

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 323 913**

21 Número de solicitud: 200600697

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **17.03.2006**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2009**

Fecha de la concesión: **03.05.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **14.05.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
14.05.2010

73 Titular/es: **Universidad de Salamanca** (Titular al 65 %)
Patio de las Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC) (Titular al 35 %)

72 Inventor/es: **Castro Soubriet, Fernando de;**
Merchán Sala, Paloma;
Bribián Arruego, Ana;
Sánchez Camacho, Cristina y
Bovolenta Nicolao, Paola

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Efecto mitógeno de Sonic hedgehog (Shh) sobre precursores de oligodendrocitos y su uso en enfermedades desmielinizantes.**

57 Resumen:

Efecto mitógeno de Sonic hedgehog (Shh) sobre precursores de oligodendrocitos y su uso en enfermedades desmielinizantes. La presente invención se refiere al efecto mitogénico de la proteína Sonic hedgehog (Shh) sobre células precursoras de oligodendrocitos. En concreto, y debido a dicho efecto mitogénico, la presente invención comprende el uso de Shh para la expansión de células precursoras de oligodendrocitos *in vitro*, así como su aplicación en la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

ES 2 323 913 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Efecto mitógeno de Sonic hedgehog (Shh) sobre precursores de oligodendrocitos y su uso en enfermedades desmielinizantes.

La presente invención se refiere al efecto mitogénico de la proteína Sonic hedgehog (Shh) sobre células precursoras de oligodendrocitos. En concreto, y debido a dicho efecto mitogénico, la presente invención comprende el uso de Shh para la expansión de células precursoras de oligodendrocitos *in vitro*, así como su aplicación en la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades neurológicas, en su conjunto, suponen uno de los mayores problemas clínicos y sociales en el mundo actual, especialmente en países de un cierto nivel de desarrollo. Con frecuencia, estos trastornos están asociados con una atrofia de las estructuras afectadas del sistema nervioso central o periférico, o bien con muerte de alguno de sus tipos celulares.

Entre estas patologías figuran las enfermedades desmielinizantes, que son un grave problema clínico y social, como es el caso de la esclerosis múltiple (EM), en las que, por diversas causas, se daña la vaina de mielina que recubre los axones de las neuronas y que actúa protegiéndolos y facilitando su función.

Los oligodendrocitos es la población celular más afectada en enfermedades desmielinizantes, donde la muerte focal de oligodendrocitos causa la pérdida de cubierta miélica de las fibras en algunas zonas del Sistema Nervioso Central (SNC). Estas zonas se conocen también con el nombre de placas de desmielinización. Los oligodendrocitos se originan a partir de precursores oligodendrogiales (OPs); éstos existen en el cerebro adulto de los mamíferos, pero, aunque en respuesta a una lesión se movilizan hacia la zona del cerebro lesionada, lo cierto es que no invaden la placa de desmielinización o, si lo hacen, mueren una vez dentro. De ahí que no se produzca una reparación efectiva del daño celular de manera espontánea.

Hasta la fecha, los tratamientos de enfermedades desmielinizantes tienen por objeto el aspecto autoinmune-inmunológico de la patología. Si nos centramos en la enfermedad más conocida, como es la esclerosis múltiple, van encaminados a disminuir el número de brotes de la enfermedad, por los que evoluciona la enfermedad y que son los causantes de los daños que quedan tras la remisión de cada brote inflamatorio: una vez que pasa el brote es cuando quedan los daños establecidos que determinan la calidad de vida del paciente y la evolución y el pronóstico de la enfermedad. Si disminuye el número de brotes, disminuye el riesgo de quedar con daño establecido. Se trata, por tanto, de tratamientos paliativos, pero, en ningún caso, encaminados a recuperar la vaina de mielina de las zonas afectadas. Así se usan antiinflamatorios de forma específica, como es el Interferón-Gamma, Immurel, etc., o de forma inespecífica como es el caso de los corticoides. Las nuevas líneas de investigación se están basando en la remielización y el uso de terapias celulares, pero sin éxito hasta el momento, debido al gran desconocimiento de la biología de las células de la glía que intervienen en el proceso de remielización (cfr. Merchán *et al.*, *Farmacoterapia* 2004, vol. 2, pp. 19-29; Dubois-Dalcq *et al.*, *Neuron* 2005, vol. 48, pp. 9-12).

