



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 329 636**

⑫ Número de solicitud: 200600386

⑬ Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**C12N 5/0797** (2010.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑮ Fecha de presentación: **17.02.2006**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2009**

Fecha de la concesión: **02.07.2010**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **26.07.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**26.07.2010**

⑲ Titular/es: **Universitat de Valencia - Estudi General**  
(Titular al 70 %)

**OTRI-Avda. Blasco Ibáñez, 13**

**46010 Valencia, ES**

**Universidad de Castilla-La Mancha** (Titular al 30 %)

⑳ Inventor/es: **Fariñas Gómez, Isabel;**  
**Andreu Agulló, Celia;**  
**Rodríguez Ferrón, Sacramento;**  
**Ramírez Castillejo, Carmen;**  
**Sánchez Gómez, Pilar;**  
**Mira Aparicio, Helena;**  
**Escribano Martínez, Julio;**  
**Sánchez Sánchez, Francisco y**  
**Aroca Aguilar, José Daniel**

㉑ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

㉒ Título: **Uso del factor PEDF para inducir la auto-renovación de células madre.**

㉓ Resumen:

Uso del factor PEDF para inducir la auto-renovación de células madre.

La presente invención se refiere al uso específico de la molécula PEDF (Factor Derivado del Epitelio Pigmentado) en la inducción y/o potenciación de la auto-renovación de células madre en cultivo. La presente invención también se refiere al uso de esta molécula para la activación de células madre en distintos tejidos mediante la administración exógena de PEDF a dichos tejidos. Se contempla además el uso del PEDF para fabricar composiciones farmacéuticas para auto-renovación celular que al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

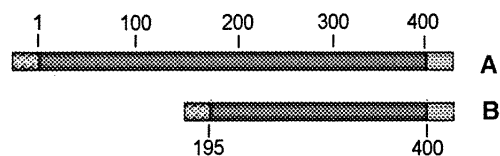


Fig. 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Uso del factor PEDF para inducir la auto-renovación de células madre.

5 **Campo de la invención**

Esta invención está dentro del campo de la Bioquímica y la Biología Celular. En particular, la invención se refiere al uso específico de la molécula PEDF (Factor Derivado del Epitelio Pigmentado) en la inducción y/o potenciación de la auto-renovación de células madre en cultivo. La presente invención también se refiere al uso de esta molécula para la activación de células madre en distintos tejidos mediante la administración exógena de PEDF a dichos tejidos. Se contempla además el uso de composiciones farmacéuticas para auto-renovación celular caracterizadas por con-  
 10 tener al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 **Antecedentes de la invención**

El factor PEDF (Factor Derivado del Epitelio Pigmentado) es un miembro de la superfamilia de las serpinas (inhibidores de la proteasa de serina), aunque carece de la actividad inhibidora de proteasas. El PEDF humano consta de 418 aminoácidos, un péptido señal para secreción y está N-glicosilado en Asn285. El producto secretado tiene un  
 20 peso molecular aparente de 50 kDa. Se han descrito en la molécula PEDF dos regiones:

- 1) Asp44-Asn77 (34 aminoácidos), con actividad anti-angiogénica,
- 2) Val78-Thr121 (44 aminoácidos), con actividad neurotrófica.

El factor PEDF es una proteína multifuncional y anteriormente en el estado de la técnica se ha demostrado su eficacia como:

- a) Estimulador de diferenciación neuronal, en células de neuroblastoma.
- b) Factor que produce disminución de fenotipo maligno, en células tumorales de próstata.
- a) Estimulador de crecimiento neurítico, en neuronas motoras.
- b) Neuroprotector frente a estímulos que inducen muerte neuronal apoptótica, en neuronas de la retina, gran-  
 35 nulares del cerebelo, hipocampales, y neuronas motoras.
- c) Factor bloqueante de proliferación, en células de microglía.
- d) Factor inductor de apoptosis, en células tumorales.
- e) Factor inductor de apoptosis, en células endoteliales.
- f) Factor bloqueante de migración celular, en células endoteliales.
- g) Factor anti-angiogénico y anti-vasculogénico, en células endoteliales.

Por lo tanto, en relación con el uso del factor PEDF, anteriormente en el estado de la técnica se ha propuesto como un factor potencialmente útil en el desarrollo, mantenimiento, y función de la retina y para el tratamiento de degenera-  
 50 ción retiniana, especialmente de la mácula, inducida por luz, edad, diabetes, glaucoma o enfermedades genéticas como la retinitis pigmentosa, en las que la neovascularización es un agravante [WO0224234; WO02058730; WO04028635; WO04027019; WO0181551; US020194639; US030087859; US010049369; Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K. (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-in-  
 55 duced cell death. *J Cell Physiol.*, 202(2):570-8; Takita H, Yoneya S, Gehlbach PL, Duh EJ, Wei LL, Mori K. (2003) Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(10):4497-504; Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Sakamoto T, Tabata T, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Ishibashi T, Sueishi K. (2003) Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of  
 60 Surgeons rats. *Gene Ther.* 10(17):1503-11. Auricchio A, Behling KC, Maguire AM, O'Connor EM, Bennett J, Wilson JM, Tolentino MJ. (2002) Inhibition of retinal neovascularization by intraocular viral-mediated delivery of anti-angiogenic agents. *Mol Ther.*, 6(4):490-4. 5. Mori K, Gehlbach P, Ando A, McVey D, Wei L, Campochiaro PA. (2002) Regression of ocular neovascularization in response to increased expression of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 43(7):2428-34. 6. Raisler BJ, Berns KI, Grant MB, Beliaev D, Hauswirth WW. (2002) Ade-  
 65 no-associated virus type-2 expression of pigmented epithelium-derived factor or Kringle 1-3 of angiostatin reduce retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 25;99(13):8909-14. Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M. (2001) Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res.* 22(4):245-52. Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, Ettyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA. Pigment epithelium-derived factor

inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol.*, 188(2):253-63. Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Szate S, Mrazek D, McGinnis JF. (2001) *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(7):1646-52. Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. (2001) Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(5):2593-7. Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C. (1999) Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis.*, 6(6):523-32. Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF. (1999) Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res.*, 57(6):789-800].

Por otro lado, también es conocido que el factor PEDF es un factor potencialmente útil para la neuroprotección de neuronas en procesos neurodegenerativos o de daño neuronal [WO0224234; WO02058730; WO04028635; WO04027019; WO0181551; US020194639; US030087859; US010049369; Cao W, Tombran-Tink J, Chen W, Mrazek D, Elias R, McGinnis JF. (1999) Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res.*, 57(6):789-800. Hounou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, Becerra SP. (1999) Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons. *J Comp Neurol.*, 412(3):506-14. Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, Lehar M, Tombran-Tink J, Kuncel RW. (1999) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 58(7): 719-28. DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, Bazan NG. (1999) Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons. *J Neurosci Res.*, 56(6):604-10. Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, Chader GJ, Etcheberrigaray R, Schwartz JP. (1997) Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity. *J Neurochem.*, 68(1):26-32. Taniwaki T, Becerra SP, Chader GJ, Schwartz JP. (1995) Pigment epithelium-derived factor is a survival factor for cerebellar granule cells in culture. *J Neurochem.* 1995 Jun; 64(6):2509-17. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 15;90(4):1526-301.

El factor PEDF también se ha descrito como un factor anti-tumoral por su efecto diferenciador en células tumorales y por su efecto de inhibición de la angiogénesis [US030082183; US040234505; WO050118136; US050222031; Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. (2006) Pigment Epithelium-derived Factor Inhibits Angiogenesis via Regulated Intracellular Proteolysis of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1. *J Biol Chem.*, 281(6):3604-13. Streck CJ, Zhang Y, Zhou J, Ng C, Nathwani AC, Davidoff AM. Adeno-associated virus vector-mediated delivery of pigment epithelium-derived factor restricts neuroblastoma angiogenesis and growth. *J Pediatr Surg.* 40(1):236-43. Wang L, Schmitz V, Perez-Medina villa A, Izal I, Prieto J, Qian C. (2003) Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol Ther.*, 8(1):72-9. Doll JA, Stellmach VM, Bouck NP, Bergh AR, Lee C, Abramson LP, Cornwell ML, Pins MR, Borensztajn J, Crawford SE. (2003) Pigment epithelium-derived factor regulates the vasculature and mass of the prostate and pancreas. *Nat Med.*, 9(6):774-80. Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW, Zhang WZ, Lu Y. (2003) Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol.*, 56(4):277-82. Dawson DW, Volpert OV, Gillis P, Crawford SE, Xu H, Benedict W, Bouck NP. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 285 (5425):245-8].

También se conoce su función diagnóstica de ciertas patologías neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, por el aumento de sus niveles en el líquido cefalorraquídeo, y de prognosis tumoral por su disminución en tumores [US050222031; Sidle DM, Maddalozzo J, Meier JD, Cornwell M, Stellmach V, Crawford SE. (2005) Altered pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor levels in lymphangioma pathogenesis and clinical recurrence. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 131(11):990-5. Matsumoto K, Ishikawa H, Nishimura D, Hamasaki K, Nakao K, Eguchi K. Antiangiogenic property of pigment epithelium-derived factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 40(1):252-9. Uehara H, Miyamoto M, Kato K, Ebihara Y, Kaneko H, Hashimoto H, Murakami Y, Hase R, Takahashi R, Mega S, Shichinohe T, Kawarada Y, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. (2004) Expression of pigment epithelium-derived factor decreases liver metastasis and correlates with favorable prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 64(10):3533-7. Guan M, Pang CP, Yam HF, Cheung KF, Liu WW, Lu Y. (2004) Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther.*, 11 (5):325-32. Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y, Watanabe H, Sugawara H, Nakamura H, Takeuchi M, Imaizumi T, Shimizu H. (2004) Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells *in vivo*. *Am J Pathol.*, 164(4):1225-32. Miyagishi D, Ohno-Matsui K, Amagasa T, Morita I. (2003) Regulation of the expression of pigment epithelium-derived factor, an anti-angiogenic factor in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett.*, 196(1):77-85. Guan M, Yam HF, Su B, Chan KP, Pang CP, Liu WW, Zhang WZ, Lu Y. Loss of pigment epithelium derived factor expression in glioma progression. *J Clin Pathol.*, 56(4):277-82. Abramson LP, Stellmach V, Doll JA, Cornwell M, Arensman RM, Crawford SE. (2003) Wilms' tumor growth is suppressed by antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in a xenograft model. *J Pediatr Surg.*, 38(3):336-42. Slavic I, Rodriguez IR, Mazuruk K, Chader GJ, Biegel JA. (1997) Mutation analysis and loss of heterozygosity of PEDF in central nervous system primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer.* 72(2):277-82. Seigel GM, Tombran-Tink J, Becerra SP, Chader GJ, Diloreto DA Jr, del Cerro C, Lazar ES, del Cerro M. (1994) Differentiation of Y79 retinoblastoma cells with pigment epithelial-derived factor and interphotoreceptor matrix wash: effects on tumorigenicity. *Growth Factors*, 10(4):289-97. Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. (1991) PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity. *Exp Eye Res.* 53

(3):411-4. Kuncel RW, Bilak MM, Bilak SR, Corse AM, Royal W, Becerra SP. (2002) Pigment epithelium-derived factor is elevated in CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.*, 81(1):178-84].

