

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 023**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/60**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2015** **E 15179955 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2982375**

54 Título: **Factores extraídos de embriones de pez y uso de mezclas de los mismos en el control de la multiplicación y la diferenciación de células madre**

30 Prioridad:

**07.08.2014 IT MI20141464**

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

**08.08.2018**

73 Titular/es:

**BIAVA, MICHELE (33.3%)**

**Piazza S. Ambrogio 2**

**20123 Milano, IT;**

**BIAVA, MAURA (33.3%) y**

**RICOTTI, ANNAMARIA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BIAVA, PIERMARIO**

74 Agente/Representante:

**RUO , Alessandro**

**ES 2 678 023 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**

Factores extraídos de embriones de pez y uso de mezclas de los mismos en el control de la multiplicación y la diferenciación de células madre

5

**Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere a extractos de embriones de pez cebra y al uso de mezclas de los mismos en el control de la multiplicación y la diferenciación de células madre.

10

**[0002]** La presente invención se origina en el campo epigenético y sus aplicaciones en un contexto nutricional, cosmético y médico.

**[0003]** Específicamente, la presente invención se refiere a factores de crecimiento y diferenciación celular recogidos de embriones de pez cebra en estadios específicos de diferenciación de células madre.

15

**Antecedentes de la invención**

**[0004]** El aumento considerable de la edad promedio expone segmentos de la población cada vez mayores a los riesgos de desarrollar tumores y enfermedades degenerativas crónicas. Estas condiciones constituyen uno de los problemas de salud más graves para los que todavía no se dispone de una respuesta terapéutica efectiva, debido a la causalidad multifactorial y a la complejidad de los mecanismos patogénicos implicados en su génesis y desarrollo.

20

**[0005]** Se han realizado algunos progresos en los últimos tiempos como resultado de los estudios de biología con células madre, de los que se desprende que la neoplasia tumoral podría ser, al menos en parte, atribuible a la presencia de células madre alteradas (células parecidas a las madre cancerígenas). Este hallazgo ha dirigido numerosas líneas de investigación sobre la reprogramación de las células parecidas a las madre cancerígenas.

25

**[0006]** El uso de ciertos factores de crecimiento en el campo de la reprogramación de células parecidas a las madre cancerígenas y la investigación del trasplante con células madre ha llevado a la hipótesis de que los factores de crecimiento y diferenciación de células madre también podrían ser útiles para determinar el destino de las células madre normales así como alteradas, regenerarlas y/o diferenciarlas.

30

**[0007]** La presente invención se origina precisamente en este campo de la investigación científica.

35

**[0008]** Un objetivo general de la presente invención es identificar y proporcionar factores de crecimiento y diferenciación celular que desempeñan un papel clave en la regulación y diferenciación de células madre y encontrar una aplicación para estos factores en el contexto nutricional y/o médico. Otro objetivo de la invención es identificar y seleccionar factores biológicos producidos por las células madre de especies de pez cebra en estadios específicos del desarrollo embrionario y encontrar aplicaciones específicas en el contexto medicinal, en particular, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o formas tumorales.

40

**Sumario de la invención**

**[0009]** La presente invención se origina al identificar estadios de diferenciación específicos de las células madre de un embrión de pez cebra en el que se producen factores específicos de crecimiento y/o diferenciación de células madre, que encuentra aplicación en el campo médico, nutricional o cosmético.

45

**[0010]** Según ciertos aspectos de la invención, se proporciona un método innovador para dirigir el destino de las células madre normales o patológicas.

50

**[0011]** La presente descripción también contiene enseñanzas destinadas a mejorar la eficacia y los resultados terapéuticos logrados con el trasplante de células madre e identifica rutas alternativas para el propio trasplante.

55

**[0012]** Según algunos aspectos, la invención se origina al haber encontrado que los efectos biológicos y terapéuticos consecuentes del trasplante de células madre no son tan atribuibles al trasplante de las propias células madre sino a la producción de células madre debido a factores de crecimiento y/o diferenciación celular.

**[0013]** El solicitante ahora ha identificado factores de diferenciación y crecimiento celular específicos y las propiedades que los hacen aplicables para ralentizar los procesos de envejecimiento celular y normal y para el tratamiento de ciertas enfermedades, tales como enfermedades neurodegenerativas y tumores.

60

**[0014]** En particular, se ha descubierto que una mezcla de factores de crecimiento y diferenciación celular de estadios seleccionados tiene una regeneración celular eficaz y, por lo tanto, encuentra aplicación para ralentizar el proceso de envejecimiento del cuerpo y tener una acción antienviejamiento. Los factores extraídos en tres estadios seleccionados pueden combinarse con otros factores extraídos de estadios específicos adicionales de diferenciación

65

de células madre, ampliando las posibilidades de uso previstas en el campo médico, nutricional y cosmético para los factores extraídos en los dos estadios seleccionados de diferenciación. Según un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan extractos de células madre embrionarias, de peces cebra, en estadios de diferenciación de células madre embrionarias o de desarrollo embrionario según la reivindicación 1.

5 **[0015]** Se descubrió que las mezclas de factores de crecimiento y/o de diferenciación celular extraídos en estadios seleccionados de desarrollo embrionario, en particular de peces cebra, desempeñan un papel en el proceso de regeneración de células madre y por lo tanto encuentran aplicación en todos los procesos en los que se requiere la acción de reparación celular y regeneración tisular, tal como por ejemplo en el caso de quemaduras, procesos de  
10 tejido necrótico, en particular, de la epidermis, en fístulas, úlceras por presión o como agentes antienvjecimiento, por ejemplo.

**[0016]** Durante la experimentación con las células madre de especies de peces, también se observó que los factores de crecimiento y/o diferenciación extraídos en el estadio de diferenciación de las células madre  
15 embrionarias a las/o 24 horas posteriores a la fertilización intervienen y ejercen una influencia en el estadio de diferenciación celular.

**[0017]** En particular, la combinación o mezcla de factores de crecimiento y/o diferenciación celular según la reivindicación 1 encuentra aplicación en la regulación de procesos celulares que son la base del envejecimiento y  
20 muerte celular. Según algunas realizaciones, la combinación de factores recogidos en estos estadios encuentra aplicación en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central, tales como Alzheimer o Parkinson y/o del sistema cardiocirculatorio, tal como en el caso de infarto de miocardio.

**[0018]** El solicitante ha descubierto, según un aspecto de la invención, que combinar extractos o factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos de células madre embrionarias en el estadio de blástula-gástrula  
25 media y en el estadio de brote caudal con factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos en los estadios de diferenciación de 5 somitas, 20 somitas y en el estadio de diferenciación de la farínula, se obtiene una acción de diferenciación combinada particularmente intensa y una regulación celular.

**[0019]** Esta acción combinada encuentra aplicación en el campo médico normalmente en la prevención y  
30 tratamiento de afecciones asociadas con un aumento de la tasa de replicación celular, como en el caso de tumores o enfermedades de la piel en las cuales las células epiteliales tienen una tasa de replicación celular mayor de lo normal, como en el caso de psoriasis, eccema, lupus eritematoso, atopía.

**[0020]** Según algunas realizaciones de la invención, los factores de crecimiento y diferenciación utilizados en el  
35 contexto de la invención se obtienen a partir de células madre de pez cebra.

**[0021]** Según un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos de embriones de pez cebra según uno de los aspectos de la  
40 invención descritos anteriormente y un vehículo comestible y/o farmacéuticamente aceptable.

**[0022]** Según algunas realizaciones, la composición de la invención es una composición farmacéutica en la que el vehículo es o comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

**[0023]** Según otras realizaciones, la composición de la invención es un producto nutracéutico o dietético o un  
45 alimento para fines especiales o una composición cosmética.

