

**PROTEÍNA HIP/PAP O UN DERIVADO DE LA MISMA PARA EL TRATAMIENTO
DE UN TRASTORNO COGNITIVO ASOCIADO CON EL TRASTORNO DE
ANSIEDAD**

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, en el tratamiento y prevención, y en particular en el tratamiento, de un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en un individuo que lo necesita, así como para mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad o para aliviar el déficit cognitivo en un individuo afectado por trastornos cognitivos particulares asociados con el(los) trastorno(s) de ansiedad como se describe a continuación.

Estado de la técnica

15 Si bien la ansiedad ocasional es una parte normal de la vida, los trastornos de ansiedad implican más que preocupación o miedo temporal. Para las personas con un trastorno de ansiedad, la ansiedad no desaparece y puede empeorar con el tiempo con síntomas que interfieren con las actividades diarias, como el desempeño laboral, el trabajo escolar y las relaciones. Estos síntomas deben distinguirse de la ansiedad y el miedo normales, que son reacciones emocionales saludables a los factores estresantes diarios relacionados con las demandas interpersonales, sociales, educativas y vocacionales. Los trastornos de ansiedad pueden manifestarse como un aumento de los niveles de ansiedad (sentirse nervioso, inquieto o tenso, tener una sensación de peligro inminente, pánico o fatalidad, tener dificultad para controlar la preocupación, tener dificultad para tomar riesgos o decisiones) o disminución de los niveles de ansiedad también conocidos como desinhibición conductual y trastornos externalizantes (tienen tendencia a mostrar un alto enfoque, ausencia de moderación, risa inapropiada, desinhibición del habla y la acción en situaciones de novedad, alta búsqueda de novedades y baja evitación de daños, alta novedad y personalidad de búsqueda de sensaciones, control deficiente de los impulsos y propensión a participar en comportamientos de riesgo - N. R. Marmorstein, J Anxiety Disord. 2007;21(3):420-32; J T Nigg, Psychol Bull. 2000 Mar;126(2):220-46; Dina R Hirshfeld-Becker et al., Biol Psychiatry. 2003 Jun 1;53(11):985-99) o una combinación de ambos (N. R. Marmorstein, J Anxiety Disord. 2007;21(3):420-32; Audra K Langley et al., Eur Child Adolesc Psychiatry. 2010 Aug;19(8):637-45; B Wanner et

al., *Psychol Med.* 2012 Nov;42(11):2373-82; Joan P Yoo et al., *Am J Orthopsychiatry.* 2009 Oct;79(4):532-40), especialmente en adultos jóvenes. En ciertos casos, la desinhibición conductual puede ser un precursor del trastorno de ansiedad que muestra la intrincada relación de ambos tipos de trastornos (Dina R Hirshfeld-Becker et al., *Biol Psychiatry.* 2003 Jun 1; 53(11):985-99).

Los trastornos del estado de ánimo y la ansiedad se caracterizan por una variedad de trastornos neuroendocrinos, neurotransmisores y neuroanatómicos. La identificación de las diferencias más relevantes funcionalmente se complica por el alto grado de interconectividad entre los circuitos que contienen neurotransmisores y neuropéptidos en las áreas límbicas, del tronco encefálico y corticales superiores. Por lo tanto, tanto los niveles altos de ansiedad como los niveles bajos de ansiedad podrían compartir el mismo mecanismo, es decir, el desequilibrio de la señalización de los neurotransmisores (Elizabeth I Martin et al., *Psychiatr Clin North Am.* 2009 Sep; 32(3):549-75).

En la Región de las Américas, se estimó en 2015 que más de 58 millones de personas padecían trastornos de ansiedad, lo que representa el 7.7 % de la población femenina y el 3.6 % de la población masculina. Los trastornos de ansiedad son en realidad más frecuentes que cualquier otro trastorno de salud mental, y constituyen la mayoría de los trastornos de salud mental de por vida en todo el mundo (Kessler *et al.*, *Epidemiol Psychiatr Soc.* 2009 Jan-Mar.; 18(1):23-33).

Los trastornos de ansiedad (incluidos los trastornos externalizantes) a menudo se asocian con trastornos cognitivos, ya sea como síntoma primario o secundario.

Un ejemplo de un trastorno cognitivo en donde los trastornos de ansiedad son síntomas primarios es el trastorno obsesivo-compulsivo, que presenta un patrón de pensamientos y miedos no deseados, obsesiones, que conducen a realizar comportamientos repetitivos o actos mentales, o compulsiones, destinados a reducir la ansiedad relacionada con las obsesiones (Anu E Castaneda et al., *J Affect Disord.* 2008 Feb; 106(1-2):1-27; Ashwini Vishwanathan, *Indian J Psychol Med.* 2022 Nov;44(6):558-566). La disfunción cognitiva (disminución del aprendizaje y la memoria de trabajo) también se ha evidenciado en los trastornos externalizantes y los trastornos de desinhibición conductual de los trastornos de ansiedad, como se observa en el trastorno bipolar, así como en el abuso de sustancias y alcohol (Michael J Endres et al., *J Abnorm Psychol.* 2011, may;120(2):336-51).

Los síntomas de ansiedad pueden ser secundarios a otros trastornos y, en particular, pueden ser secundarios en varios trastornos cognitivos. En estos trastornos cognitivos, la

alteración de las funciones cognitivas, en particular cuando se asocia con una pérdida de memoria leve a severa, conduce a una alteración de la respuesta normal a situaciones ansiogénicas y, por lo tanto, a trastornos de ansiedad.

5 No todos los trastornos cognitivos están asociados con trastornos de ansiedad. Por ejemplo, se pueden citar algunos niveles de deterioro cognitivo leve, hidrocefalia normotensiva o trastornos neurológicos relacionados con la disfunción cognitiva.

Dependiendo del trastorno cognitivo considerado, o incluso dependiendo de la etapa del trastorno cognitivo considerado, la alteración de la respuesta normal a una situación ansiogénica puede materializarse por un aumento o una disminución de los comportamientos
10 similares a la ansiedad.

Ambos comparten un mecanismo común que comprende un desequilibrio en la neurotransmisión en las áreas que controlan el estado de ánimo y la ansiedad.

Por lo tanto, existe una creciente necesidad de nuevos activos capaces de prevenir y/o tratar un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en un individuo que lo
15 necesita.

Además, existe una creciente necesidad de prevenir una alteración de las reacciones emocionales de un individuo a los factores estresantes, en particular en un individuo afectado por un trastorno cognitivo que se espera que induzca el desarrollo de (un) trastorno(s) de ansiedad.

20 De hecho, existe la necesidad de nuevos activos capaces de restaurar reacciones emocionales saludables a los factores estresantes, en particular en un individuo afectado por un trastorno cognitivo asociado con un trastorno de ansiedad.

También existe la necesidad de nuevos activos capaces de restaurar un nivel fisiológico de ansiedad en un individuo, en particular en un individuo afectado por un trastorno
25 cognitivo asociado con un trastorno de ansiedad.

También existe la necesidad de nuevos activos capaces de mejorar la memoria de un individuo afectado por un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad.

En consecuencia, existe una creciente necesidad de nuevos activos capaces de mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con
30 trastorno(s) de ansiedad, seleccionados del grupo que consiste de trastorno del espectro autista, síndrome de Angelman, síndrome de Down y otras deficiencias cognitivas relacionadas con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o neurosarcoidosis.

También existe la necesidad de nuevos activos capaces de aliviar el déficit cognitivo en un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

La presente invención proporciona una solución a estos problemas.

Resumen de la invención

El solicitante ha demostrado que, sorprendentemente, la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, hace posible mejorar la memoria en un modelo de ratón de trastornos cognitivos asociados a la ansiedad. La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, también es capaz de rescatar déficits cognitivos y, más particularmente, de restaurar un comportamiento similar a la ansiedad normal en respuesta a una situación ansiogénica en este modelo, así como en un modelo de dieta alta en grasas (HFD).