Sin embargo, el factor PEDF nunca ha sido descrito en bibliografía anterior como un factor relacionado con el comportamiento de células madre de ningún tipo y, por tanto, su utilización como inductor de la auto-renovación de células madre es un aspecto novedoso y por tanto, objeto de la presente invención. Es necesario puntualizar que, el efecto que en la presente invención se reivindica del factor PEDF como factor inductor de la auto-renovación de células madre, no guarda ninguna relación con los efectos previamente descritos en el estado de técnica para el PEDF en otros tipos celulares, como son la diferenciación celular, la supervivencia celular o la apoptosis. Por lo tanto, la presente invención proporciona un uso nuevo o aplicación del factor PEDF como un factor inductor de la auto-renovación de células madre.

### Descripción de la invención

La presente invención ofrece un método de potenciar la auto-renovación de células madre en cultivo aplicando exógenamente PEDF. La adición de PEDF a medios definidos favorece el mantenimiento en el cultivo de las células madre mediante su acción estimuladora de la división celular de tipo auto-renovante frente a la división celular diferenciadora, que conlleva la desaparición de las células madre del cultivo y su transformación en progenitores comprometidos a fenotipos celulares específicos. Esto conduce a la expansión de las células madre acompañada del mantenimiento del potencial de estas células.

La presente invención incluye el uso de la molécula “factor derivado de epitelio pigmentario” (PEDF) y/o cualquier derivado suyo para promover la auto-renovación en poblaciones de células madre, somáticas o embrionarias, de cualquier especie. Esta acción consiste en favorecer la replicación de células madre mediante división celular renovadora así como de la inducción de la expresión de moléculas que suelen estar aumentadas en células con fenotipo indiferenciado y multipotente. La invención incluye el uso de PEDF en células madre naturales así como en células madre modificadas genética o epigenéticamente. La invención también proporciona un método de estimular la activación de células madre somáticas endógenas, para producción de progenie diferenciada, mediante el uso de composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz de factor PEDF.

La expansión homogénea de una población de células madre en medios definidos *ex vivo* no es eficiente porque se observa que la propagación de estas células va acompañada de su derivación hacia células que tienen capacidad proliferativa expansiva pero que carecen de las propiedades de auto-renovación ilimitada y de multipotencia, propiedades inherentes al concepto de célula madre. El hecho de que la propagación de células madre cuando están en cultivo invariablemente se acompañe de diferenciación ha sido interpretado como una tendencia natural de estas células hacia la división de tipo diferenciador en lugar de la división de tipo auto-renovante. Dado que en los nichos naturales en los que las células madre específicas de tejido se encuentran, éstas persisten durante toda la vida del individuo, la progresiva diferenciación de estas células durante su expansión *ex vivo* puede ser un reflejo de que las condiciones del cultivo no reproducen adecuadamente la situación del microambiente endógeno natural.

El PEDF, es un factor que se encuentra en nichos neurogénicos. Es, además, una molécula secretada y soluble, que puede ser adicionada a medios de cultivo. Por esta razón, el factor PEDF es capaz de inducir auto-renovación en poblaciones de células madre obtenidas de cerebros adultos de ratón, por ejemplo, ya que promueve la división no diferenciadora de dichas células madre y la expresión de moléculas que se asocian con el estado más indiferenciado y multipotente de estas células, como es el factor de transcripción Sox2 y efectores de la vía de señalización de Notch. Es por ello que, cuando se administra PEDF a cultivos de neuroesferas, que son los agregados clonales en forma de esfera formados por la progenie de cada célula madre neural, éste factor aumenta el número de células capaces de formar nuevas esferas cuando se resiembran las células tratadas a una densidad de 2,5 células/microlitro (ensayo de auto-renovación). Además, en las células tratadas con PEDF aumenta la expresión del factor de transcripción Sox2, relacionado con indiferenciación. Por tanto, la invención proporciona también un método de ensayo en el que medir auto-renovación de células madre neurales con la adición exógena de PEDF y en el que ensayar inhibidores de este proceso y/o antagonistas del factor PEDF y por tanto, la presente invención proporciona un uso nuevo del factor PEDF como producto capaz de estimular la auto-renovación de células madre permitiendo identificar y/o ensayar diferentes compuestos inhibidores de la auto-renovación y/o antagonistas del factor PEDF.

Aparte de poder proporcionar condiciones de cultivo para la expansión más adecuada de estas células, el factor PEDF administrado directamente en el cerebro de ratones causa la activación de las células madre neurales endógenas, activación que conduce a una mayor actividad neurogénica, de producción de nuevas neuronas, en la zona subventricular de cerebro adulto. Por ello, el PEDF puede ser un factor facilitador de procesos de producción de nuevas células a partir de células madre presentes en los tejidos. Por tanto, la presente invención se refiere también al uso de la molécula PEDF en la preparación de composiciones farmacéuticas para auto-renovación de células madre endógenas.

En la presente invención, se reivindica el uso del factor PEDF para inducir la auto-renovación de células madre de cualquier tipo, sin especificar el origen del factor PEDF, ya que éste podría generarse a partir de cualquier procedimiento de síntesis u obtención o bien utilizarse factor PEDF natural. Es decir, en la presente invención se reivindica el uso del factor PEDF, ya sea natural o sintético, como inductor de la auto-renovación de células madre.

Según un primer aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF en su versión completa o fragmentado en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre de cualquier origen.

5 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre que está combinado de forma adicional con moléculas seleccionadas del grupo formado por aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono y metales.

10 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre en sistemas de expresión procariotas o eucariotas y que induce la auto-renovación de células madre somáticas.

15 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre endógenas o exógenas.

Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre en el que la composición está en una forma seleccionada de polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, trociscos, solución, suspensión, emulsión y jarabe.

20 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF para la fabricación de un medicamento para activar procesos seleccionados del grupo formado por procesos de regeneración tisular de la piel, procesos de cicatrización, procesos de regeneración neural en casos de accidente cerebrovascular.

25 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere al uso del factor PEDF para la fabricación de un medicamento para terapia celular, preferentemente para regeneración cardíaca, neural y/o hematopoyética.

Según un segundo aspecto importante la presente invención proporciona una composición farmacéutica para inducir la auto-renovación de células madre que comprende en un medio farmacéuticamente aceptable una cantidad farmacéuticamente eficaz de:

- 30
- a) la secuencia total o parcial del factor PEDF,
  - b) una variante biológica natural, como una variante alélica, del factor PEDF,
  - 35 c) un equivalente funcional del factor PEDF que contenga sustitución(es), adición(es), inserción(es) y/o delección(es) únicas o múltiples en la secuencia de la proteína tipo salvaje y/o sustituciones de aminoácidos modificados químicamente que no afecten la función biológica autorenovadora de células madre,
  - 40 d) un fragmento activo del factor PEDF en el que "fragmento activo" designa a un secuencia de PEDF que mantiene la función biológica de auto-renovación de células madre,
  - e) una proteína fusionada que comprende el factor PEDF fusionado a un péptido o a otra proteína,
  - f) Un derivado de PEDF,
  - 45 g) Un análogo estructural de PEDF
  - h) y/o un homólogo de PEDF.

50 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de la secuencia total o parcial del factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

55 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de una variante biológica natural de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un equivalente funcional de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un fragmento activo de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína fusionada de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un derivado de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un análogo estructural de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un homólogo de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Según otro aspecto importante la presente invención se refiere a una composición farmacéutica en la que la cantidad de factor PEDF es de al menos 20 ng/ml.

## Ejemplos de realización

20 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan aquí sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

### Ejemplo 1

#### 25 *Ensayo de auto-renovación en células madre neurales en cultivo*

30 Las formas de PEDF que se han utilizado para las realizaciones son las que se muestran en la Figura 1. En esta figura se muestra el esquema del polipéptido PEDF humano y una forma truncada que contiene el dominio anti-angiogénico pero no el neurotrófico y que comprende desde el aminoácido 195 al 400 (que denominamos C-ter PEDF). El PEDF completo (aquí denominado PEDF) modula la auto-renovación de células madre pero el fragmento C-ter PEDF no lo hace por lo que se ha utilizado como control negativo en los experimentos. También, y como se verá más adelante, el C-ter PEDF se ha utilizado como competidor del PEDF completo.

35 Hemos demostrado mediante este ensayo de realización que la proteína PEDF promueve la auto-renovación de células madre neurales de la zona subventricular del cerebro de ratones adultos *in vitro*. Cuando se administra PEDF a cultivos de neuroesferas, que son los agregados clonales en forma de esfera formados por la progenie de cada célula madre neural, éste factor aumenta el número de células capaces de formar nuevas esferas/clones cuando se resiembran las células tratadas a una densidad de 2,5 células/microlitro (ensayo de auto-renovación) (ver Figura 2). En la Figura 2 se muestra como la administración de PEDF a un cultivo de células madre neurales de la zona subventricular conlleva la formación de más clones (neuroesferas) en presencia solamente de medio de crecimiento habitual para estas células (medio completo). Sin embargo, la adición de PEDF no aumenta el tamaño de cada clon (ver diámetros medios de las esferas), ni la incorporación del marcador de proliferación bromo-desoxiuridina (BrdU) (ver porcentajes de incorporación), indicando por tanto que no es un mitógeno. En la figura 2: Eje de las Y corresponde con neuroesferas, 40 A corresponde a Control, B corresponde a PEDF, C corresponde a C-ter PEDF, 1 corresponde a Fase, 2 corresponde a BrdU.

45 Para realizar los cultivos de células madre neurales adultas (NSC) se sacrificaron por dislocación cervical animales de 2 a 4 meses de edad, se extrajeron los cerebros y se pusieron en PBS estéril y frío. Se realizaron los cortes coronales necesarios para la disección de la zona subventricular (SVZ) excluyendo restos de estriado y plexos coroideos. Las piezas de tejido diseccionadas se incubaron en la solución enzimática durante 30 minutos a 37°C y se disgregaron cuidadosamente con una pipeta de vidrio pulida. Una vez conseguida una suspensión celular homogénea se sembraron en medio completo (medio de cultivo definido con 20 ng/mL EGF y 20 ng/mL FGFb) [*Medio control*: 50 DMEM/F12 suplementado con 0,6% de Glucosa, 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 50 unidades/ml de penicilina/estreptomicina (Invitrogen), 0,08 mg/ml de apo-t-transferrina (Sigma), 0,02 55 mg/ml de insulina (Sigma), 9 µg/ml de Putrescina (Sigma), 16 nM de progesterona (Sigma) y 24 nM de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (Sigma). *Medio completo*: medio control suplementado con 4 mg/ml de BSA (Albúmina de suero bovino, Sigma), 0,7 unidades/ml de heparina (Sigma), 20 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico; Invitrogen), y 10 ng/ml de FGF2 (factor de crecimiento fibroblástico, Sigma)] y se crecieron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5%, hasta 60 que el tamaño de las neuroesferas fue adecuado, aproximadamente tras 6 días *in vitro* (DIV), momento en el cual se las disocia y resiembra (pase) como células individuales en el mismo medio completo para iniciar el crecimiento de nuevos clones/neuroesferas. Los cultivos realizados de esta forma pueden expandirse realizando sucesivos pases durante un tiempo prácticamente ilimitado. Para el análisis del ensayo de auto-renovación las células procedentes de neuroesfera se pasan y la siembra se realiza a una densidad de 2,5 células/microlitro. En algunos de estos cultivos 65 a baja densidad (dilución límite) se añadió PEDF o C-ter PEDF a una concentración de 20 ng/mL. Tras 4-6 DIV se determina el número de esferas formadas en cada condición y se miden los diámetros de las esferas. Para los ensayos de incorporación de bromo-desoxi-uridina (BrdU), las esferas formadas tras 48 hr se trataron 5 min con BrdU (2 µM), se engancharon sobre cubreobjetos tratados con poly-D-lisine (10 µg/ml; Sigma) y se fijaron con paraformaldehído

(PFA) al 4% durante 20 min. Tras varios lavados en PB 0.1 M, se procedió a la detección inmunocitoquímica de la BrdU incorporada mediante anticuerpos específicos.