### Breve descripción de los dibujos

**[0024]** Algunas de las características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los  
50 dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 ilustra el análisis de las proteínas de los factores extraídos de las células madre del pez cebra en 5  
estadios de desarrollo y la mezcla de los 5 estadios;

55 La Figura 2 ilustra un gráfico que notifica los resultados de un ensayo de proliferación (MTT) a las 24 horas en células madre mesenquimales humanas (CMMh) de factores de crecimiento individuales (PC1-PC5) y de la mezcla de los mismos (PC6) en 4 concentraciones;

La Figura 3 muestra un gráfico que notifica los resultados de un ensayo de proliferación (MTT) a las 72 horas en  
60 células madre mesenquimales humanas (CMMh) de factores de crecimiento individuales (PC1-PC5) y de la mezcla de los mismos (PC6) en 4 concentraciones;

La Figura 4 muestra gráficos de barras que ilustran el nivel de inmunofluorescencia con yoduro de propidio del  
área CA1 del hipocampo 24 h después de 1 h de privación de suero en presencia o ausencia de la mezcla ABC  
de factores del ejemplo 2.

65 La Figura 5 ilustra la inmunofluorescencia con yoduro de propidio del área CA1 del hipocampo 24 h después de 1 h de tratamiento con NMDA (50  $\mu$ M) en presencia o ausencia de la mezcla ABC.

La Figura 6 ilustra la inmunofluorescencia con yoduro de propidio del área CA1 del hipocampo 24 h después de 1

h de tratamiento con NMDA (300  $\mu$ M) en presencia o ausencia de la mezcla ABC.

La Figura 7 ilustra la cuantificación de la inmunofluorescencia con yoduro de propidio del área CA1 del hipocampo 24 h después de 1 h de privación de suero en presencia o ausencia de los extractos A, B o mezcla C.

5 La Figura 8 ilustra la cuantificación de la inmunofluorescencia con yoduro de propidio del área CA1 del hipocampo después de 24 h de tratamiento con NMDA (50  $\mu$ M, 1 h) en presencia o ausencia de los extractos A, B o mezcla C.

#### Descripción detallada de la invención

10 **[0025]** El solicitante, al estudiar la diferenciación de las células madre embrionarias de los peces cebra en particular, ha identificado los factores de crecimiento y diferenciación de células madre que son útiles para regenerar y/o diferenciar las células madre.

15 **[0026]** En particular, la invención se origina a partir de:

- A) haber identificado los momentos más significativos de la diferenciación de varios tipos de células madre,
- B) haber analizado y seleccionado los dos estadios tempranos de diferenciación de células madre en los que se producen factores esenciales para la regeneración celular,
- 20 C) haber identificado la distribución porcentual específica de las fracciones proteicas presentes en los dos estadios seleccionados y las proteínas producidas en esos estadios tempranos específicos de diferenciación celular, en particular en el momento en que las células madre se diferencian de totipotente a pluripotente;
- D) haber encontrado aplicaciones específicas en el campo médico para factores de crecimiento y diferenciación celular identificados mediante la realización de estudios *in vitro*, por ejemplo, mediante el análisis de los efectos sobre la multiplicación, proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales humanas recogidas de
- 25 tejido adiposo.

**[0027]** Según algunos aspectos de la invención, se descubrió que al proporcionar extractos de embriones de peces cebra, en particular que contienen células madre en estadios específicos de desarrollo embrionario o diferenciación de células madre, se está interviniendo en la regulación y/o diferenciación de células humanas.

30 **[0028]** Este enfoque revoluciona el enfoque convencional del uso de células madre para intervenir en algunos mecanismos celulares considerados en el origen de enfermedades que originan un crecimiento celular descontrolado.

35 **[0029]** Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un extracto obtenido por extracción de embriones de pez cebra en estadios seleccionados de diferenciación de células madre según la reivindicación 1. Según ciertas realizaciones i) los extractos o ii) factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos de embriones de peces cebra en el estadio de blástula-gástrula media y en el estadio del brote caudal y faríngea tienen la siguiente distribución porcentual de fracciones proteicas, refiriéndose a las proteínas totales que tienen un peso molecular inferior a 100 Kdaltons

- fracción proteica de 14 kilodaltons: 14,6 %
- fracción proteica de 20 kilodaltons: 4,2 %
- fracción proteica de 25-30 kilodaltons: 28,4 %
- 45 fracción proteica de 45 kilodaltons: 14,8 %
- fracción proteica de 97 kilodaltons: 38 %.

50 **[0030]** La preparación de los factores de crecimiento o extractos embrionarios que los contienen se puede lograr siguiendo técnicas convencionales. En ciertas realizaciones, la preparación de los extractos embrionarios de la invención comprende las siguientes etapas:

- a) los embriones se recogen en un estadio específico del desarrollo embrionario;
- b) se añade un disolvente;
- c) la mezcla obtenida en la etapa b) se somete a agitación, con un turbo-emulsionante, por ejemplo;
- 55 d) la mezcla se filtra opcionalmente, por medio de filtros de 90 micrómetros por ejemplo y
- e) con filtros de 5-10 micrómetros, por ejemplo.

60 **[0031]** Se obtiene una solución madre de la etapa c), que se puede diluir con uno o más disolventes biocompatibles convencionales para obtener soluciones con diferentes grados de dilución dependiendo de las necesidades y usos.

**[0032]** Según algunas realizaciones, el disolvente utilizado en la etapa b) se basa en una mezcla de glicerina y una solución acuosa de alcohol etílico, por ejemplo 30 % v/v, normalmente en una relación glicerol/alcohol de 85:15 v/v.

65 **[0033]** La relación en peso de dicho disolvente y dichos embriones está comprendida preferentemente entre 20:1 y 2:1.

**[0034]** La agitación de la etapa c) se lleva a cabo preferentemente a temperatura ambiente, también se aplica a las otras operaciones, durante un periodo de tiempo que normalmente varía de 1 a 2 horas.

5 **[0035]** Según algunas realizaciones, la etapa c) de mezcla o agitación se realiza con un turbo-emulsionante, emulsionando cada uno de ellos 1 a 3 veces durante 1-4 minutos.

10 **[0036]** Según otro aspecto, la presente invención proporciona una mezcla o combinación de factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos o recogidos de embriones de peces cebra en el estadio de diferenciación de células madre embrionarias de blástula-gástrula media y en el estadio del brote caudal con factores en el estadio de diferenciación seleccionado en los estadios de 5 somitas, 20 somitas y en el estadio de diferenciación de la faríngrula, en particular en el estadio de la faríngrula temprana.

15 **[0037]** En ciertas realizaciones, la mezcla de extractos de embriones de peces cebra o factores de crecimiento y/o diferenciación celular contiene 5 % en peso de factores extraídos en el estadio de blástula-gástrula media, 10 % de factores extraídos en el estadio del brote caudal, 10 % de factores extraídos en el estadio de 5 somitas, 25 % de factores extraídos en el estadio de 20 somitas, 50 % de factores extraídos en el estadio de la faríngrula.

20 **[0038]** La mezcla de factores según este último aspecto de la invención encuentra aplicación en el campo médico en el tratamiento de afecciones con tasa de replicación celular anormal como en el caso de tumores o de ciertas afecciones de la piel, tales como en casos de psoriasis, eccema, lupus eritematoso, atopía.

25 **[0039]** El solicitante ha observado además experimentalmente que los factores de crecimiento y diferenciación celular, en particular en las mezclas de estadios 1 y 2 con los estadios de 5 somitas, 20 somitas y en el estadio de la faríngrula, determinan una ralentización de la proliferación celular y un aumento en la muerte celular programada, o apoptosis, mientras que los estadios tempranos incluso han resaltado un efecto multiplicativo.

**[0040]** Ninguno de los estadios y dosis ensayadas conducen a la muerte por necrosis o a toxicidad para las células. Los extractos han demostrado ser en consecuencia inofensivos y seguros.

