



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 306**

51 Int. Cl.:
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05786995 .0**
96 Fecha de presentación : **21.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1799248**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Uso de IL-17F para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas.**

30 Prioridad: **21.09.2004 EP 04104573**
22.11.2004 US 630105 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.08.2009

73 Titular/es: **Merck Serono S.A.**
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH

72 Inventor/es: **Sagot, Yves y**
Pouly, Sandrine

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Uso de IL-17F para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere de forma general al campo de las enfermedades y los trastornos neurológicos. Se refiere a la neuroprotección, la mielinización y generación de los nervios o a la re-generación de las células productoras de mielina. En particular, se refiere a enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas, neuropatías, lesiones nerviosas traumáticas, accidente cerebrovascular y enfermedades neurológicas causadas por trastornos metabólicos congénitos. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de IL-17F, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica.

15 **Antecedentes de la invención**

La mielinización nerviosa es un proceso esencial en la formación y función de los compartimentos del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP). La vaina de mielina alrededor de los axones es necesaria para la adecuada conducción de los impulsos eléctricos a lo largo de los nervios. La pérdida de mielina aparece en varias enfermedades, entre las que están la esclerosis múltiple (EM) que afecta al SNC, el síndrome de Guillain-Barre, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y otras (véase Abramsky y Ovadia, 1997; Hartung *et al.*, 1998). Aunque existen diversas etiologías, tales como las de patógenos infecciosos o ataques autoinmunes, todas las enfermedades desmielinizantes causan la pérdida de la función neurológica y pueden conducir a una parálisis y a la muerte. Aunque los actuales agentes terapéuticos reduzcan los ataques inflamatorios en la EM y retarden la progresión de la enfermedad, es necesario desarrollar terapias que puedan conducir a la remielinización y la recuperación de la función neurológica (Abramsky y Ovadia, 1997).

El daño al SNC inducido por lesiones agudas incluyendo traumatismos, hipoxia e isquemia puede afectar tanto a las neuronas como a la materia blanca. Aunque se ha prestado la mayor atención a los procesos que conducen a la muerte neuronal, un mayor número de pruebas sugiere que el daño a los oligodendrocitos, que mielinizan los axones, es también un componente específico del daño al SNC. Así, fue demostrada la patología de los oligodendrocitos en una fase muy inicial seguida de un accidente cerebrovascular (3 horas) en ratas, sugiriendo que estas células son incluso más vulnerables frente a eventos excitotóxicos que las neuronas (Pantoni *et al.*, 1996). Un candidato potencial que media la muerte celular es la marcada elevación de la concentración de glutamato que acompaña a muchas lesiones agudas del SNC (Lipton *et al.* 1994). De hecho, además de las neuronas se encontró también que los oligodendrocitos expresaban receptores de glutamato funcionales que pertenecen al subtipo AMPA/kainato. Además los oligodendrocitos despliegan una alta vulnerabilidad como respuesta a la aplicación de glutamato (McDonald *et al.*, 1998).

El traumatismo es una lesión o daño de los nervios. Puede ser un traumatismo de la médula espinal, que es un daño en la médula espinal que afecta a todas las funciones nerviosas que están controladas en el nivel de la lesión y por debajo de éste, incluyendo el control muscular y la sensibilidad, o el traumatismo cerebral, tal como los traumatismos causados por un traumatismo craneoencefálico cerrado.

La hipoxia cerebral es específicamente una falta de oxígeno en los hemisferios cerebrales, y más típicamente la expresión se usa para referirse a una carencia de oxígeno en todo el cerebro. Dependiendo de la gravedad de la hipoxia, los síntomas pueden abarcar entre la confusión a un daño cerebral irreversible, el coma y la muerte.

Un accidente cerebrovascular está normalmente causado por una isquemia del cerebro. También se llama enfermedad cerebrovascular o accidente. Es un grupo de trastornos cerebrales que implican la pérdida de las funciones cerebrales que aparecen cuando se interrumpe el suministro sanguíneo a cualquier parte del cerebro. El cerebro requiere aproximadamente el 20% de la circulación de la sangre del cuerpo. El suministro de sangre primario al cerebro se da a través de 2 arterias en el cuello (las arterias carótidas), que luego se ramifican dentro del cerebro en múltiples arterias que suministra cada una a un área específica del cerebro. Incluso una breve interrupción del flujo sanguíneo puede causar bajadas en la función cerebral (déficit neurológico). Los síntomas varían según el área del cerebro afectado y comúnmente incluyen problemas tales como cambios en la visión, cambios en el habla, menor movilidad o sensación en una parte del cuerpo, o cambios en a nivel de la conciencia. Si el flujo sanguíneo disminuye durante más de unos pocos segundos, las células cerebrales en el área se destruyen (se infartan) causando un daño permanente en tal área del cerebro o incluso la muerte.

Los accidentes cerebrovasculares afectan aproximadamente a 4 de cada 1.000 personas. Es la 3ª causa que conduce a la muerte en la mayor parte de los países desarrollados, incluyendo los EE.UU. La incidencia del accidente cerebrovascular aumenta drásticamente con la edad, duplicándose el riesgo con cada década después de los 35. Aproximadamente el 5% de las personas por encima de los 65 han tenido al menos un accidente cerebrovascular. El trastorno aparece en hombres con más frecuencia que en mujeres.

Como se menciona anteriormente, un accidente cerebrovascular implica la pérdida de funciones cerebrales (déficit neurológico) causadas por una pérdida de la circulación de la sangre en áreas del cerebro. Los déficit neurológicos específicos pueden variar dependiendo de la localización, extensión del daño y causa del trastorno. Un accidente cerebrovascular puede estar causado por un menor flujo sanguíneo (isquemia) lo que desemboca en una deficiencia

del suministro de sangre y la muerte de los tejidos en tal área (infarto). Las causas de los accidentes cerebrovasculares isquémicos son coágulos de sangre que se forman en el cerebro (trombos) y coágulos de sangre o trozos de placas ateroscleróticas u otros materiales que viajan al cerebro desde otra localización (embolias). Un derrame (hemorragia) dentro del cerebro puede causar síntomas que se parecen al accidente cerebrovascular.

5 La causa más común de un accidente cerebrovascular es el accidente cerebrovascular secundario a aterosclerosis (trombosis cerebral). La aterosclerosis (“endurecimiento de las arterias”) es una afección en la que aparecen depósitos grasos en la cubierta interna de las arterias, y que desarrolla placas ateroscleróticas (una masa que consiste en depósitos grasos y plaquetas sanguíneas). La oclusión de la arteria se desarrolla lentamente. Las placas ateroscleróticas no causan
10 necesariamente un accidente cerebrovascular. Hay muchas pequeñas conexiones entre las diversas arterias cerebrales. Si el flujo sanguíneo disminuye gradualmente, estas pequeñas conexiones aumentarán de tamaño y “circundarán” el área obstruida (circulación colateral). Si hay suficiente circulación colateral, incluso una arteria totalmente bloqueada puede no causar déficit neurológicos. Un mecanismo de seguridad secundario dentro del cerebro es que las arterias son lo suficientemente grandes para que el 75% de los vasos sanguíneos puedan ocluirse de modo que todavía quede
15 un flujo sanguíneo adecuado a tal área del cerebro.

Un accidente cerebrovascular trombótico (un accidente cerebrovascular causado por una trombosis) es lo más común en personas de edad avanzada, y a menudo hay una enfermedad cardíaca aterosclerótica subyacente o diabetes melitus. Este tipo de accidente cerebrovascular puede aparecer en cualquier momento, incluido durante el propio
20 descanso. La persona puede perder la consciencia o no.

Los accidentes cerebrovasculares causados por embolismos (un coágulo de sangre en movimiento) son accidentes cerebrovasculares secundarios más comúnmente a un embolismo cardiogénico, coágulos que se desarrollan debido a trastornos cardíacos que luego viajan al cerebro. Un embolismo también puede originarse en otras áreas, especialmente
25 cuando hay placas ateroscleróticas. El émbolo viaja a través del flujo sanguíneo y se queda atascado en una pequeña arteria en el cerebro. Este accidente cerebrovascular aparece de repente con un inmediato déficit neurológico máximo. No está asociado a niveles de actividad y puede aparecer en cualquier momento. Las arritmias del corazón se asocian normalmente con este trastorno y a menudo son la causa de los émbolos. A menudo el daño al cerebro es más severo que con un accidente cerebrovascular causado por trombosis cerebral. Puede perderse la consciencia o no. El resultado
30 probable empeora si los vasos sanguíneos dañados por el accidente cerebrovascular se rompen y sangran (accidente cerebrovascular hemorrágico).

La neuropatía periférica es un síndrome de pérdida sensorial, debilidad muscular y atrofia, disminución del reflejo profundo del tendón y síntomas vasomotores, sola o en cualquier combinación.
35

La enfermedad puede afectar a un sólo nervio (mononeuropatía), dos o más nervios en áreas separadas (mononeuropatía múltiple), o muchos nervios simultáneamente (polineuropatía). El axón puede verse en primer lugar afectado (por ejemplo en la diabetes mellitus, enfermedad de Lyme, uremia o con agentes tóxicos) o la vaina de mielina o las células de Schwann (por ejemplo en la polineuropatía inflamatoria aguda o crónica, leucodistrofias o el síndrome de
40 Guillain-Barre). El daño a pequeñas fibras no mielinizadas y mielinizadas causa principalmente una pérdida de temperatura y sensación dolorosa; el daño a grandes fibras mielinizadas causa defectos motores o propioceptivos. Algunas neuropatías (por ejemplo las debidas a la toxicidad del plomo, el uso de dapsona, la enfermedad de Lyme (causada por la mordedura de una garrapata), porfiria o síndrome de Guillain-Barre) afectan principalmente a las fibras motoras; otras (por ejemplo debido a ganglionitis de raíz dorsal del cáncer, lepra, SIDA, diabetes mellitus o intoxicación crónica
45 por piridoxina) afectan principalmente a la ganglia de raíz dorsal o fibras sensoriales, produciendo síntomas sensoriales. Ocasionalmente, los nervios craneales están también implicados (por ejemplo, en el síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Lyme, diabetes mellitus y difteria). La identificación de las modalidades implicadas ayuda a determinar la causa.

El traumatismo es la causa más común de una lesión localizada en un sólo nervio. La actividad muscular violenta o sobreextensión forzable de una articulación puede producir una neuropatía focal, como con muchos pequeños traumatismos repetidos (por ejemplo, agarrando fuertemente pequeñas herramientas, por una excesiva vibración de martillos neumáticos). La parálisis por presión o compresión afecta normalmente a los nervios superficiales (cabital, radial, peroneal) en prominencias óseas (por ejemplo, durante el sueño profundo o durante la anestesia en personas delgadas
55 o caquéticas y a menudo en alcohólicos) o en canales estrechos (por ejemplo en el síndrome del túnel carpiano). La parálisis por presión también puede causar tumores, hiperostosis ósea, lesiones con escayolas, muletas o posturas espasmódicas prolongadas (por ejemplo en jardinería). La hemorragia en un nervio y la exposición al frío o la radiación puede producir una neuropatía. La mononeuropatía puede surgir de una invasión tumoral directa.

La mononeuropatía múltiple es normalmente secundaria respecto a trastornos vasculares del colágeno (por ejemplo, la poliarteritis nodosa, la esclerosis lateral amiotófica (ELA), el síndrome de Sjogren y la artritis reumatoide (AR)), sarcoidosis, enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes y amiloidosis) o enfermedades infecciosas (por ejemplo, la enfermedad de Lyme y la infección por el VIH). Los microorganismos pueden causar múltiples mononeuropatías por la invasión directa del nervio (por ejemplo, en la lepra).
60

Las polineuropatías debidas a enfermedades febriles agudas pueden surgir de una toxina (por ejemplo, en la difteria) o de una reacción autoinmune (por ejemplo, en el síndrome de Guillain-Barre); la polineuropatía que sigue algunas veces a las inmunizaciones es probablemente también autoinmune.
65

Los agentes tóxicos causan generalmente polineuropatías pero algunas veces mononeuropatías. Estas incluyen emetina, hexobarbital, barbital, clorobutanol, sulfonamidas, fenitoina, nitrofurantoina, alcaloides de vinca, metales pesados, monóxido de carbono, fosfato de triortocresilo, ortodinitrofenol, muchos disolventes, otros venenos industriales y ciertos fármacos del SIDA (por ejemplo, zalcitabina y didanosina).

La neuropatía inducida por quimioterapias es un prominente efecto secundario y serio de diversas medicaciones con quimioterapia normalmente usadas, incluyendo los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina y vindesina), fármacos que contienen platino (cisplatina) y Taxanos (paclitaxel). La inducción de una neuropatía periférica es un factor común en limitar la terapia con fármacos quimioterapéuticos.

Las deficiencias nutricionales y los trastornos metabólicos pueden causar polineuropatías. A menudo, la carencia de vitamina B es la causa (por ejemplo, en el alcoholismo, beriberi, anemia perniciosa, deficiencia de piridoxina inducida por isoniazid, síndromes de malabsorción e hiperemesis gravidarum). La polineuropatía también aparece en hipotiroidismo, porfiria, sarcoidosis, amiloidosis y uremia. La diabetes mellitus puede causar una polineuropatía distal sensoriomotora (la más común), una mononeuropatía múltiple y una mononeuropatía focal (por ejemplo, de los nervios oculomotrices o craneales abducens).

La malignidad puede causar una polineuropatía vía gammopatía monoclonal (mieloma múltiple, linfoma), amiloidosis o deficiencias nutricionales o como un síndrome paraneoplásico.

Mononeuropatías específicas: Las mononeuropatías simples y múltiples se caracterizan por dolor, debilidad y parestesias en la distribución del nervio afectado. La mononeuropatía múltiple es asimétrica; los nervios pueden estar implicados del todo a la vez o progresivamente. La implicación extensiva de muchos nervios puede simular una polineuropatía.

La parálisis nerviosa cubital está a menudo causada por un traumatismo en el nervio en el surco cubital del codo por inclinación repetida en el codo o por un crecimiento asimétrico óseo después de una fractura en la infancia (parálisis cubital tardía). El nervio cubital también puede comprimirse en el túnel cubital. Aparecen parestesias y un déficit sensorial en los dedos 5º y medio medial del 4º; el aductor del pulgar, abductor del 5º dedo y músculos interóseos se debilitan y atrofian. La parálisis cubital severa crónica produce una deformidad de mano en garra. Con los estudios de conducción nerviosa se puede identificar el sitio de la lesión. Antes de la reparación quirúrgica debería intentarse un tratamiento conservador.

El síndrome del túnel carpiano se origina por la compresión del nervio mediano en la cara volar de la muñeca entre el ligamento carpal superficial transversal y los tendones longitudinales de los músculos del antebrazo que flexionan la mano. Puede ser unilateral o bilateral. La compresión produce parestesias en la cara radial-palmar de la mano y dolor en las muñecas y palmas; algunas veces el dolor aparece proximalmente al sitio de compresión en el antebrazo y hombro. El dolor puede ser más severo por la noche. Un déficit sensorial en el lado palmar de los tres primeros dedos puede seguir a esto; los músculos que controlan la abducción del pulgar y la oposición pueden volverse débiles y atrofiarse. Este síndrome debería distinguirse de la compresión de raíz C-6 debida a radiculopatía cervical.

La parálisis nerviosa peroneal está normalmente causada por la compresión del nervio contra la cara lateral del cuello fibular. Es de lo más común en pacientes postrados en camas demacrados y en personas delgadas que habitualmente cruzan sus piernas. Aparecen debilidad de dorsiflexión del pie y eversion (pie pendular). Ocasionalmente, un déficit sensorial aparece sobre la cara anterolateral de la pierna inferior y dorso del pie o en el espacio reticular entre el 1er y 2º metatarsos. El tratamiento es normalmente conservativo para las neuropatías compresivas (por ejemplo, evitando el cruce de las piernas). Las neuropatías incompletas son normalmente seguidas clínicamente y habitualmente mejoran espontáneamente. Si no se produce la recuperación, puede indicarse la exploración quirúrgica.

La parálisis nerviosa radial (parálisis del sábado noche) está causada por la compresión del nervio contra el húmero, por ejemplo cuando el brazo se pasa por encima de la parte de atrás de una silla durante una intoxicación o sueño profundo. Los síntomas incluyen debilidad de las muñecas y de los extensores del dedo (muñeca péndula) y, ocasionalmente, pérdida sensorial sobre la cara dorsal del 1er músculo interóseo dorsal. El tratamiento es similar al de una neuropatía peroneal compresiva.

Las polineuropatías son relativamente simétricas, afectando a menudo a las fibras sensoriales, motoras y vasomotoras simultáneamente. Pueden afectar al cilindro del axón o a la vaina de mielina y, en cualquier forma, pueden ser agudas (por ejemplo, el síndrome de Guillain-Barre) o crónicas (por ejemplo, fallo renal).

Las polineuropatías debidas a trastornos metabólicos (por ejemplo, la diabetes mellitus) o fallo renal se desarrollan lentamente, a menudo en meses o años. Frecuentemente comienzan con anomalías sensoriales en las extremidades inferiores que son a menudo más severas distalmente que proximalmente. El hormigueo periférico, entumecimiento, dolor urente o deficiencias en la propiocepción articular y sensación vibratoria son a menudo prominentes. El dolor es peor por la noche a menudo y puede agravarse al tocar el área afectada o por cambios de temperatura. En los casos severos, hay signos objetivos de pérdida sensorial, típicamente con distribución en guante y calcetín. Los reflejos aquileo y otros reflejos de tendones profundos disminuyen o no se dan. Las úlceras indoloras en las falanges o articulaciones de Charcot pueden desarrollarse cuando la pérdida sensorial es profunda. Los déficits sensoriales o propioceptivos pueden conducir a anomalías motrices. La implicación motora causa una debilidad muscular distal y atrofia. El

sistema nervioso autonómico puede estar adicionalmente o selectivamente implicado, conduciendo a diarreas nocturnas, incontinencia urinaria y fecal, impotencia o hipotensión postural. Los síntomas vasomotores varían. La piel puede estar más pálida y seca de lo normal, algunas veces con decoloración morena; la sudoración puede ser excesiva. Los cambios tróficos (piel suave y brillante, uñas picadas o agrietadas, osteoporosis) son comunes en los casos severos y prolongados.

La polineuropatía nutricional es común entre alcohólicos y desnutridos. Una axonopatía primaria puede conducir a una desmielinización secundaria y destrucción axonal en los nervios más largos y mayores. No está claro si la causa es una deficiencia de tiamina u otra vitamina (por ejemplo, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico). La neuropatía debida a una deficiencia de piridoxina normalmente aparece solo en personas que toman isoniazida para la tuberculosis; pueden tener convulsiones los niños que tienen deficiencia o son dependientes de piridoxina. El debilitamiento por desgaste y simétrico de las extremidades distales es normalmente insidioso aunque puede progresar rápidamente, algunas veces acompañado por pérdida sensorial, parestesias y dolor. Dolores, calambres, enfriamientos, quemaduras y hormigueos en las pantorrillas y pies pueden empeorar con el tacto. Pueden administrarse múltiples vitaminas cuando la etiología es incierta, pero no se ha probado que tengan ningún beneficio.

Anormalmente, una polineuropatía exclusivamente sensorial comienza con dolores periféricos y parestesias y progresa centralmente a una pérdida de todas las formas de sensación. Aparece como un efecto remoto del carcinoma (especialmente broncogénico), después de una ingestión excesiva de piridoxina ($> 0,5$ g/día), y en amiloidosis, hipotiroidismo, mieloma y uremia. La neuropatía inducida por piridoxina se resuelve cuando la piridoxina es discontinua.

Las neuropatías hereditarias se clasifican en neuropatías sensoriomotrices o neuropatías sensoriales. La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es la neuropatía hereditaria sensoriomotora más común. Las neuropatías sensoriomotoras menos comunes comienzan en el nacimiento y causan una mayor invalidez. En las neuropatías sensoriales, que son raras, la pérdida de dolor distal y sensación térmica es más prominente que la pérdida del sentido vibratorio y de posición. El principal problema es la mutilación podálica debida a una insensibilidad frente al dolor, con frecuentes infecciones y osteomielitis.

La neuropatía hereditaria motora y sensorial tipos I y II (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, atrofia muscular peroneal) es un trastorno dominante autosómico, relativamente común, normalmente caracterizado por debilidad y atrofia, principalmente en músculos peroneales y pierna distal. Los pacientes también pueden tener otras enfermedades degenerativas (por ejemplo, la ataxia de Friedreich) o una historia de familia de ellas. Los pacientes con tipo I presentan en la infancia media pié pendular y lentamente progresan a la atrofia muscular distal, produciendo “piernas de cigüeña”. El desgaste muscular intrínseco en las manos comienza más tarde. La sensación de vibración, dolor y temperatura disminuye en una distribución en guante y calcetín. Los reflejos de los tendones profundos no se presentan. Pueden ser los únicos signos en los miembros de la familia menos afectados que padezcan la enfermedad los altos arcos pedios o dedos en martillo. Las velocidades de la conducción nerviosa son lentas y las latencias distales son prolongadas. Se produce una desmielinización segmental y remielinización. Pueden llegar a palparse nervios periféricos agrandados. La enfermedad avanza lentamente y no afecta a la extensión de la vida. La enfermedad tipo II evoluciona más lentamente, desarrollándose normalmente con debilidad más tarde en la vida. Los pacientes tienen relativamente velocidades de conducción nerviosa normal pero potenciales evocados de baja amplitud. Las biopsias muestran degeneración.

La neuropatía hereditaria motora y sensorial tipo III (neuropatía intersticial hipertrófica, enfermedad de Dejerine-Sottas), un raro trastorno recesivo autosómico, comienza en la infancia con una debilidad progresiva y pérdida sensorial y carencia de reflejos del tendón profundos. Inicialmente, se parece a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, pero la debilidad motora avanza a una velocidad más rápida. Aparece la desmielinización y la remielinización, produciéndose un agrandamiento de los nervios periféricos y se observan bulbos de cebolla en la biopsia del nervio.

Las enfermedades neurodegenerativas comprenden, entre otras, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA).

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno que implica el deterioro de las funciones mentales dando como resultado cambios en el tejido cerebral. Esto incluye la contracción de tejidos cerebrales, no causada por trastornos de los vasos sanguíneos, demencia degenerativa primaria y atrofia cerebral difusa. La enfermedad de Alzheimer también se llama demencia senil/tipo Alzheimer (DSTA). Es la causa más común del declive intelectual al avanzar la edad. La incidencia es de aproximadamente 9 de cada 10.000 personas. Este trastorno afecta ligeramente más a menudo a mujeres que a hombres y aparece principalmente en individuos más mayores.

La causa es desconocida. Los factores neuroquímicos que pueden participar en la generación de la enfermedad incluyen la carencia de las sustancias usadas por las células nerviosas para transmitir los impulsos nerviosos (neurotransmisores), incluyendo acetilcolina, somatostatina, sustancia P y norepinefrina. Los factores medioambientales incluyen la exposición al aluminio, manganeso y otras sustancias. Los factores infecciosos incluyen las infecciones por priones (organismos del tipo virus) que afectan al cerebro y la médula espinal (sistema nervioso central). En algunas familias (representando del 5 al 10% de los casos) hay una predisposición heredada al desarrollo del trastorno, pero esto no sigue modelos de herencia estrictos (Mendelianos). El diagnóstico se hace normalmente descartando otras causas de la demencia.

Los inventores han encontrado que en familias que tienen múltiples miembros con Alzheimer, hay una variación génica particular que es común a todos los que padecen la enfermedad. El gen, que produce una sustancia llamada apolipoproteína E4, no se dice que cause la enfermedad, su presencia simplemente aumenta las posibilidades de que la enfermedad pueda eventualmente aparecer. Hay mucha gente que tiene el gen E4 y nunca se han visto afectadas con Alzheimer.