Por lo tanto existe la necesidad de proporcionar nuevos compuestos capaces de recuperar la vaina de mielina de las zonas afectadas.

Descripción de la invención

Un primer aspecto de la invención proporciona un nuevo uso de Sonic hedgehog (Shh) basado en el efecto mitogénico que produce sobre células precursoras de oligodendrocitos (OPs) así como la utilización del Shh para la expansión *in vitro* de precursores de oligodendrocitos. En la presente invención se muestra como en presencia de Shh las células precursoras de oligodendrocitos proliferan (Ejemplo 1) *in vitro*; mientras que, en ausencia de Shh, las células precursoras de oligodendrocitos no proliferan en la misma medida.

Por otra parte, en el caso de una lesión producida por patologías desmielinizantes hay que tener en cuenta que la posibilidad de realizar un trasplante celular es muy compleja, por lo que, en el diseño de terapias celulares debería incluirse la administración de factores como Shh, para así aumentar el número de progenitores de oligodendrocitos en la vecindad de dichas lesiones y el efecto proliferativo de Shh podría sobreponerse a la adversa muerte celular que ocurre en las zonas de desmielinización. Shh es, por consiguiente, una molécula útil en el tratamiento de la esclerosis múltiple y de otras lesiones desmielinizantes dado su efecto mitogénico sobre los OPs.

Adicionalmente, el uso de Sonic hedgehog como herramienta terapéutica es interesante tanto para inducir la proliferación de los precursores de oligodendrocitos en zonas adyacentes a dichas lesiones como para su movilización hacia aquellas zonas lesionadas. Esto permitirá una eficaz repoblación de oligodendrocitos en zonas desmielinizadas.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención comprende el uso de Shh y/o los precursores de oligodendrocitos expandidos *in vitro*, por la acción de Shh, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, como es el caso pero sin limitarse a la esclerosis múltiple.

ES 2 323 913 B1

La capacidad proliferativa que presenta Shh para los precursores de oligodendrocitos es elevada y rápida, por lo que existe la posibilidad de una excesiva proliferación celular, para evitarlo una realización particular de la presente invención proporciona la elaboración de una composición farmacéutica que comprende la liberación de una cantidad terapéuticamente efectiva de Shh mediante un mecanismo de control molecular, como por ejemplo pero sin limitarse a microesferas acrílicas (SIGMA), biopolímeros de poro controlable, liposomas, bombas de tipo Alzet etc...

Otra realización de la presente invención comprende el uso de Shh y/o de los precursores de oligodendrocitos expandidos *in vitro*, mediante el uso de Shh, para la elaboración de una composición para su empleo como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

Un aspecto más de la invención comprende una composición farmacéutica que contiene Shh y/o precursores de oligodendrocitos y además un vehículo farmacéuticamente compatible.

A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones de la especificación, la palabra “comprende” y las variaciones de la misma, no pretenden excluir otros aspectos de la presente invención, que resultarán evidentes para un experto en la materia a la vista de la descripción.

La exposición detallada de los modos de realización y de las figuras que siguen se proporciona a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el efecto mitógeno de Shh en precursores de oligodendrocitos.

La Fig. 2 muestra el tipo de linaje celular derivado de la proliferación de precursores de oligodendrocitos en presencia de Shh.

Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad de la aplicación de Shh en células precursoras de oligodendrocitos.