30 **[0041]** Los experimentos llevados a cabo también han demostrado que cuando la información es suficientemente completa, se obtienen resultados inesperados, en protección contra los ataques que causan degeneración y daño tisular. Este hecho fue confirmado por los experimentos que se relacionaron con la proliferación o, por el contrario, con la ralentización de la multiplicación de células madre mesenquimales, que demuestran que pueden dirigirse tanto hacia la regeneración como hacia la diferenciación, a través del uso específico y selectivo de la diversas redes de proteínas identificadas en los estadios de diferenciación individual del embrión de peces cebra, y sobre todo, mediante el uso de las mezclas de los mismos, o de las mezclas de los estadios de diferenciación múltiple. Los datos experimentales notificados en los ejemplos demuestran que los diversos factores de crecimiento y diferenciación estudiados tienen la capacidad de regular selectiva y específicamente diversos genes que son la expresión de la estaminalidad o diferenciación celular.

40 **[0042]** En la presente descripción, la terminología extracto(s) de embrión(es) de peces cebra tiene esencialmente el mismo significado que factores de crecimiento y/o diferenciación celular. Normalmente, los factores de crecimiento y/o diferenciación celular mencionados en la presente descripción son extractos de embriones de peces cebra.

45 **[0043]** El término factores debe ser entendido como factores de crecimiento y/o diferenciación celular.

50 **[0044]** Los factores de crecimiento y diferenciación estudiados que se constituyen son epigenéticamente capaces de regular la expresión génica de células madre, para dirigirlos hacia la regeneración y/o hacia la diferenciación. Este hallazgo es muy importante en la medicina regenerativa, donde los tejidos deben regenerarse, como en el caso de las úlceras, heridas, etc., o los tejidos que deben regenerarse en el caso de enfermedades degenerativas.

55 **[0045]** Estos datos apoyan el uso de los factores relacionados con la invención en los trasplantes de células madre, teniendo en cuenta que, al ser moléculas pequeñas que tienen un bajo peso molecular, como lo demuestran los estudios de proteómica notificados en la presente memoria, tienen una absorción sublingual o percutánea.

60 **[0046]** Un estudio clínico aleatorizado y controlado de 179 casos de carcinoma hepatocelular intermedio en estadio avanzado, en el que otros tratamientos ya no eran posibles y, por lo tanto, tratados compasivamente con estos factores, sublingualmente, demostró una regresión del 20 % y no progresión del 16 % con un aumento en la supervivencia de los pacientes tratados. Por lo tanto, existe una absorción percutánea de estos factores en pacientes con psoriasis, en quienes el tratamiento unilateral de las lesiones ha resultado en una mejoría o en la desaparición de lesiones incluso contralaterales.

65 **[0047]** Los factores de diferenciación celular o extractos de embriones de peces cebra de la invención pueden, por consiguiente, encontrar aplicación

a) como agentes antienvjecimiento

b) como factores de regeneración tisular para tratar cicatrices, úlceras por presión, úlceras varicosas, etc.

c) junto con los trasplantes de células madre para mejorar el efecto clínico de los trasplantes

d) para prevenir o tratar diversas enfermedades degenerativas crónicas, tales como enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, ELA, cardiovasculares, por ejemplo, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, apoplejía y tumor. El extracto de la invención encuentra aplicación en el tratamiento de la apoplejía (*Therapeutic Effects of hMAPC and hMSC Transplantation after Stroke in Mice*, 2012 Silvia Mora-Lee *et al.* en PLoS ONE 7(8): e43683. doi:10.1371/journal.pone.0043683 editor: Brahim Nait-Oumesmar, Universidad Pierre et Marie Curie - París 6, INSERM, CNRS, Francia).

e) en afecciones oculares relacionadas con el envejecimiento, tales como maculopatía exudativa. Según ciertos aspectos, la invención se refiere a extractos o a los factores y las mezclas de los mismos según una cualquiera de las realizaciones y composiciones descritas anteriormente que los contienen, para su uso en combinación con un trasplante de células madre o para reemplazar el trasplante de células madre.

**[0048]** Según ciertos aspectos, la presente invención proporciona por lo tanto una composición que comprende extractos o factores de crecimiento y/o diferenciación celular extraídos de embriones de peces cebra según uno cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente.

**[0049]** Según algunas realizaciones, la composición de la invención es una composición farmacéutica, un suplemento dietético o un nutracéutico que se puede introducir en el régimen dietético de un individuo que padece una o más de las afecciones o condiciones descritas previamente.

**[0050]** En algunas realizaciones, la composición de la invención es un producto nutracéutico que comprende las mezclas de factores según las realizaciones descritas previamente y un vehículo comestible. El producto nutracéutico de la invención encuentra uso para mejorar las condiciones nutricionales del cuerpo humano o el estado funcional y la calidad de vida.

**[0051]** En algunas realizaciones, la composición de la invención puede comprender además sustancias activas, vitaminas, sustancias nutritivas, micronutrientes y/o minerales.

**[0052]** El término "vehículo", como se utiliza en la presente memoria, indica un medio, excipiente, diluyente con el que se administra la combinación de sustancias terapéuticas o activas.

**[0053]** Se contempla el uso de cualquier vehículo y/o excipiente adecuado para la forma de preparación deseada para su administración a seres humanos con los compuestos descritos en la presente invención.

**[0054]** Para los fines de la presente solicitud, la expresión "fisiológicamente aceptable" o "comestible" indica sustancias comestibles que están aprobadas por las autoridades sanitarias para su uso en aplicaciones farmacéuticas, nutricionales o dietéticas.

**[0055]** Un vehículo fisiológicamente aceptable puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0056]** Las composiciones de la presente invención comprenden cualquier composición producida administrando el extracto o los factores de crecimiento y diferenciación celular de la presente invención y un vehículo fisiológica o farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones son adecuadas para su uso dietético, nutricional, farmacéutico o dietético en mamíferos, en particular en seres humanos.

**[0057]** Según algunas realizaciones, la composición de la invención es un alimento para fines médicos especiales.

**[0058]** Según otro aspecto, se describe un método de tratamiento terapéutico de una enfermedad seleccionada entre enfermedad degenerativa, en particular enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular o tumoral, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un extracto de embrión de pez cebra en los estadios de blástula-gástrula media, brote caudal y faríngrula, y 5 somitas y 20 somitas de diferenciación celular.

**[0059]** La composición de la invención puede adoptar una amplia variedad de formas de preparación, dependiendo de la vía de administración deseada.

**[0060]** Por ejemplo, para administración oral, la composición puede encontrarse en forma sólida, como comprimidos, cápsulas, polvos, en gránulos, formulaciones de liberación prolongada de las sustancias activas, por ejemplo. Las composiciones en forma sólida, en particular en forma granular o en polvo, se prefieren con respecto a los otros tipos de preparaciones.

**[0061]** Las preparaciones en forma sólida pueden comprender uno o más vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, y opcionalmente diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes, por ejemplo.