Las esferas tratadas con PEDF contienen un mayor número de células capaces de dar lugar a más neuroesferas/clones a baja densidad, una propiedad asociada con las células madre neurales con más potencial (Figura 3). Como se observa en la Figura 3 se muestra un ensayo por el cual clones/esferas que han sido tratados con PEDF (forma truncada de PEDF, C-ter PEDF, es, de nuevo, el control sin efecto) cuando son disociados y re-sembrados en ausencia de PEDF, en distintas combinaciones mitogénicas. En esta figura A está definido por el control, B está definido por el ensayo con pretratamiento con PEDF y C está definido por el ensayo con el tratamiento con C-ter PEDF. La formación de un mayor número de nuevos clones (capacidad formadora de esferas incrementada) indica que el tratamiento con PEDF indujo la división auto-renovante de las células madre cuando estaba presente. Esto indica que el PEDF en la esfera promueve la generación de nuevas células formadoras de clones mediante división auto-renovante. En la figura 3, 1 corresponde a EGF + FGF, 2 corresponde a EGF, 3 corresponde a FGF, Eje de las X corresponde a condiciones de mitogénesis.

Para determinar que el aumento en la capacidad formadora de nuevas esferas (esferas secundarias) se relaciona con la presencia de más células madre multipotenciales en los cultivos con PEDF también se ha determinado que en dichos cultivos existen más células que expresan un antígeno de superficie (LeX) que ha sido asociado a la fracción más multipotente de las células madre neurales (ver Figura 4 en la que A está definido por el control, B está definido por el ensayo con pretratamiento con PEDF y C está definido por el ensayo con el tratamiento con C-ter PEDF). En esta Figura 4 se muestra como el tratamiento con PEDF aumenta el número de células en las neuroesferas que expresan un antígeno de superficie (LeX) que co-segrega con la población más multipotente de las células madre neurales. Para realizar esta determinación se recogieron por centrifugación las neuroesferas tras 6 DIV, y se disgregaron mecánicamente hasta tener una suspensión celular homogénea. A continuación se resuspendieron en medio control (sin mitógenos) conteniendo una dilución 1:20 de anticuerpo monoclonal anti-LeX/SSEA-1 procedente del Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, USA) durante 15 min a 37°C. Posteriormente, las células fueron fijadas con 4% PFA durante 10 min a 4°C, lavadas, e incubadas con anti-IgM de ratón biotiniladas (1:200) seguido de estreptoavidina marcada con Cy3 (1:1000; Jackson Laboratories). Se analizaron por citometría al menos 20.000 células por cultivo y se determinó el porcentaje de células inmunopositivas para LeX. Los análisis se hicieron con un analizador BECKMAN COULTER EPICS dotado con un láser de argón a 488nm como fuente de luz. En la figura 4, Eje de las Y corresponde a % de LeX+células.

## Ejemplo 2

### *Ensayo de inducción de la multipotencia a nivel molecular en células madre neurales en cultivo*

El aumento del número de células formadoras de nuevos clones promovido por PEDF va acompañado de cambios moleculares en los niveles de factores que han sido asociados en las células madre neurales, así como en otras poblaciones celulares, a un estado más indiferenciado, propiedad necesaria para el mantenimiento de la multipotencia. Algunas de estas moléculas se han visto afectadas por el tratamiento con PEDF. Así, por ejemplo, el tratamiento con PEDF induce la expresión de moléculas efectoras de la vía de Notch, que cuando se encuentran aumentadas inhiben a factores que promueven la diferenciación celular, en este caso la diferenciación hacia neuronas. Estos efectores de la vía de Notch que encontramos aumentados en los cultivos tratados con PEDF son Hes1 y Hes5. De la misma manera, se encuentra aumentado un factor cuya expresión va asociada a los estados más indiferenciados de los progenitores neurales. Esto se muestra en la figura 5. En la Figura 5 se muestran los cambios en los niveles de marcadores de indiferenciación inducidos por PEDF. Para estos experimentos se extrajeron los RNA totales mediante el Kit de extracción Rneasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se recolectaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  de células crecidas en medio completo con o sin PEDF y los RNA totales se guardaron a -80°C hasta su uso. Los análisis por RT-PCR que se realizaron para evaluar la expresión de distintos genes se iniciaron a partir de 1  $\mu$ g de RNA que fue retrotranscrito en DNA complementario (cDNA) usando hexanucleótidos al azar (3  $\mu$ g/ $\mu$ L, Invitrogen Life Technologies, USA) y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript II RT (Invitrogen Life Technologies), en un volumen de reacción de 40  $\mu$ L y en presencia de tampón first strand (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM  $Mg_2Cl$ ), 5 mM DTT y 0.25 mM de cada dNTPs (Amersham Pharmacia). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf. Se usó como molde 1  $\mu$ L de cDNA en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L conteniendo 4 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 20  $\mu$ M EDTA, 200  $\mu$ M DTT, 0.25 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 0.25  $\mu$ M de los cebadores (Sigma-Genosys) y 1 U de ADN Taq polimerasa (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se efectuaron los ciclos de amplificación correspondientes a cada pareja de cebadores y una extensión final de 10 min a 72°C. El tamaño de cada producto de amplificación se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) preparado en tampón TBE (89 mM Tris, pH 8.0, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) con 10  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Como tampón de carga 6x, se utilizó 50% de glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% cianol de xileno, 100 mM EDTA. La cuantificación se realizó por densitometría comparando la intensidad de cada banda con la del producto de la amplificación del gen de la beta-actina. Los cebadores utilizados fueron: [mHes1 (CGGTCTACACCAGCAACAGT; CACATGGAGTCCGAAGTGAG), mHes5 (GCAGCATA GAGCAGCTGAAG; GAAGGCTTTGCTGTGTTCA), mSox2 (ATGCACAACCTCGGAGATCAG; TATAATCCGGG TGCTCCTTC), m $\beta$ -actin (CCGGGACCTGACAGACTACCT; GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA)]. Tal y como se muestra en la figura 5, dado que en las células tratadas con PEDF aumenta la expresión del factor de transcripción Sox2, relacionado con indiferenciación, la invención proporciona también un método de ensayo en el que medir auto-

renovación de células madre neurales con la adición exógena de PEDF y en el que ensayar inhibidores de este proceso. En la figura 5, A corresponde a PEDF, 1 corresponde a Hest, 2 corresponde a Hes5, 3 corresponde a Mash1, 4 corresponde a b-actina, 5 corresponde a SoX2, 6 corresponde a b-actina.

5 La auto-renovación en células madre está asociada a moléculas que regulan el ciclo celular también. En particular la expresión de la molécula p21waf1, perteneciente a la familia Cip/kip de inhibidores de quinasas dependiente de ciclinas, es necesaria para la persistencia a largo plazo de las células madre somáticas y para su auto-renovación ilimitada. En la figura 6 se muestra como PEDF aumenta la expresión de p21, determinada mediante análisis por western blot con anticuerpos específicos anti-p21. Este aumento en los niveles de p21 es necesario para el efecto de PEDF ya  
10 que en células obtenidas de la zona subventricular de ratones mutantes nulos para p21, el PEDF no tiene efecto en el número de neuroesferas, como se muestra en la figura 6. Los ratones mutantes nulos para la proteína p21 procedieron del laboratorio de Philip Leder (Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts) y se generaron en una cepa con fondo genético mixto C57BL61129 y los de fenotipo salvaje se obtuvieron de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME). La colonia mutante se mantuvo en homocigosis. El genotipo de los animales se determinó mediante el análisis por PCR del DNA genómico extraído de un fragmento de cola. Los tejidos se digirieron en tampón de tisis (100 mM Tris, pH 8.0, 200 mM NaCl, 2% SDS, 5 mM EDTA, 200 µg/ml proteinasa K) durante 12 hr a 55°C. Tras la digestión se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm, 10 minutos, y los sobrenadantes se transfirieron a eppendorfs limpios. A continuación se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma) y 0,2 volúmenes de acetato potásico (Panreac) 8 M, se agitaron y se incubaron a -80°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo se dejó descongelar a temperatura ambiente y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min, para facilitar la separación entre las fases acuosa y orgánica. Se transfirieron 200 µl de la fase acuosa a un eppendorf limpio y se precipitó el DNA genómico con 1 ml de etanol absoluto (EtOH 100%). A continuación se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm durante 10 min, y los precipitados de ADN generados se lavaron con etanol al 70% (EtOH 70%), se dejaron secar y se resuspendieron en 100 µl de H<sub>2</sub>O durante toda la noche a 4°C. Los cebadores utilizados para las ampli-  
25 ficaciones fueron: p21+116F (AAGCCTTGATTCTGATGTGGGC), p21-135(TGACGAAGTCAAAGTTCCACCG) y p21-Neo19+(GCTATCAGGACATAGCGTTGGC) este último correspondiente a la secuencias *neo*. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C durante 50 seg., anillamiento a 55°C durante 30 seg. y extensión a 72°C 2 min. Después de una reacción de 40 ciclos el alelo salvaje corrió mediante electroforesis a 0,7 Kilobase y el alelo mutante a 0,5 kilobases. 6 corresponde a PEDF, 1 corresponde a p21, 2 corresponde a b-actina.