El inicio se caracteriza por un daño en la memoria, con pérdida progresiva de la función intelectual. Pueden aparecer cambios en el estado de humor, cambios en la capacidad del lenguaje, cambios en la movilidad y otros cambios según avanza el trastorno. Hay una disminución del tamaño (atrofia) de los tejidos del cerebro, un agrandamiento de los ventrículos (los espacios dentro del cerebro) y depósitos dentro de los tejidos del cerebro.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del cerebro caracterizado por un movimiento con temblores y dificultad para caminar, moverse y de coordinación. La enfermedad está asociada al daño a una parte del cerebro que controla el movimiento muscular. También se llama parálisis agitante o parkinsoniana.

La enfermedad afecta aproximadamente a 2 de cada 1.000 personas, y lo más a menudo es que se desarrolle después de los 50 años. Afecta tanto a hombres como a mujeres y es uno de los trastornos neurológicos más comunes del envejecimiento. El término "parkinsonismo" se refiere a cualquier condición que implique una combinación de los tipos de cambios en movimiento vistos en la enfermedad de Parkinson, que pasa por ser la condición más común que causa este grupo de síntomas. El parkinsonismo puede estar causado por otros trastornos o por factores externos (parkinsonismo secundario).

La enfermedad de Parkinson está causada por un progresivo deterioro de las células nerviosas de la parte del cerebro que controla el movimiento muscular (los ganglios basales y el área extrapiramidal). La dopamina, que es una de las sustancias usadas por las células para transmitir los impulsos (transmisores), normalmente es producida en este área. El deterioro de este área del cerebro reduce la cantidad de dopamina disponible para el cuerpo. Una cantidad de dopamina insuficiente perturba el equilibrio entre la dopamina y otros transmisores, tal como la acetilcolina. Sin dopamina, las células nerviosas no pueden transmitir mensajes adecuadamente, y esto causa la pérdida de la función muscular. La razón exacta de que las células del cerebro se deterioren es desconocida. El trastorno puede afectar a uno o a ambos lados del cuerpo, con grados variables de la pérdida de la función.

Además de la pérdida del control muscular, algunas personas con enfermedad de Parkinson se vuelven gravemente depresivas. Aunque no sea común una pérdida temprana de las capacidades mentales, con un Parkinson severo la persona puede exhibir un deterioro mental global (incluyendo demencia, alucinaciones, etc.). La demencia también puede ser un efecto secundario de algunas de las medicaciones usadas para tratar el trastorno.

La enfermedad de Huntington (HD) es una enfermedad neurológica dominante autosómica y heredada. La enfermedad no se vuelve normalmente clínicamente evidente hasta la quinta década de la vida, y causa una perturbación psiquiátrica, un trastorno del movimiento involuntario y un declive cognitivo asociado a una progresión inexorable hasta la muerte, típicamente 17 años después del comienzo.

El gen responsable de la enfermedad de Huntington se llama huntingtina. Se localiza en el cromosoma 4p, presentando medios eficaces de diagnóstico preclínica y prenatal. La anomalía genética consiste en un número en exceso de secuencias de nucleótidos CAG repetidas en serie. Otras enfermedades con repeticiones CAG incluyen, por ejemplo, atrofia muscular espinal (AME), tal como la enfermedad de Kennedy, y la mayor parte de las ataxias cerebelares dominantes autosómicas (ACDA) que se llaman ataxias espinocerebelares (AEC) en la nomenclatura genética.

En la EH, no se sabe cómo este gen, ampliamente expresado, causa una muerte neuronal selectiva. Además, el análisis de secuencia no reveló ninguna homología obvia respecto a otros genes conocidos y no se identificaron motivos estructurales o dominios funcionales lo que proporciona claramente conocimientos sobre su función. En particular, la cuestión de cómo estos genes ampliamente expresados causan una muerte neuronal selectiva queda sin contestar.

La esclerosis lateral amiotrófica, ELA, es un trastorno que causa la progresiva pérdida del control nervioso de músculos voluntarios debido a la destrucción de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La esclerosis lateral amiotrófica, también llamada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno que implica la pérdida del uso y control de los músculos. Los nervios que controlan estos músculos se contraen y desaparecen, lo que causa una pérdida del tejido muscular debido a la falta de estimulación nerviosa. La resistencia muscular y coordinación disminuyen, comenzando con los músculos voluntarios (aquellos bajo un control consciente, tal como los músculos de los brazos y las piernas). El grado de pérdida del control muscular continúa avanzando, y más y más grupos musculares se van implicando. Puede haber una pérdida de estimulación nerviosa en músculos semi-voluntarios, tal como los músculos que controlan la respiración y el tragar. No hay ningún efecto en la capacidad de pensar o razonar. La causa es desconocida.

La ELA afecta aproximadamente a 1 de cada 100.000 personas. Parece que en algunos casos se distribuye en familias. El trastorno afecta con más frecuencia a hombres que a mujeres. Los síntomas normalmente no se desarrollan hasta la edad adulta, a menudo no antes que después de los 50 años.

La lesión nerviosa traumática puede afectar al SNC o al SNP. La lesión cerebral traumática, también denominada simplemente daño cerebral o traumatismo craneoencefálico cerrado, se refiere a una lesión en la que hay un daño al cerebro debido a una insuflación externa a la cabeza. Sucede lo más frecuentemente en accidentes de coche o bicicleta, pero también puede ocurrir como resultado de estar a punto de un ahogamiento por inmersión, ataque al corazón, accidente cerebrovascular e infecciones. Este tipo de daño cerebral traumático se generaría normalmente debido a la falta de oxígeno o suministro de sangre al cerebro, y por lo tanto puede denominarse un “daño anóxico”.

El daño cerebral o traumatismo craneoencefálico cerrado aparece cuando hay una insuflación a la cabeza como en un accidente de un vehículo de motor o una caída. En este caso, el cráneo se golpea contra un objeto estacionario y el cerebro gira y se retuerce sobre su eje (el tronco encefálico), originándose un daño localizado o extendido. También, el cerebro, una masa blanda rodeada por un fluido que le permite “flotar,” puede hacer que rebote de nuevo en el cráneo causando otro daño.

Puede haber un periodo de inconsciencia inmediatamente después del traumatismo, que puede durar minutos, semanas o meses. Debido a la torsión y al rebote, el paciente con una lesión traumática cerebral normalmente recibe daños o hematomas en muchas partes del cerebro. Esto es lo que se llama daño difuso, o “daño no focalizado” al cerebro. Los tipos de daños cerebrales que ocurren en lesiones no focalizadas pueden ser clasificados como primarios o secundarios.

El daño cerebral primario aparece en el momento del daño, principalmente en los sitios del impacto, en particular cuando una fracción craneal está presente. Las grandes contusiones pueden estar asociadas a una hemorragia intracerebral, o pueden estar acompañadas por laceraciones corticales. Las lesiones axonales difusas aparecen como resultado de deformaciones cortantes y tensiles de procesos neuronales producidos por movimientos rotacionales del cerebro dentro del cráneo. Pueden darse pequeñas lesiones hemorrágicas o daños difusos a los axones, que sólo pueden detectarse microscópicamente.

El daño cerebral secundario aparece como consecuencia de complicaciones que se desarrollan después del momento del daño. Incluyen hemorragia intracraneal, lesión traumática en arterias extracerebrales, hernia intracraneal, lesión hipóxica cerebral o meningitis.

Una lesión craneal abierta es un ataque visible a la cabeza y puede originarse por una herida de un disparo, un accidente o un objeto que atraviese desde el cráneo al cerebro (“daño focalizado al cerebro”). Este tipo de lesión cerebral es más posiblemente un daño a un área específica del cerebro.

El llamado daño cerebral medio puede aparecer sin ninguna pérdida de consciencia y posiblemente sólo con un sensación de aturdimiento o estado de confusión que dura un pequeño tiempo. Aunque el cuidado médico administrado puede ser mínimo, las personas con lesión cerebral sin coma pueden sufrir la experiencia de síntomas y desfallecimientos similares a los sufridos por el superviviente de una lesión por coma.

Como respuesta al traumatismo, aparecen cambios en el cerebro, que requieren de una monitorización para prevenir otros daños. El tamaño del cerebro aumenta frecuentemente después de una lesión cerebral severa. A esto se le llama tumefacción cerebral y aparece cuando hay un aumento en la cantidad de sangre al cerebro. Más tarde, en la enfermedad se puede acumular agua en el cerebro lo que se llama edema cerebral. Tanto la tumefacción cerebral como el edema cerebral causan una presión excesiva en el cerebro denominada presión intracraneal.

Las lesiones de la médula espinal comportan la mayor parte de los ingresos hospitalarios de paraplejia y tetraplejia. Sobre el 80% son consecuencia de accidentes de carretera. Se reconocen clínicamente dos grupos principales de daños: lesiones abiertas y lesiones cerradas.

Las lesiones abiertas causan un traumatismo directo de la médula espinal y raíces nerviosas. Las lesiones perforantes pueden causar una rotura extensiva y hemorragias. Las lesiones cerradas comportan la mayor parte de lesiones espinales y están normalmente asociadas a una fractura/deslocalización de la columna espinal, que es normalmente demostrable radiológicamente. El daño a la médula depende del grado de las lesiones óseas y puede ser considerado en dos etapas principales: daño primario, que son las contusiones, transecciones de las fibras nerviosas y necrosis hemorrágicas, y daño secundario, que son los hematomas extradurales, infartos, infecciones y edemas.

Los últimos efectos del daño medular incluyen: degeneración anterógrada ascendente y descendente de fibras nerviosas dañadas,iringomelia post-traumática y los efectos sistémicos de la paraplejia, tales como infecciones del tracto urinario y pecho, llagas por contacto y desgaste muscular.

Los trastornos neurológicos pueden ser debidos además a trastornos metabólicos congénitos. Las vainas de mielina, que cubren muchas fibras nerviosas, están compuestas de capas de lipoproteínas formadas al principio de la vida. La mielina formada por la oligodendrogli en el SNC es diferente químicamente e inmunológicamente de la formada por las células de Schwann periféricamente, pero ambos tipos tienen la misma función: protenciar la transmisión de un impulso neuronal a lo largo de un axón.

Muchos trastornos metabólicos congénitos (por ejemplo la fenilcetonuria y otras aminoacidurias; enfermedades de Tay-Sachs, Niemann-Pick, y Gaucher; síndrome de Hurler; enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias) afectan al

desarrollo de las vainas de mielina, principalmente en el SNC. A menos que el defecto bioquímico pueda ser corregido o compensado permanentemente, a menudo se producen déficit neurológicos extendidos.

Por ejemplo, la enfermedad de Krabbe o leucodistrofia de células globoides es un trastorno que implica a la materia blanca de los sistemas nerviosos periférico y central. Las mutaciones en el gen para la enzima lisosómica galactocerebrosidasa (GALC) causan una baja actividad enzimática y una menor capacidad de degradar los galactolípidos encontrados casi exclusivamente en la mielina.

La neurofibromatosis 1 (NF1) es un trastorno autosómico común con un amplio rango de manifestaciones neurológicas.

La atrofia de múltiples sistemas (AMS) es una enfermedad neurodegenerativa con inicio en edad adulta esporádica con una etiología desconocida. La condición puede ser única entre las enfermedades neurodegenerativas por el prominente papel, si no principal, jugado por las células oligodendrogliales en el proceso patogenético. La principal diferencia con la enfermedad de Parkinson es que los pacientes con AMS no responden al tratamiento con L-dopa.

La desmielinización en edad avanzada es una característica de muchos trastornos neurológicos; puede originarse a partir de un daño en los nervios o a la mielina debido a una lesión local, isquemia, agentes tóxicos o trastornos metabólicos. Hay también pruebas de que la desmielinización puede contribuir al padecimiento de la esquizofrenia. La pérdida de mielina extensiva es seguida normalmente por la degeneración axonal y a menudo por la degeneración del cuerpo celular, ambas de las cuales pueden ser irreversibles. Sin embargo, la remielinización aparece en muchos casos, y puede ser rápida una completa reparación, regeneración y recuperación de la función neuronal. La desmielinización central (es decir, de la médula espinal, cerebro o de los nervios ópticos) es el hallazgo más importante en las principales enfermedades desmielinizantes, cuya etiología es desconocida. La mejor conocida es la EM.

La encefalomiелitis diseminada aguda, encefalomiелitis post-infecciosa, se caracteriza por la desmielinización perivascular del SNC, que puede ocurrir espontáneamente pero que normalmente sigue a una infección viral o vacuna viral (o, muy raramente, vacuna bacteriana), sugiriendo una causa inmunológica. Las neuropatías periféricas inflamatorias agudas que siguen a una vacunación viral o al síndrome de Guillain-Barre son trastornos desmielinizantes similares con la misma presunta inmunopatogénesis, pero afectan sólo a las estructuras periféricas.

La leucodistrofia metacromática es otra enfermedad desmielinizante. La adrenoleucodistrofia y la adrenomiелoneuropatía son raros trastornos metabólicos recesivos ligados al cromosoma X caracterizados por una disfunción de las glándulas suprarrenales y la desmielinización extendida del sistema nervioso. La adrenoleucodistrofia aparece en niños jóvenes; la adrenomiелoneuropatía, en adolescentes. Puede darse deterioro mental, espasticidad y ceguera. La adrenoleucodistrofia es invariablemente fatal. Están bajo estudio tratamientos dietarios e inmunomoduladores.

La atrofia óptica hereditaria de Leber y los trastornos mitocondriales relacionados se caracterizan principalmente por la pérdida bilateral de la visión central, afectando normalmente a hombres jóvenes en su adolescencia tardía o al principio de los veintitantos. La atrofia óptica hereditaria de Leber puede parecer una neuritis óptica en la EM. Se han identificado mutaciones en el ADN mitocondrial heredado maternalmente.

La mielopatía asociada al HTLV, una enfermedad de la médula espinal lentamente progresiva asociada a una infección por el virus linfotrófico de células T humanas, se caracteriza por una debilidad espástica de ambas piernas.

Otros trastornos neurológicos comprenden neuropatías con una mielinización anormal, una revisión de los cuales se ofrece a continuación.

Inmune: aguda, Guillain Barre, crónica, polineuropatía desmielinizante inmune crónica (PDIC), PDIC multifocal, neuropatía motora multifocal (MMN), síndrome anti-MAG, síndrome GALOP, síndrome de anticuerpos anti-sulfatida (con proteína M en suero), síndrome de anticuerpos anti-GM2, síndrome POEMS, polineuropatía organomegalia, endocrinopatía o edema, proteína M, cambios en la piel, perineuritis, síndrome de anticuerpos anti-GD1b de IgM (ocasional).

Toxinas: difteria, Buckthorn, hexaclorofeno, cianato de sodio, telurio.

Fármacos: Predominantemente desmielinizantes: cloroquina, FK506 (tacrolimus), perhexilina, procainamida, zimeldina; mezcla de desmielinizantes y axonales: amiodarona, síndrome de eosinofilia-mialgia, oro, suramina, taxol.

Hereditaria: glicoproteína deficiente de carbohidratos, dismorfismo de cataratas y facial, síndrome de Cockayne, hipomielinización congénita, distrofia muscular congénita: deficiencia de merosina, enfermedad de Farber (lipogranulomatosis), HMSN & CMT, dominante: IA, IB, III, HNPP, EGR2, termosensible, recesiva: III (Dejerine-Sottas); 4A; 4B; 4B2; 4C; 4D (LOM); 4E; 4F; HMSN-R; SNC, asociado al cromosoma X: IX, Krabbe, Marinesco-Sjogren, leucodistrofia metacromática, Niemann-Pick, Pelizaeus-Merzbacher (PLP), Refsum, proteína priónica (PrP27-30): mutación Glu200Lys, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, modelo de ratón: sobre-expresión priónica, enfermedad de Salla, SOX10, Tenascin-XA, envuelta irregular de vainas de mielina periféricas, fenotipo de Ehlers-Danlos.

Metabólico (inusual): Diabetes (debido a PDIC concurrente), hipotiroidismo, trastornos hepáticos.

Mitocondriales: síndrome de MNGIE, miopatía y oftalmoplegia externa, neuropatía, encefalopatía gastro-intestinal, síndrome NARP, neuropatía, ataxia, retinitis, pigmentosa.

5 *Infecciones*: enfermedad de Creutzfeld-Jakob, difteria, VIH: PDIC asociada, lepra: lepromatoso; mezcla de desmielinizantes y axonales; células de Schwann colonizadas, enfermedad variante de Creutzfeld-Jakob.

10 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que toma un curso recurrente-remite o progresivo. La EM no es la única enfermedad desmielinizante. Es contraparte en el sistema nervioso periférico (SNP) es una poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC). Además, hay trastornos agudos y monofásicos, tal como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria denominada síndrome de Guillain-Barre (SGB) en el SNP, y encefalomielitis diseminada aguda (ADEM) en el SNC. Tanto la EM como el SGB son síndromes heterogéneos. En la EM los diferentes ataques exógenos junto con los factores genéticos pueden conducir a un curso de enfermedad que cumpla finalmente los criterios diagnósticos. En ambas enfermedades, la lesión axonal puede añadirse a una lesión principalmente desmielinizante y causar un déficit
15 neurológico permanente.

20 La EM es la más común de las enfermedades desmielinizantes anteriores. Se caracteriza como un trastorno autoinmune, en el que los leucocitos del sistema inmune lanzan un ataque sobre la materia blanca del central sistema nervioso (SNC). La materia gris puede estar también implicada. Aunque la precisa etiología de la EM no se conoce, los factores que contribuyen pueden incluir los genéticos, y las infecciones bacterianas y virales. En su manifestación clásica (85% de todos los casos), se caracteriza por la alternancia de fases recurrentes-remitentes, que corresponden a episodios de disfunción neurológica que duran varias semanas seguido de una recuperación sustancial o completa (Nosworthy, 1999). Los periodos de remisión crecen menos en el tiempo. Muchos pacientes entran entonces en una fase final de la enfermedad caracterizada por una pérdida gradual de la función neurológica con una recuperación parcial o sin recuperación. Esto se llama EM progresiva secundaria. Una pequeña proporción (-15% de todos los pacientes
25 con EM) sufre un declive gradual e ininterrumpido de la función neurológica después del inicio de la enfermedad (EM progresiva primaria). No hay actualmente ningún tratamiento curativo claro para las formas más severas de EM, que son generalmente fatales.

30 El contraste básico de la EM es la placa desmielinizante con formación de cicatrices de neuroglía reactivas, vistas en los tractos de materia blanca del cerebro y la médula espinal. La desmielinización se relaciona con la reducción funcional o bloqueo en la conducción del impulso neuronal.

35 Los mecanismos moleculares que subyacen a la patogénesis de la EM parecen bascular entre los factores genéticos y medioambientales, incluyendo infecciones virales y bacterianas. Estos mecanismos promueven el aumento de la migración de linfocitos T y macrófagos a través de la barrera sangre-cerebro y en el tejido del SNC.

40 La desmielinización está causada por ataques sobre la mielina por macrófagos activados y microglia, así como por el daño a células mielinizantes que se desvenan a partir de la señalización del ligando Fas (u otros miembros de la superfamilia TNF-R) y por citotoxicidad mediada por complementos o anticuerpos. Por lo tanto, la desmielinización aparece a través de o bien un ataque directo sobre las vainas de mielina o por la eliminación de las células que producen y mantienen la mielina.

45 Los elementos genéticos y medioambientales conducen a un mayor influjo de células inflamatorias a través de la barrera sangre-cerebro. Esto causa un aumento de la migración de linfocitos T autoreactivos y macrófagos en el tejido del SNC. La secreción de citoquinas por las células T activa a las células que presentan antígenos (CPA). Cuando las células T autoreactivas en el contexto de moléculas de clase II MHC en CPA encuentra "antígenos de EM" putativos, a menudo constituyentes proteicos de la vaina de mielina, pueden volverse activos. Varios mecanismos posteriores pueden actuar entonces frente al daño de los oligodendrocitos y de la mielina. La citotoxicidad mediada por complemento y anticuerpos puede causar la mayor parte del daño en algunos pacientes, mientras que la señalización del ligando Fas, y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α por células CD4+ T puede atacar a la materia blanca en otros. Los macrófagos activados también pueden jugar un papel a través de una fagocitosis potenciada y la secreción de factores. Esto causa una desmielinización extendida y una consecuente pérdida de la eficacia de la conducción entre los axones del SNC. Los mecanismos de reparación posteriores pueden, sin embargo, dar lugar a la remielinización
50 una vez se resuelve el proceso inflamatorio. Los axones remielinizados de pacientes con EM se reconocen patológicamente por una apariencia delgada de las cubiertas a lo largo de los axones remielinizados. A menudo se encuentran insertados en la membrana axonal desmielinizada más canales de sodio y un anormal repertorio de canales iónicos, tratando de compensar la pérdida de la eficacia de la conducción. Estos modelos de expresión aberrantes sugieren que la EM puede incluir también na canelopatía. Los precursores oligodendrogiales pueden potenciar la remielinización
60 en las lesiones de la EM.

65 Los oligodendrocitos realizan una multitud de funciones relacionadas con su producción y el mantenimiento de la vaina de mielina. Esto proporciona un aislamiento, soporte y potenciación de la conductancia para los axones de las múltiples neuronas. Un simple oligodendrocito puede mielinizar hasta 50 axones diferentes. La mielinización se restringe sólo a ciertos axones de gran diámetro; dendritas y otros procesos celulares, tales como los de los astrocitos, quedan sin mielinizar. Los axones parecen ejercer un control sobre el número de oligodendrocitos mielinizantes, ya que la transección axonal en el modelo del nervio óptico de rata inhibe la renovación de mielina y la producción precursora de oligodendrocitos (revisión en Barres y Raff (Barres y Raff, 1999)). La proliferación y migración de los

oligodendrocitos puede ser estimulada por factores liberados de los axones durante el desarrollo. De esta manera, el número de oligodendrocitos y axones se acoplan cuidadosamente dentro del SNC.

Los oligodendrocitos, las células del soporte perineuronal del SNC, mielinizan los tractos axonales y sirven para potenciar la transducción del impulso. Desempeñan funciones de supervivencia y función axonal. Obsérvese que un oligodendrocito extiende sólo un proceso a cada axón que mieliniza.

La vaina de mielina multilaminar es un dominio especializado de la membrana plasmática del oligodendrocito, rica en lípidos y baja en proteínas. Sirve para sustentar a los axones y mejorar la eficacia de la conducción de la señal eléctrica en el SNC previniendo que la carga se desparrame en el tejido circundante. Los nodos de Ranvier son los sitios en la cubierta a lo largo del axón donde aparece la conductancia saltatoria.

En el cerebro de adultos, los oligodendrocitos se desarrollan a partir de células precursoras todavía pobremente definidas en la zona subventricular del cerebro y de la médula espinal (Nait-Oumesmar *et al.*, 1999). Estos precursores son proliferativos y expresan transcritos de mielina y proteínas, emergiendo primero en la región ventral de la médula espinal embrionaria varias semanas antes de la mielinización (Hajihosseini *et al.*, 1996). El proceso de mielinización aparece en el cerebro post-natal. Durante el desarrollo post-natal, estos precursores migran a los tractos neuronales que tienen que ser mielinizados.

Los oligodendrocitos son distintos a las células, mitóticamente activas, precursoras migratorias. Una vez que estas células se han vuelto post-mitóticas, transcriben y traducen genes que codifican las proteínas específicas de la mielina. La elaboración de la vaina de mielina que envuelve el axón es consecuencia del contacto directo entre los procesos del oligodendrocito maduro y el propio axón. El envainado de los axones del SNC se completa mediante la compactación de la vaina de mielina, que en su forma final imita a un cristal líquido que contiene macromoléculas en la formación de un complejo (Scherer, 1997). La promoción de la mielinización requiere una consideración de la precisa relación estequiométrica entre las proteínas estructurales individuales de la vaina de mielina, ya que si se aumenta o disminuye la cantidad de un componente podría originarse una perturbación de la estructura de la vaina completa.

La incapacidad de los oligodendrocitos de mantener la reparación de los axones desmielinizados contribuye a la disfunción neurológica acumulativa que caracteriza a la EM. La promoción de la remielinización en pacientes con EM podría proteger la pérdida axonal y así limitar la progresión de la invalidez asociada con la muerte de los axones en el SNC.