- 5 **[0062]** Los comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos también pueden contener un aglutinante tal como tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico; un lubricante tal como estearato de magnesio; un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con técnicas tradicionales.
- 10 **[0063]** Cuando la forma unitaria farmacéutica es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo mencionado anteriormente, un vehículo líquido tal como un aceite adiposo.
- 15 **[0064]** En el caso de preparaciones en forma líquida para administración oral, tales como por ejemplo en el caso de suspensiones, emulsiones, soluciones, un vehículo adecuado puede seleccionarse entre agua, glicoles, aceites, alcohol y mezclas de los mismos.
- 20 **[0065]** Los agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares también pueden estar presentes en la composición.
- 25 **[0066]** En algunas realizaciones, los factores de crecimiento contenidos en la composición de la presente invención se pueden combinar o mezclar como sustancias activas en una mezcla íntima con un vehículo y/o excipiente comestible adecuado según la industria farmacéutica y alimentaria o las técnicas nutricionales tradicionales.
- 30 **[0067]** Las composiciones para uso farmacéutico, cosmético o nutricional pueden presentarse de forma adecuada en forma farmacéutica única y prepararse mediante cualquier técnica bien conocida de la técnica farmacéutica o dietética.
- 35 **[0068]** En algunas realizaciones, las composiciones o preparaciones de la invención pueden contener al menos 0,0001 % de cada factor de crecimiento. La cantidad de factores de crecimiento presentes en estas composiciones es tal que se obtendrá una dosificación profiláctica o terapéuticamente eficaz.
- 40 **[0069]** En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende además uno o más componentes adicionales tales como aditivos, materiales de relleno, estabilizantes, emulsionantes, texturizadores, agentes formadores de película, plastificantes, humectantes y espesantes.
- 45 **[0070]** Otros materiales pueden estar presentes, tales como revestimientos o modificar la forma física de la unidad farmacéutica. Por ejemplo, los comprimidos pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos. Para prevenir la disgregación durante el tránsito a través de la parte superior del tubo digestivo, la composición puede ser una formulación con recubrimiento entérico.
- 50 **[0071]** Un jarabe o elixir puede contener, además de la sustancia activa, sacarosa como agente edulcorante, conservantes adecuados, un colorante y un agente aromatizante tal como sabor de cereza o naranja.
- 55 **[0072]** En algunas realizaciones, la composición de la invención es una composición cosmética que comprende un vehículo cosméticamente aceptable.
- 60 **[0073]** Las composiciones cosméticas adecuadas se encuentran en forma de una crema, loción, suero o emulsiones del tipo aceite/agua.
- [0074]** Las composiciones cosméticas de la invención encuentran aplicación en el tratamiento del envejecimiento de la piel, en el tratamiento cosmético de arrugas, manchas en la piel y en la piel seca y descamada, por ejemplo.
- [0075]** Según ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para uso en medicina en combinación con un trasplante de células madre o para reemplazar el trasplante de células madre.
- [0076]** En algunas realizaciones, la formulación contendrá cantidades de factores de crecimiento que dependerán de la gravedad de los síntomas asociados, la afección, las terapias adicionales en curso, el estado de salud del individuo y la respuesta a la combinación de sustancias activas. En algunas realizaciones, la dosis está en el intervalo de 0,00001 % en peso a aproximadamente 10 %, de 0,0001 a 5 %, de 0,001 a 1 %, de 0,10 a 1 % en peso de la formulación.
- [0077]** La presente invención se describirá ahora a continuación con referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

- 5 **[0078]** Efecto de los factores de crecimiento y diferenciación celular extraídos en los estadios de blástula-gástrula media, brote caudal, 5 somitas, 20 somitas y en el estadio de farínula del embrión de pez cebra tomados individualmente y en mezclas, sobre la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales (CMMh).

#### Materiales y métodos:

10

#### **[0079]**

- 15 1. Modelo celular: células madre mesenquimales humanas adultas aisladas de tejido adiposo (CMMh) mediante el sistema Lipogems,  
 2. Determinación de la concentración proteica en los extractos de pez cebra (PC) y ensayo con BCA,  
 3. Identificación de las diferentes proteínas individuales: análisis de Nano-LC-MS/MS (cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas)  
 4. Estudio de la proliferación celular: ensayo con MTT  
 20 5. Análisis de la expresión génica: RT-PCR cuantitativa relativa

20

#### **1. Células madre mesenquimales humanas (CMMh) adultas aisladas del tejido adiposo por medio de Lipogems**

- 25 **[0080]** CMMh se aislaron del tejido adiposo humano utilizando Lipogems. Este es un dispositivo para recoger células madre de los lipoaspirados utilizando un enfoque mecánico en lugar de la digestión enzimática.

25

#### **2. Ensayo con BCA (determinación proteica en los extractos)**

- 30 **[0081]** El contenido proteico en los extractos de pez cebra se determinó mediante el ensayo BCA, que es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de proteínas. El contenido proteico en cada extracto se evaluó por cuadruplicado utilizando albúmina sérica bovina (ASB) como patrón. La concentración proteica en los extractos varió de 1,5-2,7 mg/ml.

30

#### **3. Análisis de Nano-LC-MS/MS**

35

- 40 **[0082]** Las proteínas se identificaron mediante análisis LC-MS/MS. El análisis MS/MS de péptidos generados en gel por digestión en gel se realizó mediante un aparato nano-LC-ESI-Q-TOF (QSTAR Elite, Applied Biosystem). La HPLC se realizó en un sistema LC Packings Ultimate 3000 nanoflow (Dionex, Sunnyvale, CA). Se inyectaron muestras (5 µL) en una trampa de cartucho C18, 5 µm, 100A, 300 µm I.D. x 5 mm (LC Packing, Dionex) a 30 µL/min durante 5 min (2 % de ACN, 0,1 % de ácido fórmico) para enriquecer y purificar los péptidos. La separación capilar de los péptidos atrapados se realizó utilizando una columna Vydac (Grace) C18, 5 µm, 300A, 75 µm, I.D. x 15 cm. Las condiciones cromatográficas y los parámetros de masa se ajustaron de la siguiente manera: tampón A (2 % de ACN, 0,1 % de ácido fórmico) y tampón B (2 % de agua, 0,1 % de ácido fórmico en ACN) con un gradiente de 8-50 % de tampón B en 35 min, 50-80 % en 15 min, 80 % durante los siguientes 15 min y 80-8 % en 5 min; por último, la columna se volvió a equilibrar a 8 % de B durante 10 min. Para cada exploración TOF MS (350-1300 m/z), los dos iones con carga doble o triple más intensa se seleccionaron para las exploraciones iónicas del producto potencial (110-1600 m/z). El voltaje de pulverización de iones fue de 1,6 kV, la barrera de gases se ajustó a 15 y el potencial de pulverización catódica fue de 80 V. Se utilizó el software Mascot V1.6b20 (Matrix Science, Londres) para la búsqueda de bases de datos de proteínas. Las búsquedas se realizaron utilizando la base de datos CNIB y los siguientes parámetros convencionales: pez cebra; digestión triptica con como máximo un fallo de escisión; carbamidometilación de cisteína, oxidación parcial de metionina y una tolerancia de masa de 100 ppm. Para los datos de MS/MS, las búsquedas se realizaron con los siguientes criterios adicionales: tolerancia máxima de 0,3 Da para datos de MS/MS y la búsqueda de carga de péptido 2+ y 3+.

40

45

50

- 55 **[0083]** Compuestos y reactivos químicos.

**[0084]** Los compuestos químicos generales se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Poole, Reino Unido). Todos los compuestos químicos y bioquímicos utilizados fueron de grado analítico.

60

#### **4. Ensayo con MTT (proliferación celular)**

- [0085]** La proliferación de células madre mesenquimales humanas después del tratamiento con extractos de pez cebra se determinó mediante el ensayo con MTT. En las células metabólicamente activas, MTT se convierte en formazán, que se puede evaluar espectrofotométricamente. La cantidad de formazán es proporcional a la cantidad de células en el pocillo.

65



Optimización

5 **[0086]** Inicialmente, se realizaron estudios preliminares para determinar la densidad celular óptima, así como el tiempo para el metabolismo de MTT. Las siguientes condiciones experimentales fueron seleccionadas sobre la base de estos estudios:

Número de células: 4.000 o 5.000 células sembradas por cm<sup>2</sup> en una placa de 48 pocillos.

Tratamiento: las células fueron tratadas con extractos de pez cebra en los siguientes estadios:

10 estadio 1: estadio de blástula-gástrula media

estadio 2: estadio del brote caudal

estadio 3: estadio de 5 somitas

estadio 4: estadio de 20 somitas

15 estadio 5: estadio de diferenciación temprana (normalmente alrededor de 24 horas después de la fertilización)  
del estadio de faríngrula

estadio 6: mezcla de los estadios 1-5;

cada estadio en cuatro concentraciones diferentes: 10, 1, 0,1, 0,01 µg/ml e incubados durante 24 o 72 h respectivamente.