30

### Ejemplo 3

#### *Ensayo de inducción de la indiferenciación en células madre neurales*

35

Que el PEDF promueve indiferenciación se comprueba en el hecho de que cuando células madre neurales previamente tratadas con PEDF se ponen a diferenciar sembrándolas en un sustrato adhesivo en ausencia de mitógenos muestran un fenotipo más indiferenciado, en el caso de las células madre neurales aumenta el número de células que expresan el marcador de indiferenciación nestina durante más tiempo (Figura 7). En la Figura 7 se muestra como el  
40 tratamiento con PEDF aumenta el número de células que expresan marcadores de indiferenciación (nestina) en los cultivos sin afectar a su proliferación. Para la inducción de la diferenciación poblacional se recogieron células crecidas durante 5 DIV en presencia o ausencia de PEDF en el medio de crecimiento completo por centrifugación y se lavaron varias veces en medio control, para eliminar las trazas de mitógenos y de PEDF. A continuación se realizó la siembra en placas pretratadas durante 2 horas con matrigel (15 mg/mL solución stock diluida 1:100 en medio control; Becton Dickinson, Bedford, MA), a una densidad de 1x10<sup>4</sup> células/mL, en un medio de diferenciación que contenía medio control, suplementado con FGF (20 ng/mL), factor de crecimiento que favorecía la supervivencia celular en los pasos iniciales de la diferenciación. A los 2 DIV las células se trataron 5 min con BrdU (2 µM) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 min. Tras varios lavados en PB 0.1 M, se procedió a la detección inmunocitoquímica de la BrdU incorporada y del marcador de progenitores neurales nestina mediante anticuerpos específicos.  
50 Para ello, se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con un tampón bloqueo que contenía 10% suero de cabra (invitrogen), 10% (p/v) glicina, y 0,25% (v/v) Tritón X-100 como detergente no iónico para la permeabilización de las células. Las células se incubaron toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-nestina del DSHB (University of Iowa, USA) y un anticuerpo policlonal anti-BrdU (Dakko) diluidos en el mismo tampón de bloqueo. Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PB 0.1 M y se incubaron con los anticuerpos secundarios fluorescentes: Alexa 350 cabra anti-conejo (1:200), Cy3 cabra anti-ratón(1:2000) seguido de una contratinción nuclear con bisbencimida. En esta figura 7, A se refiere a expansión y B se refiere a diferenciación. En la figura 7, 7 DIV; EGF; FGF corresponde con 7, 2 DIV; FGF corresponde a 2, 5 DIV corresponde a 5, 1 corresponde a control, 2 corresponde a PEDF.

60

### Ejemplo 4

#### *Ensayo de inducción de neurogénesis en células madre neurales en cultivo*

65

Aun así, el tratamiento con PEDF durante la fase de expansión no impide la diferenciación terminal de estas células a neuronas. De hecho, como se muestra en la Figura 8 se potencia la neurogénesis en los cultivos tratados con PEDF. En la Figura 8 se muestra como el aumento de marcadores de indiferenciación no impide la diferenciación terminal de los cultivos, pasado el tiempo habitual al que se culmina la diferenciación final del cultivo. Más aun, se



observa como el tratamiento previo con PEDF mejora la capacidad neurogénica, favoreciendo la diferenciación de un número mayor de neuronas (Tuj1-positivas). A los 2 DIV después de sembrar las NSCs en sustrato adherente como se comenta en el párrafo anterior se sustituyó el medio por medio control suplementado con 2% suero bovino fetal (Invitrogen) durante 5 DIV más, lo que favorece la maduración de las neuronas y de la glía. A los 7 DIV las células se fijaron con PFA al 4% en PB 0.1M, durante 20 min a temperatura ambiente y se examinaron por inmunocitoquímica para la detección de marcadores específicos de neuronas y células gliales, determinándose las proporciones de cada fenotipo. La diferenciación neuronal y glial se definió por un marcaje inmunocitoquímico triple usando un anticuerpo primario anti-Tuj1 (neuronas), anti-GFAP (astrocitos) y anti-MBP (oligodendrocitos). Tras la fijación de las células se realizaron varios lavados en PB 0.1 M y se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con un tampón bloqueo que contenía 10% suero de cabra (Invitrogen), 10% (p/v) glicina, y 0,25% (v/v) Tritón X-100 como detergente no iónico para la permeabilización de las células. Las células se incubaron toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en el mismo tampón de bloqueo: anti- $\beta$ III-Tubulina (Tuj1) monoclonal de ratón (IgG) (1:300; Covance); anti-proteína fibrilar ácida glial (GFAP) policlonal de conejo (IgG) (1:300; Dako); anti-proteína básica de la mielina (MBP) monoclonal de rata (IgG) (1:300, Chemicon). Posteriormente las células se lavaron 3 veces con PB 0.1M y se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios fluorescentes: Alexa 350 cabra anti-conejo (1:200), Cy3 cabra anti-ratón(1:2000), Biotinilado goat anti-rata (1:300), Cy2 conjugado con estreptoavidina (1:200) seguido de una tinción nuclear con bisbencimida (DAPI). Las diferenciaciones poblacionales se utilizaron para determinar la capacidad neurogénica de los diferentes cultivos, para lo cual se montaron los cubres de vidrio sobre un portaobjetos con líquido de montaje permanente protector de fluorescencia (Fluorsave, Calbiochem, La Jolla, CA) y se determinó el número de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos contando el número de neuronas y astrocitos, o de oligodendrocitos con respecto al total de núcleos teñidos con DAPI en al menos 25 campos aleatorios. La fluorescencia fue visualizada con un microscopio invertido Nikon diaphon, o vertical (E400) y se capturaron imágenes con una cámara digital Nikon. En la figura 8, 1 corresponde al control y 2 corresponde a PEDF.

## Ejemplo 5

### *Ensayo de competición del efecto del PEDF en la auto-renovación de células madre neurales en cultivo con el fragmento C-ter PEDF*

La forma truncada conteniendo la mitad C-terminal del polipéptido PEDF antagoniza la acción del PEDF completo en el ensayo de auto-renovación de células madre constituyéndose en una herramienta útil para determinar la especificidad de la acción de la forma completa (Figura 9, en la que la parte de la gráfica punteada con el símbolo ■ representa la prueba control y la parte de la gráfica punteada con el símbolo ● representa el ensayo con 0,4 nM de PEDF). Por tanto, la presente invención también proporciona un método para analizar la especificidad de los efectos de la molécula PEDF sobre el proceso de auto-renovación. Para la realización de el ensayo que se muestra en la figura 8 se sembraron NSCs disociadas en medio completo con 20 ng/ml PEDF (equivalente a una concentración 0.4 nM) y en presencia de concentraciones crecientes del fragmento C-ter PEDF. Al cabo de 4 DIV, el número de neuroesferas formado en cada condición fue determinado. Como se muestra en la figura concentraciones crecientes de C-ter PEDF antagonizan el efecto del PEDF proporcionando un ensayo de especificidad. El receptor del PEDF es todavía desconocido pero se ha descrito la interacción del PEDF con una molécula de membrana de unos 80 kDa. (Alberdi, E., Aymerich, M.S., Becerra, S.P. (1999) Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 31605-31612). Este tipo de ensayo sugiere que la forma completa y truncada podrían estar compitiendo a nivel de su unión al receptor de membrana. En la figura 9, A corresponde al control y B a 0.4 nM PEDF.

Para determinar si la forma truncada era capaz de antagonizar el efecto de un PEDF producido por células de mamífero se realizó un ensayo en el que se transfectaron células COS, que no poseen niveles significativos de PEDF, con un cDNA que codifica para PEDF humano. Para ello, se obtuvo el cDNA del Pedf humano mediante RT-PCR y fue clonado en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Las células fueron co-transfectadas con dicho plásmido y uno conteniendo una construcción para GFP como marcador de transfección, mediante Lipofectamine, en DMEM. Tras 8 hr las células fueron transferidas a DMEM con FBS al 10% durante 12 horas. La expresión y secreción de Pedf en las células transfectadas con vector vacío o con pcDNA-hPedf se analizó, respectivamente, mediante RT-PCR y por inmunoblot de medio condicionado como se explica en los párrafos siguientes. Las células transfectadas fueron cambiadas a medio completo de NSCs, se colocó se colocó un inserto (transwell de Millipore de 12 mm y 0.4  $\mu$ m diámetro de poro) 2 horas más tarde y en él se sembraron células madre neurales disociadas a baja densidad. Estos cultivos se realizaron en presencia o ausencia de C-ter PEDF a una concentración de 15 nM. A los 4 DIV se contó el número de neuroesferas formadas en cada cultivo. En el caso de los co-cultivos de NSCs con células COS transfectadas con Pedf, se observó un aumento en el número de neuroesferas que era antagonizado por el fragmento C-ter, tal como se observa en la figura 10. En la figura 10 se muestra como células COS transfectadas con una construcción conteniendo la secuencia del PEDF humano expresan y secretan PEDF. Este PEDF es activo en un ensayo de auto-renovación en células madre neurales (panel de la derecha) y el efecto es bloqueable por el fragmento C-ter. En la figura 10, A está definido por el medio de crecimiento. En la figura 10, A corresponde a Pedf, B corresponde a b-actina, C corresponde a PEDF, 1 corresponde a COS7+pcDNA, 2 corresponde a COS7+pcDNA-Pedf 3 corresponde a A, 4 corresponde a D+C-ter PEDF, F corresponde a COS7+pcDNA, G corresponde a COS7+pcDNA-Pedf.

La forma truncada C-ter PEDF permite, por tanto, identificar la participación del PEDF a partir de un sistema celular que lo exprese mediante su antagonismo específico con la forma truncada, como se muestra en el experimento

siguiendo en el cual se antagoniza con C-ter PEDF el efecto sobre auto-renovación que tienen tipos celulares que, de forma natural, producen y secretan PEDF. Así, por ejemplo, en la figura 11 se muestran tipos celulares que expresan PEDF y, de entre ellos, aquellos que secretan cantidades detectables de proteína PEDF. Estos tipos celulares son productores naturales del factor, como las células endoteliales o las células endimarias. En la figura 11 se muestra como células endoteliales y endimarias expresan y secretan PEDF de forma natural y A corresponde a Pedf, B corresponde a b-actina, C corresponde a PEDF, D corresponde a b-tubulin, E corresponde a PEDF, 3 corresponde a endimaria, 4 corresponde a astrositos, 5 corresponde a granule células, F corresponde a WB, G corresponde a RT-PCR.

Para estos experimentos se analizaron distintos tipos de células:

- células endoteliales primarias de tipo arterial procedentes de cordón umbilical humano (células HUAEC): obtenidas de AdvanceCell y mantenidas con los medios que sugiere el distribuidor.
- células endoteliales primarias de tipo venoso procedentes de cordón umbilical humano (células HUVEC): obtenidas de AdvanceCell y mantenidas con los medios que sugiere el distribuidor.
- células endimarias obtenidas mediante extracción de la capa endimaria de los ventrículos laterales de cerebros de ratones adultos y mantenidas en medio completo de neuroesferas.
- células astrocitarias obtenidas mediante la diferenciación de células madre neurales en ensayos de diferenciación o mediante cultivos de astrocitos a partir de cerebros de ratones neonatales
- neuronas granulares aisladas a partir de cerebelos de ratones de siete días postnatales y sembradas sobre poli-D-lisina en DMEM-F12, 10% FBS y 25 mM de cloruro potásico.