El fenotipo desmielinizante de la EM conduce a amplios estudios sobre la naturaleza de la lesión activa de la EM. Los axones desnudos y la ausencia de oligodendrocitos mielinizantes indicaron la alteración de la mielina normal y aberraciones en el proceso remielinizante asociado a la EM. Aproximadamente el 40% de las lesiones por EM se mostraron que exhibían pruebas de una remielinización abortiva, especialmente en las fases iniciales de la enfermedad (Prineas *et al.*, 1993). Esto presenta el prospecto realista de que el desarrollo de estrategias para promocionar la reparación de mielina podría prevenir el daño permanente al sistema nervioso. La probabilidad de éxito es particularmente alta en lesiones del SNC más jóvenes, en las que ha sido mostrado que ya ha tenido lugar una remielinización inicial. Sin embargo, un oligodendrocito mielinizante o remielinizante es una célula bajo un extremo estrés metabólico, que bajo la presión de cualquier otro mínimo ataque puede ser dañado irreversiblemente (Scolding y Lassmann, 1996). Esto disminuye la probabilidad de una reparación espontánea en una lesión activa de la EM, donde la inflamación y otros detrimentos introducen obstáculos a la remielinización. Las estrategias que promueven la reparación de mielina pueden así contribuir así a otras posibilidades en favor de la remielinización y la protección axonal en las lesiones activas de la EM.

Se ha demostrado que el SNC del humano adulto contiene células precursoras de oligodendrocitos que son capaces de proliferar, y que podrían madurar como oligodendrocitos mielinizantes. Además, parece que las poblaciones de precursores de oligodendrocitos endógenas adyacentes a las lesiones de la EM se agotan durante las fases crónicas de la enfermedad, debido a la inhibición de esta capacidad de los precursores de proliferar y diferenciarse (Wolswijk, 1998). Tales células precursoras son generalmente quiescentes en el ambiente de una lesión crónica de la EM, previniéndolas de contribuir activamente a la remielinización. La situación en las lesiones crónicas de EM podría implicar por lo tanto a factores que obstaculizarían la regeneración oligodendroglial o que carecerían de los factores necesarios para la estimulación de la población de células precursoras de oligodendrocitos (Wolswijk, 1998).

Las pruebas de los efectos beneficiosos de la remielinización en trastornos desmielinizantes tales como la EM se proporcionan mediante los estudios realizados con factores de crecimiento glial como tratamientos en modelos con animales de la enfermedad. El factor de crecimiento glial 2 (neuregulina/GGF-2), un factor de crecimiento del SNC conocido por promover la proliferación y supervivencia de oligodendrocitos, fue mostrado que retrasaba el inicio de la enfermedad, reducía la severidad clínica y disminuía la frecuencia de recaídas en el modelo murino EAE de EM (Marchionni *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la neuregulina tiene un efecto beneficioso en la supervivencia de oligodendrocitos maduros y es producida por los axones (Fernandez *et al.*, 2000).

Otros factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y IGF-1, se ha demostrado que promueven la remielinización y tienen efectos terapéuticos en modelos de EAE (revisado en Dubois-Dalq y Murray, 2000). El éxito logrado con la estimulación de la remielinización, a través de la inducción de células del linaje de oligodendrocitos para proliferar y/o diferenciarse, indica que las posibilidades de remielinización como

estrategia terapéutica para la EM son favorables. También sería importante identificar moléculas que inhibieran la síntesis de mielina, ya que éstas podrían reducir la eficacia de las estrategias de reparación tal como el trasplante de células oligodendrogliales en la EM.

- 5 El proceso de remielinización podría funcionar en combinación con rutas anti-inflamatorias para reparar el daño y proteger a los axones de la transección y la muerte.

Se puede inducir a los oligodendrocitos a remielinizar a los tractos axonales en el SNC, contribuyendo así a la mejora de la condición de la enfermedad. El potenciamiento de la remielinización contrarrestaría la destrucción previa causada por la invasión de células del sistema inmune en el tejido del SNC y su ataque sobre las vainas de mielina.

Las células de Schwann son células de la glia periféricas que proporcionan una función de apoyo en el sistema nervioso periférico y que pertenecen a las células satélites. Las células de Schwann envuelven individualmente el eje de los axones periféricos, formando una capa o vaina de mielina a lo largo de los segmentos del axón. Las células de Schwann están compuestas principalmente de lípidos o grasas; la grasa sirve como aislante acelerando así la velocidad de transmisión de los potenciales de acción a lo largo del axón. Aunque las células de Schwann son distintas de sus contrapartidas del SNC, tienen muchas semejanzas en términos de estructura y biología.

Las células de Schwann también participan en el proceso de la regeneración neuronal en el sistema nervioso periférico. Cuando un axón se está muriendo, las células de Schwann circundantes le ayudan en su digestión. Esto deja un canal vacío formado por sucesivas células de Schwann, a través del cual puede crecer un nuevo axón a partir de un extremo seccionado a una velocidad de 3-4 milímetros por día.

Las neuropatías son normalmente selectivas según el tipo de neurona del SNP afectado (por ejemplo, sensorial frente a autonómico) y de hecho también según el subtipo de neuronas (pequeñas frente a grandes). La axotomía de los nervios periféricos es el modelo animal usado más normalmente para la evaluación de los efectos neuroprotectores de factores neurotróficos. La lesión nerviosa traumática, lesiones del plexo y lesiones de raíz son serias complicaciones de los accidentes. Además, la presión sobre los nervios periféricos que puede causar daños en la mielina frecuentemente vista en trastornos tales como el síndrome del túnel carpal o está asociada a complicaciones ortopédicas de la columna espinal. La axotomía produce fenómenos, como la muerte de la células, una reducida velocidad de conducción axonal y niveles alterados de los neurotransmisores en las neuronas dañadas. Las lesiones por compresión permiten la regeneración, otro proceso de interés en relación con los estados neuropáticos (McMahon y Priestley, 1995).

La neuro-inflamación es una característica común de la mayor parte de las enfermedades neurológicas. Muchos estímulos son desencadenantes de la neuro-inflamación, que puede ser inducida tanto por sufrimiento neuronal como oligodendroglial, o ser una consecuencia de un traumatismo, de una lesión nerviosa central o periférica o de una infección viral o bacteriana. Las principales consecuencias de la neuro-inflamación son (i) secreción de varias quimioquinas inflamatorias por los astrocitos; y (ii) reclutamiento de otros leucocitos, que después estimularán los astrocitos. En enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como la esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer (EA) o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se piensa que la presencia de la neuro-inflamación persistente participa en la progresión de la enfermedad. Las enfermedades neurológicas asociadas a la neuro-inflamación también pueden llamarse enfermedades inflamatorias neurológicas.

IL-17F es un miembro de la familia IL-17 de citoquinas. Fue descubierto independientemente como una nueva citoquina ML-1 (Kawaguchi *et al.*, 2001) o IL-17F (Hymowitz *et al.*, 2001; Starnes *et al.*, 2001).

La familia IL-17 se ha revisado en Moseley *et al.* (Moseley *et al.*, 2003) y Aggarwal y Gurney (Aggarwal y Gurney, 2002).

Starnes *et al.* (2001) ha aislado un cADN de IL-17F que codifica una proteína de 153 aminoácidos que comparte un 40% de homología con IL-17. Además de los 2 enlaces disulfuro invariantes encontrados en otros miembros de la familia IL-17, IL-17F contiene un péptido señal con un par extra cys-cys que podría funcionar como un enlace disulfuro extra. IL-17F se dimeriza en un modo en paralelo como las neurotrofinas, y presenta una cavidad anormalmente grande en su superficie y se ha demostrado que pertenece a la familia del factor de crecimiento cisteína-nudo (Hymowitz *et al.*, 2001). IL-17F se produce mediante células T activadas (Kawaguchi *et al.*, 2001; Starnes *et al.*, 2001) y también se ha demostrado en monocitos activados (Starnes *et al.*, 2001). Puede inducirse por IL-23 (Aggarwal *et al.*, 2003).

ML-1 fue capaz de inducir la expresión de IL-6, IL-8 y MAIC-1 (molécula de adhesión intracelular-1) en células epiteliales bronquiales primarias (PBEC) (Kawaguchi *et al.*, 2001) vía la activación de ERK1/2 (Kawaguchi *et al.*, 2002). Se mostró que ML-1 inducía las quimioquinas C-X-C GRO α y ENA-78 vía la activación de la ruta Raf 1-MEK-ERK1/2 sugiriendo su papel potencial en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (Kawaguchi *et al.*, 2003).

El análisis funcional de Starnes *et al.* (Starnes *et al.*, 2001) indicó que IL-17F induce la expresión de TGF β e inhibe la angiogenesis de células endoteliales pero no tiene ningún efecto sobre la hematopoyesis o migración linfocítica. Propusieron que IL-17F puede proporcionar una regulación general de la respuesta inmune gobernando la expresión de citoquinas críticas que tienen muchos más efectos estimuladores activos.

Hurst *et al.* (Hurst *et al.*, 2002) sugirieron un papel *in vivo* de IL-17F humano en el reclutamiento de neutrófilos en la mucosa pulmonar en ratones después de la transferencia adenoviral sugiriendo además el papel potencial de ML-1 en la patogénesis de la inflamación neutrofílica.

5 En la actualidad, el(los) receptor(es) para IL-17F no está/están estrictamente identificado(s). IL-17F no se une con alta afinidad al dominio extracelular purificado de tanto IL-17R como IL-17Rh1 (Hymowitz *et al.*, 2001).

10 Las secuencias de nucleótidos y proteínas de IL-17F fueron descritas en la solicitud de patente internacional del instituto Genetics WO97/04097. En el documento WO0146420, el uso de homólogos de IL-17, sus agonistas, antagonistas y anticuerpos se describen para el tratamiento de trastornos inmunes.

15 Los interferones son una subclase de citoquinas que exhiben actividad anti-inflamatoria, antiviral y antiproliferativa. En base a las propiedades bioquímicas e inmunológicas, los interferones humanos naturales se agrupan en tres clases: el interferón alfa (leucocito), interferón beta (fibroblasto) e interferón gamma (inmune). El interferón alfa está aprobado actualmente en los Estados Unidos y otros países para el tratamiento de leucemia de células pilosas, verrugas venéreas, Sarcoma de Kaposi (un cáncer que afecta normalmente a pacientes que sufren del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA)), y hepatitis crónica no A, no B.

20 Además, los interferones (IFN) son glucoproteínas producidas por el cuerpo en respuesta a una infección viral. Inhiben la multiplicación de virus en células protegidas. Los IFN, que consisten en una proteína de bajo peso molecular, son remarcadamente no específicos en su acción, es decir el IFN inducido en respuesta a un virus es eficaz contra un amplio rango de otros virus. Son, sin embargo, específicos de especies, es decir, el IFN producido por una especie solo estimulará la actividad antiviral en células de la misma o una especie cercanamente relacionada. Los IFN fueron el primer grupo de citoquinas que se explotaron por sus potenciales actividades antitumorales y antivirales.

25 Los tres IFN principales se denominan IFN- α , IFN- β e IFN- γ . Tales tipos principales de IFN se clasificaron inicialmente de acuerdo con sus células de origen (leucocito, fibroblasto o célula T). Sin embargo, está claro que varios tipos pueden ser producidos por una célula. De ahí que el IFN de leucocito se llame ahora IFN- α , IFN de fibroblasto es IFN- β e IFN de célula T es IFN- γ . Hay también un cuarto tipo de IFN, el IFN de linfoblastoide, producido en la línea celular "Namalwa" (derivado del linfoma de Burkitt), que parece que produce una mezcla de ambos IFN de leucocito y fibroblasto.

30 Se ha descrito la unidad del interferón como una medida de la actividad de IFN definida (de alguna forma arbitrariamente) como la cantidad necesaria para proteger el 50% de las células frente a un daño viral.

35 Cada clase de IFN contiene varios tipos distintos. IFN- β e IFN- γ son cada uno el producto de un sólo gen. Las diferencias entre los tipos individuales parece ser debida principalmente a variaciones en la glicosilación.

40 Los IFN- α son el grupo más diverso, conteniendo aproximadamente 15 tipos. Hay un grupo de genes de IFN- α en el cromosoma 9, que contiene al menos 23 miembros, de los cuales 15 son activos y transcritos. Los IFN- α maduros no están glicosilados.

45 Los IFN- α e IFN- β tienen todos la misma longitud (165 ó 166 aminoácidos) con similares actividades biológicas. Los IFN- γ tienen 146 aminoácidos de longitud, y se parecen menos a las clases α y β . Sólo los IFN- γ pueden activar a los macrófagos o inducir la maduración de linfocitos T citotóxicos. De hecho, estos nuevos tipos de agentes terapéuticos pueden llamarse modificadores de la respuesta biológica (MRB), porque tienen un efecto en la respuesta del organismo frente al tumor, que afecta a la inmunomodulación vía el reconocimiento.

50 En particular, el interferón de fibroblasto humano (IFN- β) tiene actividad antiviral y puede estimular también a los linfocitos citotóxicos naturales contra las células neoplásicas. Es un polipéptido de aproximadamente 20.000 Da inducido por virus y ARN bicatenarios. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen para el interferón de fibroblasto, clonado por la tecnología del ADN recombinante, Derynk *et al.* (Derynck *et al.*, 1980) dedujeron la secuencia de aminoácidos completa de la proteína. Tiene 166 aminoácidos.

55 Shepard *et al.* (Shepard *et al.*, 1981) describieron una mutación en la base 842 (Cys $\rightarrow$ Tyr en la posición 141) que abolía su actividad anti-viral, y una variante del clon con una delección de los nucleótidos 1119-1121.

60 Mark *et al.* (Mark *et al.*, 1984) insertaron una mutación artificial sustituyendo la base 469 (T) con (A) causando un desplazamiento de aminoácidos de Cys $\rightarrow$ Ser en la posición 17. Se ha publicado que el IFN- β resultante era activo como el IFN- β "natural" y estable durante el almacenamiento a largo plazo (-70°C).

65 Rebif® (Interferón- β humano recombinante) es un desarrollo reciente en la terapia con interferón para la esclerosis múltiple (EM), y representa un avance significativo en el tratamiento. Rebif® es interferón(IFN)-beta 1a, producido a partir de líneas celulares de mamíferos y virtualmente idéntico a la molécula humana natural.

Los mecanismos por los cuales los IFN ejercen sus efectos no se comprenden completamente. Sin embargo, en la mayor parte de los casos actúan afectando a la inducción o transcripción de ciertos genes, afectando así al sistema

inmunológico. Se ha demostrado con estudios *in vitro* que los IFN son capaces de inducir o suprimir aproximadamente 20 productos génicos.

El estudio PRISMS ha establecido la eficacia del interferón beta-1a dado sub-cutáneamente tres veces a la semana en el tratamiento de la esclerosis múltiple recurrente-remite (EM-RR). Este estudio mostró que el interferón beta-1a puede tener un efecto positivo sobre el curso a largo plazo de la EM reduciendo el número y la gravedad de las recaídas, y reduciendo la carga de la enfermedad y la actividad de la enfermedad medidas mediante IRM (Anonymous, 1998).

La osteopontina (OPN) es una sialoproteína altamente fosforilada que es un componente prominente de las matrices extracelulares mineralizadas de huesos y dientes. La OPN se caracteriza por la presencia de una secuencia de ácido poliaspártico y sitios de fosforilación de Ser/Thr que median la unión de hidroxiapatito, y un motivo RGD altamente conservado que media la unión/señalización celular. Se ha dicho que los inhibidores de osteopontina son útiles para el tratamiento de infecciones, trastornos inmunes y enfermedades, trastornos autoinmunes, incluyendo la EM, varias inmunodeficiencias y cáncer, documento WO00/63241. El uso de osteopontina o de un agonista de la actividad de osteopontina, se reivindica en el documento WO02/92122 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica.

La clusterina es una proteína extracelular que también se conoce como Apolipoproteína J, SGP-2, TRPM-2 y SP-40,40. Tiene una distribución en tejido casi ubicua y se le han dado muchos nombres de acuerdo con la fuente de la que se purificó (revisado en Trougakos y Gonos (Trougakos y Gonos, 2002), Jones y Jomary (Jones y Jomary, 2002)). Giannakopoulos *et al.* han sugerido que la clusterina tienen un papel neuroprotector en la enfermedad de Alzheimer (Giannakopoulos *et al.*, 1998).

El tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica con IL-17F todavía no ha sido considerado en la técnica.

No se pretende que la cita de cualquier documento en esta memoria comporte una admisión de que tal documento es pertinente de la técnica anterior, o es considerado material para la patentabilidad de cualquier reivindicación de la presente aplicación. Cualquier informe de contenido o fecha de cualquier documento está basado en la información disponible para los solicitantes en el momento de rellenar la solicitud y no constituye ninguna admisión como corrección de tal informe.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos medios para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica.

La invención se basa en el hallazgo de que la proteína IL-17F promueve la proliferación y diferenciación de células de la glia, promoviendo así la mielinización y regeneración de los nervios. IL-17F también puede promover la supervivencia y/o diferenciación neuronal. De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado además que IL-17F tiene efectos beneficiosos en modelos con animales de neuropatía periférica, esclerosis múltiple así como inflamación y neuro-inflamación.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de IL-17F, en una enfermedad neurológica, tal como lesión nerviosa traumática, accidente cerebrovascular, enfermedades desmielinizantes del SNC o SNP, neuropatías y enfermedades neurodegenerativas.

De acuerdo con la presente invención, IL-17F también puede ser usado en combinación con un interferón o una osteopontina o clusterina para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas. También se describe el uso de moléculas de ácidos nucleicos, vectores de expresión que comprenden IL-17F, y de células que expresan IL-17F, para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica.

La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden IL-17F y un interferón u osteopontina o clusterina opcionalmente junto con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 A. muestra los resultados de un bioensayo usado para comparar la bioactividad de diferentes lotes de IL-17F en ausencia (Lote 1, 2, 3) o presencia de rhIFNgamma (Lote 1 + IFN, Lote 2 + IFN, Lote 3 + IFN). La liberación de hIL-6 por células U373 (5000 células/pocillo) puestas en placa con diluciones en serie de IL-17F (log ng/ml), con o sin una concentración constante de rhIFNgamma (1000 U/ml), durante 24h se muestra en pg/ml. B. Se muestran los valores de EC50 (ng/ml) para los tres lotes en presencia o ausencia de rhIFNgamma.

Fig. 2 muestra los registros electrofisiológicos en ratón, después de una compresión del nervio ciático, tratado con vehículo (PBS/glicerol al 20%/BSA al 0,02%), 0,001 mg/kg o 0,03 mg/kg o 0,1 mg/kg subcutáneo de IL-17F, 0,1 mg/kg de un compuesto control de referencia (positivo) (Osteopontina; OPN). Los valores "sin compresión" se registran en el lado contra lateral de los animales. Los registros se realizaron los días 7, 15 y 22 después de la lesión (dpl).

2.A representa la amplitud en milivoltios (mV) del potencial de acción en el músculo del compuesto.

2.B muestra la latencia en milisegundos (ms) del potencial de acción en el músculo del compuesto.

5 2.C muestra la duración en milisegundos (ms) del potencial de acción en el músculo del compuesto.

Se realizaron los análisis estadístico (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al grupo del vehículo. El nivel de significancia fue puesto a: p < 0,001; b: p < 0,01; c: p < 0,05; d: p < 0,1. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

10 Fig. 3 muestra la infiltración de leucocitos en porcentaje de células CD45 positivas (%CD45+), como se evalúa por citometría de flujo, en la parte distal del nervio ciático comprimido y en el lado contralateral (sin compresión) del ratón tratado con vehículo (PBS/glicerol al 20%/BSA al 0,02%), 0,001 mg/kg o 0,03 mg/kg o 0,1 mg/kg de IL-17F y 0,1 mg/kg de osteopontina (OPN). Los animales se sacrificaron el día 22 después de la lesión. Se realizaron los análisis estadísticos (ANOVA seguido de un post-ensayo de Bonferroni) frente al grupo del vehículo, para los nervios “distales”. El nivel de significancia fue puesto a *: p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

20 Fig. 4 Contenido de MBP en picogramos por microgramo de proteína (pg MBP/μg prot tot) de cultivos mezclados de médula espinal tratados con vehículo, 0,1, 1, 10 y 100 ng/ml de IL-17F, IL-17F(L) (de Leinco) y IL-17F(P) (de Peprotech) y cultivados en “suero del 1%” (4.A) o medio “RPMI-B27” (4.B). Las medidas se tomaron el día 11 *in vitro* (11DIV). Se realizaron los análisis estadísticos (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al grupo control (vehículo). El nivel de significancia fue puesto a *: p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

25 Fig. 5 La actividad de colin acetil transferasa (ChAT) en cuentas por minuto (cpm) por miligramo de proteína (cpm/mg de prot) de cultivos mezclados de médula espinal tratados con vehículo, 0,1, 1, 10 y 100 ng/ml de IL-17F, IL-17(L) y IL-17F(P) y cultivados en medio de “suero al 1%” (5.A), medio “RPMI-B27” (5.B) o medio “RPMI-B27” con la adición de la arabinosida C antimetabólica (AraC, 500 nM) a los cultivos desde el día 3 en adelante (5.C). Las medidas se tomaron el día 11 *in vitro* (11DIV). Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al grupo control (CTRL, no tratado). El nivel de significancia fue puesto a *: p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

35 Fig. 6 muestra la incorporación de BrdU (Bromodesoxiuridina) (unidades relativas, OD a 492 nm) en cultivos de médula espinal mezclados tratado con vehículo, 0,1, 1, 10 y 100 ng/ml de IL-17F. BrdU se administró a los cultivos durante 18 horas desde el día 10 a 11 *in vitro* (DIV). Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al grupo control (CTRL, no tratado). El nivel de significancia fue puesto a *p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

40 Fig. 7 muestra el contenido de MBP en picogramo por microgramo de proteína (pg MBP/μg prot tot) de láminas hipocampales organotípicas, tratadas con 1, 10 y 100 ng/ml de IL-17F después de la desmielinización inducida por anticuerpos anti-mielina de glicoproteína de oligodendrocitos (anti-MOG) y complementos de conejos bebés (cpl). Los cultivos se trataron durante 2 días con la combinación de anticuerpos anti-MOG y proteínas de complemento de conejo bebé (cpl), IL-17F se administró entonces en días alternos durante 8 días. Como controles positivos, los cultivos se trataron con inmunoglobulina correspondiente de isotipo no relevante IgG1 y complemento (IgG1 + cpl). Se realizaron los análisis estadísticos (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al tratamiento con anti-MOG + cpl. El nivel de significancia fue puesto a *: p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

50 Fig. 8 muestra liberación de IL-6 en pg/ml en DRG de ratón tratado con IL-17A o IL-17F a 0,1, 1, 10 ó 100 ng/ml, IL-17E a 1, 10 ó 100 ng/ml, 100 ng/ml de NGF como control positivo o con vehículo. El control negativo consistió en explantes no tratados (RPMI medio solo). Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA seguido del post-ensayo de Dunnett) frente al grupo control (CTRL, no tratado). El nivel de significancia fue puesto a *: p < 0,05; **: p < 0,01. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

55 Fig. 9 efecto de la administración de hIL-17 a la dosis de 2,5 μg/kg subcutáneo y mIFNβ a la dosis de 20.000 U/ratón subcutáneo en los resultados clínicos de EAE inducido por MOG en ratón expresado como el resultado promedio (± s.e.m) dentro de cada grupo. El nivel de significancia fue puesto a *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001 vs. vehículo (ANOVA unimodal seguido del ensayo de Fisher).

60 Fig. 10 muestra la infiltración de leucocitos en porcentaje de células CD45/CD11 positivas (CD45/CD11+) como se evalúa por citometría de flujo, en las partes anterior (no inflamada) y posterior (inflamada) de médulas espinales a partir de ratas operadas con corte en el nervio tratadas con: vehículo, dexametasona (0,5 mg/kg), IL-17F a 0,1 y 0,01 mg/kg. Los animales se sacrificaron el día 3 después de la lesión. Los análisis estadísticos se realizaron frente a los grupos control (***: anterior vs posterior y ⁰⁰⁰ vehículo vs tratado). El nivel de significancia fue puesto a *:p<0,05, **: p<0,01 ⁰⁰⁰ o ***p<0,001.

