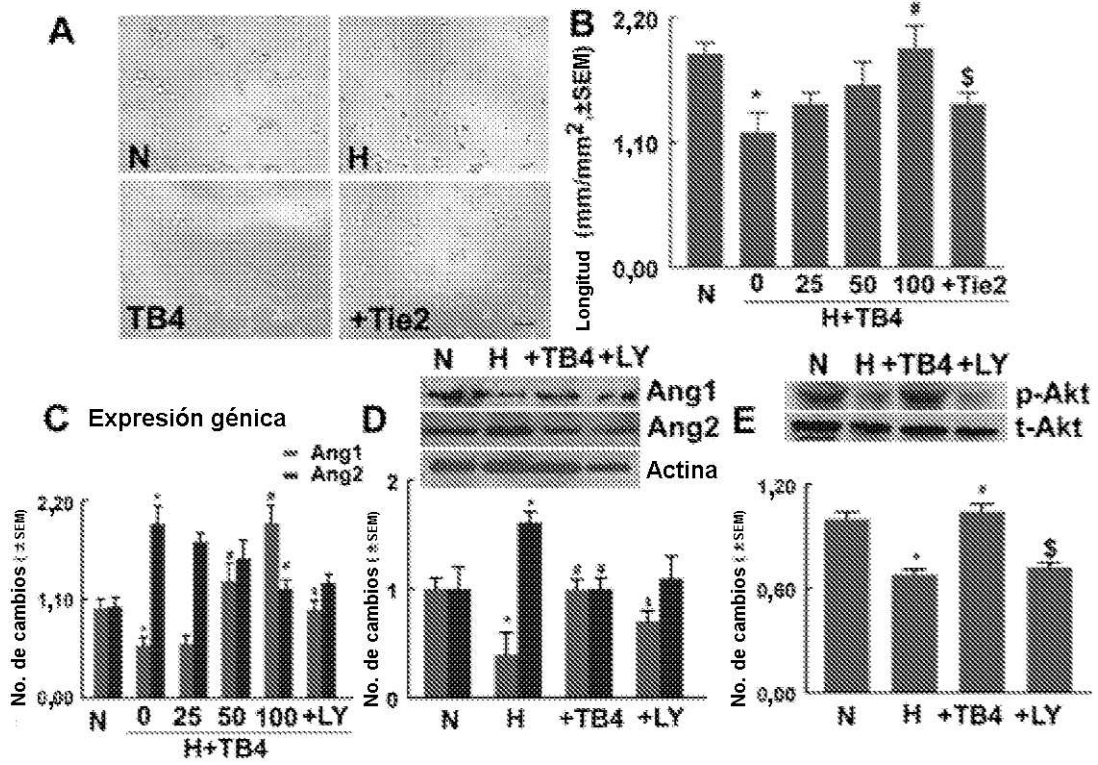


FIG. 7