Estos tipos celulares fueron cultivados o en sus medios correspondientes o en medio completo de neuroesferas. Para analizar la expresión a nivel de RNAm se extrajeron los RNA totales mediante el Kit de extracción Rneasy Mini Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. A partir de 1 µg de RNA se realizó una retro-transcripción usando hexanucleótidos al azar (3 µg/µL, Invitrogen Life Technologies, USA) y 200 U de la transcriptasa reversa SuperScript II RT (Invitrogen Life Technologies), en un volumen de reacción de 40 µL y en presencia de tampón first strand (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM Mg2Cl), 5 mM DTT y 0.25 mM de cada dNTPs (Amersham Pharmacia). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf. Se usó como molde 1 µL de cDNA en un volumen de reacción de 20 µL conteniendo 4 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 20 µM EDTA, 200 µM DTT, 0.25 mM dNTPs (Amersham Pharmacia), 0.25 µM de los cebadores (Sigma-Genosys) y 1 U de ADN Taq polimerasa (Eppendorf). Después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, se efectuaron los ciclos de amplificación correspondientes a cada pareja de cebadores y una extensión final de 10 min a 72°C. El tamaño de cada producto de amplificación se resolvió mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) preparado en tampón TBE (89 mM Tris, pH 8.0, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) con 10 µg/ml de bromuro de etidio. Como tampón de carga 6x, se utilizó 50% de glicerol, 0.05% azul de bromofenol, 0.05% cianol de xileno, 100 mM EDTA. La cuantificación se realizó por densitometría comparando la intensidad de cada banda con la del producto de la amplificación del gen de la beta-actina. Los cebadores utilizados fueron: hPEDF (forward: CTGAAGCT GAGTTATGAAGGCG; reverse: GGTAAAGGTGATAGTCCAGCGC), hβ-actin (GCATGGAGTCCTGTGGCATC CACG;GGGTGTAACGCAACTAAGTCATAG), mPEDF (GAGTACATCTTCTTCCTGCC;CCAGTAATCTTGC TGAAGTCGG), mβ-actin (CCGGGACCTGACAGACTACCT;GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA). Para las determinaciones proteicas se recogieron o bien las células o bien el medio condicionado por ellas. Las células se homogeneizaron en tampón de tisis RIPA (20 mM Tampón fosfato sódico, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas (1 mM ortovanadato sódico, 1 mM fluoruro sódico, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina y 10 µg/ml leupeptina). La concentración de la proteína extraída se determinó por el método de Bradford modificado (DC Protein assay; Bio-Rad) usando la albúmina bovina del suero (BSA) como estándar. La misma cantidad de proteína (50-100 µg) fue resuspendida en un tampón disolvente de muestras (625 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 4% (v/v) β-mercaptoetanol, 0.025% (p/v) azul de bromofenol), desnaturalizada por ebullición durante 5 minutos y resuelta mediante electroforesis de SDS-PAGE en geles de 10-13%. Los geles se electrotransfirieron (100 V, 1 hora) a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences), utilizando tampón de transferencia (25 mM Tris, pH 8.3, 20% (v/v) metanol, 192 mM glicina) en un sistema Mini Trans-blot (Bio-Rad). Las membranas fueron bloqueadas en leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en tris borato salino-Tween-20 (Sigma) al 0.1% (v/v) (TBS-T) (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.9% (p/v) NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios anti-PEDF (Chemicon, 1:1000) y anti-beta-actina (Sigma; 1:5000) en TBS-T, durante toda la noche a 4°C y en agitación. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces en TBS-T, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios adecuados unidos a peroxidasa y se revelaron mediante quimioluminiscencia (Roche Lumi-light ECL kit), exponiendo las membranas en papel fotográfico (Konica) hasta la detección óptima de la señal. Las intensidades de las bandas individuales se cuantificaron mediante un densitómetro de imágenes (Scion Image). Los niveles de expresión de la proteína analizada en nuestros estudios se normalizaron con respecto a la β-actina de estas mismas muestras.

El fragmento C-ter es capaz de competir el efecto inductor de las células endoteliales y endimarias en el ensayo de auto-renovación de células madre neurales, como se muestra en la figura 12. Este bloqueo está de acuerdo con la observación de que estos tipos de células secretan PEDF y demuestra que el PEDF producido de forma natural por ciertos tipos de células puede ser antagonizado por el fragmento C-ter en el proceso de auto-renovación. Esto se muestra en la figura 12. En la figura 12 se muestra cómo células endoteliales y endimarias, que expresan y secretan PEDF de forma natural (ver figura 11), inducen formación de esferas y que este efecto inductor es bloqueable por 15 nM C-ter PEDF. En la figura 12, A está definido por el ensayo control. Para la realización de estos experimentos, se sembraron los distintos tipos de células en placas de 24 pocillos en medio completo de NSCs, se colocó un inserto (transwell de Millipore de 12 mm y 0.4  $\mu$ m diámetro de poro) 2 hr más tarde y en él se sembraron células madre neurales disociadas a baja densidad. Estos cultivos se realizaron en presencia o ausencia de C-ter PEDF a una concentración de 15 nM. A los 4 DIV se contó el número de neuroesferas formadas en cada cultivo. En el caso de los co-cultivos de NSCs con células endoteliales y endimarias, se observó un aumento en el número de neuroesferas que era antagonizado por el fragmento C-ter. En el caso de los astrocitos, había un efecto inductor en la formación de esferas no mediado por PEDF ya que no era antagonizado por el fragmento (de acuerdo con la falta de secreción de PEDF) y en el caso de las neuronas no había ningún efecto. Todo esto indica que fuentes celulares naturales de PEDF pueden activar la auto-renovación y que el fragmento C-ter puede ser utilizado para demostrar la especificidad del efecto. En la figura 12, A corresponde a A, 1 corresponde a HUVEC, 2 corresponde a HUAEC, 3 corresponde a apendima, 4 corresponde a astrositos, 5 corresponde a granule cells.

Para demostrar de forma paralela que las células endoteliales favorecían la auto-renovación de células madre neurales porque producen PEDF, silenciamos la expresión de PEDF endógena en estas células mediante técnicas de RNA interferentes, observando que el efecto inductor de las células HUVEC sobre la formación de esferas se veía reducido cuando la expresión y secreción del PEDF endógeno disminuía. Esto se muestra en la figura 13. En la figura 13 por tanto se muestra como células HUVEC en las que se ha silenciado parcialmente la expresión de PEDF mediante un siRNA específico secretan menos PEDF al medio e inducen la formación de un número menor de neuroesferas que las HUVEC tratadas con un siRNA control. Para realizar este experimento, obtuvimos de PROLIGO 21-bp siRNAs específicos (siPedf 5'-CGAGUUCAUUCAUGACAUAGA-3'. sicontrol (luciferasa) 5'-AACGUACGCGGAUACAACGA-3') que fueron introducidos en las células mediante dos rondas de transfección con Lipofectamine (Invitrogen). La determinación de los niveles de PEDF en el medio de cultivo se realizó mediante inmunoblot y la determinación del número de esferas se hizo mediante co-cultivo, tal como se ha contado anteriormente. En la figura 13, A corresponde a PEDF, B corresponde a b-actin, 1 corresponde a siRNA control, 2 corresponde a siRNA Pedf.

#### Ejemplo 6

##### *Ensayo de auto-renovación de células madre neurales el nicho neurogénico de la zona subventricular mediante administración intracerebral del PEDF*

El PEDF también activa la división auto-renovante de células madre neurales presentes en los nichos neurogénicos endógenos aumentando su número y su capacidad de dar lugar a progenie pero manteniendo su estado de célula madre (auto-renovación), como se demuestra cuando se administra PEDF intracerebralmente mediante bombas mini-osmóticas en cerebros de ratón (Figuras 14 y 15). En la figura 14 se muestra que cuando el factor PEDF es administrado intracerebralmente conduce a un mayor número de células madre neurales (que retienen BrdU largos periodos, una indicación de su relativa quiescencia, y que son positivas para el marcador GFAP). El bloqueo del PEDF endógeno que se produce en el nicho neurogénico de la zona subventricular en condiciones normales no causa cambios, lo que sugiere que el PEDF no actúa como factor de supervivencia para estas células. Por tanto, la figura 14 muestra cómo el PEDF administrado intracerebralmente conduce a un mayor número de células madre neurales (que retienen BrdU largos periodos, una indicación de su relativa quiescencia, y que son positivas para el marcador GFAP). El bloqueo del PEDF endógeno que se produce en el nicho neurogénico de la zona subventricular en condiciones normales no causa cambios, lo que sugiere que el PEDF no actúa como factor de supervivencia para estas células. En la figura 14, 1 corresponde a salino, 2 corresponde a PEDF, 3 corresponde a C-ter PEDF, 4 corresponde a BrdU/GFAP A corresponde a BrdL.

En la figura 15, A corresponde a GFAP/BrdU, 1 corresponde a PEDF, 2 corresponde a C-ter PEDF y la Figura 15 muestra el efecto del PEDF administrado a ratones a nivel de la zona subventricular es activar la división de las células madre neurales, como se observa en el hecho de que incorporan más BrdU, indicación de que están proliferando en presencia de PEDF exógeno. Para la realización de estos experimentos se implantaron mini-bombas osmóticas Alzet (modelo 1007D) acopladas a cánulas de 28  $\mu$ m de diámetro que se insertaron intracerebralmente en ratones adultos con coordenadas estereotóxicas: 0.0 anteroposterior a Bregma, 0.7 mediolateral y 1.7 dorsoventral y fueron fijadas al cráneo con Histoacryl (B/Braun). Se infundió solución salina (vehículo), PEDF (20 ng/ml) o C-ter PEDF (100 ng/ml) durante 7 días a una tasa de flujo de 0.5  $\mu$ l/h. Para analizar las distintas poblaciones de células con capacidad proliferativa en la zona subventricular, incluyendo las células madre, se utilizó la técnica de incorporación de BrdU. La BrdU es un análogo estructural del nucleótido timidina, y se incorpora al ADN de las células que se encuentran en fase S en el momento del pulso. Posteriormente podemos detectar las células que han quedado marcadas mediante el uso de un anticuerpo específico en cortes histológicos. Para los marcajes con BrdU de las células proliferantes en el cerebro adulto, los ratones se sometieron a dos tipos de régimen de administración distinto en función de las células que se deseaba marcar:

- una tanda de ratones recibieron el último día del periodo de infusión intraventricular 7 inyecciones intraperitoneales de BrdU (Sigma), (50  $\mu$ g/g de peso) cada dos horas (Nowakowski *et al.*, 1988), y fueron sacrificados una hora después de la última inyección. Esta estrategia marca las células que en el último día de infusión están proliferando.

- Otra tanda de ratones recibieron un mes antes del inicio del periodo de infusión, 6 inyecciones de BrdU en un periodo de dos días (3x2) y fueron sacrificados al final del periodo de infusión. Esta estrategia marca las células madre neurales, relativamente quiescentes y que, por tanto, mantienen la marca asociada a la incorporación de la BrdU durante un mes, y que expresan GFAP.