20 Tiempo de metabolismo de MTT: 3 h

Estadísticas: los datos se presentan como absorbancia media comparada con respecto al control (células no tratadas).

Resultados

25 **[0087]** Los resultados sobre las fracciones que tienen diferente peso molecular para los diferentes estadios de diferenciación se indican en la Figura 1.

La Tabla 1 a continuación, indica las diferentes proteínas individuales identificadas por un análisis LC-MS/MS

Tabla 1 Listado de proteínas identificadas utilizando nano_LC-ESI-1-TOF en el embrión de pez cebra en la fase de blástula-gástrula media					
Acceso	Nombre proteína	Puntuación	Peso molecular	PI calculado	Cobertura secuencia
gi 166795887	precursor de vitelogenina 1	1108	150308	8,68	19
gi 94733730	Vitelogenina 1	1039	149825	8,74	21
gi 94733733	Nueva proteína similar a vitelogenina 1 (vg1)	913	149828	8,92	19
gi 94733734	Nueva proteína similar a vitelogenina 1 (vg1)	835	150550	8,83	16
gi 145337918	Proteína Vtg1	780	116965	9,07	18
gi 94733731	Nueva proteína similar a vitelogenina 1 (vg1)	762	149911	8,84	19
gi 94732723	Nueva proteína similar a vitelogenina 1 (vg1)	745	147826	8,73	17
gi 159155252*	Proteína Zgc:136383	720	124413	8,78	17
gi 68448530	Vitelogenina 5	559	149609	8,77	13
gi 92097636	Zgc:136383	402	28924	9,33	36
gi 63100501	Proteína Vtg1	345	36580	9,23	28
gi 57864789	Vitelogenina 7	341	24490	8,37	40
gi 57864783	Vitelogenina 4	334	31304	9,48	27
gi 113678458	precursor de la isoforma 1 de vitelogenina 2	323	181208	8,70	11
gi 125857991	Proteína Zgc:136383	171	149328	8,93	9
gi 15209312*	Cadena alfa 2 procolágeno tipo 1	169	147826	9,35	4
gi 57864779	Vitelogenina 2	122	69906	7,84	8
gi 11118642	precursor de vitelogenina 3	117	140477	6,92	2
gi 303227889	Vitelogenina 6	73	151677	8,84	4

Continuación

Acceso	Nombre de proteína	Puntuación	Peso molecular	PI calculado	Cobertura de secuencia
gi 13242157*	Proteína ZP2 de la membrana pelúcida del huevo	71	48194	6,04	5
gi 6644111*	nucleósido difosfato quinasa-21	69	17397	7,77	14
gi 18859071*	nucleósido difosfato quinasa 3	69	19558	7,68	7
gi 126632622*	Nueva proteína que contiene un dominio de lectina de unión a galactosa	67	19245	9,33	13
gi 66773080*	Subunidad similar a ATP mitocondrial- beta sintasa	66	55080	5,25	4
gi 38541767*	Proteína ppia	60	19745	9,30	13
gi 1865782	Proteína HSC70	58	71473	5,18	2
gi 28279108	Proteína de choque térmico B	58	71382	5,32	4
gi 41152402*	Histona H2B 3	49	13940	10,31	11
gi 41393113*	Precursor alfa 1b de colágeno tipo 1	46	137815	5,39	4
gi 94732492*	Miembro F de la familia del gen homólogo RAS	46	24035	9,00	6
gi 47778620*	Triptófano hidroxilasa D2	45	55686	6,56	1
gi 68448517*	Precursor 2 de la glicoproteína de la zona pelúcida 3	44	47365	4,92	2
gi 326677766*	PREVISTO: proteína tipo 2 de unión a RIMS	41	138659	5,86	0
gi 112419298	Proteína Vtg3	40	60622	6,32	2
gi 54400406*	Glutaredoxina 3	39	36541	5,18	11
gi 41152400*	isomerasa peptidilprolil tipo a	37	17763	8,26	7

La puntuación iónica es  $-10 \cdot \log(P)$ , en el que P es la posibilidad de que el emparejamiento observado es el evento causal.  
 Las puntuaciones iónicas individuales  $>36$  indican homología de identidad o extensiva ( $p < 0,05$ ).  
 Las puntuaciones de las proteínas individuales se derivan de las puntuaciones iónicas de la base no probabilística para la clasificación de los aciertos proteicos.

Resultados de los ensayos de proliferación celular

5 **[0088]** Proliferación celular después de 24 h y 72 h de incubación con extractos de pez cebra, en diferentes experimentos independientes.

**[0089]** Los datos se presentan como absorbancia normalizada (abs de células tratadas/abs de células no tratadas) y como el promedio de 3 experimentos independientes.

10 **[0090]** Los resultados del ensayo con MTT después de 24 h de tratamiento con extracto de pez cebra se ilustran en la Fig. 2.

**[0091]** A partir de los datos, se puede concluir lo siguiente:

- 15 - Después de 24 h de tratamiento, hubo una ligera reducción en la proliferación;  
 - El extracto 6 (mezcla de todos los estadios) tuvo el efecto más pronunciado, y el efecto fue más evidente con la concentración mínima (es decir, 0,01 µg/ml).

20 **[0092]** Los resultados del ensayo con MTT después de 72 h de tratamiento con extracto de pez cebra se ilustran en la Fig. 3.

**[0093]** Después de 72 h de tratamiento, se puede concluir que:

- 25 - Los estadios 4, 5 y 6 inhiben la proliferación de CMMh;  
 - El efecto de los extractos fue dependiente de la dosis (para todos los estadios, 10 µg/ml tuvo el efecto más pronunciado).

**[0094]** Comparación de los resultados con MTT después de 24 y 72 h, ensayo con MTT después de 72 h de tratamiento con pez cebra.

30 **[0095]** Comparando las 24 y 72 h, se destaca que los estadios tempranos (es decir, 1, 2 y 3) y los estadios tardíos influyen en la proliferación de una manera diferente, siendo los estadios 4, 5 y 6 los más efectivos (es decir, menos

proliferación).

#### 4. RT-PCR cuantitativa relativa (expresión génica)

5 **[0096]** Con el fin de estudiar el efecto de los extractos de pez cebra embrionarios en la diferenciación, la expresión génica se analizó después de la incubación con los extractos. Dado que el ensayo con MTT indicó que el efecto más pronunciado se observó después del tratamiento con el extracto de PC6 (una mezcla de 5 estadios), se estudió la expresión génica después del tratamiento con este extracto en concentraciones que varían de 0,01-10 µg/ml.

10 **[0097]** Los genes estudiados son marcadores para:

- potencial de células madre (OCT3/4 y KLF4)
- cardiogénesis (NKX2.5 y MEF2C)
- vasculogénesis (VEGF)

15 - neurogénesis (NEUROG1)  
 - miogénesis (MyoD).

**[0098]** La expresión génica se analizó utilizando RT-PCR cuantitativa relativa después de 24, 72 horas y 7 días de tratamiento. La expresión génica se normalizó a un gen doméstico (HK) (GAPDH) y se comparó con las células no tratadas.

**[0099]** Principio fundamental.

20 **[0100]** Sobre la base del resultado del ensayo con MTT, se utilizó PC6 para tratar las células antes de analizar la expresión génica.

**[0101]** Se utilizaron las siguientes concentraciones:

- 30 - 10 µg/ml en los experimentos de 24 y 72 h;  
 - 0,01 µg/ml en los experimentos de 7 días.

**[0102]** En los primeros experimentos, se utilizaron bajas concentraciones de PC6 (0,01, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml) para estudiar la expresión génica después de 7 días de tratamiento. Se añadió una concentración adicional (10 µg/ml) en los experimentos de 24 y 72 h.