Sin querer estar atados a ninguna teoría, los inventores plantean la hipótesis de que HIP/PAP puede restaurar la homeostasis de los neurotransmisores por acción directa o indirecta (en los sistemas gabaérgico y glutamatérgico). De hecho, los resultados de los ejemplos adjuntos indican una restauración de los niveles fisiológicos de ansiedad (al nivel de los controles) en los ratones tratados con HIP/PAP.

Además, los inventores han demostrado sorprendentemente tanto la capacidad de prevenir la alteración de la cognición como la capacidad de mejorar la cognición de los individuos que presentan una alteración de la cognición después de la administración de la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma.

Por lo tanto, la proteína HIP/PAP puede utilizarse ventajosamente para:

- tratar y/o prevenir, en particular tratar, un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en una persona que lo necesite;

en particular, tratar y/o prevenir, en particular tratar, un trastorno cognitivo asociado a un trastorno externalizante, seleccionándose el trastorno cognitivo en particular del grupo formado por el trastorno bipolar, el abuso de sustancias, los trastornos por déficit de atención y los trastornos psicóticos;

- mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad, más particularmente seleccionado del grupo que consiste en trastorno del espectro autista, síndrome de Angelman, síndrome de Down y otros trastornos cognitivos relacionados con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o *neurosarcoidosis*; y

- aliviar el déficit cognitivo en un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

La presente invención se relaciona en consecuencia con los siguientes ítems:

Ítem 1: Una proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso en el tratamiento y/o prevención, en particular el tratamiento, de un trastorno cognitivo asociado con los trastornos de ansiedad en un individuo que lo necesita.

Ítem 2: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con el ítem 1 en donde el/los trastorno(s) de ansiedad asociado con el trastorno cognitivo es:

(i) un síntoma primario, como en el trastorno obsesivo-compulsivo, y/o

(ii) un síntoma secundario, como en una enfermedad neurodegenerativa seleccionada en el grupo que consiste en trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

Ítem 3: Una proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso en la mejora de la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad, seleccionado del grupo que consiste en trastorno del espectro autista, síndrome de Angelman, síndrome de Down y otros trastornos cognitivos relacionados con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o *neurosarcoidosis*.

Ítem 4: Una proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso en el alivio del déficit cognitivo en un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la

epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

5 **Ítem 5:** La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con cualquiera de los ítems 1 a 4, en donde el trastorno de ansiedad es un trastorno externalizante y, en particular, el trastorno cognitivo se selecciona del grupo que consiste en trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención y trastornos psicóticos.

10 **Ítem 6:** Una proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso en la prevención y/o tratamiento de los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por la dieta en un individuo que lo necesita, y en particular los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por una dieta alta en grasas.

Ítem 7: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 6, en los que el individuo es un mamífero, en particular un ser humano.

15 **Ítem 8:** La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 7, en donde la proteína HIP/PAP comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias establecidas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y es en particular la secuencia establecida como SEQ ID NO: 4.

20 **Ítem 9:** La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1 a 8, en donde dicho derivado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y una actividad biológica de la misma naturaleza que la
25 secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y más particularmente una identidad de secuencia de al menos el 80 % con la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 4 y una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 4.

30 **Ítem 10:** La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con un cualquiera de los ítems 1 a 9, en donde la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, se encuentra en una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable.

Ítem 11: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para uso de acuerdo con el ítem 10, en donde la composición es para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal o rectal.

5 **Ítem 12:** La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para uso de acuerdo con el ítem 10 u 11, en donde la composición es para administración oral, subcutánea, intravenosa, tópica o local.

Ítem 13: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 10 a 12, en donde la composición comprende además al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un déficit cognitivo, como
10 por ejemplo un agente seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la colinesterasa, como donepezilo, rivastigmina o galantamina; reguladores de glutamato; como la memantina; inhibidores de la colinesterasa, en particular en combinación con reguladores del glutamato, como la combinación de donepezilo y memantina; metilfenidato; anfetamina; atomoxetina; agonistas de AMPA-R; "agonistas nicotínicos alfa7"; guanfacina; bupropión; vortioxetina y D-cicloserina.
15

Ítem 14: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 10 a 13, en donde la composición comprende además al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de ansiedad, en particular seleccionado del grupo que consiste en inhibidores selectivos de la recaptación de
20 serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, moduladores del calcio, azapirona, inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A, agomelatina, quetiapina y vortioxetina, y más particularmente seleccionados del grupo que consiste de citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, duloxetina, venlafaxina, clomipramina, pregabalina, buspirona, moclobemida, agomelatina,
25 quetiapina y vortioxetina.

Ítem 15: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con el ítem 14, en donde el trastorno cognitivo asociado con los trastornos de ansiedad se selecciona del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva
30 relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

Ítem 16: La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 10 a 15, en donde la composición comprende además al menos un agente conocido por ser útil para aliviar los síntomas asociados con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en el trastorno del espectro autista, el síndrome de angelman, el síndrome de Down y otras deficiencias cognitivas relacionadas con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o neurosarcoidosis, en particular seleccionadas del grupo que consiste en un medicamento anticonvulsivo; suplementos de aminoácidos; antifúngicos; corticosteroides, como prednisona; e inmunosupresores, como metotrexato o azatioprina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A representa la actividad locomotora, en particular la distancia recorrida en campo abierto) de varios grupos de ratones: de izquierda a derecha en la abscisa: ratones de control normales (Ntg – n = 10); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – n=8); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – n=8).

Ordenada: Distancia total recorrida (m)

La Figura 1B representa el tiempo inmóvil en campo abierto de varios grupos de ratones: de izquierda a derecha en la abscisa: ratones control normales (Ntg – n=10); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – n=8); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – n=8).

Ordenada: tiempo total inmóvil (segundos)

La Figura 2 representa los resultados de una prueba de reconocimiento de objetos novedosos realizada en varios grupos de ratones: de izquierda a derecha en la abscisa:

ratones de control normales (Ntg – n = 10); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – n=8); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – n=8).

Cada grupo que muestra da como resultado la presencia de un objeto familiar (izquierda) o de un objeto novedoso (derecha).

Ordenada: tiempo con objetos (segundos).

Se realizó ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post hoc de Comparaciones Múltiples de Tukey, establecida en una significancia de $p < 0.05$. Los datos se analizaron

utilizando GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, San Diego California UDA, www.Graphpad.com).

Las figuras 3A y 3B representan los resultados de un experimento de laberinto de agua de brazo radial realizado en varios grupos de ratones:

5 ratones de control normales (Ntg – n = 10); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – n=8); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – n=8).

La Figura 3A representa el número de errores para bloques de 3 ensayos consecutivos promediados para cada grupo de ratones al final de la prueba para un total de 15
10 ensayos durante el día 1 (bloques 1 a 5) y 15 ensayos durante el día 2 (bloques 6 a 10), de izquierda a derecha: Ntg; Tg Veh, Tg HIP/PAP.

Ordenada: Número de errores

La Figura 3B representa la suma del número total de errores cometidos por los ratones en cada grupo (Ntg ; Tg Veh ; Tg HIP/PAP ) durante el día 2 (bloques 5
15 a 10).

Ordenada: número de errores

Para los bloques de errores durante los 2 días (Fig. 3A), se realizó ANOVA de dos vías con medidas repetidas, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, establecida en una significancia de $p < 0.05$. Para el número total de errores durante el
20 día 2 (Fig. 3B), se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, establecida en una significancia de $p < 0.05$. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, San Diego California UDA, www.Graphpad.com).

Las figuras 4A y 4B representan los resultados de un ensayo de inversión del
25 experimento del laberinto de agua del brazo radial realizado en varios grupos de ratones: ratones de control normales (Ntg – n = 10); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – n=8); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – n=8).