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (13 mg/gr de animal) y sacrificados mediante perfusión intracardíaca con paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v) en tampón fosfato 0.1M, pH 7.4. Tras la postfijación durante toda la noche (o/n), se extrajeron los cerebros y se lavaron en PB durante 2 horas. A continuación, se procedió a la deshidratación del tejido, e inclusión en parafina. Cortes seriados de 7  $\mu$ m de grosor fueron incubados en HCl 2N a 37°C durante 20 minutos y neutralizados con tampón borato 0,1 M pH 8,5. El bloqueo de uniones inespecíficas se llevó a cabo incubando los cortes con una solución de bloqueo (0,2% triton X-100, 10% suero de cabra en PB 0,1 M) durante 1 hora a temperatura ambiente. En esa misma solución de bloqueo se incubaron los cortes con un anticuerpo primario anti-BrdU (DAKO, 1:200) durante 12 horas, seguido de anticuerpos secundarios específicos marcados con fluorocromos. Esta detección inmunocitoquímica se combinó con la detección inmunocitoquímica de marcadores específicos de NSCs, como es la GFAP (proteína glial ácida fibrilar), y de neuroblastos, como es la forma polisializada de la molécula de adhesión neural (PSA-NCAM).

El PEDF hace que el nicho sea más eficiente en la producción de progenie neuronal (Figura 10). En la Figura 16 se observa que cuando el factor PEDF es administrado exógenamente conduce a una mayor producción de neuronas en la zona subventricular (positivas para el antígeno PSA-NCAM) y a una mayor actividad proliferativa de la zona (incorporación de BrdU). Lo contrario se obtiene cuando se bloquea el PEDF endógeno mediante el fragmento no activo C-ter PEDF. Por tanto la figura 16 muestra cómo el PEDF administrado exógenamente conduce a una mayor producción de neuronas en la zona subventricular (positivas para el antígeno PSA-NCAM) y a una mayor actividad proliferativa de la zona (incorporación de BrdU). Lo contrario se obtiene cuando se bloquea el PEDF endógeno mediante el fragmento no activo C-ter PEDF. Además, la administración de PEDF conduce a la obtención de cultivos con mayor capacidad de generar neuroesferas (Figura 17). En la Figura 17 se muestra cómo cuando el PEDF es administrado exógenamente a cerebros conduce a una mayor producción de neuroesferas a partir del tejido disociado de estos cerebros. Esto indica que la activación de células madre somáticas por PEDF favorece la producción de progenie celular y, por tanto, puede contribuir a procesos regenerativos y de reparación tisular. En la figura 16, A corresponde a PSA-NCAM/BrdUS, B corresponde a BrdS, C corresponde a PSA-NCAM, 1 corresponde a salino, 2 corresponde a PEDF, 3 corresponde a C-ter PEDF.

En la figura 17, 1 corresponde a salino, 2 corresponde a PEDF, 3 corresponde a C-ter PEDF, P corresponde a Primario, S corresponde a Secundario, Eje de las Y corresponde a número de neuroesferas.

#### Ejemplo 7

##### *Ensayos relacionados con las fuentes de PEDF*

Se incluyen cuatro ejemplos de producción de PEDF, para demostrar que el objeto de la presente invención se centra fundamentalmente en el nuevo uso del factor PEDF como inductor de la auto-renovación de células madre, independientemente de la forma en la que haya sido obtenido el PEDF:

- A partir de células que expresan y secretan PEDF de forma natural, como por ejemplo, células endoteliales (por ejemplo, de cordón umbilical) o células de naturaleza endodermia (ver Figura 11). Estas células basta para cultivarlas tanto en su medio de cultivo habitual como en medio de cultivo de células madre neurales para que secreten PEDF. Estas células pueden ser de cultivos primarios o bien líneas celulares de origen endotelial o endodermia, cedidas o adquiridas a empresas. Para usarlas como fuente de PEDF para la auto-renovación pueden ser co-cultivos con las células madre mediante sistemas de co-cultivo con insertos de membranas porosas que no permiten el contacto entre las células de las dos procedencias, tal y como se explica para los ensayos contenidos en el ejemplo 5.
- A partir de células en las que se expresa de forma heteróloga la secuencia de PEDF, como por ejemplo células COS. Para ello, se puede expresar PEDF en cualquier línea celular que no exprese o que exprese niveles bajos de PEDF mediante la introducción de un cDNA para *Pedf* utilizando transfección, como se explica por ejemplo en los ensayos que se incluyen en el ejemplo de realización 5.
- Como recombinante en bacterias (*E. coli*). Hemos comprobado que producido en bacterias también tiene efecto en la auto-renovación de células madre neurales:  $41 \pm 1\%$  más neuroesferas en cultivos tratados con PEDF,  $n = 3$ ;  $P < 0.01$ , Student's t-test. Este PEDF fue obtenido de la compañía Bioproducts MD.

- Producido en *Pichia pastoris*: a partir de la secuencia humana obtenida por PCR y clonada en el vector pPICZ $\alpha$ A a la que se añade la secuencia para el péptido señal de *Saccharomyces cerevisiae* y una cola de histidinas. Una vez producida en *Pichia*, se purifica mediante cromatografía y se comprueba la obtención y pureza por electroforesis en SDS-PAGE y western blot con anticuerpos específicos anti-PEDF (ver Figura 18). Estas moléculas fueron obtenidas del laboratorio de Julio Escribano en la Universidad de Castilla La Mancha, que las cedió para los análisis mostrados en los ejemplos de realización. En la figura 18 se muestra Formas purificadas por cromatografía de PEDF completo y la mitad C-terminal del PEDF humano a partir del medio obtenido de *Pichia* modificadas genéticamente para la expresión de estas formas. La electroforesis en SDS-PAGE muestra la pureza de la separación y el peso molecular aparente del PEDF (47 kDa) y del C-ter PEDF (26 kDa) y la inmunodetección con anticuerpos anti-PEDF muestra la especificidad de los dos productos. En la figura 18, 1 corresponde a PEDF, 2 corresponde a C-ter PEDF, A corresponde a SDS-PAGE, B corresponde a WB.

En el contexto de la presente invención, el uso de PEDF biológicamente activo en el proceso de auto-renovación de células madre incluye al PEDF y a cualquier derivado de PEDF con acción en renovación celular. El PEDF puede ser purificado a partir de fuentes naturales, como el humor vítreo. La invención no se restringe al uso de la molécula completa de PEDF ni a la de su secuencia precisa ni en su procedencia de humanos ni de otras especies. Una secuencia codificadora para PEDF puede incluir variaciones alélicas poblacionales o mutaciones puntuales, así como variantes por inserción, delección o sustitución, sobre polipéptidos de PEDF que se encuentran en la naturaleza. El polipéptido PEDF puede contener otros dominios, como epítomos especiales para la purificación (como, por ejemplo, colas de histidinas, myc) o para el seguimiento (como, por ejemplo, GFP). Puede tratarse además de variantes de modificaciones post-traduccionales, como glicosilación o fosforilación. El PEDF puede ser utilizado en su forma completa o en forma de fragmentos que retengan la actividad sobre renovación celular. Todas estas formas pueden ser suministradas a cultivos de células madre directamente para su activación y mantenimiento. También pueden ser aplicadas sistémica o localmente mediante el uso de composiciones farmacéuticas para auto-renovación celular caracterizadas por contener al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En este sentido, el PEDF no es tóxico y los efectos sobre auto-renovación, al menos en células madre neurales de ratón tanto en experimentos en cultivo como administrándolo directamente en el cerebro de los ratones, los hemos encontrado con concentraciones de tan sólo 0.4 nM.

El PEDF puede ser utilizado en forma de construcción conteniendo una secuencia de ácido nucleico que codifica para cualquiera de las formas de PEDF contempladas en el párrafo anterior. En este caso, estas secuencias pueden ser introducidas en sistemas celulares usando tecnología de DNA recombinante. El PEDF puede ser introducido de esta forma en sistemas celulares (mediante transfección, infección, electroporación, microinyección, etc.), que luego puedan ser puestos en co-cultivo con células madre, o bien introducidos en tejidos en los que sea necesario activar células madre endógenas, o puede ser introducido directamente en los tejidos mediante infección con vectores virales utilizados en terapia génica. También, estas secuencias pueden ser utilizadas para la expresión masiva de la forma de PEDF activo en renovación celular en sistemas de expresión procariotas o eucariotas. En todos estos casos, las construcciones deberán contener promotores capaces de dirigir la expresión de la molécula en las células de interés.

En todos los casos anteriores, el PEDF puede ser suministrado sólo o en combinación con otros factores inductores de la auto-renovación. En el contexto de la presente invención también proponemos el uso de fragmentos C-terminales de la molécula de PEDF como estrategia para el bloqueo de los efectos de PEDF completo sobre la auto-renovación celular.

El polipéptido PEDF activa la división auto-renovante de células madre somáticas, como las neurales, en nichos naturales y con ello, la producción de progenie diferenciada. La presente invención proporciona un método para activar células madre presentes en los tejidos que requieren una mayor actividad de sus células madre para renovación tisular e, incluso, regeneración, como por ejemplo, regeneración de piel, hematopoyética, neural tras accidente cerebrovascular, cardíaca, etc.

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del factor PEDF en su versión completa o fragmentado en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre de cualquier origen.
2. Uso del factor PEDF según la reivindicación 1 en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre combinado de forma adicional con moléculas seleccionadas del grupo formado por aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono y metales.
- 10 3. Uso del factor PEDF según la reivindicación 1 en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre en sistemas de expresión procariotas o eucariotas.
4. Uso del factor PEDF según la reivindicación 1 en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre somáticas.
- 15 5. Uso del factor PEDF según la reivindicación 1 en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre endógenas o exógenas.
- 20 6. Uso del factor PEDF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de una composición que induce la auto-renovación de células madre en el que la composición está en una forma seleccionada de polvo, gránulos, comprimidos, cápsulas, trociscos, solución, suspensión, emulsión y jarabe.
7. Uso de factor PEDF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento para activar procesos seleccionados del grupo formado por procesos de regeneración tisular de la piel, procesos de cicatrización, procesos de regeneración neural en casos de accidente cerebrovascular.
- 25 8. Uso del factor PEDF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para terapia celular.
- 30 9. Uso de factor PEDF según la reivindicación 8 para la fabricación de un medicamento para terapia celular preferentemente para regeneración cardíaca, neural y/o hematopoyética.
10. Composición farmacéutica para inducir la auto-renovación de células madre **caracterizada** porque comprende en un medio farmacéuticamente aceptable una cantidad farmacéuticamente eficaz de:  
35
  - i) la secuencia total o parcial del factor PEDF,
  - j) una variante biológica natural, como una variante alélica, del factor PEDF,
  - 40 k) un equivalente funcional del factor PEDF que contenga sustitución(es), adición(es), inserción(es) y/o deleción(es) únicas o múltiples en la secuencia de la proteína tipo salvaje y/o sustituciones de aminoácidos modificados químicamente que no afecten la función biológica autorenovadora de células madre,
  - 45 l) un fragmento activo del factor PEDF en el que “fragmento activo” designa a un secuencia de PEDF que mantiene la función biológica de auto-renovación de células madre,
  - m) una proteína fusionada que comprende el factor PEDF fusionado a un péptido o a otra proteína,
  - n) Un derivado de PEDF,
  - 50 o) Un análogo estructural de PEDF
  - p) y/o un homólogo de PEDF.
- 55 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de la secuencia total o parcial del factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 12. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de una variante biológica natural de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un equivalente funcional de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65