**[0103]** Luego se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

- 40 - CMMh tratadas con PC6 a 0,01 y 0,1 µg/ml y extracción de ARN después de 7 días (n = 2);  
 - CMMh tratadas con PC6 a 1 µg/ml y extracción de ARN después de 7 días (n = 1);  
 - CMMh tratadas con PC6 a 10, 1, 0,01 y 0,1 µg/ml y extracción de ARN y proteína después de 24 h (n = 1);  
 - CMMh tratadas con PC6 a 10, 1, 0,01 y 0,1 µg/ml y extracción de ARN y proteína después de 72 h (n = 1).

#### Resultados

45 **[0104]** Los resultados después de 7 días de tratamiento con PC6 han puesto de relieve:

- 50 - El tratamiento con PC6 a 0,01 µg/ml induce una modulación débil y negativa (cambio en tiempos <1) de OCT3/4, las expresiones de KLF4 y VEGF (barras azules) así como una modulación positiva de las expresiones de NKX2.5 iMEF2C;  
 - El tratamiento con PC6 a 0,1 µg/ml parece inducir una modulación positiva de la expresión de OCT3/4, NKX2.5 y MEF2C y una modulación negativa de la expresión de VEGF, mientras que la expresión de KLF4 es similar al control.  
 Análisis de la expresión génica después de 24 h de tratamiento con PC6 (10 µg/ml).

55 **[0105]** Se puede concluir que después de 24 h:

- 60 - El tratamiento con PC6 indujo una modulación positiva de la expresión de VEGF y MEF2C;  
 - El tratamiento con PC6 indujo una modulación negativa de la expresión de KLF4 y NKX2.5.  
 - La expresión de OCT3/4 (marcador del potencial de células madre) no se vio afectada.

#### Análisis de la expresión génica después de 72 h de tratamiento con PC6 (10 µg/ml).

**[0106]** Se puede concluir que después de 72 h:

- 65 - El tratamiento con PC6 indujo una modulación positiva de la expresión de VEGF y MEF2C;  
 - El tratamiento con PC6 indujo una modulación negativa de la expresión de NKX2.5.

- La expresión de OCT3/4 y KLF4 no se vio afectada.
- La expresión de NEUROG y MyoD no se detectó en las células tratadas o en los controles.

**[0107]** En conclusión, se ha demostrado que los factores (en particular los presentes en PC1 + PC2, PC5 y PC6) han conducido a una ralentización de la proliferación celular y a un aumento en la muerte celular programada, o apoptosis, mientras que los estadios tempranos también destacaron un efecto multiplicativo. Ninguno de los estadios y dosis ensayados condujeron a la muerte por necrosis o toxicidad para las células. Los extractos, por lo tanto, demostraron ser inofensivos y seguros.

## 10 Ejemplo 2

**[0108]** Estudio de los efectos producidos por los factores recogidos en 3 estadios diferentes de diferenciación [A = PC1 + PC2 (blástula-gástrula media + brote caudal), B = PC1 + PC2 + PC5: (estadio de blástula-gástrula media + brote caudal + faríngrula temprana), C = PC6 (una mezcla de estadio de blástula-gástrula media + brote caudal + 5 somitas + 20 somitas + faríngrula temprana) para prevenir la neurodegeneración de las células del hipocampo.

**[0109]** Se prepararon cortes de hipocampo organotípicos como se ha descrito previamente (Gardoni *et al.*, 2002) utilizando ratas de 7-8 días; todos los tratamientos farmacológicos se llevaron a cabo en cortes organotípicos en el día 14 en cultivo (*DIV14*).

**[0110]** Para ensayar el efecto del extracto de pez cebra, los cortes organotípicos se expusieron a 50  $\mu\text{M}$  de NMDA o a 300  $\mu\text{M}$  de NMDA en medio libre de suero, en presencia o ausencia de los extractos. En algunos experimentos, los cortes se incubaron durante una hora en medio libre de suero en presencia o ausencia de los extractos. Para cada tipo de tratamiento, se evaluó la actividad neuroprotectora tanto de la mezcla de los extractos (A + B + C) como de los extractos individuales (A o B o C).

**[0111]** Después de una hora, los cortes se lavaron con medio libre de suero y luego se incubaron con su medio en presencia o ausencia del extracto de pez cebra durante 24 horas.

**[0112]** Se utilizó fluorescencia, en combinación con el uso de yoduro de propidio (PI) (5 mg/ml) como se ha descrito previamente (Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1999), para evaluar el daño celular inducido por los diferentes tratamientos. El análisis cuantitativo de la mortalidad celular se realizó en el área CA1 del hipocampo utilizando el máximo daño celular obtenido al exponer los cortes organotípicos al tratamiento con NMDA, como término de comparación.

**[0113]** Las imágenes se adquirieron con un microscopio epifluorescente Zeiss Axiovert 200M (lente 10x) y una cámara CoolSnap CCD. Para el análisis cuantitativo, las imágenes se adquirieron con los mismos ajustes y tiempos de exposición. La intensidad media de fluorescencia se determinó después de trazar el área correspondiente con el área CA1 y la mortalidad analizada como una función de la intensidad de fluorescencia y del área expresada como  $\text{pixel}^2$ .

## Resultados.

**[0114]** Se llevó a cabo una primera serie de experimentos con el fin de establecer las condiciones experimentales óptimas para la evaluación de una posible acción del tipo neuroprotector de los extractos de pez cebra.

**[0115]** Para este fin, se verificó que el tratamiento durante 1 h con 50  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$  de NMDA indujo una mortalidad significativa en nuestras condiciones experimentales. Los cortes de hipocampo organotípicos (*DIV14*) se trataron durante una hora con 50  $\mu\text{M}$  de NMDA, o con 300  $\mu\text{M}$  de NMDA, para tener una condición que determina cierta mortalidad, y la tinción con PI se llevó a cabo 24 horas después. Después de la fijación, se adquirió el CA1 y se analizó la mortalidad como se describe en los materiales y métodos. El tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de NMDA determina un aumento del 47 % en la mortalidad (50  $\mu\text{M}$  de NMDA frente a CTRL) mientras que 300  $\mu\text{M}$  de NMDA determina un aumento del 139 % (300  $\mu\text{M}$  de NMDA frente a CTRL).

**[0116]** Las propiedades neuroprotectoras de los extractos se evaluaron tras la exposición de los cortes de hipocampo organotípicos con tres estímulos tóxicos diferentes, de diferente intensidad (privado de suero, 50  $\mu\text{M}$  de NMDA, 300  $\mu\text{M}$  de NMDA, 1 h). En una primera serie de experimentos, se analizó el posible efecto neuroprotector de la mezcla de extractos C. La mezcla se añadió contemporáneamente (dilución 1:100) al tratamiento con NMDA o a la privación de suero simple y los análisis se llevaron a cabo después de 24 h.

**[0117]** Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento con la mezcla ABC determina una reducción significativa en la mortalidad neuronal ( $-31,6 \pm 6,2\%$ ,  $*p = 0,005$ ) inducida por 1 h de privación de suero.

**[0118]** El tratamiento con NMDA (50  $\mu\text{M}$ ) causó un aumento significativo de la mortalidad en el área CA1 ( $**p = 0,002$ , 50  $\mu\text{M}$  de NMDA frente a CTRL); el cotratamiento con la mezcla ABC determina una reducción significativa en la mortalidad inducida por NMDA (50  $\mu\text{M}$ ) (Figura 5;  $*p = 0,01$ , 50  $\mu\text{M}$  de NMDA + ABC frente a 50  $\mu\text{M}$  de NMDA).

5 **[0119]** En una última serie de experimentos, la capacidad de la mezcla ABC para inducir neuroprotección incluso después del tratamiento de cortes de hipocampo con concentraciones aún mayores de NMDA (300  $\mu$ M). Incluso en estas condiciones experimentales, el cotratamiento con la mezcla ABC determina una reducción significativa en la mortalidad inducida por NMDA (300  $\mu$ M) (Figura 6; \*p = 0,0002, 300  $\mu$ M de NMDA frente al control; \*\*p = 0,009 300  $\mu$ M de NMDA + ABC frente a 300  $\mu$ M de NMDA).