La Figura 4A representa el número de errores cometidos por los ratones de cada
30 grupo (Ntg ; Tg Veh ; Tg HIP/PAP ) como bloques de 3 ensayos consecutivos promediados para cada grupo de ratones al final del día para un total de 15 ensayos.

Ordenada: bloque 1 a 5 (de izquierda a derecha).

La Figura 4B representa el número combinado de errores cometidos por cada grupo de ratones en todos los ensayos (de izquierda a derecha: Ntg; Tg Veh, Tg HIP/PAP).

Para los bloques de errores (Fig. 4A), se realizó ANOVA de dos vías con medidas repetidas, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, establecida en una significancia de $p < 0.05$. Para el número total de errores (Fig. 4B), se realizó ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, establecida en una significancia de $p < 0.05$. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software, San Diego California UDA, www.Graphpad.com).

La Figura 5 representa el comportamiento similar a la ansiedad de cada grupo de ratones detallado anteriormente evaluado mediante mediciones de duración en brazos abiertos versus cerrados de un laberinto en cruz elevado (EPM), Fig. 5 A, y una comparación de la duración en brazos cerrados solo entre los diferentes grupos (Fig. 5B).

De izquierda a derecha en la abscisa: ratones control normales (Ntg – $n = 10$); ratones APP/PS1 tratados con una cápside vacía de rAAV9 (Tg Veh – grupo de control – $n=8$); o ratones APP/PS1 tratados con rAAV9-hHIP/PAP (Tg HIP/PAP – $n = 8$).

Cada grupo que muestra da como resultado los brazos abiertos (izquierda) o los brazos cerrados (derecha).

Ordenada: número de entradas.

La Figura 6 A representa una construcción del virus adenoasociado recombinante serotipo 9 (rAAV9) para sobreexpresar HIP/PAP humano marcado con la etiqueta de hemaglutinina (HA).

La Figura 6B representa el resultado de la inmunohistoquímica con anti-HA en el hipocampo de ratones APP/PS1 inyectados con una cápside vacía de rAAV9 después de 6 meses de expresión.

La Figura 6C representa el resultado de la inmunohistoquímica con anti-HA en el hipocampo de ratones APP/PS1 inyectados con una cápside rAAV9-HIP/PAP después de 6 meses de expresión.

La Figura 6D representa el nivel de HIP/PAP humano en la corteza de ratones APP/PS1 inyectados con rAAV9-HIP/PAP medido por ELISA 6 meses después de la inyección. HA es hemaglutinina de influenza humana. Escala: 100 μm , escala del inserto: 30 μm .

Abscisa : Corteza ; Ordenada : Concentración de HIP/PAP (pg/mg).

Las Figuras 7A y 7B representan la representación micrográfica de la tinción rojo congo en los grupos de ratones APP/PS1 tratados con cápside vacía de rAAV9 (Fig. 8A) o rAAV9-HIP/PAP (Fig. 8B) durante 6 meses. Escala: 100 μ m.

La Figura 7C representa la cuantificación del porcentaje de área teñida para rojo congo en la corteza anterior (ACX), hipocampo (HPC) y corteza posterior (PCX) utilizando el análisis del software nearcyte para los dos grupos de ratones mencionados anteriormente: grupos de ratones APP/PS1 tratados con cápside vacía rAAV9 o rAAV9-HIP/PAP durante 6 meses.

Ordenada : Área positiva teñida (relación).

Abscisa: de izquierda a derecha: ACX, HPC y PCX. Para cada uno, de izquierda a derecha: grupo de ratones tratados con cápside vacía de rAAV9 (APP/PS1 Vacío) y grupo de ratones tratados con rAAV9-HIP/PAP (APP/PS1 HIP/PAP).

Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La Figura 7D representa la cuantificación de los niveles de beta amiloide en ACX y HPC cuantificados con ELISA para los dos grupos de ratones mencionados anteriormente: grupos de ratones APP/PS1 tratados con cápside vacía de rAAV9 o rAAV9-HIP/PAP durante 6 meses.

Ordenada : Concentración (ng/mL).

Abscisa: de izquierda a derecha: ACX y HPC. Para cada uno, de izquierda a derecha: grupo de ratones tratados con cápside vacía de rAAV9 (APP/PS1 Vacío) y grupo de ratones tratados con rAAV9-HIP/PAP (APP/PS1 HIP/PAP).

Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

La Figura 8 representa un análisis de Western Blot con micrografía del blot (Figura 8A) y análisis de la cuantificación de densitometría de banda de catalasa (Figura 8B), hemo oxigenasa 1 (Ho-1) (Figura 8C) y superóxido dismutasa (SOD-1) (Figura 8D) en el hipocampo de ratones APP/PS1 tratados con cápside vacía de rAAV9 (APPPS1 vacía) o rAAV9-HIP/PAP (APPPS1 HIP/PAP), y controles no transgénicos (Ntg). N = 6-10. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. *p <0.05, **p <0.01. Se utiliza ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Valores atípicos eliminados de acuerdo con la prueba de Grubb con prisma.

Ordenadas para 8B a 8D : Proporción con respecto a la proteína total

Abscisa para 8B a 8D: Ntg, APPPS1 vacío y APPPS1 HIP/PAP.

La Figura 9A representa la concentración de HIP/PAP en muestras de plasma y cerebro después de la administración subcutánea de rHIP/PAP (o ALF5755) en ratones (n = 7) a través de la bomba Alzet durante 28 días.

Ordenada izquierda : concentración (mg/mL)

5 Ordenada derecha : concentración (pg/mL)

La Figura 9B representa las imágenes IVIS (In Vivo Imaging System) de ratones no transgénicos 30 min después de la inyección intravenosa con 250 µg de albúmina sérica bovina (BSA) (arriba) o rHIP/PAP (abajo) marcada con vivotag 680XL (Revvity, Hopkinton, MA, EUA).

10 Las Figuras 9C y 9D representan la concentración de HIP/PAP en muestras de plasma (Figura 9C) y en muestras de cerebro (Figura 9D) 1 mes después de la inyección intravenosa (corazón, Fig. 9C, n=3) o intramuscular (extremidad posterior, Fig. 9D, n=2) de rAAV9-HIP/PAP 2×10^{13} vg en los ratones mencionados anteriormente.

La Figura 10A representa el seguimiento del peso corporal durante 10 semanas de ratones no transgénicos bajo dieta de control (Ntg CD, n = 6) o dieta alta en grasas (Ntg HFD, n = 5) o bajo dieta alta en grasas tratados con rAAV9-HIP/PAP (Ntg HFD HIP/PAP n = 4).

Ordenada : Peso corporal (% basal)

Abscisa : tiempo (semanas de 0 a 10)

La Figura 10B representa el tiempo de permanencia en brazos abiertos "o" versus brazos cerrados "c" durante la prueba de laberinto en cruz elevado (EPM). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Se utilizó ANOVA de una vía y dos vías o ANOVA de medida repetida cuando correspondió, seguido de la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey.

Ordenada : Tiempo de permanencia en brazo(s)

25 Abscisa: de izquierda a derecha: ratones no transgénicos bajo dieta control (Ntg CD), ratones no transgénicos bajo HFD (Ntg HF) y ratones no transgénicos bajo HFD y tratados con rAAV9-HIP/PAP (Ntg HFD HIP/PAP). Para cada grupo, la parte izquierda representa los resultados en brazos cerrados y la parte derecha representa los resultados en brazos abiertos.

30 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

En el contexto de la presente invención, los términos "*prevenir*", "*prevención*" y "*previniendo*" denotan la reducción en menor grado del riesgo o de la probabilidad de

ocurrencia de un fenómeno dado, es decir, en la presente invención, la prevención de un trastorno cognitivo asociado con la ansiedad, en particular de complicaciones seleccionadas del grupo que consiste en úlcera del pie diabético, infección del pie y amputaciones. Los términos "prevenir", "prevención" y "previniendo" también incluyen prevenir el agravamiento, reducir la tasa de progresión o prevenir la recurrencia de dicho fenómeno.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratamiento" o "trato" incluyen el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o condición específica y/o la eliminación de dichos síntomas, es decir, en la presente invención, el tratamiento de un trastorno cognitivo asociado con la ansiedad.