## ES 2 329 636 B2

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un fragmento activo de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 15. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína fusionada de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 16. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de un derivado de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 17. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos un análogo estructural de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 **caracterizada** porque contiene al menos una cantidad farmacéuticamente eficaz al menos un homólogo de factor PEDF y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 19. Composición farmacéutica para inducir la auto-renovación de células madre según la reivindicación 10 **caracterizada** porque la cantidad de factor PEDF es de al menos 20 ng/ml.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

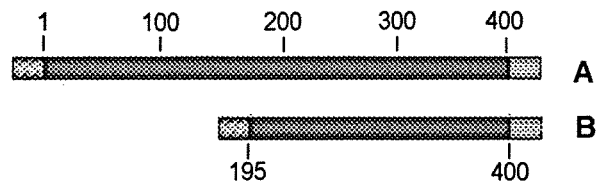


Fig. 1

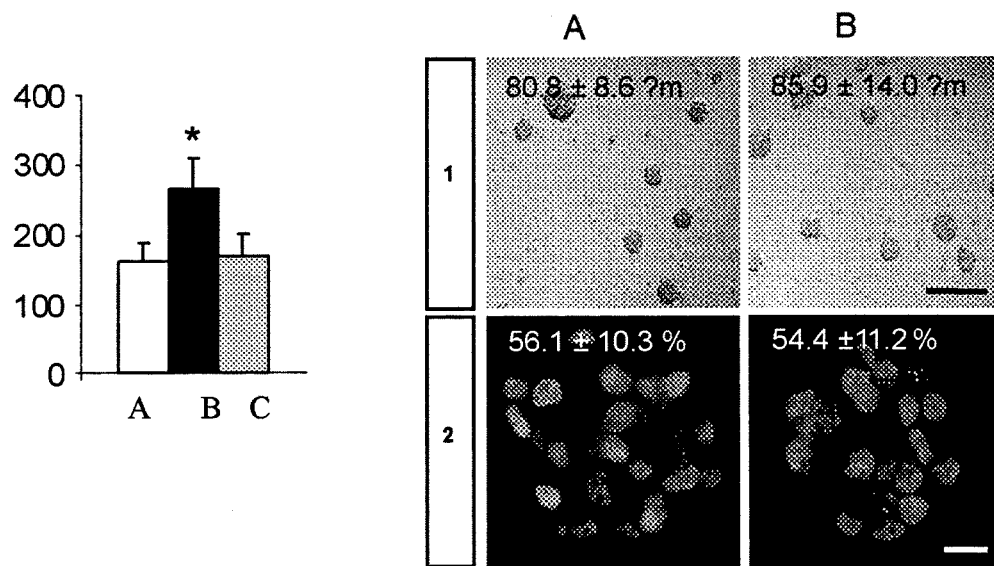


Fig. 2

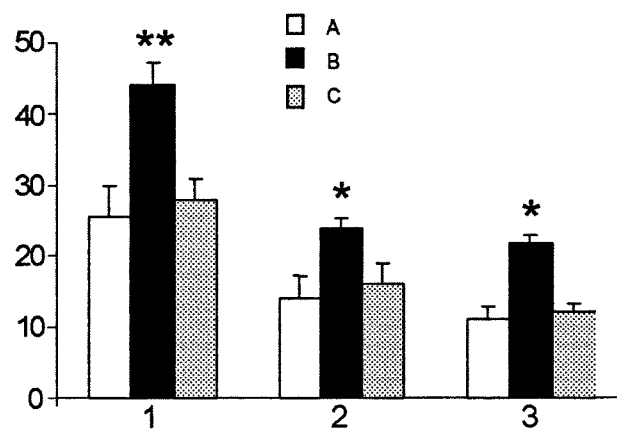
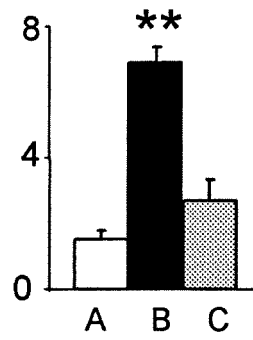
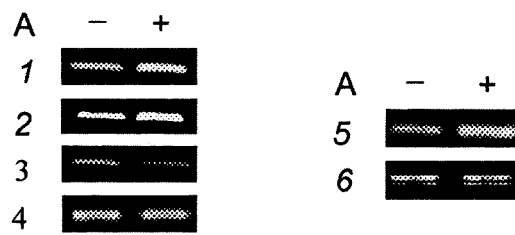