Fig. 11 efecto de la administración de IL-17F en la liberación de TNF- α en pg/ml en un modelo animal para la liberación de TNF- α inducida por LPS:

11.A. Los ratones se trataron con vehículo (NaCl), IL-17F a 1 mg/kg, 500 y 100 μ g/kg administrado por ruta i.v., o dexametasona a 0,1 mg/kg administrada por ruta subcutánea.

11.B Los animales se trataron con vehículo (NaCl) subcutáneo y i.v., IL-17F a 500 μ g/kg administrado vía rutas subcutánea o i.v.s.

Fig. 12 muestra el efecto de IL-17F en un modelo de neuropatía diabética inducida por la administración de estreptozotocina (STZ). Las ratas se trataron con vehículo, IL-17F a 0,03, 0,1 ó 0,3 mg/kg. IL-6 a 30 μ g/kg se usó como referencia. Las siguientes medidas se tomaron tanto 7 días antes de la administración de STZ (D-7) como a D40, o a D25 y D40:

12.A muestra la latencia de la pata posterior en milisegundos después del ensayo de filamento de Von Frey.

12.B muestra el registro electrofisiológico de CMAP (potencial de acción en el músculo del compuesto) en milisegundos (ms).

12.C muestra el registro electrofisiológico de la SNCV (velocidad de conducción del nervio sensitivo) en milisegundos (ms).

Descripción detallada de la invención

En el ámbito de la presente invención, se ha encontrado que la administración de IL-17F tiene un efecto beneficioso en un modelo de animal *in vivo* de enfermedades neurológicas periféricas. En un modelo murino de una neuropatía inducida por compresión del nervio ciático, todos los parámetros fisiológicos relacionados con la regeneración del nervio, integridad y vitalidad fueron positivamente influidos por la administración de IL-17F.

Además de esto, se ha mostrado en un modelo de desmielinización mediada autoinmune que IL-17F promueve la remielinización después de un episodio de desmielinización inducida.

La invención se basa también en el hallazgo de que la proteína IL-17F promueve la proliferación y diferenciación de células de la glia, promoviendo así la mielinización y regeneración de los nervios. IL-17F también promueve la supervivencia y/o diferenciación neuronal.

En un modelo murino de esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por MOG (EAE), se mostró que IL-17F dado a dosis relativamente bajas mejoraba los resultados clínicos de la enfermedad.

IL-17F también reveló un efecto beneficioso en un modelo de neuropatía periférica diabética.

Se encontró un efecto anti-inflamatorio de IL-17F en un modelo de inflamación de médula espinal retrógrado inducido por un corte del nervio ciático. Finalmente, se encontró que IL-17F inhibía TNF- α en el modelo animal de liberación de TNF- α inducido por LPS, que es un modelo genérico de inflamación.

Las pruebas experimentales presentadas en este documento proporcionan por lo tanto una nueva posibilidad de tratar enfermedades neurológicas, en particular las relacionadas con las neuronas, función de las células de la glia e inflamación.

La invención se refiere, por tanto, al uso de IL-17F, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas, como se define en las reivindicaciones.

El término "IL-17F", como se usa en este documento, se refiere a IL-17F humano maduro de cadena completa o su fragmento. La secuencia de IL-17F humana se describe en este documento como SEQ ID NO: 1 del listado de secuencia adjunto. El término "IL-17F", como se usa en este documento, se refiere además a cualquier IL-17F derivado de animales, tal como IL-17F murino, bovino o de rata, siempre que haya suficiente identidad para mantener la actividad de IL-17F.

También se describen muteínas y fragmentos biológicamente activos, tal como las isoformas naturales de IL-17F. Se han descrito en su medida dos variantes de transcrito empalmadas alternativamente del gen que codifica las distintas isoformas de IL-17F (Variantes 1 y 2). La variante 2 se diferencia de la región del extremo 5' y usa un codon de inicio en marco corriente abajo, comparado con la variante 1. La isoforma resultante 2 (aminoácidos de 55 a 163 de SEQ ID NO: 1) tiene un extremo N-terminal más corto, según se compara con la isoforma 1 (SEQ ID NO: 1). IL-17F se dimeriza de una manera paralela como la neurotrofinas, y presenta una cavidad anormalmente grande en su superficie. Se demostró que pertenece a la familia del factor de crecimiento cisteína-nudo (Hymowitz *et al.*, 2001).

También se describen isoformas, muteínas, proteínas condensadas, derivados funcionales, fracciones activas o fragmentos o derivados permutados circularmente o sus sales. Estas isoformas, muteínas, proteínas condensadas o derivados funcionales, fracciones activas o fragmentos, o derivados permutados circularmente retienen la actividad biológica de IL-17F. Preferiblemente, tienen actividad biológica, que se mejora según se compara con IL-17F silvestre.

La expresión “agonista de la actividad de IL-17F”, como se usa en este documento, se refiere a una molécula que estimula o imita la actividad de IL-17F, tal como anticuerpos agonísticos del receptor de IL-17F, o agonistas de bajo peso molecular que activan la señalización a través de un receptor de IL-17F.

La expresión “agonista de la actividad de IL-17F”, como se usa en este documento, también se refiere a agentes que potencian las actividades mediadas por IL-17F, tal como la promoción de la unión celular a los componentes de la matriz extracelular, morfogénesis de células del linaje de oligodendrocitos en células productoras de mielina, la promoción del reclutamiento, proliferación, diferenciación o maduración de células del linaje de oligodendrocitos (tal como progenitores o células precursoras), o la promoción de la protección de células del linaje de oligodendrocitos a partir de la apoptosis y el daño celular. Actividades similares de IL-17F también se aplican a las células de Schwann.

Las expresiones “tratar” y “prevenir”, como se usan en este documento, deben entenderse como prevenir, inhibir, atenuar, mejorar o revertir uno o más síntomas o causa(s) de la enfermedad neurológica, así como síntomas, enfermedades o complicaciones que acompañen a la enfermedad neurológica. Cuando se “trata” una enfermedad neurológica, las sustancias de acuerdo con la invención se administran después del inicio de la enfermedad, “prevención” se refiere a la administración de las sustancias antes de que el paciente pueda sentir los síntomas de la enfermedad.

La expresión “enfermedades neurológicas”, como se usa en este documento abarca a todas las enfermedades neurológicas o trastornos conocidos, o lesiones del SNC o SNP, incluyendo las descritas con detalle en los “Antecedentes de la invención”.

Las enfermedades neurológicas comprenden los trastornos relacionados con la disfunción del SNC o SNP, tales como enfermedades relacionadas con la neurotransmisión, dolor de cabeza, traumatismo craneal, infecciones del SNC, trastornos neuro-oftalmológicos y nerviosos craneales, función y disfunción de los trastornos de movimiento de los lóbulos cerebrales, estupor y coma, enfermedades desmielinizantes, delirio y demencia, anormalidades de la unión cráneo-cervical, trastornos epilépticos, trastornos de la médula espinal, trastornos del sueño, trastornos del sistema nervioso periférico, enfermedad cerebrovascular o trastornos musculares. Para la definiciones de estos trastornos, véase, por ejemplo, The Merck Manual for Diagnosis and Therapy, Edición 17, publicado por los Laboratorios de Investigación Merck, 1999.

En una realización preferida de la invención, la enfermedad neurológica está asociada a la inflamación, en particular, la neuro-inflamación.

Preferiblemente, las enfermedades neurológicas de la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en lesión nerviosa traumática, accidente cerebrovascular, enfermedades desmielinizantes del SNC o SNP, neuropatías y enfermedades neurodegenerativas.

La lesión nerviosa traumática puede afectar al SNP o al SNC, puede ser un traumatismo cerebral o de la médula espinal, incluyendo paraplejia, según se describe en los “Antecedentes de la invención” anteriores.

El accidente cerebrovascular puede estar causado por hipoxia o por isquemia del cerebro. También se llama enfermedad cerebrovascular o accidente. El accidente cerebrovascular puede implicar la pérdida de funciones cerebrales (déficit neurológico) causadas por una pérdida de la circulación de la sangre en áreas del cerebro. La pérdida de circulación de sangre puede ser debida a coágulos de sangre que se forman en el cerebro (trombos), o trozos de placas ateroscleróticas u otros materiales que viajan al cerebro desde otra localización (embolias). El derrama (hemorragias) dentro del cerebro puede causar síntomas que se parecen al accidente cerebrovascular. La causa más común de un accidente cerebrovascular es el accidente cerebrovascular secundario a la aterosclerosis (trombosis cerebral), y por lo tanto la invención también se refiere al tratamiento de la aterosclerosis.

La neuropatía periférica puede estar relacionada con un síndrome de pérdida sensorial, debilidad muscular y atrofia, disminución de los reflejos de tendón profundo y síntomas vasomotores, solo o en cualquier combinación. La neuropatía puede afectar a un sólo nervio (mononeuropatía), dos o más nervios en áreas separadas (mononeuropatía múltiple), o muchos nervios simultáneamente (polineuropatía). El axón puede estar en primer lugar afectado (por ejemplo en la diabetes mellitus, enfermedad de Lyme o uremia o con agentes tóxicos) o la vaina de mielina o células de Schwann (por ejemplo en polineuropatía inflamatoria aguda o crónica, leucodistrofias o síndrome de Guillain-Barre). Otras neuropatías, que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención, pueden ser debidas, por ejemplo, a toxicidad por plomo, uso de dapsona, picadura de garrapata, porfiria o síndrome de Guillain-Barre, y pueden afectar principalmente a las fibras motoras. Otras, tales como las debidas a ganglionitis de raíz dorsal del cáncer, lepra, SIDA, diabetes mellitus o intoxicación crónica por piridoxina, pueden afectar principalmente a la ganglia de raíz dorsal o fibras sensoriales, produciendo síntomas sensores. Los nervios craneales están también implicados, tales como por ejemplo en el síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Lyme, diabetes mellitus y difteria.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno que implica la deterioración de las funciones mentales dando como resultado cambios en el tejido cerebral. Esto puede incluir la contracción de los tejidos cerebrales, demencia degenerativa primaria y atrofia cerebral difusa. La enfermedad de Alzheimer también se llama demencia senil/tipo Alzheimer (DSTA).

La enfermedad de Parkinson es un trastorno del cerebro que incluye un movimiento con temblores y dificultad para caminar, moverse y de coordinación. La enfermedad está asociada al daño a una parte del cerebro que controla el movimiento muscular, y también se llama parálisis agitans o parálisis agitante.

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurológica dominante autosómica y heredada. La anomalía genética consiste en un número en exceso de secuencias de nucleótidos CAG repetidas en serie. Otras enfermedades con repeticiones CAG incluyen, por ejemplo, atrofia muscular espinal (AME), tal como la enfermedad de Kennedy, y la mayor parte de las ataxias cerebelares dominantes autosómicas (ACDA) que se llaman ataxias espino-cerebelares (SCA) en la nomenclatura genética.

La esclerosis lateral amiotrófica, ELA, es un trastorno que causa la progresiva pérdida del control nervioso de músculos voluntarios, incluyendo la destrucción de células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. La esclerosis lateral amiotrófica, también llamada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno que implica la pérdida del uso y control de los músculos.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) que toma un curso recurrente-remitente o progresivo. La EM no es la única enfermedad desmielinizante. Su contrapartida en el sistema nervioso periférico (SNP) es una poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC). Además, hay trastornos agudos y monofásicos, tal como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria denominada síndrome de Guillain-Barre (SGB) en el SNP, y encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM) en el SNC.

Otros trastornos neurológicos comprenden neuropatías con mielinización anormal, tales como las citadas en los “Antecedentes de la invención” anterior, así como el síndrome del túnel carpiano. La lesión nerviosa traumática puede estar acompañada por complicaciones ortopédicas de la columna espinal, y las que están también dentro de las enfermedades de acuerdo con la presente invención.

Los trastornos neurológicos pueden ser debidos además a trastornos metabólicos congénitos. En una realización preferida de la invención, la enfermedad neurológica es debida, por lo tanto, a un déficit metabólico congénito.

Los trastornos metabólicos congénitos abarcados por la presente invención pueden ser, por ejemplo, fenilcetonuria y otras aminoacidurias, enfermedades de Tay-Sachs, Niemann-Pick, y Gaucher, síndrome de Hurler; enfermedad de Krabbe y otras leucodistrofias. Pueden afectar al desarrollo de la vaina de mielina, principalmente en el SNC.

Las enfermedades neurológicas causadas por los trastornos metabólicos congénitos también se han discutido con detalle en los “Antecedentes de la invención”.

Otras enfermedades neurológicas menos conocidas también se encuentran dentro del ámbito de la presente invención, tales como neurofibromatosis o atrofia sistémica múltiple (MSA). Otros trastornos que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención, se han descrito con detalle en los “Antecedentes de la invención” anterior.

En otra realización preferida, la enfermedad neurológica es una neuropatía periférica, más preferiblemente una neuropatía diabética. Las neuropatías asociadas/inducidas a quimioterapia también son preferidas de acuerdo con la presente invención.

La expresión “diabética neuropatía” se refiere a cualquier forma de neuropatía diabética, o uno o más síntoma(s) o trastorno(s) que acompañan o están causados por la neuropatía diabética, o complicaciones de la diabetes que afectan a los nervios según se describe con detalle en los “Antecedentes de la invención” anterior. La neuropatía diabética puede ser una polineuropatía. En la polineuropatía diabética, muchos nervios están afectados simultáneamente. La neuropatía diabética puede ser también una mononeuropatía. En mononeuropatía focal, por ejemplo, la enfermedad afecta a un sólo nervio, tal como el nervio craneal oculomotriz o abducens. También puede ser una mononeuropatía múltiple cuando dos o más nervios están afectados en áreas separadas.

En otra realización preferida, el trastorno neurológico es una enfermedad desmielinizante. Las enfermedades desmielinizantes comprenden preferiblemente condiciones desmielinizantes del SNC, como la encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM) y esclerosis múltiple (MS), así como enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso periférico (SNP). Las últimas comprenden enfermedades tales como poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y aguda, trastornos monofásicos, tales como la poliradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria llamada síndrome de Guillain-Barre (SGB).

En otra realización preferida, la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple, más preferiblemente la esclerosis múltiple recurrente-remitente.

ES 2 324 306 T3

En otra realización más preferida, la enfermedad desmielinizante se selecciona entre esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y síndrome de Guillain-Barre (SGB).

Otra realización preferida de la invención se refiere al tratamiento y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa. La enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y ALS.

Preferiblemente, el IL-17F se selecciona entre un péptido, un polipéptido o una proteína seleccionada entre el grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1;
- (b) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 11 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (c) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 21 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (d) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 31 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (e) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 55 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (i) una sal o proteína condensada, de cualquiera de (a) a (e).

Las fracciones activas o fragmentos pueden comprender cualquier porción o dominio de cualquiera de las isoformas de IL-17F, tal como una porción N-terminal de una porción C-terminal, o cualquiera de las isoformas de IL-17F.

El experto en la técnica apreciará que incluso pequeñas porciones de IL-17F pueden ser suficientes para ejercer su función, tal como un péptido activo que comprende los residuos de aminoácidos esenciales requeridos para la función de IL-17F.

El experto en la técnica apreciará además que las muteínas, sales, isoformas, proteínas condensadas, derivados funcionales de IL-17F, fracciones activas o derivados permutados circularmente de IL-17F, pueden retener una actividad biológica similar, o incluso mejor, de IL-17F. La actividad biológica de IL-17F y muteínas, isoformas, proteínas condensadas o derivados funcionales, fracciones activas o fragmentos, derivados permutados circularmente, o sus sales, puede ser medida en un bioensayo, usando un sistema celular.

Las fracciones activas preferidas tienen una actividad que es igual o mejor que la actividad de IL-17F de cadena completa, o tienen otras ventajas, tales como una mejor estabilidad o una menor toxicidad o inmunogenicidad, o son más fáciles de producir en grandes cantidades, o más fáciles de purificar. El experto en la técnica apreciará que las muteínas, fragmentos activos y derivados funcionales pueden generarse clonando el cADN correspondiente en plásmidos apropiados y analizarlos en el ensayo celular, como se menciona anteriormente.

Las proteínas usadas de acuerdo con la presente invención pueden estar glicosiladas o no glicosiladas, pueden derivarse a partir de fuentes naturales, tales como fluidos corporales, o pueden producirse preferiblemente recombinantemente. La expresión recombinante puede llevarse a cabo en sistemas de expresión procariota tal como *E. coli*, o en células eucariotas, tales como células de insecto Ts, y preferiblemente en sistemas de expresión de mamíferos, tales como células CHO o células HEK. Además, las proteínas de la invención pueden modificarse, extenderse o acortarse, eliminando o añadiendo N-terminalmente una Metionina (Met) o aminooxipentano (AOP), siempre que sean preservados los efectos neuroprotectores.

Cuando se usa en la presente memoria, el término “muteínas” se refiere a análogos de IL-17F, en los cuales uno o más de los residuos aminoácidos de un IL-17F natural son reemplazados por residuos aminoácidos diferentes, o se eliminan, o se añaden uno o más residuos aminoácidos a la secuencia natural de IL-17F, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con el IL-17F silvestre. Estas muteínas se preparan por técnicas de síntesis y/o mutagénesis dirigida conocidas, o por cualquier otra técnica conocida adecuada.

Las muteínas de IL-17F, o los ácidos nucleicos que lo codifican, incluyen un grupo finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos de sustitución o polinucleótidos que pueden obtenerse normalmente por cualquier experto ordinario en la técnica, sin una experimentación indebida, basado en las enseñanzas y guías presentadas en este documento.

Las muteínas incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, que se hibrida al ADN o ARN, que codifica IL-17F, de acuerdo con la presente invención, bajo condiciones estrictas moderadas o altas. El cADN que codifica IL-17F se describe en la SEQ ID NO 2. La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones de hibridación y posterior lavado que los expertos en la técnica denominan convencionalmente “rigurosas”. Véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, Interscience, N.Y., §§6.3 y 6.4 (1987, 1992), y Sambrook *et al.* (Sambrook, J. C, Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de lavado 12-20°C por debajo de la T_m calculada del híbrido bajo estudio, por ejemplo, 2 x SSC y SDS al 0,5% durante 5 minutos, 2 x SSC y SDS al 0,1% durante 15 minutos; 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 37°C durante 30-60 minutos y luego, a 0,1 x SSC y SDS al 0,5% a 68°C durante 30-60 minutos. Los expertos en la técnica entenderán que las condiciones rigurosas también dependen de la longitud de las secuencias de ADN, las sondas oligonucleotídicas (tales como 10-40 bases) o las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, *supra*.

En una realización preferida, cualquiera de dicha muteína tiene al menos un 40% de identidad u homología con la secuencia de SEQ ID NO: 1 del listado de secuencia adjunto. Más preferiblemente, tiene una coincidencia u homología de al menos un 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, lo más preferible, al menos 90% con ésta.

La identidad refleja una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido de los dos polinucleótidos o dos secuencias de polipéptidos, respectivamente, respecto a la longitud de las secuencias que se compararan.

Para las secuencias en las que no hay una correspondencia exacta puede determinarse un “% de identidad”. En general, las dos secuencias a comparar se alinean para dar una correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar “huecos” en una o en ambas secuencias, para aumentar el grado de alineación. Puede determinarse un % de identidad respecto a la longitud completa de cada una de las secuencias que se comparan (denominada alineación global), que es particularmente adecuado para las secuencias de la misma longitud o muy similar, o sobre longitudes definidas más cortas (denominada alineación local), que es más adecuado para secuencias de diferente longitud.

Los métodos para comparar la identidad y la homología de dos o más secuencias son conocidos en la técnica. Así, por ejemplo, los programas disponibles en el paquete de análisis de secuencia Wisconsin, versión 9.1 (Devereux *et al.*, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, pueden usarse para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de identidad y el % de homología entre dos secuencias de polipéptidos. BESTFIT usa el algoritmo de “homología local” de Smith y Waterman (Smith y Waterman, 1981) y encuentra la mejor región simple de similitud entre dos secuencias. Otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias también se conocen en la técnica, por ejemplo la familia de programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997), accesible a través de la página web del NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov y FASTA (Pearson, 1990; Pearson y Lipman, 1988).

Los cambios preferidos para las muteínas son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos de IL-17F pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares que la sustitución entre miembros del grupo preservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Esta claro que las inserciones y eliminaciones de aminoácidos también pueden hacerse en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o eliminaciones sólo implican a unos pocos aminoácidos, por ejemplo por debajo de treinta, y preferiblemente por debajo de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo los residuos de cisteína. Las proteínas y las muteínas producidas mediante tales delecciones y/o inserciones entran en el ámbito de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla II; y mucho más preferiblemente los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 324 306 T3

TABLA I

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

5	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
10	Arg	Arg, Gin, Lys, Glu, His
	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
15	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gin, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
20	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, He
25	Phe	Trp, Met, Tyr, He, Val, Leu, Phe
	Tyr	Trp, Met, Phe, He, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
30	His	Glu, Lys, Gin, Thr, Arg, His
	Gin;	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
35	Lys	Glu, Gin, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
40	Glu	Asp, Lys, Asn, Gin, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

ES 2 324 306 T3

TABLA II

Grupos de Aminoácidos Sinónimos Más Preferidos

5	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Ser	Ser
10	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Leu, lie, Phe, Met
	Pro	Ala, Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Val, Met, lie
20	Gly	Gly
	lie	lie, Met, Phe, Val, Leu
25	Phe	Met, Tyr, lie, Leu, Phe
	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Cys, Ser
30	His	His, Gin, Arg
	Gin;	Glu, Gin, His
	Asn	Asp, Asn
35	Lys	Lys, Arg
	Asp	Asp, Asn
40	Glu	Glu, Gin
	Met	Met, Phe, lie, Val, Leu
	Trp	Trp

TABLA III

Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos

5	Aminoácido	Grupo Sinónimo
	Ser	Ser
	Arg	Arg
10	Leu	Leu, lie, Met
	Pro	Pro
	Thr	Thr
15	Ala	Ala
	Val	Val
	Gly	Gly
20	lie	He, Met, Leu
	Phe	Phe
25	Tyr	Tyr
	Cys	Cys, Ser
	His	His
30	Gin;	Gin;
	Asn	Asn
35	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
40	Met	Met, lie, Leu
	Trp	Met

45 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de polipéptidos o de proteínas de IL-17F, para emplear en la presente invención, incluyen cualquier etapa de un método conocido, tales como las presentadas en los documentos de patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, de Mark *et al.*; 5.116.943 de Koths *et al.*, 4.965.195 de Namen *et al.*; 4.879.111 de Chong *et al.*; y 5.017.691 de Lee *et al.*; y las proteínas sustituidas con lisina, presentadas en la patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Shaw *et al.*).

50 La expresión “proteína condensada” se refiere a un polipéptido que comprende IL-17F, o una muteína o su fragmento, condensado con otra proteína, que, por ejemplo tiene un tiempo de residencia ampliado en los fluidos corporales. Un IL-17F puede ser condensado así a otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo una inmunoglobulina o a su fragmento.

55 Los “derivados funcionales”, como se usa en este documento, abarcan los derivados de IL-17F, y sus muteínas y proteínas condensadas, que pueden prepararse a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales sobre los restos o los grupos N- o C-terminales, mediante medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de un IL-17F, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

60 Estos derivados pueden incluir cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar a los sitios antigénicos y extender la residencia de un IL-17F en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo mediante una reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los restos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanofilo o arofilo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los restos serilo o treonilo) formados con restos acilo.

Con la expresión “fracciones activas” de una IL-17F, sus mutéínas y proteínas condensadas, la presente descripción cubre cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína individual o junto con moléculas asociadas o restos unidos a ella, por ejemplo, restos azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los restos azúcar individuales, con la condición de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la de IL-17F.