Un "trastorno cognitivo" es cualquier trastorno que afecta significativamente la función cognitiva de un individuo hasta el ítem en que el funcionamiento normal en la sociedad es imposible sin tratamiento. Problemas con la capacidad de una persona para pensar, aprender, recordar, usar el juicio y tomar decisiones. Los signos del trastorno cognitivo varían según el trastorno en particular, pero algunos signos y síntomas comunes se superponen en la mayoría de los trastornos. Algunos de los signos más comunes de trastorno cognitivo incluyen: confusión, mala coordinación motora, confusión de identidad, deterioro del juicio, pérdida de memoria (pérdida de memoria a corto o largo plazo), problemas para concentrarse, completar tareas, comprender, recordar, seguir instrucciones y resolver problemas. Otros signos comunes pueden incluir cambios en el estado de ánimo o el comportamiento, pérdida de motivación y desconocimiento del entorno. El deterioro cognitivo puede ser leve o grave. Algunos trastornos cognitivos se desarrollan en etapas y los síntomas aumentan en gravedad a medida que avanza la enfermedad. La inestabilidad cognitiva tiene efectos tanto a corto como a largo plazo. Algunos efectos comunes a corto plazo incluyen la capacidad de pensar y razonar, pérdida de memoria, un estado de confusión y falta de coordinación. Los efectos a largo plazo incluyen la creciente pérdida de la memoria declarativa, como olvidar nombres y rostros significativos, y una falta general de estabilidad emocional y control sobre las propias acciones, así como demencia (alteración del estado mental y el nivel de conciencia, cambio en la atención, cambios de humor, comportamientos violentos o poco comunes y alucinaciones). De acuerdo con la presente invención, un trastorno cognitivo de interés es un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad. Por "trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad", se entiende que el individuo considerado se ve afectado por al menos un trastorno cognitivo y al menos un trastorno de ansiedad, siendo dicho trastorno de ansiedad un síntoma primario o secundario del trastorno cognitivo. Los términos "síntoma primario" se utilizan para describir

una afección que no es causada por una afección médica diferente. Los términos "*síntoma secundario*" significan que es una consecuencia de otra afección. En consecuencia, de acuerdo con la presente invención, los términos "*trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad*" incluyen tanto los trastornos cognitivos que son consecuencia de los trastornos de ansiedad como los trastornos cognitivos que condujeron al desarrollo de un trastorno de ansiedad.

El diagnóstico de los trastornos cognitivos se puede realizar utilizando diferentes métodos, entre los que se encuentran el Mini Examen del Estado Mental (MMSE), la Evaluación Cognitiva de Montreal (MoCA), el Mini-Cog y el Método de Evaluación Cognitiva (CAM), la Puntuación de Coma de Glasgow (GCS), la Escala de Agitación y Sedación de Richmond (RASS) (Kelvin K F Tsoi et al., JAMA Intern Med. 2015 Sep; 175(9):1450-8).

Un "*trastorno de ansiedad*" se ha definido minuciosamente anteriormente. Aunque sentirse ansioso de vez en cuando es una experiencia común, los trastornos de ansiedad son diferentes de los sentimientos típicos o temporales de preocupación o miedo. Los trastornos de ansiedad pueden tomar diferentes formas, incluido el aumento de los niveles de ansiedad que pueden causar sentimientos de nerviosismo, inquietud y peligro inminente, así como dificultad para controlar la preocupación y tomar decisiones. Alternativamente, los trastornos de ansiedad pueden manifestarse como una disminución de los niveles de ansiedad, lo que puede resultar en desinhibición conductual y trastornos externalizantes. Estos trastornos se caracterizan por una tendencia a exhibir un alto enfoque, falta de moderación, risa inapropiada y desinhibición del habla y la acción en situaciones nuevas. También pueden implicar una alta búsqueda de novedades, baja evitación de daños, control deficiente de los impulsos y una propensión a participar en comportamientos de riesgo. En algunos casos, la desinhibición conductual puede incluso ser un precursor de los trastornos de ansiedad. Tanto los trastornos del estado de ánimo como los de ansiedad son afecciones complejas que implican alteraciones en los sistemas neuroendocrino, neurotransmisor y neuroanatómico. Identificar las diferencias entre estos trastornos puede ser difícil debido a las complejas interacciones entre los diferentes circuitos neuronales del cerebro. No obstante, tanto los niveles altos como los bajos de ansiedad pueden deberse a una causa subyacente similar, a saber, un desequilibrio en la señalización de los neurotransmisores.

El diagnóstico de los trastornos de ansiedad se puede realizar mediante cuestionarios como el Inventario de Ansiedad Estado-Rasgo (STAI), el Trastorno de Ansiedad Generalizada 7 (GAD-7), el Inventario de Ansiedad de Beck (BAI), la Escala de Ansiedad de

Autoevaluación de Zung y la Escala de Ansiedad Manifiesta de Taylor (Matthias Rose y Janine Devine, *Diálogos Clin Neurosci.* 2014 Jun; 16(2):197-211). El diagnóstico de los trastornos de ansiedad se realiza por los síntomas, los desencadenantes y los antecedentes personales y familiares de una persona. No existen biomarcadores objetivos ni pruebas de laboratorio que puedan diagnosticar la ansiedad.

Los términos "abuso de sustancias" se refieren al uso excesivo y persistente de una sustancia, como el alcohol o las drogas, a pesar de las consecuencias negativas que puede tener en el bienestar físico, psicológico o social. El abuso de sustancias puede conducir a la adicción, que es una condición crónica y recurrente caracterizada por un comportamiento compulsivo de búsqueda de drogas y el uso de drogas a pesar de las consecuencias dañinas. El diagnóstico del abuso de sustancias generalmente se basa en criterios como la tolerancia (la necesidad de aumentar las cantidades de la sustancia para lograr el efecto deseado), los síntomas de abstinencia, el uso continuo a pesar de las consecuencias negativas y los intentos fallidos de dejar o reducir el uso. Vale la pena señalar que la definición de abuso de sustancias puede variar de acuerdo con la sustancia en cuestión y el contexto en donde se usa.

Los "trastornos por déficit de atención" (ADD), que comprenden el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD), son afecciones médicas que se caracterizan por síntomas de falta de atención, hiperactividad e impulsividad. Los síntomas de falta de atención pueden incluir dificultad para prestar atención, olvido, mala organización y distracción. Los síntomas de hiperactividad pueden incluir inquietud, desasosiego, dificultad para quedarse quieto y hablar en exceso. Los síntomas de impulsividad pueden incluir actuar sin pensar, interrumpir a los demás y dificultad para esperar su turno. El diagnóstico de ADD/ADHD generalmente se basa en una combinación de síntomas, duración y deterioro en el funcionamiento, así como en descartar otras posibles afecciones médicas o psicológicas que puedan estar causando síntomas similares.

Los trastornos psicóticos son un grupo de enfermedades mentales que se caracterizan por una pérdida de contacto con la realidad, que puede incluir síntomas como delirios, alucinaciones, pensamiento desordenado y comportamientos anormales. Los delirios son creencias fijas que no se basan en la realidad y, a menudo, son de naturaleza extraña o paranoica. Las alucinaciones son experiencias sensoriales que no se basan en estímulos externos, como escuchar voces o ver cosas que no existen. El pensamiento desordenado puede incluir dificultad con el pensamiento lógico, habla que es difícil de seguir y saltar entre temas

no relacionados. Los comportamientos anormales pueden incluir gestos o movimientos extraños, falta de expresión emocional y retraimiento social.