Ejemplo 1

Efecto mitogéno de Shh en células precursoras de oligodendrocitos

Como fuente de precursores de oligodendrocitos (OPs) se utilizó explantes de nervio óptico de ratones CD1 y transgénicos plp-GFP, a edad embrionaria E16-16.5, edad a la que estos nervios están homogéneamente colonizados por OPs que, además, son las únicas células que migran al exterior de los explantes.

Una vez disecado el nervio, se procedió a obtener piezas de unos 200-250 μm de largo (cada una de ellas, un explante) y se colocó en cultivo en geles tridimensionales de colágeno en un medio de cultivo de Bottenstein-Sato modificado [glutamina 1% (v/v), penicilina-estreptomicina 1% (v/v), piruvato de sodio 1% (v/v), suero fetal de ternero 1% (v/v), transferrina 0,1 mg/ml, insulina 9,3 ng/ml, progesterona 62 ng/ml, putrescina 16 ng/ml, selenito de sodio 40 ng/ml, T3 0,3 ng/ml, T4 0,4 ng/ml y albúmina bovina (BSA) 0,03% (v/v)].

Para obtener una fuente inmóvil de la proteína Shh se utilizó unas microesferas acrílicas (SIGMA) que retienen el Shh en su superficie y lo van liberando al medio de cultivo progresivamente. Se cultivaron los explantes y las microesferas durante tres días (3DIV).

Para estudiar la proliferación se utilizó la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) para lo cual se añadió al medio de cultivo BrdU durante 6 horas a tres tiempos distintos (24 horas, 48 horas y 72 horas).

En la Fig. 1 se observaron los núcleos de las células que han incorporado BrdU (y por tanto se están dividiendo), tanto en condiciones control (Fig. 1A), como en presencia de microesferas con Shh (Fig. 1B). Se observó también que, tanto la cuantificación del número total de células BrdU⁺ (C), como el porcentaje de células BrdU⁺ con respecto al total de células que hay fuera de los explantes (D) es mayor en presencia de Shh que en control. ($p < 0.05$ Test de la *t* de Student). El número fue mayor en todos los tiempos, aunque diferencias significativas se encontraron solo durante el primer (1 DIV) y segundo (2DIV) día de cultivo.

Ejemplo 2

Linaje celular derivado del efecto proliferativo de Shh en precursores de oligodendrocitos

Este efecto proliferativo de Shh dio lugar a una serie de células nuevas que se identificaron como pertenecientes al linaje oligodendroglial según se muestra en la figura 2.

Para este ejemplo se utilizaron una serie de marcadores característicos de linajes celulares específicos.

ES 2 323 913 B1

Ninguna de las células que salieron de los explantes pertenecían al linaje neuronal, ya que no se detectó expresión alguna del marcador pan-neuronal Tuj-1 (Fig. 2A).

5 De la misma forma, se realizó una inmunohistoquímica para dos de los marcadores más tempranos del linaje astrogial (Pax-2 y GFAP), y se observó que prácticamente la totalidad de las células que proliferaron en respuesta al Shh no expresan ninguno de estos dos marcadores (Fig. 2B y Fig. 2D respectivamente).

10 Puesto que astrocitos y oligodendrocitos son dos tipos celulares bastante relacionados en su origen es lógico observar en el interior de los explantes marcaje correspondiente al linaje astrogial (Pax-2 y GFAP; Fig. 2B, D), pero en ningún caso estas células respondieron a Shh.

15 Por último, se utilizó un marcador temprano de precursores indiferenciados (Nestina; Fig. 2E) y un marcador igualmente temprano pero específico del linaje oligodendroglial (plp; Fig. 2F) se observó una población de precursores del linaje oligodendroglial que, por acción de Shh, proliferaban. Las nuevas células fueron, otra vez, del mismo linaje, aunque en determinados casos se trataba de células más inmaduras que expresaban determinados marcadores típicos (Nestina/plp) pero no otros (A2B5). A2B5 marca este tipo celular, la estirpe oligodendroglial, pero a partir de un determinado grado de diferenciación, y no antes (cfr. Rowitch, D.H. *Nat. Rev. Neurosci* 2004, vol. 5, pp. 409-419). Ya que las nuevas células que han proliferado, las que incorporan la BrdU, son de estirpe oligodendroglial (Figura 2), pero aún no han madurado lo suficiente como para empezar a expresar A2B5.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 323 913 B1