El término “sales” en este documento se refiere tanto a sales de grupos carboxilo y sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula IL-17F o sus análogos. Pueden formarse sales de un grupo carboxilo por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc y similares, y sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas sales deben conservar la actividad biológica de IL-17F según la presente invención, es decir, el efecto neuroprotector en una enfermedad neurológica.

En una realización preferida de la invención IL-17F es dimérico.

En una realización preferida de la invención, IL-17F se condensa a una molécula vehículo, un péptido o una proteína que promueva el paso a través de la barrera sangre-cerebro (“BBB”). Esto sirve para el reconocimiento adecuado de la molécula al sitio de acción en aquellos casos, en los que el SNC está implicado en la enfermedad. Las modalidades para la administración del fármaco a través de la BBB implica la ruptura de la BBB, por medios osmóticos o bioquímicamente por el uso de sustancias vasoactivas tales como la bradiquina. Otras estrategias para atravesar la BBB pueden implicar el uso de sistemas de transporte endógenos, incluyendo transportadores mediante un vehículo tal como glucosa y vehículos de aminoácidos; transcitosis mediante receptor para insulina o transferina; y transportadores de flujo activos tal como p-glicoproteína; La penetratina, un péptido de 16-meros (pAntp) derivado a partir del tercer dominio helicoidal de la homeoproteína de antenapedia, y sus derivados. La estrategias para la administración del fármaco detrás de BBB incluye además la implantación intracerebral.

Los derivados funcionales de IL-17F pueden conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano, o inmunogenicidad. Para lograr este objetivo, el IL-17F puede unirse, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede realizar mediante métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095, por ejemplo.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, IL-17F está PEGilada.

En otra realización preferida de la invención, la proteína condensada comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig). La fusión puede ser directa o a través de un péptido corto que actúa como agente de enlace, que puede tener una longitud tan corta como de 1 a 3 residuos de aminoácidos o más larga, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos de longitud. E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia enlazadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducidos entre la secuencia de IL-17F y la secuencia de la inmunoglobulina, por ejemplo. La proteína de fusión resultante tiene mejores propiedades, tales como un mayor tiempo de residencia en los fluidos corporales (semi-vida), o una mayor actividad específica, un mayor nivel de expresión. La fusión de Ig puede también facilitar la purificación de la proteína condensada.

En otra realización preferida, IL-17F se condensa a la región constante de una molécula Ig. Preferiblemente, se fusiona a regiones de cadena pesada, como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humano, por ejemplo. Otras isoformas de las moléculas de Ig también resultan adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como las isoformas IgG2 o IgG4, u otras clases de Ig, como IgM, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero- u homomultímeras. La porción de inmunoglobulina de la proteína condensada puede modificarse además de modo que no se active la unión complementaria o la cascada complementaria o se una a receptores de Fc.

Otras proteínas de fusión de IL-17F pueden prepararse condensando dominios aislados entre otras proteínas permitiendo la formación de dímeros, trímeros, etc. Los ejemplos para las secuencias de proteína que permiten la multimerización de los polipéptidos de la invención son dominios aislados entre proteínas tales como hCG (documento WO 97/30161), colágeno X (documento WO 04/33486), C4BP (documento WO 04/20639), proteínas Erb (documento WO 98/02540), o péptidos cabeza-cola (documento WO 01/00814).

También se describe el uso de una combinación de IL-17F y un agente inmunodepresivo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos neurológicos, para el uso simultáneo, secuencial o separado. Los agentes inmunodepresivos pueden ser esteroides, metotrexato, ciclofosfamida, anticuerpos anti-leucocito (tal como CAMPATH-1), y similares.

La invención se refiere además al uso de una combinación de IL-17F y un interferón y/u osteopontina y/o clusterina, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos neurológicos, para uso simultáneo, secuencial o separado.

El término “interferón”, como se usa en la presente solicitud de patente, pretende incluir cualquier molécula definida como tal en la bibliografía, que comprende, por ejemplo, cualquier tipo de los IFN mencionados en la sección anterior “Antecedentes de la invención”. El interferón puede ser preferiblemente humano, pero también derivado de otras especies, siempre que la actividad biológica sea similar a la de los interferones humanos, y la molécula no sea inmunogénica en hombres.

En particular, cualquier tipo de IFN- α , IFN- β e IFN- γ está incluido en la definición anterior. IFN- β es el IFN preferido según la presente invención.

La expresión “interferon-beta (IFN- β)”, como se usa aquí, pretende incluir el interferón de fibroblastos, en particular de origen humano, obtenido mediante el aislamiento a partir de líquidos biológicos u obtenido mediante técnicas de ADN recombinante a partir de células hospedadoras procarióticas o eucarióticas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y fragmentos.

De particular interés es una proteína que se ha derivatizado o combinado con un agente complejante que sea de larga duración. Por ejemplo, las versiones de PEGiladas, como se mencionan anteriormente, o proteínas genéticamente manipuladas que exhiben una actividad a largo plazo en el cuerpo, pueden usarse de acuerdo con la presente invención.

El término “derivados” pretende incluir solo los derivados que no cambian un aminoácido con otro de los veinte aminoácidos naturales.

Los interferones también se pueden conjugar con polímeros para mejorar la estabilidad de las proteínas. Un conjugado entre el interferón β y el poliol polietilenglicol (PEG) está descrito, por ejemplo, en el documento de patente W099/55377, por ejemplo.

En otra realización preferida de la invención, el interferón es el Interferón- β (IFN- β), y más preferiblemente el IFN- β 1a.

IL-17F es preferiblemente usado simultáneamente, secuencialmente o separadamente con el interferón.

En una realización preferida de la presente invención, IL-17F se usa en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

La invención se refiere además al uso de una molécula de ácido nucleico para fabricar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica, en el que en este documento la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1;
- (b) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 11 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (c) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 21 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (d) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 31 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- (e) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 55 a 163 de SEQ ID NO: 1;

El ácido nucleico puede administrarse por ejemplo como una molécula de ácido nucleico desnuda, por ejemplo por inyección intramuscular.

Puede comprender además secuencias de vector, tal como una secuencia viral, útil para la expresión del gen codificado por la molécula de ácido nucleico en el cuerpo humano, preferiblemente en las células o tejidos apropiados.

Por lo tanto, en una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprende además una secuencia del vector de expresión. Las secuencias del vector de expresión son conocidas en la técnica, comprenden además elementos que sirven para la expresión del gen de interés. Pueden comprender secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y potenciadoras, secuencias del marcador de selección, orígenes de multiplicación, y similares. Un enfoque terapéutico genético es así usado para tratar y/o prevenir la enfermedad. Ventajosamente, la expresión de IL-17F estará entonces *in situ*.

En una realización preferida, el vector de expresión es un vector derivado lentiviral. Se ha mostrado que los vectores lentivirales son muy eficaces en la transferencia de genes, en particular dentro del SNC. Otros vectores virales representativos, tal como vectores derivados adenovirales, pueden también usarse de acuerdo con la invención.

Un vector reconocido puede usarse con el fin de potenciar el paso de IL-17F a través de la barrera sangre-cerebro. Tales vectores pueden reconocer por ejemplo el receptor de transferencia u otros mecanismos de transporte endoteliales.

- 5 En una realización preferida de la invención, el vector de expresión puede ser administrado por inyección intramuscular.

10 El uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de IL-17F en una célula que normalmente es silente para la expresión de IL-17F, o que expresa cantidades de IL-17F que no son suficientes, también se contempla de acuerdo con la invención. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células deseadas para expresar IL-17F. Tales secuencias reguladoras pueden ser, por ejemplo, promotores o potenciadores. La secuencia reguladora entonces puede introducirse en el locus apropiado del genoma mediante recombinación homóloga, uniéndose operativamente, con ello, la secuencia reguladora con el gen, cuya expresión se requiere inducir o potenciar. La tecnología se denomina generalmente “activación génica endógena” (EGA), y se describe, p. ej., en el documento de
15 patente WO 91/09955.

También se describe el uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para producir IL-17F en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas.

- 20 También se describe una célula que ha sido genéticamente modificada para producir IL-17F para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas. Así, un enfoque terapéutico celular puede usarse con el fin de administrar el fármaco a las partes apropiadas del cuerpo humano.

25 La aplicación describe además composiciones farmacéuticas, particularmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades neurológicas, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-17F y una cantidad terapéuticamente eficaz de un interferón y/u osteopontina y/o clusterina opcionalmente además una cantidad terapéuticamente eficaz de un inmunodepresivo.

30 La definición de “farmacéuticamente aceptable” significa que incluye cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra, o que puede aumentar la actividad. Por ejemplo, para la administración por vía parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular en una forma de dosificación unitaria para la inyección en vehículos, tales como disolución salina, disolución de dextrosa, seroalbúmina y disolución de Ringer.

35 Los principios activos de la composición farmacéutica según la invención se pueden administrar a un individuo en una variedad de formas. Las vías de administración incluyen la vía intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulación de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica, intratecal, rectal e intranasal. Puede emplearse cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales, o mediante una terapia génica en la que una molécula de ADN
40 que codifica el agente activo se administra al paciente (por ejemplo, a través de un vector), lo cual provoca que el agente activo se exprese y se segregue *en vivo*.

45 Además, la(s) proteína(s) según la invención se puede(n) administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 Para la administración por vía parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular como una solución, una suspensión, una emulsión o un polvo liofilizado junto con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua, solución salina, solución de dextrosa) y los aditivos que mantienen la isotonicidad (p. ej., manitol) o la estabilidad química (p. ej., agentes conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas empleadas de forma habitual.

55 La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) según la invención también puede mejorarse utilizando procedimientos de conjugación que aumentan la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo, uniendo la molécula a polietilenglicol (PEG), según se describe en la solicitud de patente PCT WO 92/13095.

60 Las cantidades terapéuticamente eficaces de la(s) proteína(s) activa(s) estarán en función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad de la proteína, cualquier actividad citotóxica residual que muestren los antagonistas, la vía de administración, la afección clínica del paciente (incluyendo el deseo de mantener un nivel no tóxico de actividad IL-17F endógena).

65 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” es tal que cuando se administra, la IL-17F ejerce un efecto beneficioso sobre la enfermedad neurológica. La dosificación administrada, en forma de dosis única o múltiple, a un individuo, variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-17F, la vía de administración, el estado del paciente y las características (sexo, edad, peso corporal, salud, altura), el grado de extensión de los síntomas, tratamientos simultáneos, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado.

ES 2 324 306 T3

Como se menciona anteriormente, IL-17F puede usarse preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

- 5 La vía de administración, que se prefiere según la invención es la administración por vía subcutánea. La administración por vía intramuscular también se prefiere según la invención.

En otras realizaciones preferidas, IL-17F se administra diariamente o cada dos días.

- 10 Las dosis diarias se proporcionan generalmente en dosis divididas o en una forma de liberación sostenida, eficaz para obtener los resultados deseados. La segunda administración u otras posteriores se pueden realizar con una dosificación que sea la misma, menor o superior a la dosis inicial o la dosis previa administrada al individuo.

- 15 De acuerdo con la invención, IL-17F se puede administrar de forma profiláctica o terapéutica a un individuo antes de otros regímenes o agentes terapéuticos, simultánea o secuencialmente a los mismos (p. ej., regímenes múltiples de fármacos), en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los agentes activos que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos se pueden administrar en las mismas composiciones o en diferentes composiciones.

- 20 La referencia a etapas de métodos conocidas, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no supone admitir que cualquier aspecto, descripción o realización de la presente invención se describa, indique o sugiera en la técnica pertinente.

- 25 La anterior descripción de las realizaciones específicas también revelará completamente la naturaleza general de la invención que otros, aplicando el conocimiento de los expertos en la técnica (incluyendo los contenidos de las referencias citadas en la presente), pueden modificar y/o adaptar con facilidad para diversas aplicaciones de estas realizaciones específicas, sin una experimentación indebida, y sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por tanto, estas adaptaciones y modificaciones pretenden estar dentro del significado y gama de equivalentes de las realizaciones descritas, basándose en las indicaciones y directrices presentadas en la presente. Debe entenderse que la fraseología o terminología en la presente tiene el propósito de describir y no limitar, de forma que la terminología o fraseología de la presente descripción debe ser interpretada por los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones y directrices presentadas en la presente, en combinación con el conocimiento de los expertos en la técnica.

- 30 Habiendo descrito ahora la invención, ésta se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención.

35

Ejemplos

Abreviaturas

40

CMAF potencial de acción en el músculo del compuesto

div día *in vitro*

45

dpi día después de la lesión

EMG Electromiografía

50

i.p. intraperitoneal

i.v. intravenoso

s.c. subcutáneo

55

s.e.m. error estándar del promedio

SNCV velocidad de conducción de nervio sensitivo

Ejemplo 1

60

Expresión recombinante de IL-17F

Clonación y expresión

65

La secuencia de codificación de IL-17F se amplificó a partir de células T de Jurkat y se clonó dentro del vector pCR4-TOPO usando el número de entrada del banco de genes AF384857. Luego se clonó dentro de un vector pEAK12 con un marcador en el extremo C-terminal.

ES 2 324 306 T3

La IL-17F de humano recombinante marcado (en adelante IL-17F) se expresó en células HEK y se purificó como sigue:

Se mantuvieron en suspensión células 293 de riñón embrionario humano que expresaba el antígeno nuclear del virus Epstein-Barr (HEK293-EBNA, Invitrogen) en medio sin suero Excell VPRO (solución madre sembrada, medio de mantenimiento, JRH). El día de la transfección, las células se contaron, centrifugaron (a baja velocidad) y el pelete se re-suspensión en el volumen deseado de medio FEME (500 ml) suplementado con FCS al 1% para proporcionar una concentración celular de células 1XE6 viables/ml. El cADN se diluyó en un volumen de 2 mg/litro en FEME (volumen 200 ml/litro). El agente de transfección de polietilenoimina (volumen 4 mg/litro) se añadió después a la solución de cADN, se agitó e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos (generando la mezcla de transfección).

Esta mezcla de transfección se añadió después al agitador y se incubó durante 90 minutos en un incubador de CO₂ (CO₂ al 5% y 37°C). El medio FEME recién preparado (FCS al 1%) se añadió después de 90 minutos para doblar el volumen del agitador inicial. El agitador se incubó durante 6 días. El día 6 (el día de recolección), el sobrenadante del agitador (500 ml) se centrifugó (4°C, 400 g) y se puso en un recipiente que llevaba un único identificador con número de plásmido y número de fermentación.

Proceso de purificación

La muestra del medio de cultivo de 3000 ml que contenía la proteína recombinante con un marcador C-terminal se diluyó con un volumen de tampón A frío (NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 600 mM; glicerol al 8,7% (p/v), pH 7,5) a un volumen final de 6000 ml. La muestra se filtró a través de un filtro estéril de 0,22 µm (Millipore, unidad de filtro de 500 ml) y se mantuvo a 4°C.

La purificación se realizó a 4°C en la estación de trabajo VISION (Applied Biosystems). El procedimiento de purificación estaba compuesto de dos etapas secuenciales, cromatografía de afinidad por marcador en un Poros 20 MC (Applied Biosystems) columna cargada con iones de Ni (10 x 100 mm, 7,8 ml), seguido de intercambio de tampón en una columna de filtración de gel (1,0 x 15 cm) con medio G-25 de Sephadex (Amersham Pharmacia).

La primera etapa de cromatografía se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para la segunda etapa de cromatografía, la columna de filtración de gel G-25 de Sephadex se regeneró con 2 ml de tampón D (NaCl 1,137 M; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HP0₄ 8 mM; pH 7,2), y posteriormente se equilibró con 4 volúmenes de columna de tampón C (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HP0₄ 8 mM; glicerol al 20% (p/v); pH 7,4). La fracción del pico eluido de la columna iónica metálica fue automáticamente, a través de del cargador de muestra integrado en la VISION, cargada en la columna G-25 de Sephadex y la proteína se eluyó con tampón C a un caudal de 2 ml/min. La muestra desalada se recuperó en una fracción de 3,5 ml. La fracción se filtró a través de un filtro de centrifugación estéril de 0,22µm (Millipore), se puso en alícuotas, se congeló y almacenó a -80° C. Un alícuota de la muestra se analizó en SDS-PAGE (gel al 4-12% NuPAGE; Novex) mediante tinción azul de Coomassie y transferencia Western con anticuerpos anti-marcadores.

Tinción azul de Coomassie. El gel NuPAGE se tiñó en una solución al 0,1% de tinción azul de coomassie R250 (metanol al 30%, ácido acético al 10%) a temperatura ambiente durante 1 h y posteriormente se destiñó en metanol al 20%, ácido acético al 7,5% hasta que la línea de fondo se puso clara y las bandas de proteína eran claramente visibles (no mostrado).

Transferencia Western. Después de la electroforesis las proteínas fueron electro transferidas a partir del gel a una membrana de nitrocelulosa a 290 mA durante 1 hora a 4°C. La membrana se bloqueó con polvo de leche al 5% en tampón E (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; Na₂HP0₄ 8 mM; Tween 20 al 0,1%, pH 7,4) durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente se incubó con una mezcla de 2 anticuerpos anti-marcador policlonal de conejo (G-18 y H-15, 0,2 µg/ml cada uno; Santa Cruz) en polvo de leche al 2,5% en tampón E toda la noche a 4°C. Después de una incubación de 1 hora más a temperatura ambiente, la membrana se lavó con tampón E (3 x 10 min), y luego se incubó con un anticuerpo anti-conejo secundario conjugado con HRP (DAKO, HRP 0399) diluido 1/3000 en tampón E que contenía polvo de leche al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón E (3 x 10 minutos), la membrana se desarrolló con el kit ECL (Amersham) durante 1 min. La membrana se expuso posteriormente a un Hyperfilm (Amersham), la película se desarrolló y la imagen de transferencia Western se analizó visualmente. Alternativamente, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-IL-17F comerciales de R&D (policlonal: 1:500 o monoclonal 1:250), y se reveló con los anticuerpos secundarios apropiados.

La concentración de proteína se determinó usando el coeficiente de extinción calculado a 280 nm, 14,660 M⁻¹ cm⁻¹. El rendimiento en proteínas fue de 28 y 7,8 mg, respectivamente para las dos preparaciones realizadas.

Ejemplo 2

Bioensayo para analizar la actividad de IL-17F

5 *Introducción*

Se realizó un ensayo para evaluar la bioactividad de IL-17F con el fin de comparar las actividades de los diferentes lotes purificados (Lote de 1 a 3).

10

Materiales y métodos

Células de glioma U373 (de la Colección Europea de Cultivos Celulares, Inglaterra) fueron puestas en placas de 96 pocillos (5000 células/pocillo) en FCS al 10% que contenía MEM, fueron tratadas con diluciones en serie de IL-17F con o sin una concentración constante de rhIFN γ (1000 U/ml, R&D) y se incubaron durante 24h (37C, CO₂ al 10%). Los sobrenadantes diluidos (50 x en PBS) se analizaron después de 24h para la liberación de IL-6 humana, usando un ELISA comercial (de R&D).

20 *Resultados*

Fig. 1.A y B muestran que los diferentes productos de purificación tienen actividades muy similares. La adición de rhIFN γ no altera significativamente los valores de EC₅₀, sin embargo aumenta la relación señal a ruido del ensayo.

25

Como no hubo ninguna diferencia significativa entre los lotes, en lo siguiente no se hizo ninguna referencia respecto al lote respectivo.

30 Ejemplo 3

Efecto protector de IL-17F en una neuropatía inducida por compresión del nervio ciático en ratón

Introducción

35

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la regeneración nerviosa y la remielinización en ratón tratado con IL-17F a diferentes dosis. En este modelo un efecto positivo de IL-17F en la supervivencia neuronal y axonal (neuronas sensoriales y motoras) y regeneración, o en la mielinización o inflamación del macrófago, puede conducir a la restauración de la función motora. La regeneración puede medirse de acuerdo con la restauración de funciones sensoriomotoras, lo que puede evaluarse por registros electrofisiológicos.

40

Materiales y Métodos

45

Animales

Se usaron treinta ratones hembra de 8 semanas C57bl/6 RJ (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Francia). Se dividieron en 5 grupos (n = 6): (a) grupo operado de compresión del nervio vehículo; (c) compresión del nervio/IL-17F (0,1 mg/kg); (d) compresión del nervio/IL-17F (0,03 mg/kg); (e) compresión del nervio/IL-17F (0,001 mg/kg); (f) compresión del nervio/osteopontina (0,1 mg/kg). La osteopontina (OPN) es una sialoproteína altamente fosforilada que es un componente prominente de las matrices extracelulares mineralizadas de huesos y dientes. El documento WO02092122 describe los efectos de OPN en enfermedades neurológicas.

50

Los animales fueron alojados en grupo (6 animales por celda) y se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (21-22°C) y un ciclo luz-oscuridad revertido (12h/12h) con alimentación y agua disponible *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones institucionales.

55

Lesión del nervio ciático

60

Los animales se anestesiaron por inhalación de Isofluran® al 3% (Baxter). El nervio ciático derecho se expuso quirúrgicamente a un nivel del muslo medio y se comprimió a 5 mm proximal respecto a la trifurcación del nervio ciático. El nervio se comprimió dos veces durante 30s con fórceps hemostáticos (ancho 1,5 mm; Koenig; Estrasburgo; Francia) con una rotación de 90 grados entre cada compresión.

65

Planificación de experimentos y tratamiento farmacológico

El ensayo electromiográfico (EMG) se realizó una vez antes del día de la cirugía (línea base) y cada semana durante 3 semanas después de la operación.

El día de la cirugía por compresión del nervio se consideró como dpl 0 (dpl = día después de la lesión). No se realizó ningún ensayo el día 4 después de la compresión. Se registraron el peso corporal y la tasa de supervivencia cada día.

A partir del día del daño nervioso al final del estudio, se administraron IL-17F o OPN diariamente por vía de inyecciones subcutáneas (subcutánea), excepto los fines de semana. El vehículo consistió en PBS/glicerol al 20%/BSA al 0,02%. A 22 dpi, todos los animales se sacrificaron y los nervios ciáticos se diseccionaron y disociaron para realizar los análisis FACS en las células infiltrantes.

Registro electrofisiológico

Se realizaron registros electrofisiológicos usando una electromiografía Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les Ulis, Francia). Los ratones se anestesiaron por inhalación de Isofluran® al 3% (Baxter). La temperatura normal del cuerpo fue mantenida a 30°C con una lámpara de calentamiento y controlada por un termómetro de contacto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la cola.

El potencial de acción en músculo del compuesto (CMAP) se midió en el músculo *gastrocnemius* después de una estimulación simple de 0,2 EM del nervio ciático a una intensidad supramaximal de 12,8 mA. La amplitud (mV), la latencia (ms) y la duración (tiempo necesitado para una sesión de despolarización y una repolarización) del potencial de acción se midieron en ambas piernas operadas, y en la pierna contra lateral (= sin compresión). La amplitud y duración son indicativas del número de unidades motoras activas, mientras que la latencia distal refleja indirectamente la conducción del nervio motor y velocidades de transmisión neuromusculares, lo que depende en parte del grado de mielinización.

Análisis por citometría de flujo (FACS) de la infiltración de leucocitos

Después del sacrificio de los animales el día 22 después de la lesión, los nervios ciáticos se diseccionaron (parte distal y contralateral), se picaron e incubaron en colagenasa (8 mg/ml) y ADNsa al 1% durante 2h a 37°C. La parte distal representa la parte de los nervios ciáticos que van desde la compresión al final de la pierna, mientras que la parte contralateral representa la pierna que no ha sufrido compresión. Los pedazos fueron mecánicamente disociados entonces con un pipeteado y se pasaron a través de un malla de 70 micrones. Las células se lavaron entonces y se bloquearon en BSA al 1%, NaN₃ al 0,01% e IgG de conejo (3 ug/ml) durante 30 min, y se incubaron en anticuerpos anti-CD45 de ratón conjugado con ficoeritrina (25 ug/ml, de R&D) durante 45 min. Las células se analizaron entonces en FACSCalibur de Becton Dickinson. El porcentaje de células CD45 positivas se representaron en una gráfica, para las partes distal y contralateral, para todos los tratamientos. Se tomaron cuatro animales para cada tratamiento.