Los trastornos psicóticos pueden tener un impacto significativo en la capacidad de una persona para funcionar en la vida diaria y pueden variar de leves a graves en severidad. Los trastornos psicóticos más comunes son la esquizofrenia, el trastorno esquizoafectivo y el trastorno delirante.

Los "inhibidores de la colinesterasa" son sustancias químicas que previenen la descomposición del neurotransmisor acetilcolina. Ejemplos de inhibidores de la colinesterasa son donepezilo, rivastigmina y galantamina. Los "reguladores del glutamato" son sustancias químicas que regulan la actividad del mensajero químico glutamato, que es responsable de ayudar al cerebro a procesar la información. Dichos reguladores son conocidos por mejorar la memoria, la atención, la razón, el lenguaje y la capacidad para realizar tareas simples. Un ejemplo de regulador de glutamato es la memantina. Los "antagonistas de NMDA-R" son sustancias químicas que pueden disminuir de forma no selectiva la actividad anormal de NMDA-R.

Los "agonistas nicotínicos alfa7" son sustancias químicas que se implementan para la normalización de las disfunciones atencionales. Ejemplos de tales agonistas pueden ser, por ejemplo, la clozapina o la 3-2,4 dimetoxibencilideno anabaseína (DMXBA). Se conocen otros ejemplos de agonistas nicotínicos alfa7, como se ilustra, por ejemplo, en Laura F. Martin et al., *Psychopharmacology* (Berl). 2004 Jun; 174(1):54-64 que se incorpora por referencia.

Los "inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina" son particularmente conocidos por ser los antidepresivos más comúnmente recetados. Ejemplos de tales inhibidores pueden ser, por ejemplo, citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina o sertralina.

Los "inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina" son una familia de antidepresivos que inhiben la recaptación de serotonina y norepinefrina. Ejemplos de tales inhibidores son la duloxetina y la venlafaxina.

El "modulador de calcio", también denominado moduladores de los canales de calcio, de los cuales los gabapentinoides son, con mucho, los más prominentemente prescritos, inhiben las señales de dolor propagadas por los canales de calcio dependientes de voltaje situados en la terminal nerviosa central. La pregabalina puede, por ejemplo, citarse como ejemplo de dicho modulador.

Los "inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A (RIMA)" inhiben la descomposición de tres neurotransmisores principales, serotonina, norepinefrina y dopamina reciendo una estrategia de múltiples neurotransmisores para el tratamiento de la depresión. La moclobemida puede citarse, por ejemplo, como ejemplo de dicho producto químico.

5 El "medicamento anticonvulsivo" es un tipo de medicamento que se usa para prevenir o tratar convulsiones o convulsiones mediante el control de la actividad eléctrica anormal en el cerebro. Los medicamentos anticonvulsivos se usan para tratar la epilepsia y otros trastornos convulsivos. También se usan para tratar afecciones médicas, como el trastorno bipolar, el dolor nervioso, las migrañas, la fibromialgia y el síndrome de piernas inquietas.

10 Los "antimicóticos" son medicamentos que matan o detienen el crecimiento de hongos (el plural de hongo) que causan infecciones. También se les llama agentes antimicóticos.

Los "corticosteroides", a menudo conocidos como esteroides, son un medicamento antiinflamatorio. Como costicosteroide, se puede citar la prednisona, por ejemplo.

15 Los "inmunosupresores", o fármacos inmunosupresores, son herramientas terapéuticas clave que inhiben o previenen la actividad del sistema inmunitario. Se pueden citar, por ejemplo, como inmunosupresores metotrexato y azatioprina.

Por "respuesta normal a una situación ansiogénica", se entiende una respuesta fisiológica y psicológica que es apropiada y proporcional al nivel percibido de amenaza o estrés
20 en una situación ansiogénica.

Los términos "situación ansiogénica" se refieren a cualquier situación o circunstancia que pueda provocar o aumentar la ansiedad en un individuo. Estas situaciones pueden incluir, entre otras, hablar en público, confrontaciones, situaciones sociales, incertidumbre sobre el futuro o situaciones que impliquen una amenaza potencial para la
25 seguridad o el bienestar de una persona. En general, las situaciones ansiogénicas son aquellas que tienden a provocar ansiedad o miedo en las personas.

El término "*medio fisiológicamente aceptable*" tiene la intención de denotar un medio que es compatible con el cuerpo del individuo al que se debe administrar dicha
30 composición. Es, por ejemplo, un disolvente no tóxico como el agua. En particular, dicho medio es compatible con administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal o rectal, y más particularmente con administración oral, subcutánea, intravenosa, tópica o local.

Los términos "*homología de secuencia*" o "*identidad de secuencia*" u "*homología*" o "*identidad*" se utilizan indistintamente en este documento. Para el propósito de la invención, se define aquí que para determinar el porcentaje de homología de secuencia o identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos. Para optimizar la alineación entre las dos secuencias, se pueden introducir brechas en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Dicha alineación puede llevarse a cabo en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Alternativamente, la alineación puede llevarse a cabo en una longitud más corta, por ejemplo, aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/basados en aminoácidos. La identidad de secuencia es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias en la región alineada notificada. Se puede realizar una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias utilizando un algoritmo matemático. La persona experta será consciente del hecho de que hay varios programas informáticos diferentes disponibles para alinear dos secuencias y determinar la identidad entre dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) Una visión general de la comparación de secuencias En D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), Deformaciones del tiempo, ediciones de cadenas y macromoléculas: la teoría y la práctica de la comparación de secuencias, págs. 1-44 Addison Wesley).

El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Tanto las secuencias de aminoácidos como las secuencias de nucleótidos pueden alinearse mediante el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE.

Para el propósito de la invención, se utilizó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden J. and Bleasby, A. Trends in genetics 16, (6) pp. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias de proteínas EBLOSUM62 se utiliza para la matriz de sustitución. Para la secuencia de nucleótidos, se utiliza EDNAFULL. Los parámetros opcionales utilizados son una penalización de apertura de brecha de 10 y una penalización de extensión de brecha de 0.5. No se agrega penalización de brecha final. En la sección Salida, se ha indicado Sí en respuesta a la pregunta "Breve identidad y similitud" y "SRS por pares" indicado como formato de alineación de salida.

Después de la alineación por el programa NEEDLE como se describe anteriormente, el porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia de la invención se calcula de la siguiente manera: Número de posiciones correspondientes en la alineación que muestran un aminoácido idéntico o nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total de la alineación después de restar el número total de brechas en la alineación. La identidad definida como en este documento se puede obtener de NEEDLE mediante la opción NOBRIEF y se etiqueta en la salida del programa como "longest-identity".

La similitud de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de la secuencia, se puede determinar mediante alineaciones de secuencias utilizando varios otros algoritmos conocidos en la técnica, preferiblemente con el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877), con hmmlalign (paquete HMMER, <http://hmmer.wustl.edu/>) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80) disponible, por ejemplo, en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> o el programa GAP (algoritmo matemático de la Universidad de Iowa) o el algoritmo matemático de Myers y Miller (1989 – Cabios 4: 11-17) o Clone Manager 9. Los parámetros preferidos utilizados son los parámetros predeterminados, ya que se establecen en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

El grado de identidad de la secuencia (coincidencia de secuencias) puede calcularse utilizando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Un algoritmo similar se incorpora en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410. Las búsquedas de polinucleótidos BLAST se realizan con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de polinucleótidos que son homólogas a los ácidos nucleicos que codifican la proteína correspondiente.

Las búsquedas de proteínas BLAST se realizan con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas al polipéptido SHC. Para obtener alineaciones con brecha con fines comparativos, se utiliza BLAST Gapped como se describe en Altschul et al (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y BLAST Gapped, se utilizan los parámetros predeterminados de los programas respectivos. El análisis de coincidencia de secuencias puede complementarse con técnicas de mapeo de homología establecidas como Shuffle-LAGAN (Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: 154-162) o campos aleatorios de Markov.