10 **[0120]** Las posibles propiedades neuroprotectoras de los extractos administrados individualmente (A, B o C) se evaluaron posteriormente. También en este caso, se evaluó la mortalidad neuronal, a través del ensayo con yoduro de propidio, después de la exposición de los cortes de hipocampo organotípicos a la privación de suero o con NMDA, en presencia de varios extractos de pez cebra. Como se muestra en las Figuras 7 y 8, ninguno de los extractos individuales ha mostrado una capacidad neuroprotectora significativa, después de la privación de suero (Figura 7) o después del tratamiento con NMDA (50  $\mu$ M, Figura 8).

15 Discusiones y conclusiones

15 **[0121]** En este estudio se evaluaron las propiedades neuroprotectoras de los extractos de pez cebra, administrados como una mezcla de los tres extractos, y como extractos individuales (A, B, C), después de la exposición de cortes de hipocampo organotípicos a varios tipos de ataques neurotóxicos.

20 **[0122]** Los mejores resultados en términos de neuroprotección con respecto a cada tipo de ataque tóxico analizado se obtuvieron utilizando la mezcla A + B + C. El extracto A también mostró una cierta acción neuroprotectora, que se puede definir en el límite de importancia, especialmente con respecto a la muerte celular inducida por la privación de suero.

25 **[0123]** La mezcla A + B + C de extractos, por otra parte, demostró una actividad neuroprotectora significativa con respecto a la muerte neuronal inducida por 1 h de privación de suero o inducida por tratamiento con NMDA (tanto 50  $\mu$ M como 300  $\mu$ M). Esto significa que se ha de utilizar una cierta redundancia de información para obtener la mejor respuesta.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un extracto de embriones de peces en estadios seleccionados de la diferenciación de células madre, **caracterizado por que** es una mezcla de extractos de embriones de peces cebra en el estadio de blástula-gástrula media, estadio de brote caudal, estadio de 5 somitas, estadio de 20 somitas y estadio de farínula.
2. El extracto según la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
- 10 3. El extracto según la reivindicación 1, para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
4. Una composición farmacéutica que comprende un extracto según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Análisis de las proteínas del extracto de pez cebra:  
5 estadios de desarrollo (PC1-PC5) y una mezcla de los 5 estadios (PC6)

**SDS-PAGE de los extractos de pez cebra embrionarios**

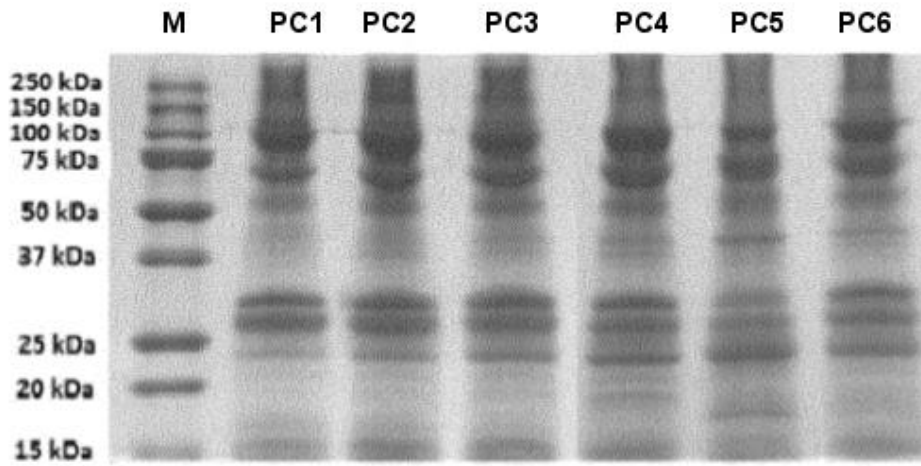


Figura 1



Ensayo de proliferación:  
 Extractos de pez cebra: 6 estadios (PC1-PC6) en 4 concentraciones,  
 después de 24 horas de tratamiento

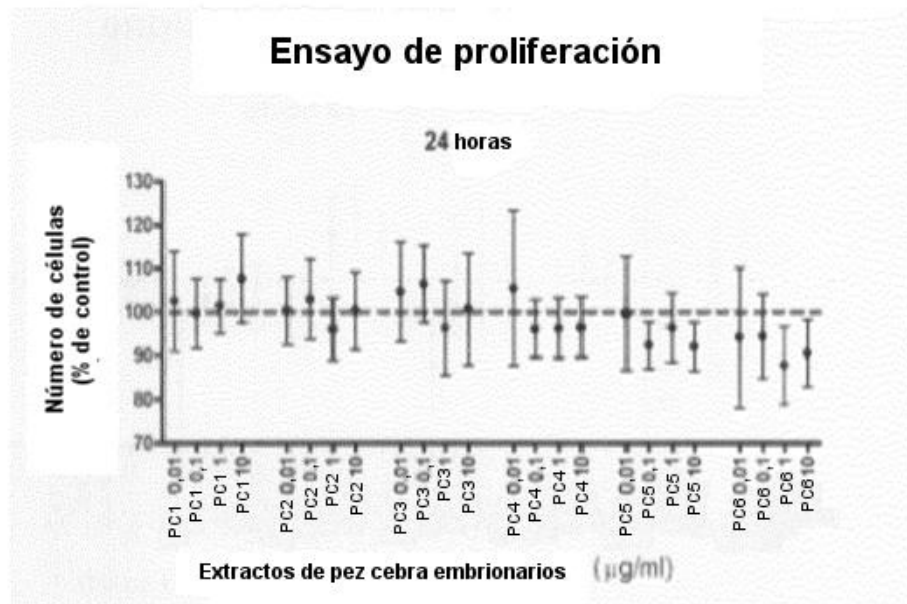


Figura 2

Ensayo de proliferación:  
 Extractos de pez cebra: 6 estadios (PC1-PC6) en 4 concentraciones,  
 después de 72 horas de tratamiento