Análisis de datos

El análisis global de los datos se realizó usando ANOVA unimodal. El ensayo de Dunnett se usó después, y los datos se compararon con el control "vehículo". El nivel de significancia fue puesto a: p < 0,001; b o **: p < 0,01; c o *: p < 0,05; d: p < 0,1. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

Resultados

Todos los animales sobrevivieron a los procedimientos del nervio comprimido y durante todo el estudio. Los valores electrofisiológicos del lado contralateral sin compresión fueron significativamente diferentes del lado vehículo-comprimido en todos los momentos analizados, como se esperaba.

Peso del animal

Ninguno de los animales perdió significativamente peso corporal durante el estudio (no mostrado).

*Medidas electrofisiológicas**Amplitud del potencial de acción en músculo del compuesto (Fig. 2.A)*

5 Ningún cambio significativo se observó en la amplitud del CMAP a través del estudio en las piernas contralaterales “sin compresión”. En contraste, la compresión del nervio ciático indujo una disminución drástica en la amplitud de CMAP con una disminución en el grupo del vehículo de aproximadamente 80% a dpl7 y dpi 15, cuando se compara con los niveles respectivos del lado contralateral (sin compresión). Cuando se trataron ratones con IL-17F, a 0,1 mg/kg o 0,03 mg/kg, u osteopontina a 0,1 mg/kg, demostraron un aumento (aproximadamente 1,8 veces) en la amplitud de CMAP, según se compara con los niveles en los ratones no tratados, peso este efecto era solo significativo a 15 dpl.

Latencia del potencial de acción en músculo del compuesto (Fig 2.B)

15 Los músculos en el lado comprimido mostró 1,2 veces más latencia de CMAP que las piernas contralaterales “sin compresión”. En ratones tratados con IL-17F u osteopontina, el valor de la latencia del CMAP se redujo significativamente según se compara con el del ratón del vehículo. El día 7, este efecto podría observarse después del tratamiento con 0,1 mg/kg de IL-17F o 0,1 mg/kg de osteopontina. Los días 15 y 22 dpl, se obtuvo un efecto significativo con 0,1 mg/kg y 0,03 mg/kg (pero no con 0,001 mg/kg) de IL-17F. La significancia estadística se obtuvo también con el compuesto de referencia osteopontina, todos los días analizados.

Duración del potencial de acción en músculo del compuesto (Fig 2.C)

25 Los músculos en el lado comprimido mostraron una extensión significativa de la duración de CMAP en el grupo del vehículo, cuando se comparaba con el lado contralateral, especialmente 15 dpi cuando la duración era 2,7 veces mayor que en las piernas contralaterales (sin compresión). Esta duración fue significativamente reducida después de dos semanas cuando se administró IL-17F a 0,1 ó 0,03 mg/kg (pero no a 0,001 mg/kg), mientras que 22 dpl, solo 0,1 mg/kg era todavía significativamente diferente.

Análisis por citometría de flujo (FACS) de la infiltración de leucocitos (Fig. 3)

35 Tres semanas después de la compresión del nervio, la infiltración de los leucocitos en la parte distal del nervio ciático comprimido era mayor en todos los grupos si se comparaba con el lado contralateral (sin compresión). En animales tratados con IL-17F, esta infiltración fue reducida significativamente a todas las dosis si se comparaba con los animales tratados con vehículo.

Conclusiones

45 El modelo de compresión nerviosa es un modelo muy dramático de la neuropatía periférica. Inmediatamente después de la compresión nerviosa la mayor parte de las fibras que tienen un diámetro grande se pierden, debido al daño mecánico, conduciendo a una fuerte disminución en la amplitud de CMAP. La latencia de CMAP no fue inmediatamente afectada pero mostró un aumento a los 15 días debido a la degeneración adicional de fibras de pequeño diámetro por degeneración secundaria mediada inmunológicamente (macrófagos, granulocitos). La duración de CMAP aumentaba el 7 dpl y el máximo fue el 15 dpl.

50 IL-17F mostró un efecto protector en el modelo de compresión de nervio en ratón en todos los parámetros medidos. IL-17F era tan eficaz como la molécula de referencia usada en este estudio, osteopontina. Además, la infiltración de leucocitos parece haber disminuido bastante después de tratamientos con IL-17F, si se compara con los animales tratados con vehículo.

Ejemplo 4

IL-17F estimula la producción de proteína básica de mielina (MBP) en la maduración de cultivos mezclados de médula espinal (Figs 4-6)

Introducción

65 La regulación de la regeneración nerviosa después de la lesión o la enfermedad requiere no sólo un rebrote axonal y una elongación, sino que también una nueva síntesis de mielina. La mielinización es necesaria para la conducción nerviosa normal y protección axonal frente a la excitotoxicidad o ataques inmunológicos, por ejemplo. Debido a que la reparación de mielina es en su mayor parte una recapitulación de acontecimientos ontogenéticos (Capello *et al.*, 1997; Kuhn *et al.*, 1993), y dado que las motoneuronas están afectadas en varias neuropatías periféricas, los inventores usaron cultivos de médula espinal mezclados para evaluar los efectos de IL-17F sobre la mielina y los parámetros neuronales. Más precisamente, el contenido de proteína básica de mielina (MBP), una proteína representativa de

oligodendrocitos maduros y células Schwann, fue monitorizado por ELISA. Se determinó la actividad de colin acetil transferasa (ChAT), una enzima representativa de la actividad colinérgica de las motoneuronas, usando un ensayo enzimático. La incorporación de BrdU (Bromodesoxiuridina) también se cuantificó para evaluar los efectos de IL-17F en la proliferación.

Materiales y Métodos

Cultivos

De prepararon cultivos mezclados de médula espinal según el protocolo de Messmer-Joudrier *et al.* (Messmer-Joudrier *et al.*, 1996). Brevemente, se disociaron médulas espinales de embriones de rata E14 Wistar por una digestión enzimática (tripsina-EDTA) seguido de una disociación mecánica usando una pipeta de vidrio pulida con fuego. Se cultivaron entonces las células (2×10^5 células/pocillo) en placas de 96 pocillos revestidos con poli-L-Lisina, en FCS al 0,5% - suero de caballo 0,5% - medio DMEM (medio "suero al 1%"), o en RPMI al 50% - medio neurobasal 50% - FCS al 0,25% - suero de caballo al 0,25% - B27 al 1% (medio "RPMI-B27"). Se iniciaron tratamientos con IL-17F el día 0 y se renovaron dos veces por semana. En algunos experimentos, el antimitótico arabinosida C (AraC, 500 nM) se añadió a los cultivos, a partir del día 3 hasta el final. Los cultivos se lisaron entonces y se procesaron para el ELISA de MBP, o la actividad de ChAT según se describe más abajo. En algunos experimentos, la incorporación de BrdU se realizó con el fin de evaluar los efectos de IL-17F sobre la proliferación, y se cuantificó con un kit ELISA comercial.

MBP-ELISA

El anticuerpo de captura, anticuerpo monoclonal de ratón anti-MBP (1/5000; Chemicon), se diluyó en PBS y se incubó toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con PBS que contenía BSA al 1% durante 1 hora. Las muestras diluidas en PBS se incubaron durante 2 horas. El anticuerpo de detección, anti-MBP policlonal de conejo (1/300; Zymed) diluido en PBS-BSA, se incubó durante 2 horas y se reveló con un sustrato de Dihidrocloreto de O-fenilendiamina (OPD) después de una incubación con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1/3000, Sigma; diluido en PBS-BSA, 1 hora). Los valores de las lecturas de la densidades ópticas a 492 nm se representaron en una curva estándar de MBP (InVitrogen) y luego el contenido de proteína de cada muestra.

Ensayo enzimático de colin acetil transferasa (ChAT)

Este ensayo se realizó según la técnica de Fonnum (1969) (Fonnum, 1969). Brevemente, se incubaron muestras en una mezcla de tampón fosfato (0,05 M, pH 7,4), que contenía cloruro de colina (0,01 M, Sigma), NaCl 3M y suero de albúmina bovina (0,01%), a 37°C durante 20 min. También se añadieron a la mezcla neostigmina (un inhibidor de acetil colin esterasa, 0,2 mM, Sigma) y ^3H -acetil Co-A (1 uCi/ml). La reacción se paró añadiendo 14 volúmenes de tetrafenilborato en acetonitrilo (2 mg/ml, FLUKA). El tetrafenilborato se compleja a los ésteres de colina formados por la actividad de la colin acetil transferasa (contenido en las muestras) en colina y acetil-CoA. Estos complejos que son insolubles en agua, se realizó un intercambio de catión líquido usando un fluido de cintilación orgánico (Instafluor Plus, Perkin Elmer), así solo se leía la radioactividad en la fase orgánica en el contador de cintilación. Para este fin, se añadieron 2,5 volúmenes (del producto de reacción + solución de parada) de tampón fosfato (0,05 M, pH 7,4) y 1,4 volúmenes (del volumen resultante) del fluido de cintilación y se mezclaron fuertemente. Los resultados se expresaron finalmente en cuentas (cpm) por ml y se dividieron por la concentración de proteína de las muestras (medido con el kit de BCA de Pierce).

ELISA de BrdU

La incorporación de BrdU y el ELISA se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham). Brevemente, después de una incubación de 18-horas con BrdU, se lavaron las células, se fijaron y se incubaron con un anticuerpo anti-BrdU conjugado con HRP, que luego se reveló con un sustrato colorimétrico. El producto de la reacción se leyó entonces a 492 nm y se representaron las unidades relativas en una gráfica.

Resultados

Se analizaron IL-17F recombinante comercial de Leinco (IL-17F (L)) y Peprotech (IL-17F (P)), para comparar la actividad de la proteína de los inventores, producida en células HEK y que llevaban un marcador, con la actividad de IL-17F producida en *E. coli*, sin marcador. La Fig. 4 muestra que el contenido de MBP era significativamente mayor en los tratamientos con IL-17F, con IL-17F de todas las fuentes, incluso si se lograba una significancia en algo de diferentes niveles (entre 10 y 100 ng/ml). Una curva dosis-respuesta se obtuvo en medio de "suero al 1%", (Fig. 4A) que era un medio que favorecía a todos los tipos de células, mientras que el medio "RPMI-B27" favorecía principalmente a las neuronas. Como consecuencia, el mayor contenido de MBP inducido por IL-17F en cultivos generados en RPMI-B27 no fue tan pronunciado (Fig. 4B). Como resultado del uso de estos diferentes medios, se observó un efecto positivo de IL-17F en la actividad de ChAT (Fig.5 A, B, C), especialmente en cultivos generados

en RPMI-B27 (Fig. 5B). El aumento en la actividad de ChAT fue incluso más obvia en cultivos que se trataron con la AraC antimetabólica (Fig. 5C), que eliminaban la proliferación de células (es decir, células de la glía, ya que las neuronas no proliferaban más en tales cultivos). Esta mayor actividad de ChAT podría haber reflejado tanto un aumento de la diferenciación como un aumento de la supervivencia de las neuronas.

Tomados juntos, estos resultados sugirieron que IL-17F aumentaba MBP induciendo la proliferación de progenitores de oligodendrocitos, mientras que el efecto de IL-17F sobre las neuronas podría haber sido directo (en la diferenciación o supervivencia), o indirecto (produciendo más mielina, proporcionando por lo tanto más soporte trófico para las neuronas).

Para confirmar además la inducción de la proliferación por IL-17F, se analizó la incorporación de BrdU en diferentes puntos temporales siguiendo los tratamientos con IL-17F usando un kit ELISA comercial. Se encontró que IL-17F de hecho aumentaba la incorporación de BrdU (Fig. 6, mostrado en 11DIV). Las tinciones con TUNEL indicaron que no hubo un aumento de la apoptosis en los cultivos tratados, y también se analizó la liberación de LDH en los sobrenadantes. Ninguno de estos parámetros indicó que IL-17F era tóxico para los cultivos.

Conclusión

Se ha mostrado que IL-17F aumenta el contenido de MBP y el nivel de ChAT en cultivos mezclado de médula espinal a partir de embriones de rata.

Ejemplo 5

IL-17F aumenta la remielinización de los cortes de hipocampo después de una desmielinización inducida por el anticuerpo anti-MOG y proteínas complementarias de conejo bebé (Fig.7)

Introducción

La ruptura de mielina, una característica de la esclerosis múltiple inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante (PDIC) y síndrome de Guillain-Barre (SGB), se piensa que es debida a la presencia de una reacción autoinmune contra los nervios, incluyendo los componentes de mielina (Ho *et al.*, 1998; Kwa *et al.*, 2003; Steck *et al.*, 1998). Para imitar una desmielinización inducida por anticuerpo, se montó un sistema *in vitro* en el que se trataron cultivos de cortes de hipocampo organotípico durante dos días mediante anticuerpo anti-MOG (glicoproteína de oligodendrocito de mielina) en combinación con proteínas de complemento de conejo bebé. El tratamiento causa una desmielinización específica ya que el tratamiento con inmunoglobulina control con emparejamiento isotópico no induce una desmielinización significativa, aparte de algunas actividades citotóxicas del suero de conejo bebé *per se*. El sistema se usó para analizar el efecto promielinatorio potencial de IL-17F. En este paradigma, se añadió IL-17F 48 horas después del tratamiento desmielinizante, y se administró en días alternos durante 8 días más. Al final del experimento, se monitorizó el nivel de MBP mediante ELISA (véase el Ejemplo 4 para más detalles).

Materiales y Métodos

Cultivos de cortes de hipocampo organotípicos

Se prepararon cultivos de cortes de hipocampo organotípicos según el método de Stoppini *et al.* (Stoppini *et al.*, 1991). Brevemente, se obtuvieron los hipocampos de ratones C57/BI6 de cinco días. Usando a cortador de tejido McIlvain, se realizaron cortes de 500 micras de espesor. Los cortes se dispusieron entonces en insertos de Millicell-CM colocados en palcas de 6 pocillos conteniendo 1 ml de medio de cultivo (MEM al 50%, HBSS al 25%, suero de caballo al 25%). Los cultivos se mantuvieron en C02 al 5% a 37°C durante los días 6th y luego se transfirieron a 33°C. El medio se cambió cada 3 días.

Protocolo desmielinizante

Se trataron los cultivos de cortes de hipocampo organotípicos al final del desarrollo de la mielinización que aparece después de 21 días *in vitro* (DIV).

La desmielinización se indujo tratando los cortes con anticuerpos anti-MOG asociados a proteínas de complemento de conejo bebé (1/60-1/30 dependiendo del lote; CL-3441, Cedarlane) durante 2 días en suero de caballo al 25% que contenía medio.

Como controles, los cortes se trataron con anticuerpos irrelevantes de IgG1 (60 ug/ml; M-7894, Sigma) y complemento, o los cortes no se trataron.

Al final del tratamiento, se lisaron los cortes (6 por grupo) en tampón detergente triple y el contenido del nivel de mielina se analizó por ELISA de MBP (Ejemplo 4).

Se administró IL-17F (1 ng/ml, 10 ng/ml o 100 ng/ml) al final del tratamiento desmielinizante. El medio se cambió los días alternos durante 8 días más y el tratamiento con IL-17F se renovó en cada cambio.

Los resultados mostrados en la Fig. 7 representan un grupo de datos individuales de dos experimentos independientes.

Resultados

Los resultados de este experimento se muestran en Fig. 7. La adición de 10ng/ml o 100 ng/ml de IL-17F al medio después de la inducción de la desmielinización aumentó significativamente el contenido de MBP durante la fase de remielinización.

Conclusión

En un modelo de desmielinización mediado por autoinmunología, IL-17F induce la remielinización después del episodio de desmielinización inducido por anti-MOG y complemento.

Ejemplo 7

IL-17F aumenta la liberación de IL-6 en ratones DRG (Fig. 8)

Introducción

Algunas pruebas sugieren que IL-6 es un regulador de la supervivencia neuronal y la diferenciación en el sistema nervioso central y periférico. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la producción de IL-6 por explantes de DRG (ganglio de la raíz dorsal) tratados con 3 miembros de la familia de IL-17.

Materiales y métodos

Los DRG se aislaron a partir de ratones C57/negro de P2-5 días. Los explantes de DRG fueron puestos en placa en una placa de 96 pocillos revestida con poli-D-lisina, en medio de RPMI 1640 (Invitrogen, suplementado solo con glutamina y pen/strep), dos explantes/pocillo, y se trataron con IL-17A, IL-17F (a 0,1, 1, 10 ó 100 ng/ml) o IL-17E (a 1, 10 ó 100 ng/ml), todos de Peprotech. El control negativo consistió en medio RPMI solo, y se usó NGF como control positivo (100 ng/ml), debido a sus efectos conocidos con el crecimiento de neuritas. Los explantes se incubaron en CO₂ al 5%, 37°C durante 3 días. Se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron para IL-6 de ratón, usando un ELISA comercial (de R&D).

Resultados

Como se muestra en la Fig. 8, la liberación de IL-6 en DRG de ratón fue significativamente inducida por IL-17A y IL-17F, de una forma dependiente de la concentración. En comparación, IL-17E, a concentraciones similares indujo poca o ninguna liberación de IL-6.

Conclusión

Dos miembros de la familia de IL-17, IL-17A y IL-17F, fueron capaces de inducir significativamente la liberación de IL-6 por DRG de ratón.

Ejemplo 8

Efecto de IL-17F en la encefalomyelitis autoinmune experimental (EAE) inducida por MOG en ratón (Fig. 9)

Introducción

La IL-17F es una citoquina con funciones pleiotrópicas, incluyendo propiedades inmuno-reguladoras. IL-17F puede desempeñar también un papel de modulador neuronal y función de la glia. El objetivo de este estudio era analizar el efecto terapéutico de IL-17F en el modelo de EAE inducido por MOG en ratón.

Materiales y métodos

El método de inducción de EAE usado para este estudio se ha adaptado del protocolo publicado por Sahrbacher *et al.* (1998). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones institucionales.

Animales

Se usaron ratones hembra C57 BL/6JICO de la colonia IFFA CREDO (Saint Germain sur l'Arbresle, Francia), proporcionados por Charles River Italia (Calco, Lecco, Italia). Esta cepa seleccionada se ha documentado susceptible a EAE.

Los animales se aclimataron al menos 5 días antes de que el estudio fuera iniciado. En este periodo los animales se observaron diariamente para asegurarse de que mantenían cierto estado de salud para el estudio.

Edad y peso corporal: aproximadamente de 8 semanas; 18-22 g.

Condiciones de alojamiento, los animales se mantuvieron en las siguientes condiciones

- 10 animales/jaula en habitaciones con aire acondicionado

- Temperatura: 22°C ± 2

- humedad relativa: 55% ± 10

- Cambios de aire: aproximadamente 15-20/hora filtrado con HEPA al 99,99%

- Luz: ciclo de 12 horas (7 a.m. - 7 p.m.)

Dieta: Una dieta de peletes GLP 4RF25 certificado producido por la franquicia de alimentación Charles River Italia Mucedola S.r.l., Settimo Milanese. Para facilitar la nutrición de los animales enfermos, desde el día 7 se colocaron los peletes cada día en el fondo de la jaula.

Agua: A partir del sistema de la red del agua municipal. El agua se filtró y se distribuyó "ad libitum" a los animales vía un sistema de válvulas automático.

Procedimiento de inmunización

Se inmunizaron 3 grupos de 10 ratones hembras (día=0) inyectando subcutáneo en el flanco izquierdo 0,2 ml de una emulsión compuesta de 200 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅ (Neosystem, Estrasburgo, Francia) en adyuvante completo de Freund (CFA, Difco, Detroit, EE.UU.) que contenía 0,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis*. Inmediatamente después, reciben una inyección i.p. de 500 ng de toxina pertussis (List Biological Lab., Campbell, CA, EE.UU.) disuelta en 400 µL de tampón (NaCl 0,5 M, 0,017% de Triton X-100, Tris 0,015 M, pH = 7,5). En el día 2, se administra una segunda inyección i.p. a los animales de 500 ng de toxina pertussis. En el día 7, los ratones reciben una segunda dosis de 200 µg de péptido MOG₃₅₋₅₅ en CFA inyectado s.c. en el lado derecho. Comenzando aproximadamente a partir del día 8-10, este procedimiento da como resultado una parálisis progresiva gradualmente, que surge desde la cola y asciende hasta las extremidades delanteras.

Protocolo de tratamiento

El tratamiento de los grupos inmunizados según se describe anteriormente, se inició para cada animal en la aparición de un resultado clínico ≥1 y continuó durante 21 días consecutivos. Los animales se trataron diariamente como sigue:

grupo 1: grupo control tratado por ruta subcutánea con vehículo solo (NaCl al 0,9% + BSA al 0,1% en un volumen de 10 ml/kg).

grupo 2: Se administró mIFNβ por ruta subcutánea con la dosis de 20.000 U/ratón en un volumen de 200 µl/ratón.

grupo 3: tratado con IL-17F a 2,5 µg/kg administrado por ruta subcutánea en un volumen de 10 ml/kg.

Se usó vehículo (NaCl al 0,9% + BSA al 0,1%) para diluir IL-17F y PBS para diluir mIFNβ a las concentraciones apropiadas.

Observaciones clínicas

Comenzando por el día 7 después de la inmunización los animales se examinaron individualmente según la presencia de parálisis mediante los resultado clínico siguientes:

- 0 = sin signos de enfermedad
- 0,5 = parálisis parcial
- 1 = parálisis de la cola
- 1,5 = parálisis de la cola + parálisis parcial unilateral de las extremidades traseras
- 2 = parálisis de la cola + debilidad o parálisis parcial bilateral de las extremidades traseras
- 2,5 = parálisis de la cola + parálisis parcial de las extremidades traseras (pelvis baja)
- 3 = parálisis de la cola + parálisis completa de las extremidades traseras
- 3,5 = parálisis de la cola + parálisis de las extremidades traseras completa + incontinencia
- 4 = parálisis de la cola + parálisis de las extremidades traseras + debilidad o parálisis parcial de las extremidades delanteras
- 5 = moribundo o muerto

La observación de los animales se llevó a cabo en una habitación tranquila. Los signos clínicos son monitorizados diariamente en cada grupo de tratamiento en un modo de experimentación ciego por un técnico que ignoraba los tratamientos. El peso corporal de los animales se controló diariamente.

Se examinaron los animales que se consideraban con sufrimiento doloroso o en condición moribunda por personal veterinario o personal autorizado y, si fuera necesario, se sacrificaron humanamente para minimizar el dolor innecesario o sufrimiento.

Evaluación de los datos

Los resultados de los exámenes clínicos se expresaron como el valor promedio ($\pm$ SEM) dentro de cada grupo. Los efectos de las sustancias de ensayo (IL-17F y mIFN β) se compararon con los de los del grupo control positivo tratados con vehículo (grupo 1). Las diferencias en los valores de los resultados clínicos entre grupos se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis seguido de, en caso de significancia, por la prueba de Wilcoxon pareada, en cada tiempo de medida. Se usó el software S- Plus@.

Resultados

Los ratones tratados con vehículo desarrollaron la enfermedad alcanzando un pico el día 4 después del inicio de la enfermedad (resultados clínicos ≥ 1) con un valor de resultado promedio de $2,3 \pm 0,2$ (Fig 9). El tratamiento crónico con IL-17F en la dosis de $2,5 \mu\text{g/kg}$ subcutáneo mostró un efecto ligero pero continuo sobre los resultados clínicos. El compuesto de referencia mIFN β administrado al inicio (resultados clínicos ≥ 1) a la dosis de 20,000 U/ratón subcutáneo redujo significativamente la invalidez clínica como se muestra en la Fig. 9.

Conclusión

Estos datos sugieren que la IL-17F dada a una dosis relativamente baja no tienen ningún efecto pro-inflamatorio, y mejora bastante los efectos clínicos en la EAE de ratón, y puede, por lo tanto, ser un tratamiento para la esclerosis múltiple.