Cuando se hace referencia a los porcentajes de identidad de secuencia en la presente solicitud, estos porcentajes se calculan en relación con la longitud total de la secuencia más larga, a menos que se indique específicamente lo contrario.

En realizaciones particulares, el % de identidad entre dos secuencias se determina
5 utilizando CLUSTAL O (versión 1.2.4).

Tal como se usa en este documento, el término "*polipéptido*" se refiere a una molécula que comprende residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y que contiene más de cinco residuos de aminoácidos. Los aminoácidos se identifican mediante designaciones de una o tres letras. El término "proteína", tal como se usa en este documento, es sinónimo del
10 término "*polipéptido*" y también puede referirse a dos o más polipéptidos. Por lo tanto, los términos "*proteína*", "*péptido*" y "*polipéptido*" se pueden usar indistintamente. Los polipéptidos pueden modificarse opcionalmente (por ejemplo, glicosilados, fosforilados, acilados, farnesilados, prenilados, sulfonados y similares) para agregar funcionalidad.

15 Proteína HIP/PAP y derivado de la misma implementada de acuerdo con la invención

La proteína HIP/PAP es conocida por su actividad antiapoptótica y mitogénica en las células hepáticas (US 13/032.521, WO 2004/112824, Simon et al., *FASEB J.* 2003 Aug; 17 (11): 1441-50).

20 También se ha demostrado que un péptido de 15 aminoácidos, derivado de la familia Reg IIIa (HIP/PAP), el péptido HIP (péptido proinsular humano), tiene una actividad regeneradora en los islotes pancreáticos y, por lo tanto, estimula la producción de insulina (US 2010/0093605).

La proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia
25 de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de secuencias establecidas como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, en particular la secuencia establecida como SEQ ID NO: 4.

La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 corresponde a la proteína HIP/PAP de la secuencia SEQ ID NO: 4, de la que se ha eliminado el péptido señal N-terminal de 26
30 aminoácidos de dicha proteína.

En una realización particular, la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 4.

En una realización particular, la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 1.

La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 corresponde a la forma corta de la proteína HIP/PAP y, en comparación con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, se le ha
5 eliminado el propéptido de 11 aminoácidos en la posición N-terminal.

En una realización particular, la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 2.

La secuencia SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 1, a la que se le ha añadido una metionina en la posición N-terminal. El derivado HIP/PAP de la secuencia
10 SEQ ID NO: 3 también se denomina rcHIP/PAP o ALF5755. Este derivado puede, en particular, producirse de forma recombinante en células E. Coli. El propéptido N-terminal de 12 aminoácidos (propéptido de 11 aminoácidos más la metionina adicional) puede escindirse para obtener la forma corta de la proteína HIP/PAP (SEQ ID NO: 2).

En una realización particular, la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención
15 comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos establecida como SEQ ID NO: 3.

De acuerdo con la invención, las formas cortas o largas de la proteína HIP/PAP o de sus derivados pueden utilizarse indistintamente.

Un derivado de la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención designa una forma derivada biológicamente activa de una proteína HIP/PAP de una cualquiera de las secuencias
20 SEQ ID No. 1 a 4. Los términos "*biológicamente activo*" significan que el derivado de la proteína HIP/PAP tiene la misma actividad biológica que la proteína HIP/PAP de una cualquiera de las secuencias SEQ ID No. 1 a 4.

Un derivado de la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el
25 80 % con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, en particular SEQ ID NO: 4, y una actividad biológica de la misma naturaleza que la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, en particular SEQ ID NO: 4.

30 Una actividad biológica de la misma naturaleza que la proteína HIP/PAP de acuerdo con la presente invención es la descrita anteriormente, es decir, la capacidad de tratar y/o prevenir la neuropatía periférica en un individuo, en particular una neuropatía periférica

diabética, y de prevenir en consecuencia una complicación de la neuropatía periférica en un individuo, en particular una complicación como se detalla en otra parte del presente texto.

Como se describe en este documento, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de referencia
5 abarca secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad de aminoácidos con dicha secuencia de aminoácidos de referencia, y también una actividad biológica de la misma naturaleza que dicha secuencia de aminoácidos de referencia.

10 En ciertas realizaciones, la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, puede estar asociada o combinada por enlaces no covalentes con porciones no HIP/PAP. Por ejemplo, la proteína HIP/PAP o un derivado de la misma podría estar asociada a una partícula liposómica. Dependiendo del tipo de liposoma, o del proceso de producción, la proteína HIP/PAP, o el derivado de la misma, puede estar asociada en la superficie del liposoma o encapsulada en el
15 interior de dicho liposoma.

La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, también puede estar asociada con porciones no HIP/PAP por enlaces covalentes. Dichas porciones no HIP/PAP pueden seleccionarse a partir de compuestos proteicos o no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, formando así un derivado pegilado de HIP/PAP.

20 Un derivado de la proteína HIP/PAP de acuerdo con la invención también comprende los derivados que se vuelven biológicamente activos sólo cuando se administran al paciente.

Finalmente, los derivados de la proteína HIP/PAP también comprenden proteínas quiméricas o proteínas de fusión. Dichas proteínas se fusionan con polipéptidos que no son
25 HIP/PAP. Este último puede fusionarse con la parte terminal N o C. Normalmente, la proteína HIP/PAP o un derivado de la misma puede fusionarse con la secuencia GST a nivel de su parte C-terminal, con el fin de facilitar la purificación de las proteínas recombinantes.

En ciertas realizaciones de la invención, la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención se produce recombinantemente en células bacterianas o
30 animales, incluidas las células de insectos y mamíferos, de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

En otras realizaciones, la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención puede aislarse de una célula o de un tejido mediante técnicas de purificación conocidas.

La proteína HIP/PAP y sus derivados también pueden producirse por síntesis química.

En el texto, los términos "*proteína HIP/PAP*" abarcan la proteína HIP/PAP en sí misma, y también los derivados de la misma, tal como se ha descrito anteriormente.

Composiciones implementadas de acuerdo con la invención

La invención también se refiere a la implementación de la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, tal como se definió anteriormente en una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable.

El medio fisiológicamente aceptable, previamente definido en el presente texto, puede elegirse, de acuerdo con la forma farmacéutica y el modo de administración deseado, de los excipientes habituales que son conocidos por los expertos en la técnica (ver Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edición, Osol, A ed., 1980).

A modo de ejemplo, las composiciones implementadas de acuerdo con la invención pueden comprender, de acuerdo con las indicaciones terapéuticas y la proteína HIP/PAP o su derivado:

- a) la proteína HIP/PAP o un derivado de la misma; y
- b) un tampón capaz de mantener el pH en un rango máximo de estabilidad, preferentemente de 1 a 9, más particularmente de 4 a 8 y aún más particularmente de 6 a 7.5; y/o
- c) un detergente o un tensioactivo que estabiliza la proteína o el polipéptido contra la agregación inducida por la agitación; y/o
- d) un isotónico; y/o
- e) un conservante, elegido, por ejemplo, del grupo compuesto por fenoles, alcoholes bencílicos, haluros de benzotolio y cloruros; y/o
- f) agua.

Si el detergente o el tensioactivo utilizado es no iónico, se puede elegir entre polisorbato, PLURONIC TM, polietilenglicol (PEG) o poloxámeros.

Un isotónico permitirá mantener la isotonicidad de la composición y típicamente incluirá polialcoholes como glicerol, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol o manitol, utilizados

solos o en combinación. Alternativamente, se puede usar cloruro de sodio y/o cualquier otra sal inorgánica como isotónica.

El tampón puede ser, por ejemplo, acetato, citrato, succinato, un tampón de fosfato o cualquier otro tampón inorgánico, dependiendo del pH deseado.