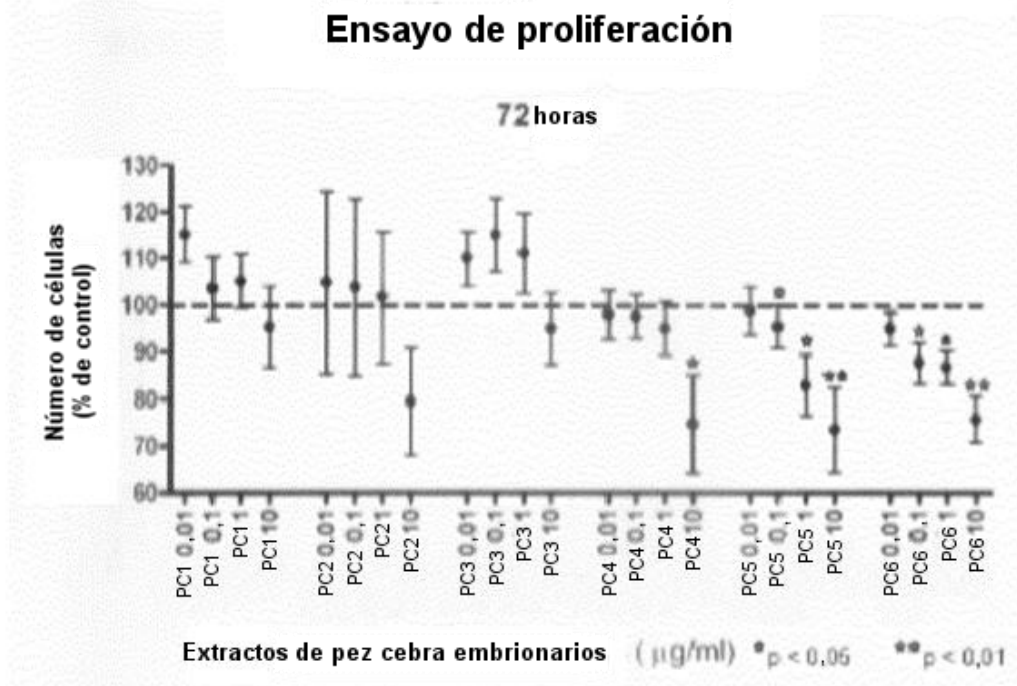


Figura 3

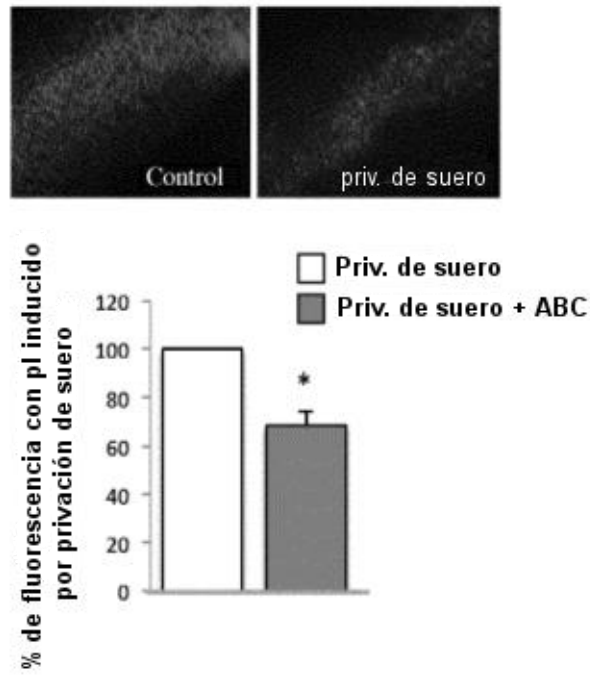


Figura 4

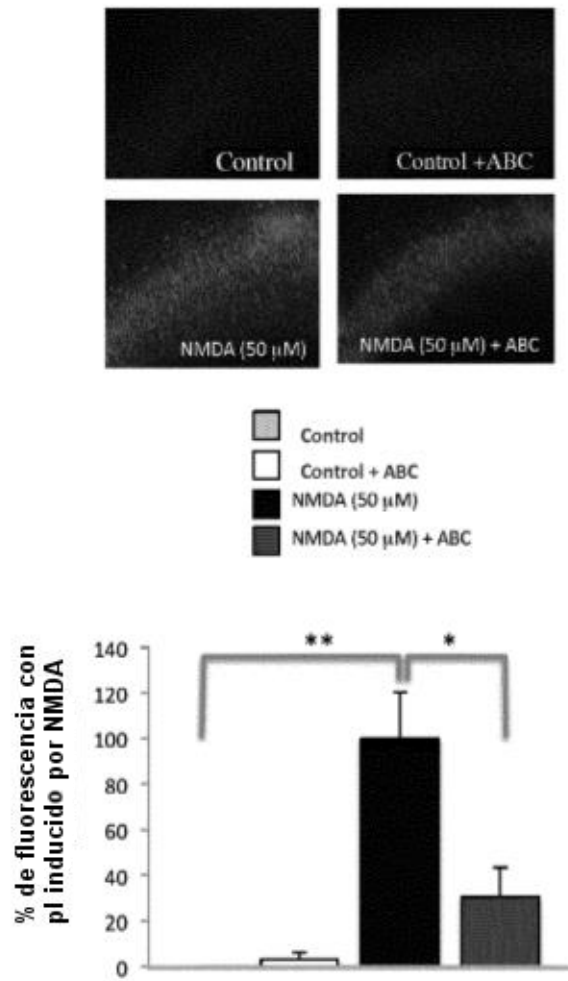


Figura 5

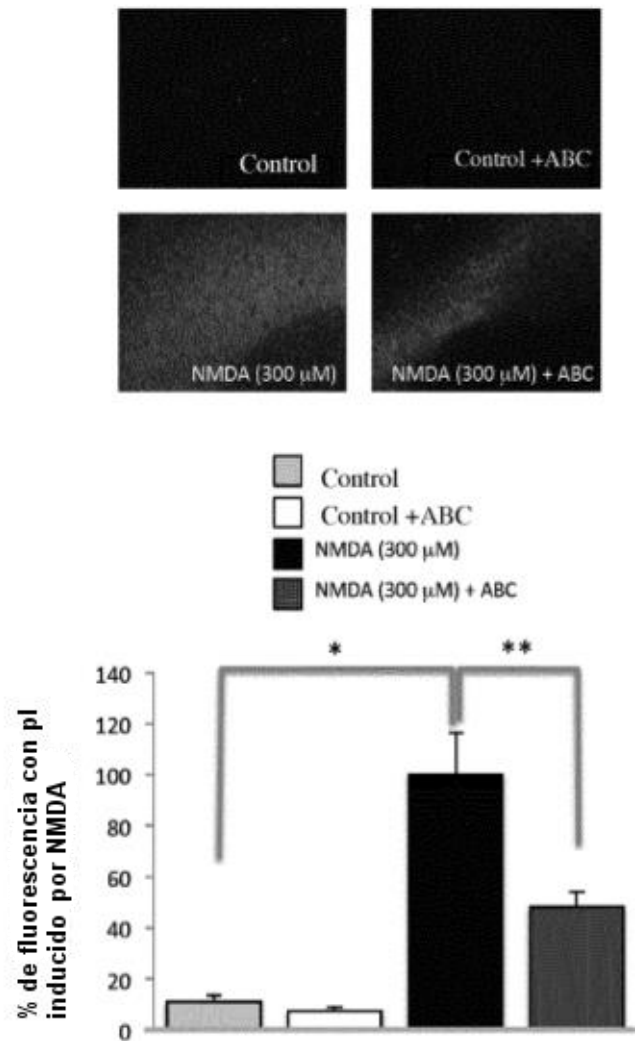


Figura 6

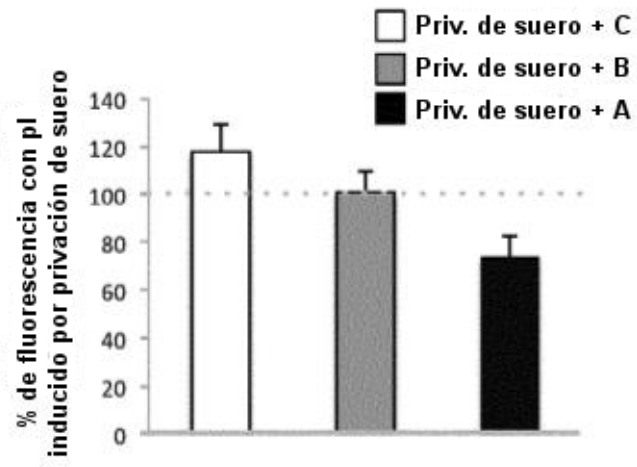


Figura 7

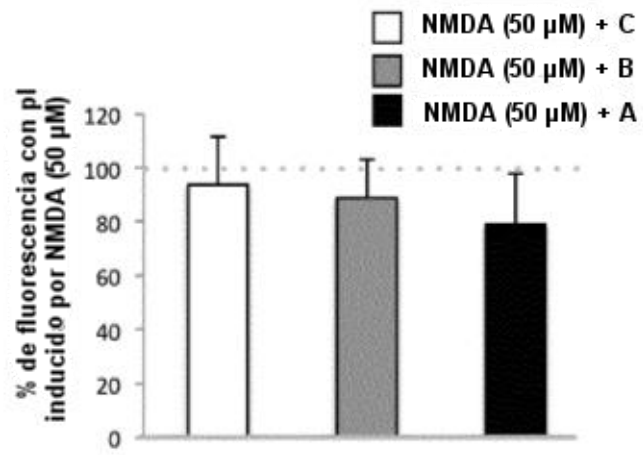


Figura 8