Ejemplo 9

Efecto anti-inflamatorio de IL-17F sobre la inflamación de médula espinal inducida por corte del nervio ciático (Fig. 10)

Introducción

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar el efecto de IL-17F en un modelo de inflamación de médula espinal retrógrado después de un corte del nervio ciático. En este modelo se usó dexametasona como control positivo.

*Materiales y Métodos**Animales*

5 Se usaron veintiún ratas bebés Wistar de 2 semanas a partir de dos diferentes camadas (Charles River, Francia). Se dividieron en 4 grupos (n = de 4 a 6): (a) grupo operado con corte del nervio vehículo; (c) corte del nervio/IL-17F (0,1 mg/kg); (d) corte del nervio/IL-17F (0,01 mg/kg); (e) dexametasona (0,5 mg/kg).

10 Los animales fueron mantenidos con sus madres respectivas en jaulas individuales y se mantuvieron en una habitación a temperatura regulada (21-22°C) y un ciclo de luz-oscuridad revertido (12h/12h) con alimentos y agua disponible *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones institucionales.

Lesión del nervio ciático

15 Los animales se anestesiaron por inhalación de Isofluran® al 3% (Baxter). El nervio ciático derecho se expuso quirúrgicamente a un nivel del muslo medio y se cortó a 5 mm proximal respecto a la trifurcación del nervio ciático. La lesión se cerró con pegamento quirúrgico.

Planificación de los experimentos y tratamiento farmacológico

20 Se registraron el peso corporal y la tasa de supervivencia cada día. El peso corporal y la tasa de supervivencia se registraron todos los días.

25 Se administraron diariamente IL-17F o dexametasona mediante inyecciones por rutas subcutáneas (subcutáneo) desde el día de la cirugía (4 horas antes de la cirugía). Los tratamientos se repitieron los siguientes dos días. El vehículo consistió en acetato de sodio 50 mM + NaCl 150 mM pH5 y se diluyó en NaCl al 0,9% para conseguir la misma concentración que los animales que recibieron IL-17F. Todos los animales fueron sacrificados a 3 dpi con una sobredosis de pentobarbital (100 mg/kg), y perfusionados con PBS. Las médulas espinales fueron entonces retiradas y sometidas a inmunotinción.

Análisis por citometría de flujo (FACS) de la infiltración de leucocitos

35 En el sacrificio (3 días después de la lesión), los animales se sometieron a perfusión con PBS. Las médulas espinales se diseccionaron entonces (parte anterior y parte posterior), se picaron y se incubaron en collagenasa (8 mg/ml) y ADNsa al 1% durante 2h a 37°C. La parte anterior representa la parte de la médula espinal que no tiene inflamación, mientras que la parte posterior representa la parte inflamada (contiene la región lumbar L4-L5 en la que el nervio ciático tiene sus raíces). Los pedazos fueron mecánicamente disociados entonces con un pipeteado y se pasaron a través de un malla de 70 micrones. Las células se lavaron entonces y se bloquearon en BSA al 1%, NaN3 al 0,01% e IgG de conejo (3 ug/ml) durante 30 min, y se incubaron en anticuerpos anti-CD45 de ratón conjugado con ficoeritrina y anticuerpos anti-CD11 de conjugados con fluoresceína (25 ug/ml, de R&D) durante 45 min. The células se analizaron entonces en FACSCalibur de Becton Dickinson. El porcentaje de células CD45 y CD 11 positivas se representó en una gráfica, para las partes anterior y posterior de las médulas espinales, para todos los tratamientos. Se tomaron de cuatro a seis animales para cada tratamiento.

Análisis de datos

50 El análisis global de los datos se realizó usando ANOVA unimodal. El ensayo de Dunnett se usó después, y los datos se compararon con el control “vehículo”. El nivel de significancia fue puesto a: p < 0,001; b: p < 0,01; c: p < 0,05; d: p < 0,1. Los resultados se expresaron como el promedio ± error estándar del promedio (s.e.m.).

*Resultados**Peso del animal*

60 Los animales tratados con dexametasona perdieron significativamente peso corporal durante el estudio (no mostrado). Todos los animales sobrevivieron a los procedimientos del nervio cortado durante todo el estudio.

Análisis por citometría de flujo (FACS) de la infiltración de leucocitos (Fig. 10)

65 Tres días después del corte del nervio, la infiltración de leucocitos en la parte posterior de la médula espinal se redujo en los animales tratados con IL-17F o dexametasona en comparación con los tratados con animales vehículo.

Conclusiones

La IL-17F humana recombinante inyectada subcutáneamente indujo una disminución del número de células inflamadas dentro de la médula espinal, sugiriendo que IL-17F ejerce efectos antiinflamatorios.

Ejemplo 10

Efecto de IL-17F sobre la liberación de citoquina medido en el modelo animal de liberación de TNF- α inducida por LPS (Fig. 11)

Materiales y Métodos

El modelo de liberación de TNF- α inducido por lipopolisacárido (LPS) en ratón fue puesto según la solicitud de patente W098/38179. Se inyectó LPS (0111:B4; SIGMA) (0,3 mg/kg, i.p.) en ratón C3H/HeN (Charles River, Francia). Noventa minutos más tarde la sangre fue tomada en muestras y se determinó el TNF- α en plasma usando un kit ELISA (R&D). La IL-17F humana recombinante y la dexametasona se diluyeron en NaCl y se inyectaron 15 minutos antes de la administración de LPS.

Se realizaron dos experimentos y los animales se trataron como sigue:

1. vehículo (NaCl), IL-17F a 1 mg/kg, 500, 100 μ g/kg, administrado por ruta i.v. o dexametasona a 0,1 mg/kg administrado por ruta subcutánea.

2. vehículo (NaCl) subcutáneo y i.v., IL-17F a 500 μ g/kg administrado vía subcutánea o ruta i.v.s.

Resultados

En el primer experimento (Fig. 11.A), se encontró que IL-17F inhibía la liberación de TNF- α inducida por LPS en un modo dependiente de la dosis invertida.

En el segundo experimento (Fig. 11.B) IL-17F administrado por ruta i.v. inhibió la liberación de TNF- α inducida por LPS en un 52%. También fue observada una disminución en la liberación de TNF- α con administración subcutánea de IL-17F, a pesar de tener una inhibición eficiente menos significativa.

Ejemplo 11

Efecto de la administración terapéutica de IL-17F sobre la neuropatía periférica diabética en ratas (Fig. 12)

La neuropatía periférica diabética representa una complicación común de la diabetes que puede afectar virtualmente a cada tejido del cuerpo y causa una morbilidad y mortalidad significativas. Aparece en más del 50% de pacientes que han sido hiperglucémicos durante más de 15 años e implica una degeneración de las fibras mielinizadas y defectos de la sensibilidad que pueden volverse incapacitadoras y irreversibles. Los pacientes con neuropatía sensoriomotora pueden sufrir de causalgia, hipersensibilidad táctil y parestesia. En una etapa más larga, pueden aparecer perturbaciones de la función motora. Esta enfermedad es una polineuropatía que afecta a diversas clases de fibras, conduce a la reducción de la velocidad de conducción del nervio, degeneración axonal y pérdida neuronal.

En este ejemplo la neuropatía diabética se indujo por una administración aguda de la estreptozotocina (=STZ - 55 mg/kg, I.V.), un antibiótico aislado de un caldo de fermentación de *Streptomyces achromogenes*, que se sabe que induce la diabetes en varias especies animales. En este modelo, aparecen la desmielinización y la pérdida axonal.

En esto el efecto de IL-17F se comparó con el efecto de IL-6 administrado subcutáneamente, que ya ha sido demostrado que desempeña una actividad neuroprotectora.

Materiales y Métodos

Inducción de la enfermedad

Se hicieron diabéticas ratas macho Sprague-Dawley (200-225 g) por inyección intravenosa de estreptozotocina (55 mg/kg). Una semana más tarde, se confirmó la diabetes en ratas a las que se les había inyectado STZ obteniendo una muestra de sangre de la vena de la cola y midiendo la concentración de glucosa usando un monitor de glucosa. Solo las ratas tratadas con STZ con plasma-glucosa > 260 mg/dl se volvieron "diabéticas".

ES 2 324 306 T3

Los 60 animales fueron distribuidos aleatoriamente en los siguientes grupos (12 ratas por grupo):

grupo (n = 12)	Sustancia de ensayo	Dosis	Ruta de administración	Frecuencia	Tratamiento periodo (días después de la inmunización)
Gr. 1	No diabético	-	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40
Gr.2	vehículo	-	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40
Gr.3	IL-17F	0,3 mg/kg	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40
Gr.4	IL-17F	0,1 mg/kg	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40
Gr.5	IL-17F	0,03 mg/kg	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40
Gr.6	r-hIL-6	30 ng/kg	subcutáneo	diariamente	de 11 a 40

Ensayo de filamentos de Von Frey (para alodinia)

Se pusieron las ratas en un suelo de reja metálico. El análisis nociceptivo se hizo insertando el filamento de von Frey (Bioseb, Francia) a través del suelo de reja y aplicándolo a la superficie plantar de la pata trasera. Un ensayo consistió en varias aplicaciones de los diferentes filamentos de von Frey (a una frecuencia de 1-1,5 s). Los filamentos de von Frey se aplicaron a partir del filamento 10 g a 100 g. La presión que produce una retirada enérgica de la pata trasera se consideró como el valor umbral. El valor de corte fue puesto en 100 g.

Mediciones electrofisiológicas (el día 40 después de la administración de STZ)

Se realizaron registros electrofisiológicos usando una electromiografía Neuromatic 2000M (EMG) (Dantec, Les Ulis, Francia). Las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 60 mg/kg de clorhidrato de quetamina (Imalgene 500®, Rhone Merieux, Lyon, Francia). La temperatura normal del cuerpo fue mantenida a 30°C con una lámpara de calentamiento y controlada por un termómetro de contacto (Quick, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia) colocado en la superficie de la cola.

CMAP (potencial de acción en músculo del compuesto) se registró en el músculo gastrocnemius después de la estimulación del nervio ciático. Un electrodo de referencia y una aguja activa se pusieron en la pata trasera. Una aguja rectificada se insertó en la parte trasera inferior de la rata. Se estimuló el nervio ciático con un pulso 0,2 EM simple a una intensidad supramaximal. La velocidad de la onda motora fue registrada.

SNCV (velocidad de conducción de nervio sensitivo) también fue registrado. Los electrodos de la piel de la cola se colocaron como sigue: una aguja de referencia insertada en la base de la cola y una aguja ánodo situada a 30 mm de la aguja de referencia hacia la extremidad de la cola. Un electrodo de aguja de tierra se insertó entre las agujas del ánodo y de referencia. El nervio caudal se estimuló con una serie de 20 pulsos (durante 0,2 ms) a una intensidad de 12,8 mA. las velocidad se expresó en m/s.

Protocolo

- Día -7: línea de base (EMG)
- Día 0: inducción por la estreptozotocina
- Día 10: control de glucemia
- Día 11: Inicio del tratamiento
- Día 25: Evaluación del dolor
- Día 40: EMG y evaluación del dolor

Análisis de datos

Para los estudios de comportamiento y EMG se hizo un análisis global de los datos usando un factor o análisis de medidas repetidas de varianza (ANOVA). La prueba de Fisher o la prueba de Student-Newman-Keuls T se usaron para hacer múltiples comparaciones de grupos de prueba individuales con el grupo control o entre grupos pareados.

Resultados

10 *Ensayo de filamento de Von Frey (para alodinia) (Fig 12.A)*

La diabetes inducida por STZ resultó en una cantidad significativa de alodinia los días D25 y D40. Este efecto se invirtió por el tratamiento de IL-6 el día D25 pero se perdió el día D40.

15 Aunque no se alcanzaba una significancia estadística, el tratamiento de IL-17F a 0,1 y 0,3 mg/kg invirtió parcialmente la alodinia el día D25 ($p=0,069$, $p=0,085$, respectivamente) sugiriendo que IL-17F puede tener un efecto sobre la sensibilidad de las fibras.

20 *Mediciones electrofisiológicas (el día 40 después de la administración de STZ)*

CMAP (indicativo de la conducción de fibra nerviosa motora), Fig 12.B

La diabetes inducida por STZ retrasó significativamente los potenciales de acción motor del compuesto en comparación con los animales control/vehículo revelando daños nerviosos motores continuados potenciales.

Este efecto fue significativamente invertido por tratamiento con IL6 e IL-17F a una dosis de 0,3 mg/kg sugiriendo un efecto beneficioso de IL-17F en la funcionalidad nerviosa motora.

30 *SNCV (velocidad de conducción del nervio sensitivo), Fig 12.C*

La diabetes inducida por STZ redujo significativamente la velocidad nerviosa sensorial. El tratamiento con IL6 e IL-17F a 0,3 y 0,1 mg/kg mejoró significativamente SNCV sugiriendo que IL-17F puede tener también un efecto beneficioso sobre las fibras sensoriales. Las diferencias observadas entre los grupo control/vehículo los días D-7 y D40 refleja el aumento natural en SNCV debido a la maduración del sistema nervioso (Biessels *et al.*, 1999).

Conclusiones

40 El tratamiento con IL-17F en un modelo de diabetes inducido por STZ reveló un potencial efecto beneficioso en una lectura conductual de la alodinia mecánica que fue puesto en paralelo por la mejora significativa en la evaluación electrofisiológica motora y sensorial.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de IL-17F o de una molécula de ácido nucleico que codifica IL-17F, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurológica en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:
 - (a) un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1;
 - 10 (b) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 11 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - (c) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 21 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - 15 (d) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 31 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - (e) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 55 a 163 de SEQ ID NO: 1;
- 20 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad neurológica se asocia con la inflamación.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la inflamación es una neuro-inflamación.
4. El uso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad neurológica se selecciona entre el grupo que consiste en lesión nerviosa traumática, accidente cerebrovascular, enfermedades desmielinizantes del SNC o SNP, neuropatías y enfermedades neurodegenerativas.
- 25 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad neurológica está causada por un trastorno metabólico congénito.
- 30 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad neurológica es una neuropatía periférica.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la enfermedad neurológica es neuropatía diabética.
- 35 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple (MS).
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la esclerosis múltiple es una esclerosis múltiple recurrente-remitente.
- 40 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad desmielinizante se selecciona entre esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y síndrome de Guillain-Barre (SGB).
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ALS).
- 45 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que IL-17F se selecciona entre el grupo que consiste en:
 - 50 (a) un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 1;
 - (b) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 11 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - (c) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 21 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - 55 (d) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 31 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - (e) un polipéptido que comprende los aminoácidos de 55 a 163 de SEQ ID NO: 1;
 - 60 (f) una sal o proteína condensada, de cualquiera de (a) a (e).
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que IL-17F es dimérico.
14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que IL-17F se condensa a una molécula vehículo, un péptido o una proteína que promueve el atravesamiento de la barrera sangre cerebro.
- 65 15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la IL-17F está PEGilada.

ES 2 324 306 T3

16. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la proteína condensada comprende una fusión de inmunoglobulina (Ig).

5 17. El uso de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende además un interferón y/u osteopontina y/o clusterina, para su uso simultáneo, secuencial o separado.

18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el interferón es interferón-p.

10 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la IL-17F se usa en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

15 20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico comprende además una secuencia del vector de expresión.

20

25

30

35

40

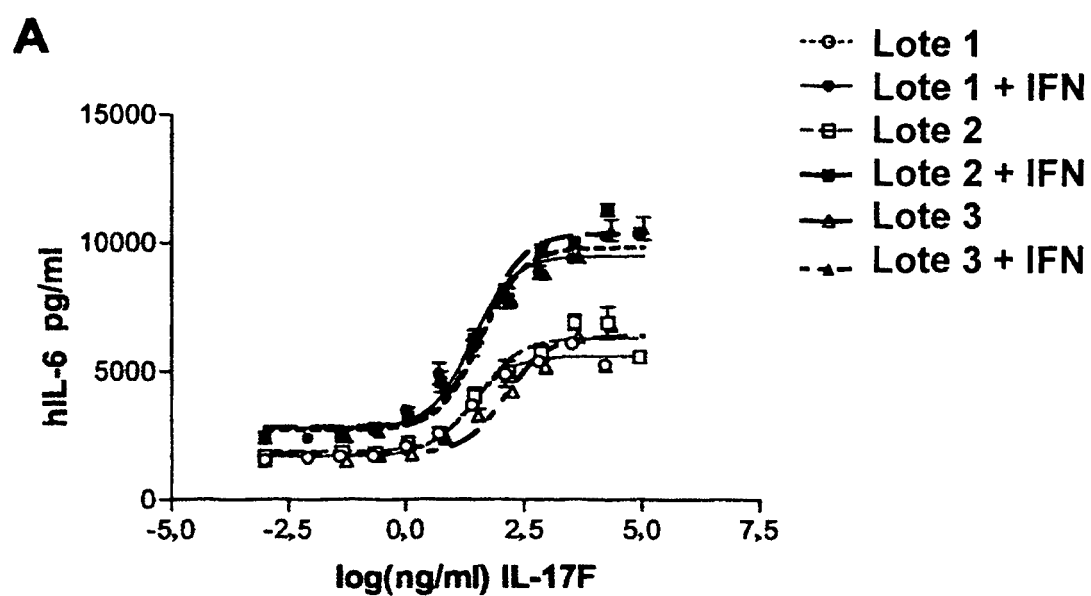
45

50

55

60

65



B

	Lote 1	Lote 1 + IFN	Lote 2	Lote 2 + IFN	Lote 3	Lote 3 + IFN
EC50	23	26	37	40	135	41

FIG. 1

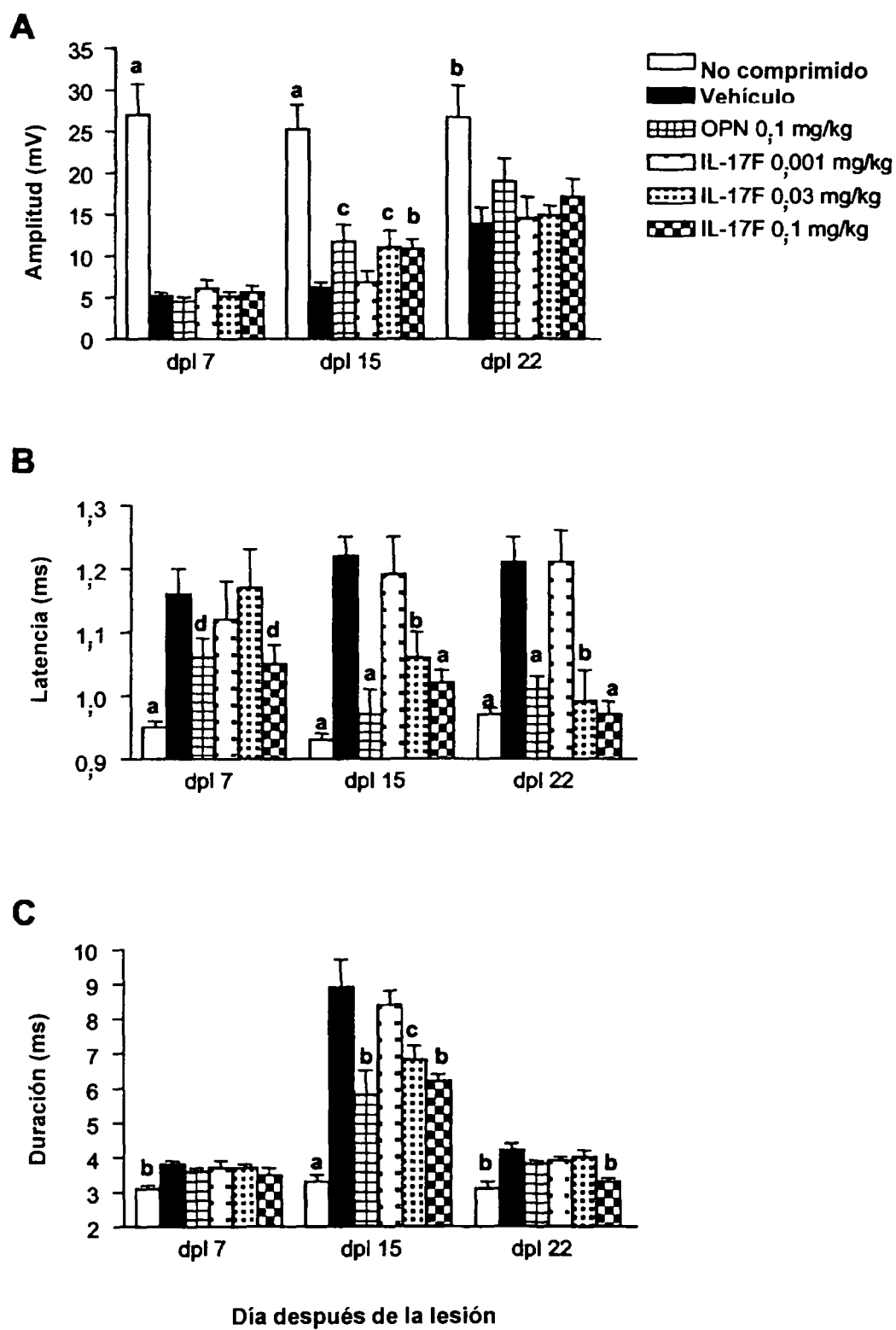


FIG. 2

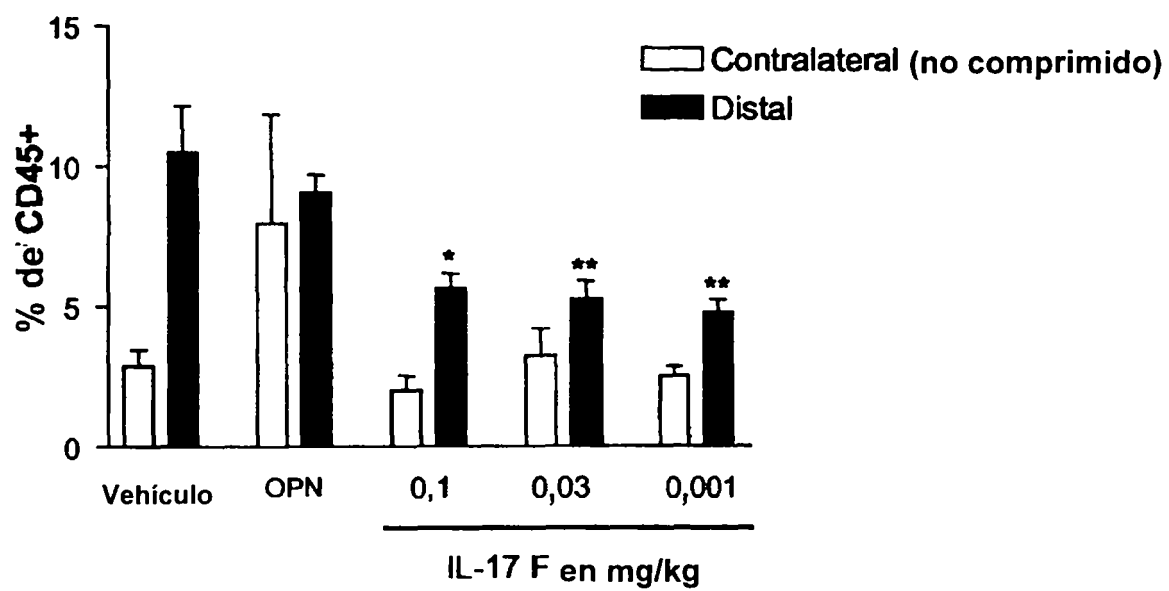
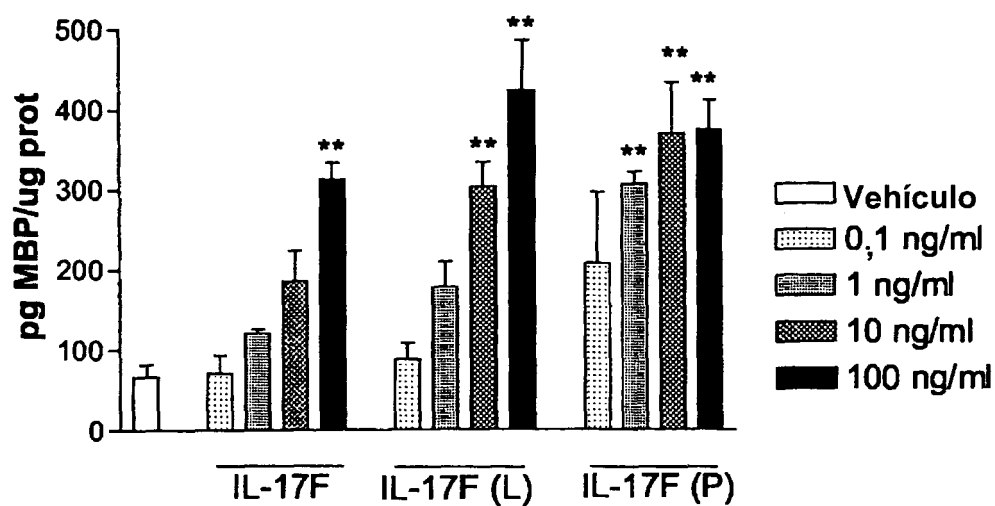