REIVINDICACIONES

1. Uso de Shh como mitógeno de precursores de oligodendrocitos.
- 5 2. Uso del Shh según la reivindicación 1, para la expansión *in vitro* de precursores de oligodendrocitos.
3. Uso del Shh según la reivindicación 1, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
- 10 4. Uso del Shh según la reivindicación 1, para la elaboración de una composición para su empleo como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
- 15 5. Uso del Shh según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.
6. Uso de Shh según la reivindicación 1 y de precursores de oligodendrocitos para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
- 20 7. Uso de Shh según la reivindicación 1 y de precursores de oligodendrocitos, para la elaboración de una composición para su empleo como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
8. Uso de Shh y de precursores de oligodendrocitos, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.
- 25 9. Uso de precursores de oligodendrocitos para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
- 30 10. Uso de precursores de oligodendrocitos, para la elaboración de una composición para su empleo como coadyuvante en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.
11. Uso de precursores de oligodendrocitos según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.
- 35 12. Composición farmacéutica que comprende Shh, precursores de oligodendrocitos o la combinación de ambos.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 14. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, que además comprende un mecanismo de control molecular para liberar una cantidad terapéuticamente efectiva de la misma.

45

50

55

60

65

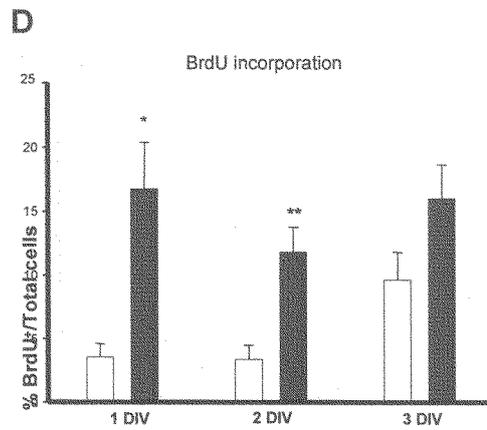
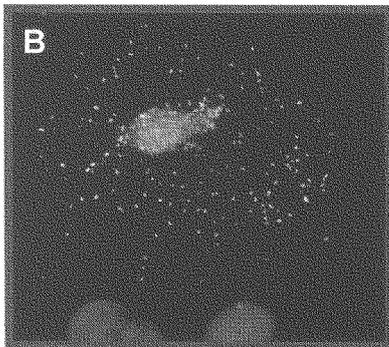
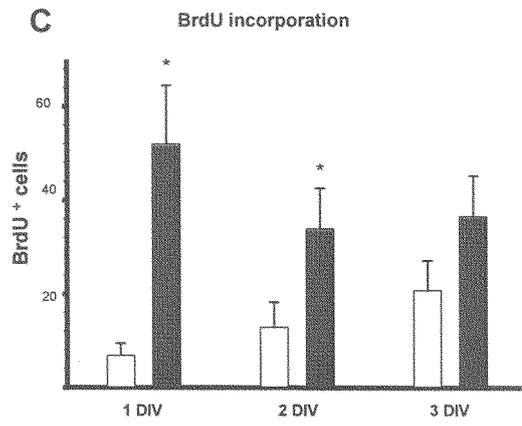
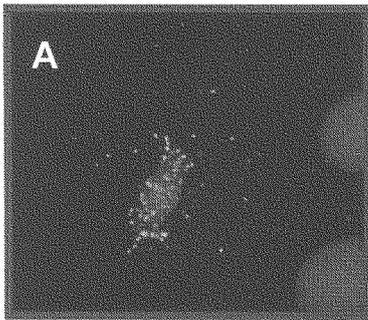