Fig. 3

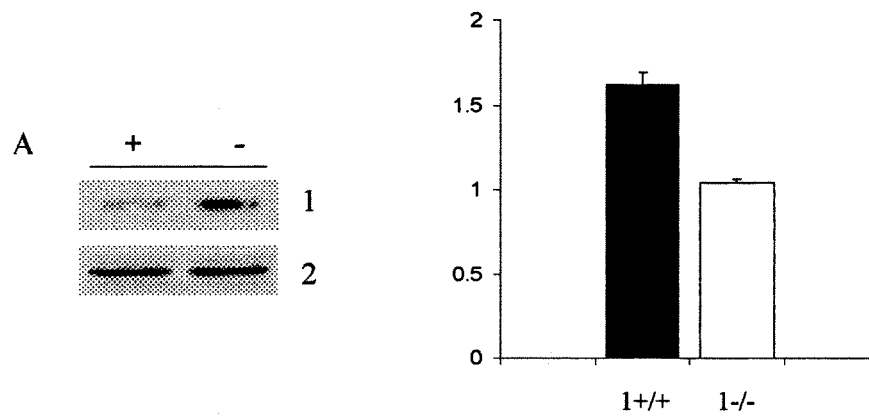




**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

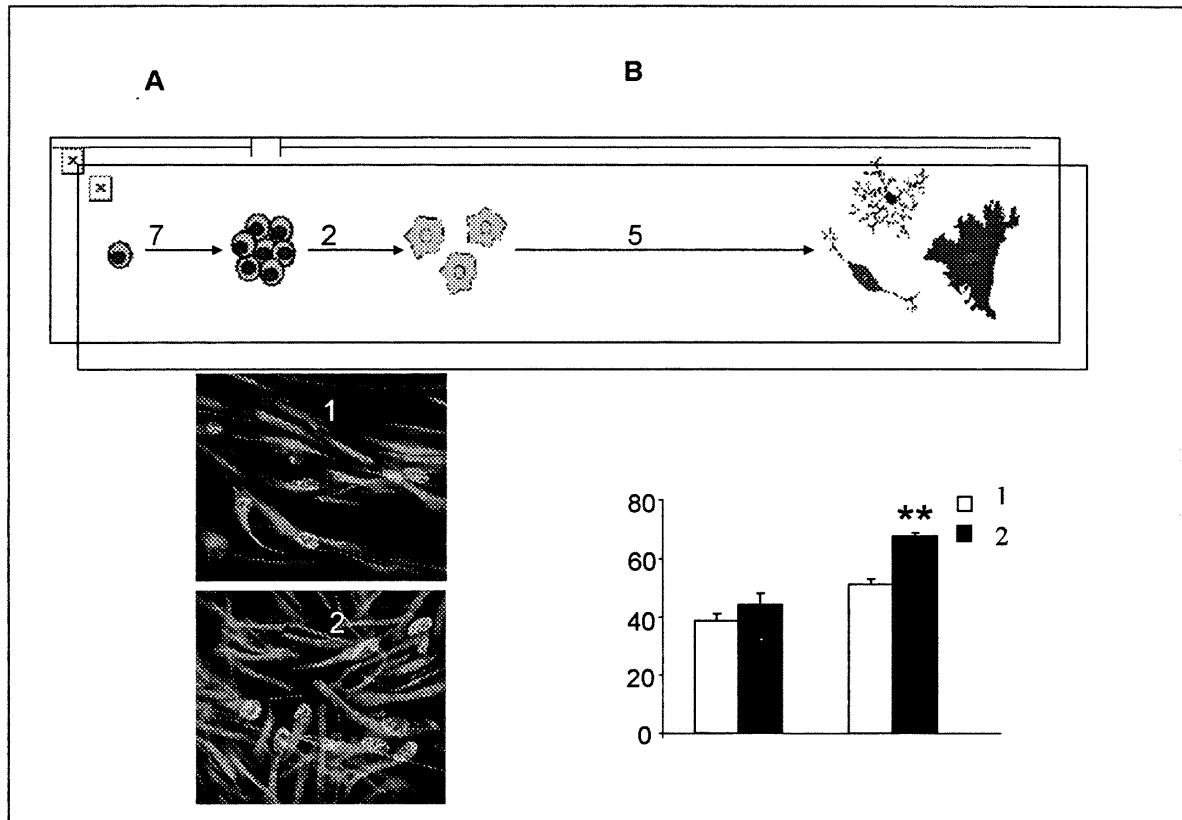


Fig. 7

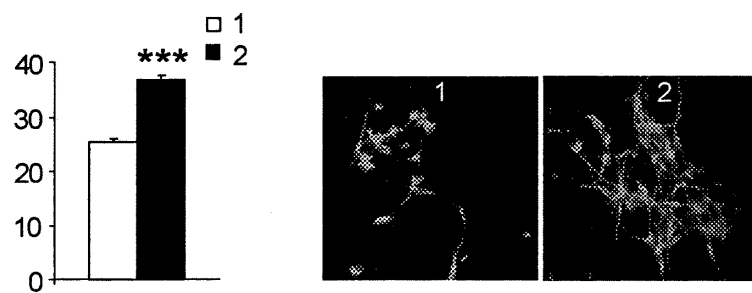


Fig. 8

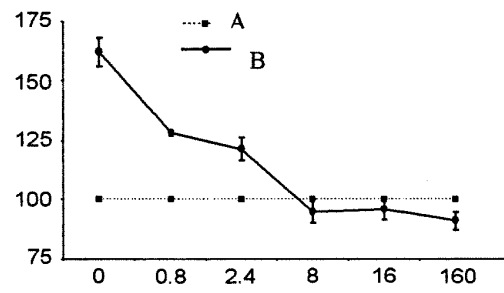


Fig. 9

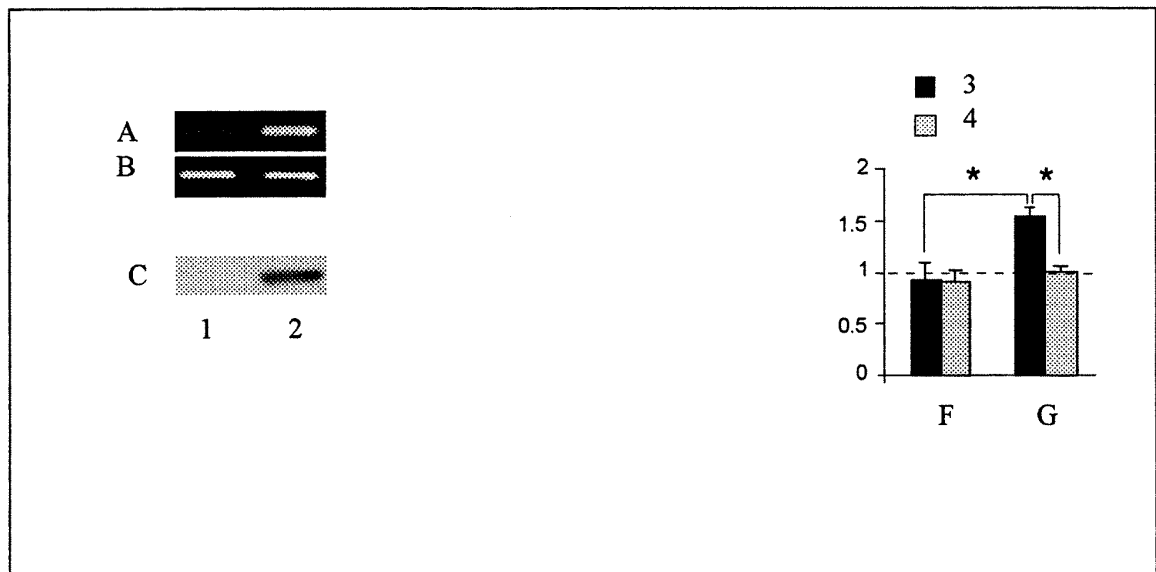


Fig. 10

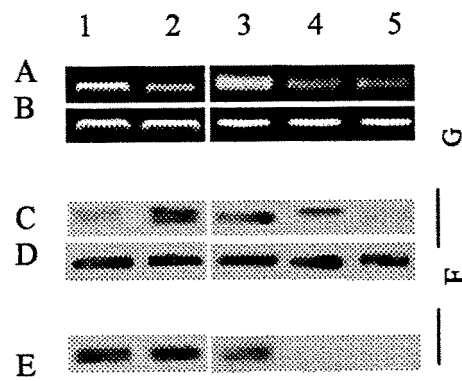


Fig. 11

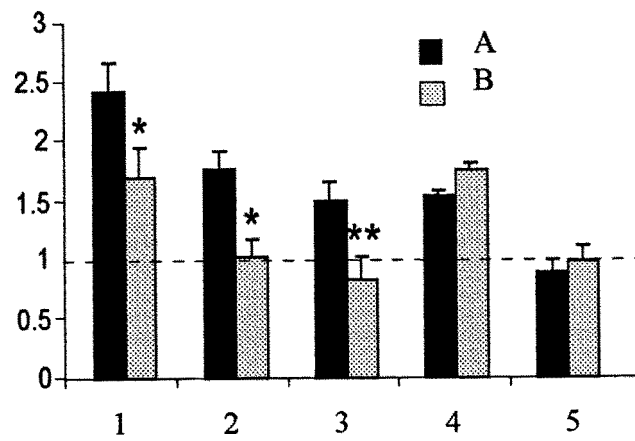


Fig. 12

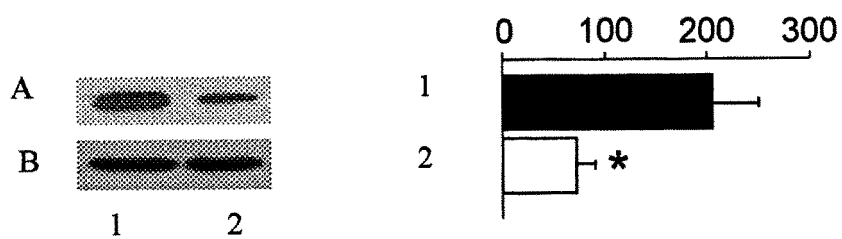


Fig. 13

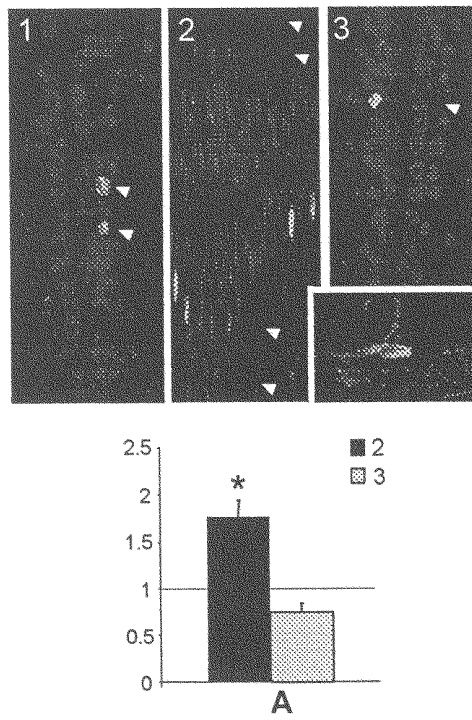


Fig. 14

A

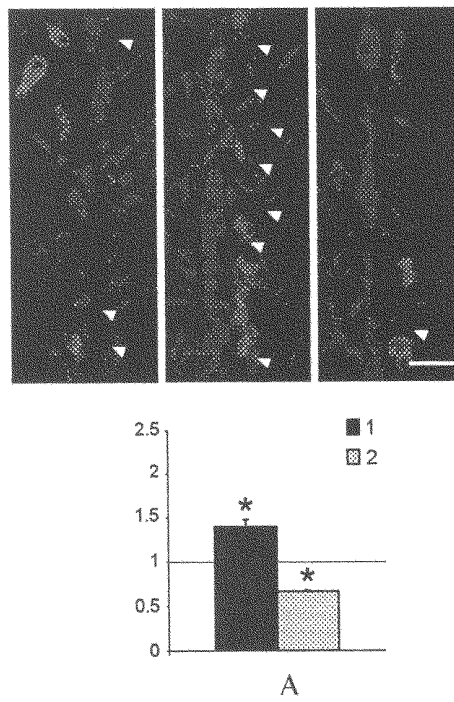


Fig. 15

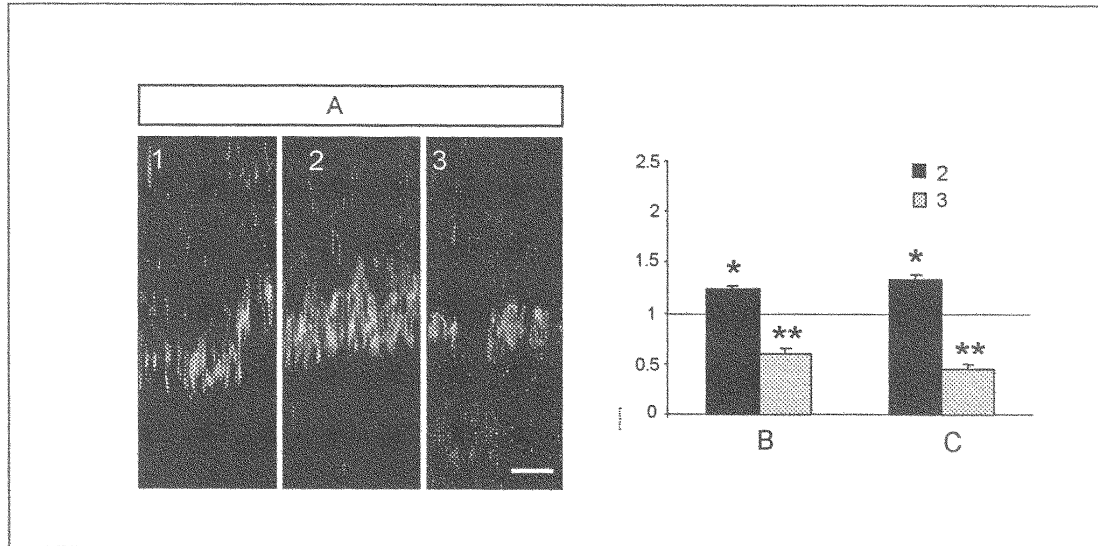


Fig. 16

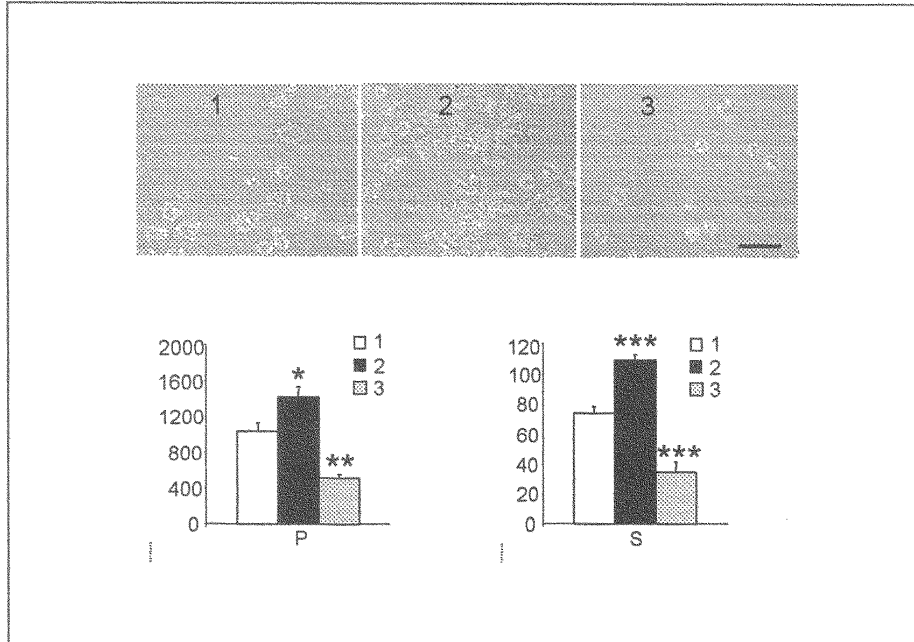
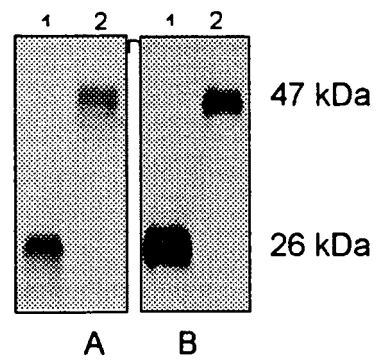


Fig. 17



**Fig. 18**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 329 636

⑫ Nº de solicitud: 200600386

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 17.02.2006

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005041887 A2 (UNIV. JOHN HOPKINS) 12.05.2005, todo el documento.	1-19
A	WO 2004028559 A1 (UNIV. ILLINOIS FOUND.) 08.04.2004, todo el documento.	1-19
A	WO 0162725 A2 (UNIV. NORTHWESTERN) 30.08.2001, todo el documento.	1-19

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.11.2009

Examinador

M. Hernández Cuéllar

Página

1/2



CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**C12N 5/06** (2006.01)