FIG. 3

A



B

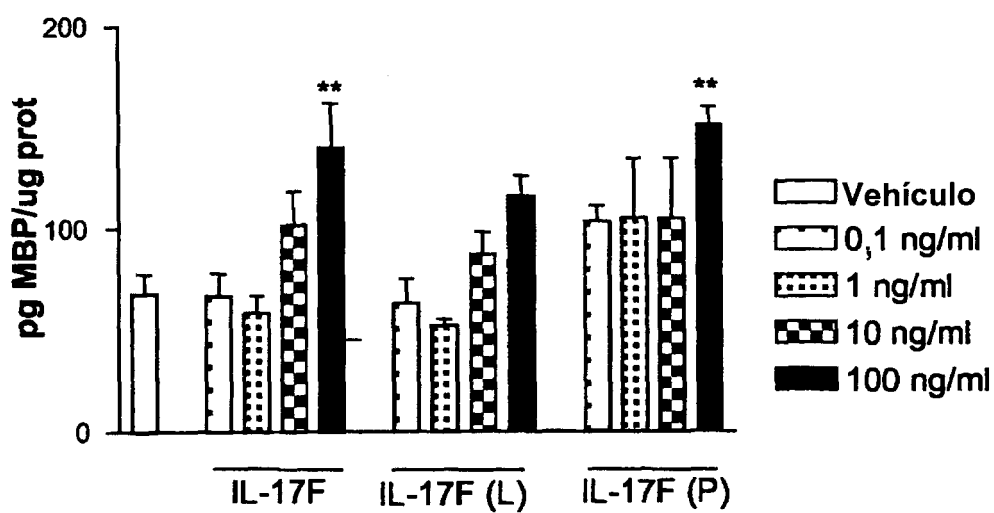


FIG. 4

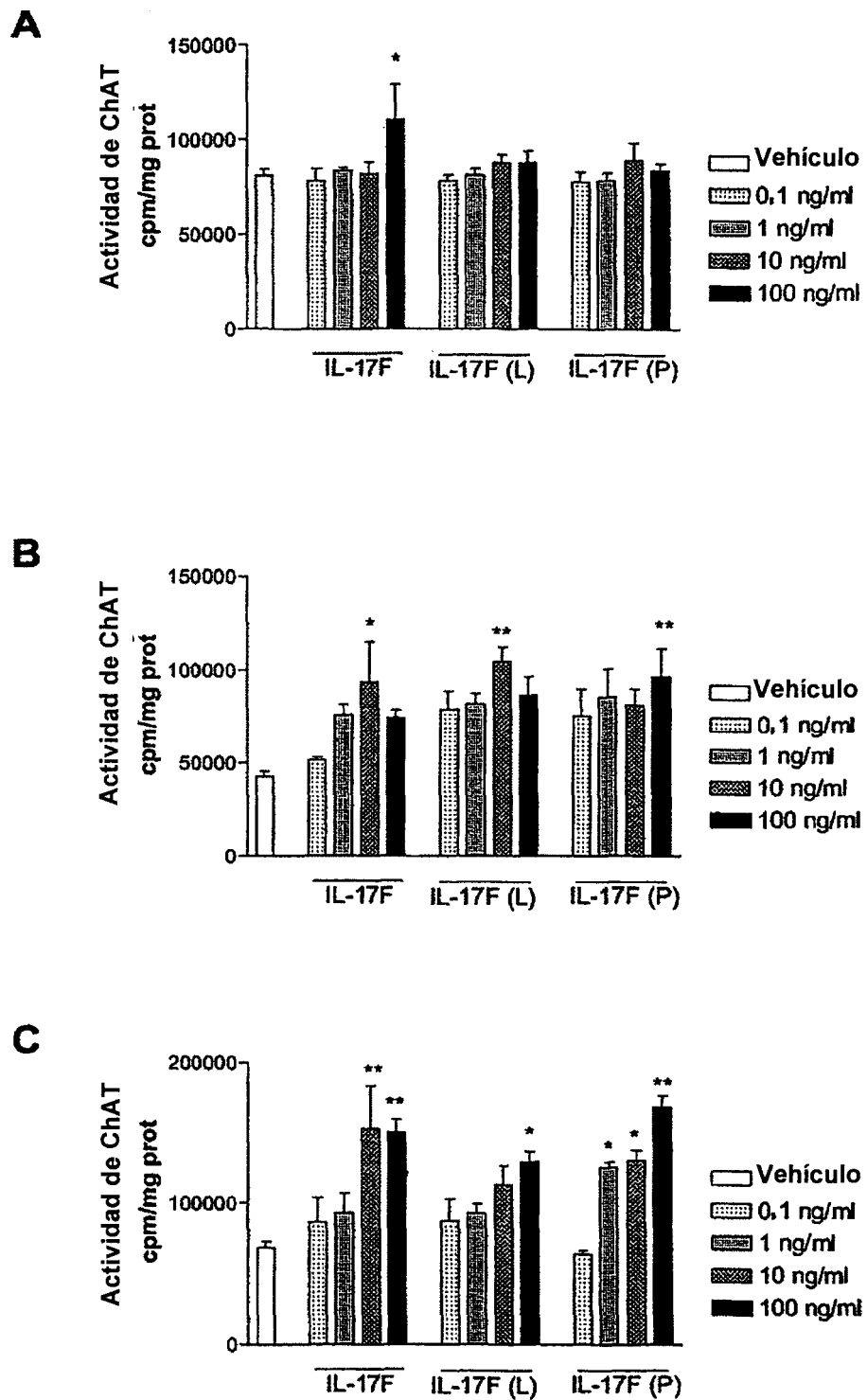


FIG. 5

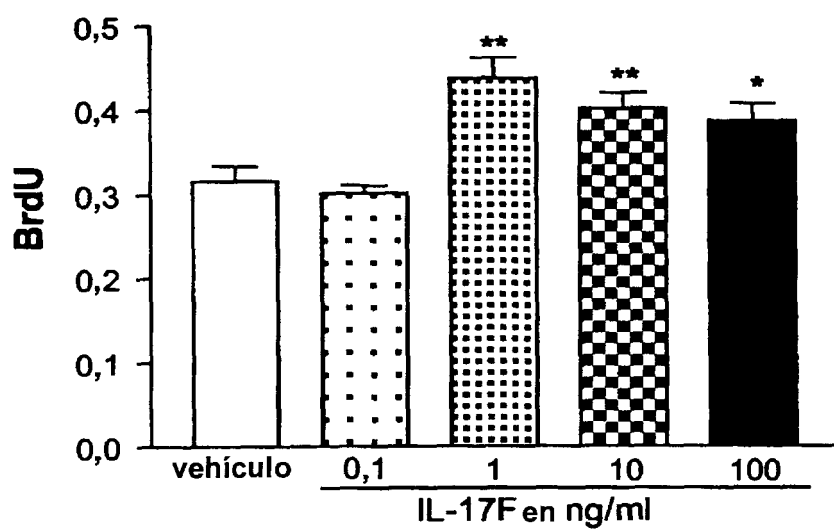


FIG. 6

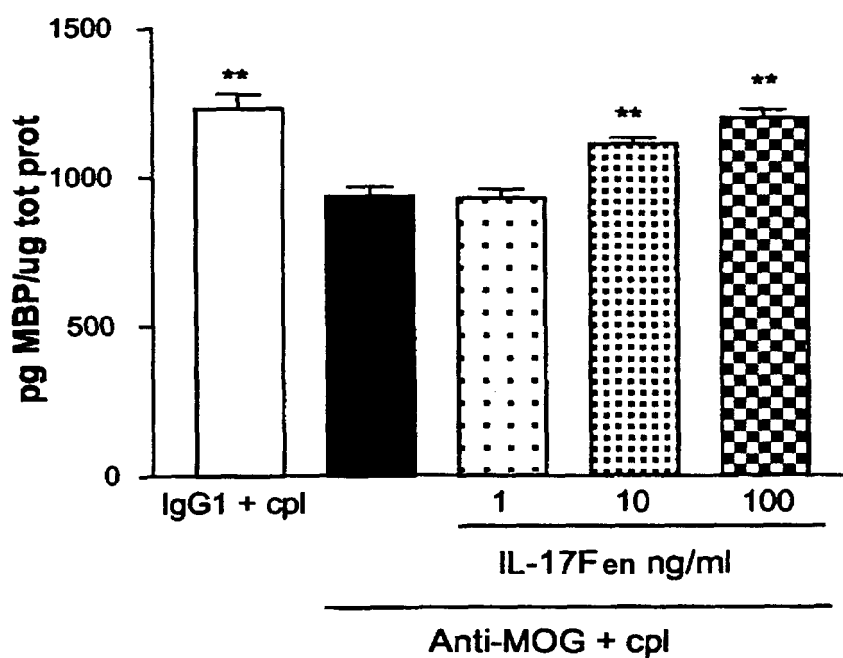


FIG. 7

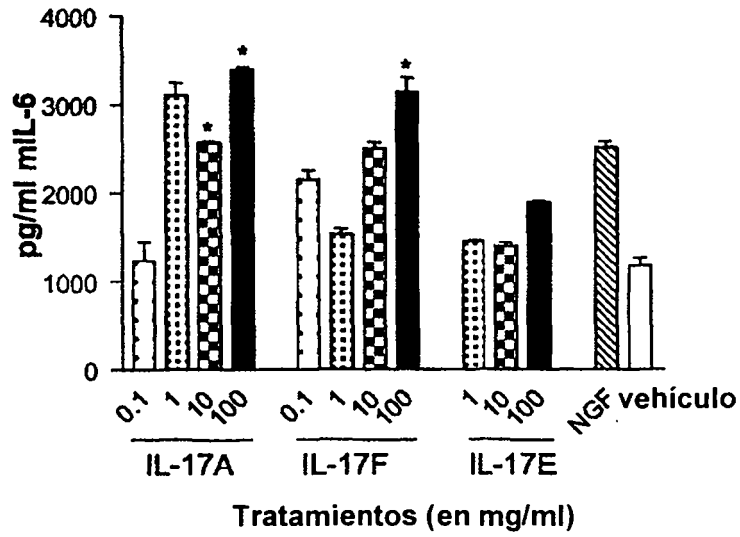


FIG. 8

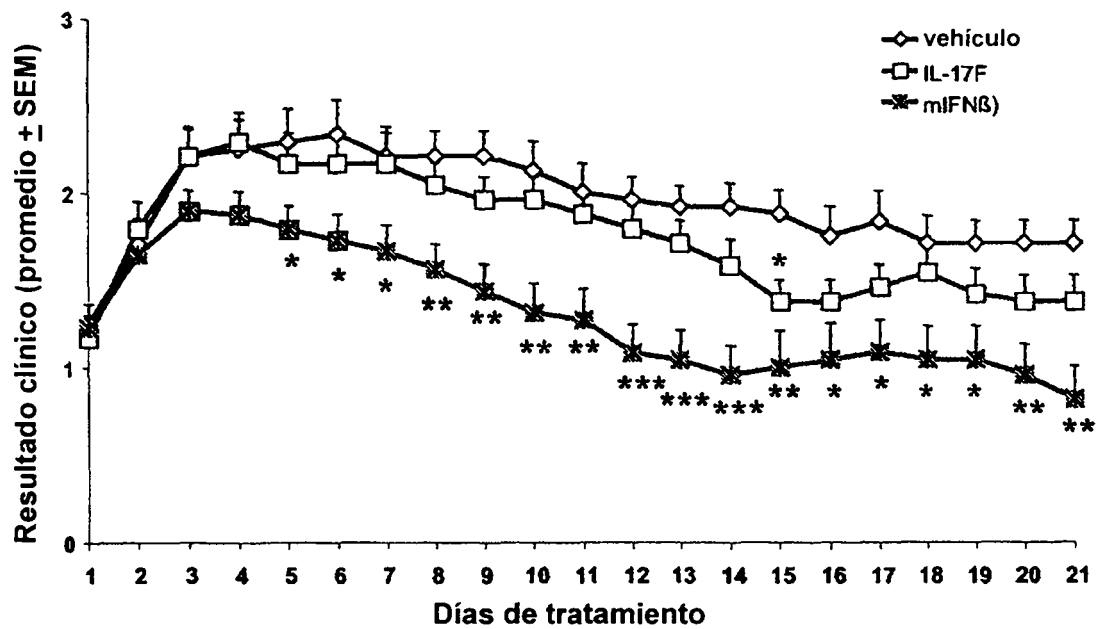


FIG. 9

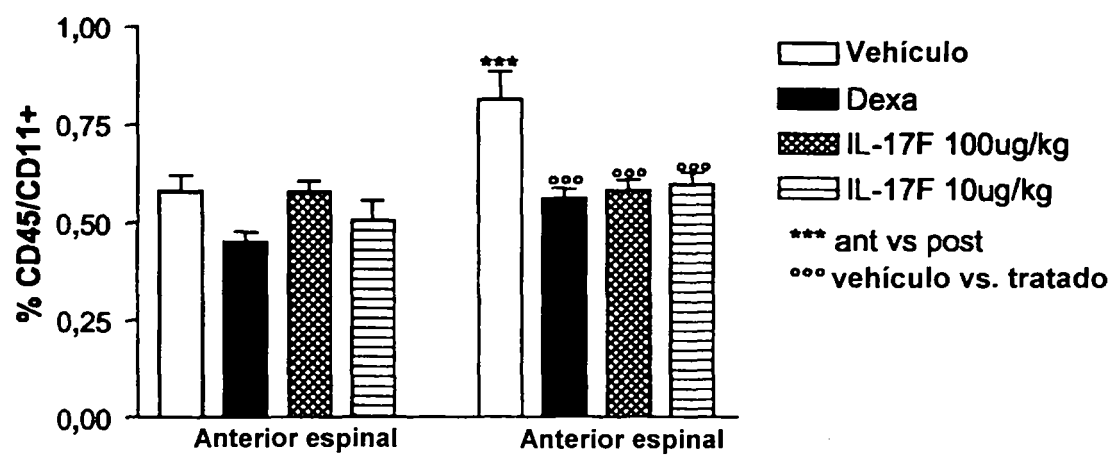


FIG. 10

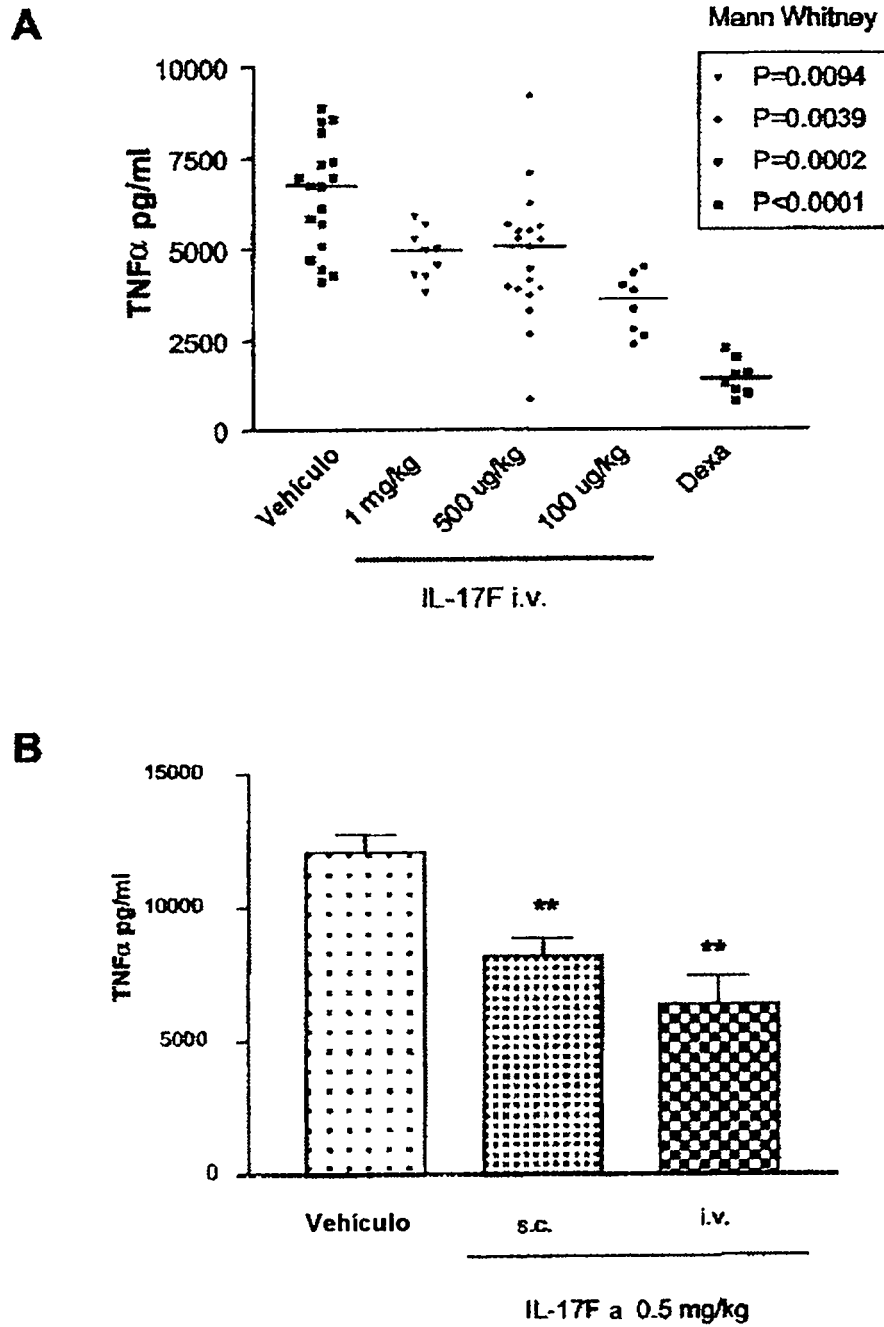


FIG. 11

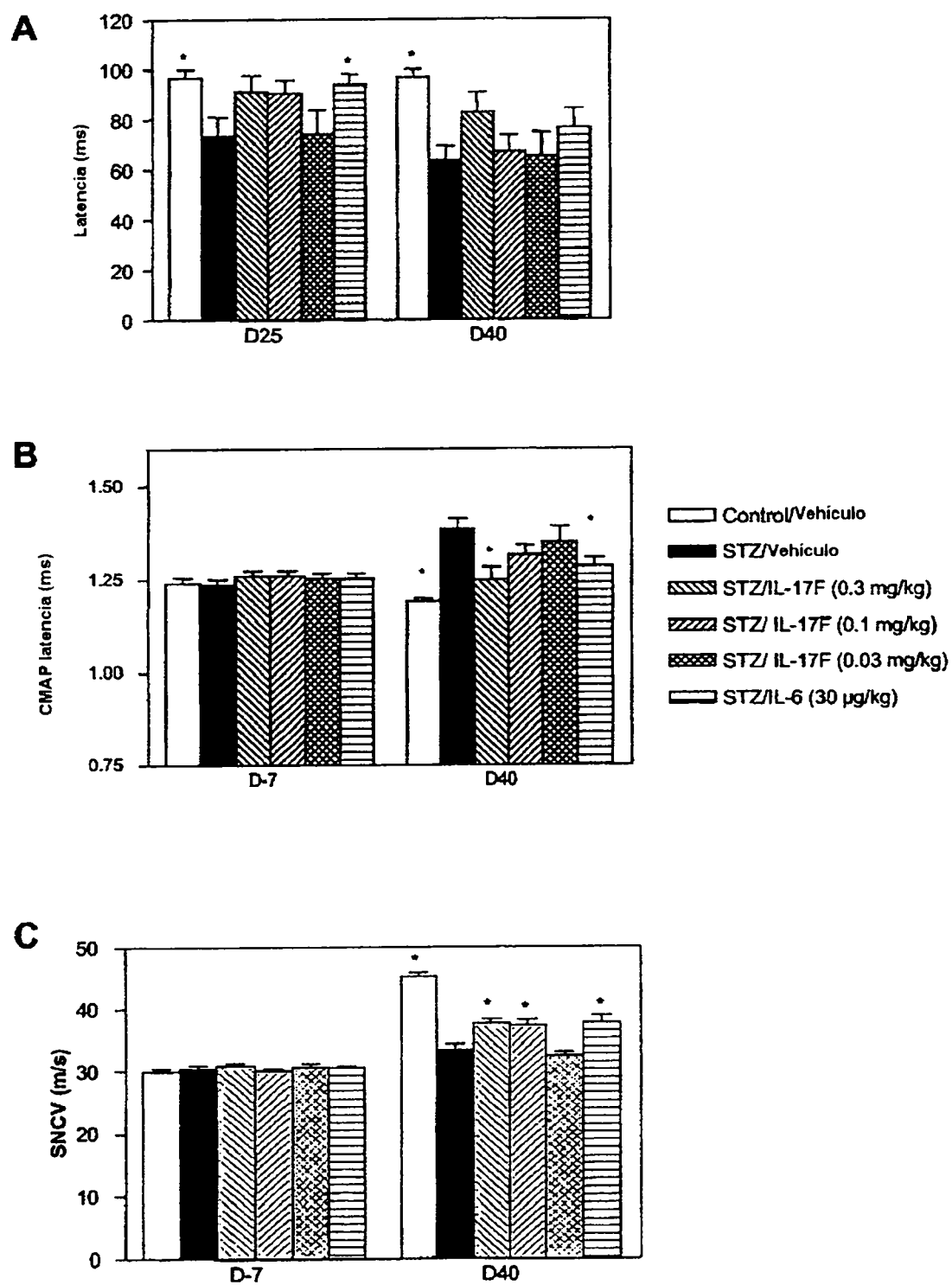


FIG. 12

ES 2 324 306 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.
 <120> Uso de IL-17F para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurológicas
 <130> 1004 WO
 <150> Documento EP04104573.3
 <151> 2004-09-21
 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 1
 Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
 20 25 30
 Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
 35 40 45
 Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
 50 55 60
 Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
 85 90 95
 Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
 100 105 110
 Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
 115 120 125
 Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
 130 135 140
 Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
 145 150 155 160
 His Val Gln
 <210> 2
 <211> 492
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 324 306 T3

<400> 2

	atgacagtga agaccctgca tggcccagcc atggtcaagt acttgetgct gtcgatattg	60
5	gggcttgccct ttctgagtga ggcggcagct cggaaaatcc ccaaagtagg acatactttt	120
	ttccaaaagc ctgagagttg cccgcctgtg ccaggaggta gtatgaagct tgacattggc	180
	atcatcaatg aaaaccagcg cgtttccatg tcacgtaaca tcgagagccg ctccacctcc	240
10	ccctggaatt acactgtcac ttgggacccc aaccggtacc cctcggaagt tgtacaggcc	300
	cagtgtagga acttgggctg catcaatgct caaggaaagg aagacatctc catgaattcc	360
	gttcccatcc agcaagagac cctggtcgtc cggagggaagc accaaggctg ctctgtttct	420
15	ttccagttgg agaagggtgct ggtgactgtt ggctgcacct gcgtcacccc tgatcatccac	480
	catgtgcagt aa	492
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		