5 Los conservantes de fenol, alcohol bencílico, haluro de benzotelio y cloruro son agentes antimicrobianos conocidos. Los conservantes típicos incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, fenol, alcoholes butílicos o bencílicos, alquilparabenos, como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

10 Los excipientes adicionales también pueden comprender antioxidantes, como el ácido ascórbico y la metionina, agentes quelantes, como EDTA, azúcares, como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, etc.

La proteína HIP/PAP, o el derivado de la misma, de acuerdo con la invención puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Se refiere a las sales preparadas a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables o bases farmacéuticamente aceptables no tóxicas, incluidas las sales y ácidos orgánicos e inorgánicos. A modo de ejemplo, se pueden mencionar las sales metálicas alcalinas (sales de sodio y potasio), las sales metálicas alcalinotérreas (sales de calcio y magnesio), las sales de amonio, las sales de bases orgánicas (sales de piridina o trietilamina), las sales de ácidos inorgánicos (clorhidrato, sulfato, nitrato) y las sales de ácidos orgánicos (acetato, oxalato, p-toluenosulfonato).

Una composición implementada de acuerdo con la invención puede ser para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal, intranasal o rectal, y en particular para administración oral, subcutánea, intravenosa, tópica o local.

25 De acuerdo con una realización preferida, la proteína HIP/PAP se administra en una cantidad efectiva, es decir, la cantidad requerida para obtener los efectos esperados de la invención. Dicha cantidad de proteína HIP/PAP se determinará, generalmente empíricamente, de acuerdo con el sujeto a tratar y su condición patológica. La cantidad efectiva también dependerá del modo de administración previsto. Los ajustes necesarios para determinar la cantidad efectiva para obtener el máximo efecto terapéutico corresponden a técnicas que son rutinarias para el clínico.

30 Una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP o de un derivado de la misma puede estar, por ejemplo, entre 0.1 µg/día/kg de peso corporal y 100 mg/día/kg de peso corporal del

individuo al que debe administrarse. Aunque en ciertas realizaciones una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP, o derivado de la misma, puede alcanzar más de 10 mg/kg, una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP, o derivado de la misma, de acuerdo con la presente invención es generalmente inferior a 5 mg/kg de peso corporal, lo que incluye cantidades inferiores a 4.5 mg/kg, 4 mg/kg, 3.5 mg/kg, 3 mg/kg, 2.5 mg/kg o 2000 µg/kg. Más particularmente, una cantidad efectiva de la proteína HIP/PAP, o derivado de la misma, de acuerdo con la presente invención comprende cantidades de al menos 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 6 µg/kg, 7 µg/kg, 8 µg/kg, 9 µg/kg, 10 µg/kg, 15 µg/kg, 20 µg/kg, 25 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 50 µg/kg, 60 µg/kg, 70 µg/kg, 80 µg/kg, 90 µg/kg, 100 µg/kg, 150 µg/kg, 200 µg/kg, 250 µg/kg, 300 µg/kg, 350 µg/kg, 400 µg/kg, 450 µg/kg, 500 µg/kg, 600 µg/kg, 700 µg/kg, 800 µg/kg, 900 µg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg o más con respecto al peso corporal de la persona a la que se administra o debe administrarse.

De acuerdo con realizaciones particulares, la proteína HIP/PAP, o derivado de la misma, se administra de acuerdo con una dosis de entre 10 y 5000 µg/kg, preferentemente entre 100 y 2000 µg/kg con respecto al peso corporal.

En las composiciones implementadas de acuerdo con la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, tópica, local, intratraqueal o intranasal o rectal, el ingrediente activo (la proteína HIP/PAP o un derivado de la misma) puede administrarse en forma de administración unitaria como una mezcla con excipientes farmacéuticos.

Cuando la composición sea para administración oral, dicha composición podrá elegirse del grupo que consiste de un producto alimenticio, una bebida, un producto farmacéutico, un nutracéutico, un aditivo alimentario, un complemento alimenticio y un producto lácteo.

Los modos de administración preferidos son la vía oral, subcutánea, intravenosa, tópica o local, y más particularmente la vía subcutánea, intravenosa, tópica o local.

La administración de un compuesto o composición de la invención puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de una funda, un parche, una almohadilla, una compresa, un vendaje, una cinta, un apósito a base de gasa, una esponja tejida o no tejida o una jeringa.

La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, puede esterilizarse antes de la administración *in vivo*. La esterilización puede obtenerse por filtración en membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización o la reconstitución. La proteína HIP/PAP administrada sistémicamente, o derivado de la misma, puede liofilizarse ventajosamente o

almacenarse en solución. En forma liofilizada, la proteína HIP/PAP, o derivado de la misma, puede formularse generalmente en combinación con excipientes que permitan la reconstitución con un diluyente adecuado, en el momento de su uso.

La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, puede administrarse diariamente
5 en una sola toma o de forma fraccionada (por ejemplo, de 2 a 3 veces al día) hasta obtener el efecto terapéutico deseado. También se puede administrar de forma crónica.

La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, también puede administrarse en forma de ciclo, por ejemplo, ciclos que van de 15 días a 3 meses, opcionalmente repetidos de 1 a 6 veces a dosis e intervalos de tiempo determinados.

10 La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención también puede combinarse en el contexto de una politerapia con agentes conocidos para tratar y/o prevenir un déficit cognitivo. Los agentes adicionales conocidos por ser útiles en la prevención y/o el tratamiento de un déficit cognitivo son conocidos por la persona experta en la técnica y, en particular, pueden seleccionarse del grupo que consiste en un agente
15 seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la colinesterasa, como donepezilo, rivastigmina o galantamina; reguladores de glutamato; como la memantina; inhibidores de la colinesterasa, en particular en combinación con reguladores del glutamato, como la combinación de donepezilo y memantina; metilfenidato; anfetamina; atomoxetina; agonistas de AMPA-R; "agonistas nicotínicos alfa7"; guanfacina; bupropión; vortioxetina y D-cicloserina.

20 La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención también puede combinarse en el contexto de una politerapia con agentes conocidos para tratar y/o prevenir un trastorno de ansiedad. Dichos agentes adicionales conocidos por ser útiles en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno de ansiedad son conocidos por la persona experta en la técnica y, en particular, pueden seleccionarse del grupo que consiste en inhibidores
25 selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, moduladores del calcio, azapirona, inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A, agomelatina, quetiapina y vortioxetina, y más particularmente seleccionadas del grupo formado por citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, duloxetina, venlafaxina, clomipramina, pregabalina,
30 buspirona, moclobemida, agomelatina, quetiapina y vortioxetina.

Una composición implementada de acuerdo con la invención puede comprender, en consecuencia, además de la proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención, al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un

déficit cognitivo y al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de ansiedad, lo que incluye el caso en donde un agente desempeña ambos roles, es decir, es conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un déficit cognitivo y de un trastorno de ansiedad, como la votioxetina, por ejemplo.

5 Por administrado en combinación con, significa que la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende de acuerdo con la invención puede administrarse simultánea o secuencialmente en comparación con los otros agentes o compuestos. Cuando están en composiciones separadas, la composición que comprende la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, de acuerdo con la invención y la composición que
10 comprende al menos un agente adicional pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes.

La proteína HIP/PAP, o un derivado de la misma, de acuerdo con la invención y al menos un agente adicional pueden administrarse en la misma composición o en composiciones separadas.

15 Simultáneamente, se entiende que las composiciones se pueden administrar en el mismo momento o hasta el mismo día o par de días.

Por secuencialmente, se entiende que las composiciones se pueden administrar con al menos varios días, por ejemplo, al menos dos días de diferencia.