FIG.1

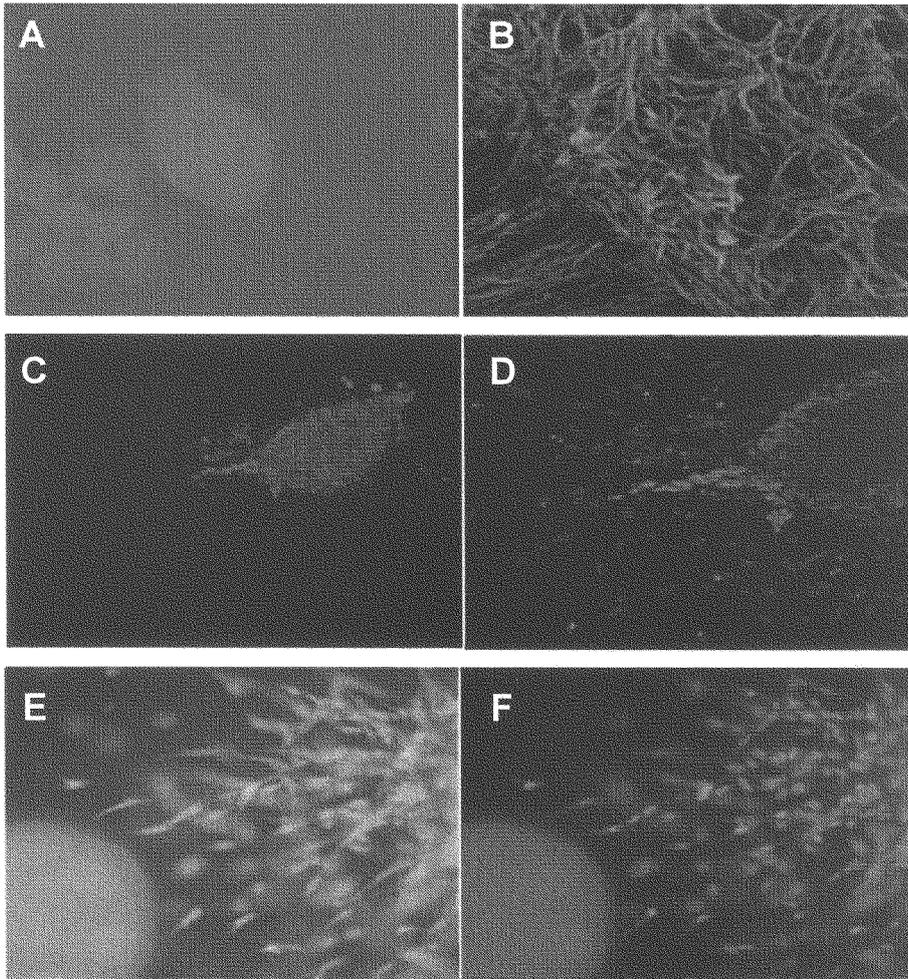


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 323 913

② Nº de solicitud: 200600697

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.03.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 38/00** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BAMBAKIDIS, N.C, et al. Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion.2004. The Spine Journal. Vol. 4, páginas 16-26. Página 16.	1,3,4,6,7, 9,10,12-14
X	BAMBAKIDIS, N.C, et al. Sonic hedgehog-induced neural precursor proliferation after adult rodent spinal cord injury. 2003. J. Neurosurg. Vol. 99, páginas 70-75. Página 70..	1,3,4, 12-14
Y		6-8
X	WO 2005007797 A2 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD) 27.01.2005, reivindicaciones.	9-14
Y		6-8

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
01.07.2009

Examinador
I.Rueda Molins

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200600697

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.07.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2, 4, 5, 8, 10, 13, 14	SÍ
	Reivindicaciones	1, 3, 6, 7, 9, 11, 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2, 5	SÍ
	Reivindicaciones	1, 3, 4, 6-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BAMBAKIDIS, N.C, et al. Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. The Spine Journal.	2004
D02	BAMBAKIDIS, N.C, et al. Sonic hedgehog-induced neural precursor proliferation after adult rodent spinal cord injury. J. Neurosurg.	2003
D03	WO 2005/007797 A2 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD).	27.01.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga: el uso de Shh como mitógeno de precursores de oligodendrocitos (reivindicaciones 1 -8), el uso de precursores de oligodendrocitos para la elaboración de una composición farmacéutica (reivindicaciones 9 - 11) y una composición farmacéutica que comprende Shh, precursores de oligodendrocitos o la combinación de ambos (reivindicaciones 12 - 14).

El documento D01, que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga el uso de Shh y de precursores de oligodendrocitos para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes.

El documento D02, divulga como Shh juega un papel importante en la proliferación de precursores de oligodendrocitos.

El documento D03, divulga el uso de precursores de oligodendrocitos para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

En la solicitud de patente se reivindica el uso de Shh como mitógeno de precursores de oligodendrocitos, tanto para la elaboración de una composición farmacéutica, como para su empleo como coadyuvante, en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes (reivindicaciones 1, 3 y 4). Los documentos D02 (página 70) y D01 (página 16) divulgan como Shh juega un papel importante en la proliferación de precursores de oligodendrocitos. Los documentos muestran como el porcentaje de precursores de oligodendrocitos, aumenta en ratones que presentan una enfermedad desmielinizante, cuando dichos ratones, son tratados con Shh. Por tanto, las reivindicaciones 1 y 3, no presentan novedad según lo establecido en el Artículo 6 LP11/1986. El empleo de Shh como coadyuvante, resultaría evidente para el experto en la materia, a partir de la información divulgada en los documentos D01 y D02. Por ello, la reivindicación 4, presenta novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en el Artículo 8 LP11/1986.

En la solicitud de patente, además, se reivindica el uso de precursores de oligodendrocitos, tanto para la elaboración de una composición farmacéutica, como coadyuvante para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple (reivindicaciones 9 -11). También se reivindica, una composición farmacéutica, que comprende Shh, precursores de oligodendrocitos, o la combinación de ambos, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable o junto con un mecanismo de control molecular de liberación (reivindicaciones 12 -14). Los documentos D03 (reivindicaciones 49, 51 y 52) y D01 (página 16) divulgan un método para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes. (Concretamente, el documento D03, hace referencia, a la esclerosis múltiple), basado en la administración al enfermo de una cantidad efectiva de precursores de oligodendrocitos. Por tanto, las reivindicaciones 9, 11 y 12 no presentan novedad según lo establecido en el Artículo 6 LP11/1986. El hecho de que los precursores de oligodendrocitos se empleen como coadyuvantes y que la composición farmacéutica comprenda además un vehículo farmacéuticamente aceptable o un mecanismo de control molecular de liberación, resultaría evidente para un experto en la materia, a partir de la información divulgada en los documentos D01 y D03. Por ello, las reivindicaciones 10, 13 y 14 presentan novedad, pero no actividad inventiva según lo establecido en el Artículo 8 LP11/1986.

Hoja adicional

Las reivindicaciones 6, 7 y 8 de la solicitud de patente, reivindican el uso de Shh y de precursores de oligodendrocitos para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple. Puesto que en el documento D02, se divulga el uso de Shh para la proliferación de precursores de oligodendrocitos y en el documento D03 el uso de precursores de oligodendrocitos para el tratamiento de la esclerosis múltiple, las reivindicaciones 6, 7 y 8, no presentan actividad inventiva teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D02 y D03 según lo establecido en el Artículo 8 LP11/1986. El documento D01, divulga el uso de Shh para inducir proliferación en precursores de oligodendrocitos así como el uso de precursores de oligodendrocitos para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes, Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en el documento D01, las reivindicaciones 6 y 7 no presentan novedad según lo establecido en el Artículo 6 LP11/1986.