20 **Implementación de la proteína HIP/PAP y/o de un derivado de la misma**

Como se mencionó anteriormente, una proteína HIP/PAP, de un derivado de la misma, así como una composición que la comprende, se utilizan en:

- el tratamiento y/o la prevención, en particular el tratamiento, de un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en una persona que lo necesite; y/o

25 en particular, el tratamiento y/o la prevención, en particular el tratamiento, de un trastorno cognitivo asociado a un trastorno externalizante, seleccionándose el trastorno cognitivo en particular del grupo formado por el trastorno bipolar, el abuso de sustancias, los trastornos por déficit de atención y los trastornos psicóticos; y/o

- restaurar un nivel fisiológico de ansiedad en un individuo, en particular en un
30 individuo afectado por un trastorno cognitivo asociado con un trastorno de ansiedad; y/o

- mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad, seleccionado del grupo que consiste en trastorno del espectro autista, síndrome de Angelman, síndrome de Down y otras deficiencias cognitivas

relacionadas con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o *neurosarcoidosis*;

- aliviar el déficit cognitivo en un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2; y/o

- el tratamiento y/o la prevención de los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por la dieta en un individuo que lo necesita, y en particular los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por una dieta alta en grasas.

De hecho, se ha demostrado que los factores ambientales como la dieta afectan la neurobiología y la función cognitiva con efectos sobre el envejecimiento cerebral saludable (Evans et al., 2022, *Front Pharmacol.* 13, 1030609; González Olmo et al., 2021, *Nutrientes.* 13; Spencer et al., 2019, *Neurobiol Aging.* 74, 121–134; Wieckowska-Gacek et al., 2021, *Ageing Res Rev.* 70, 101397). El consumo de una dieta alta en grasas se ha asociado con obesidad, resistencia a la insulina, diabetes, deterioro cognitivo relacionado con la edad y trastornos neurodegenerativos (Buckman et al., 2014, *Brain Behav Immun.* 35, 33–42; Sánchez et al., 2018, *Int J Mol Sci.* 19(2): 533). Los mecanismos a través de los cuales la HFD afecta la función cerebral no están bien establecidos, aunque es probable que la señalización neuroinmune sea un factor contribuyente (Butler, 2021, *Brain Behav Immun Health.* 16, 100298).

Se ha demostrado que la exposición aguda a un HFD, tan corta como tres días, induce neuroinflamación y perjudica la consolidación de la memoria en ratas envejecidas (Spencer et al., 2019, *Neurobiol Aging.* 74, 121–134). También se ha demostrado que la HFD aumenta el comportamiento relacionado con la ansiedad y afecta el aprendizaje y la memoria en ratones jóvenes (Gainey et al., 2016, *Front Behav Neurosci.* 10, 156.). La obesidad inducida por la dieta después de la administración crónica de HFD contribuye a un entorno inflamatorio sistémico, que puede afectar la neuroinflamación, la neurobiología y la función cognitiva (Buckman et al., 2014, *Brain Behav Immun.* 35, 33–42; Butler, 2021, *Brain Behav Immun Health.* 16, 100298).

Como se indicó anteriormente, los trastornos de ansiedad asociados con el trastorno cognitivo pueden ser, en particular:

(i) un síntoma primario, como en el trastorno obsesivo-compulsivo, y/o

(ii) un síntoma secundario, como en una enfermedad neurodegenerativa seleccionada en el grupo que consiste en trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

Un individuo al que se administra la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición para su uso de acuerdo con la invención, puede ser un mamífero y en particular un ser humano.

La proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición para su uso de acuerdo con la invención, puede administrarse en combinación con estándares de atención médica para un déficit cognitivo y/o para un trastorno de ansiedad.

En consecuencia, la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición para su uso de acuerdo con la invención, puede administrarse al individuo que la necesite junto con al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un déficit cognitivo, como por ejemplo un agente seleccionado del grupo que consiste en inhibidores de la colinesterasa, como donepezilo, rivastigmina o galantamina; reguladores de glutamato; como la memantina; inhibidores de la colinesterasa, en particular en combinación con reguladores del glutamato, como la combinación de donepezilo y memantina; metilfenidato; anfetamina; atomoxetina; agonistas de AMPA-R; "agonistas nicotínicos alfa7"; guanfacina; bupropión; vortioxetina y D-cicloserina.

Alternativamente, o adicionalmente, la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición para su uso de acuerdo con la invención, puede administrarse al individuo que la necesite junto con al menos un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de ansiedad, en particular seleccionado del grupo que consiste en inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina, antidepresivos tricíclicos, moduladores del calcio, azapirona, inhibidores reversibles de la monoaminoxidasa A, agomelatina, quetiapina y vortioxetina, y más particularmente seleccionados del grupo que consiste de citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina, duloxetina, venlafaxina, clomipramina, pregabalina, bupiriona, moclobemida, agomelatina, quetiapina y vortioxetina.

Cuando un agente conocido por ser útil en la prevención y/o tratamiento de un trastorno de ansiedad se implementa con la proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una

composición para su uso de acuerdo con la invención en un paciente que lo necesita, el trastorno cognitivo asociado con el trastorno o trastornos de ansiedad puede seleccionarse particularmente más del grupo que consiste en el trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

La proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición para su uso de acuerdo con la invención, puede administrarse más particularmente junto con al menos un agente conocido por ser útil para aliviar los síntomas asociados con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en el trastorno del espectro autista, el síndrome de Angelman, el síndrome de Down y otros trastornos neurológicos relacionados con el deterioro cognitivo, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o neurosarcoidosis, en particular seleccionadas del grupo que consiste en un medicamento anticonvulsivo; suplementos de aminoácidos; antifúngicos; corticosteroides, como prednisona; e inmunosupresores, como metotrexato o azatioprina. En particular, una composición para su uso de acuerdo con la invención puede comprender además al menos un agente conocido por ser útil para aliviar los síntomas asociados con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en el trastorno del espectro autista, el síndrome de Angelman, el síndrome de Down y otras deficiencias cognitivas relacionadas con trastornos neurológicos, como la meningitis crónica, la encefalitis autoinmune o la neurosarcoidosis, en particular seleccionado del grupo que consiste en un medicamento anticonvulsivo; suplementos de aminoácidos; antifúngicos; corticosteroides, como prednisona; e inmunosupresores, como metotrexato o azatioprina.

La presente invención también se refiere a un método para tratar y/o prevenir, en particular el tratamiento, de un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en un individuo que lo necesita, que comprende la administración a dicho individuo de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende.

La presente invención también se refiere a un método para mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad, el trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad se selecciona del grupo que consiste en trastorno del espectro autista, síndrome de Angelman, síndrome de Down y otros trastornos

cognitivos relacionados con trastornos neurológicos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o *neurosarcoidosis*, que comprende la administración a dicho individuo de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma o una composición que la comprende.

La presente invención también se refiere a un método para aliviar el déficit
5 cognitivo en un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de
10 atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2, que comprende la administración a dicho individuo de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma o una composición que la comprende.

La presente invención también se refiere a un método para tratar y/o prevenir los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por la dieta en un individuo que lo necesita, que
15 comprende la administración a dicho individuo de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, de acuerdo con la invención.

La presente invención se refiere además al uso de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, para tratar y/o prevenir, en particular tratar, un trastorno cognitivo asociado con trastornos de ansiedad en un individuo que
20 lo necesita.

La presente invención se refiere además al uso de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, para mejorar la cognición en un individuo afectado por un trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad, seleccionándose el trastorno neurológico asociado con trastornos de ansiedad del grupo que
25 consiste en el trastorno del espectro autista, el síndrome de Angelman, el síndrome de Down y otros trastornos neurológicos relacionados con deterioros cognitivos, como meningitis crónica, encefalitis autoinmune o *neurosarcoidosis*.

La presente invención se refiere además al uso de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, para aliviar el déficit cognitivo en
30 un individuo afectado por un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por déficit de atención, demencia con cuerpos de Lewy, demencia de inicio temprano, disfunción cognitiva relacionada con la epilepsia, demencia frontotemporal, atrofia cortical posterior, enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de

Parkinson (PD), trastorno bipolar, abuso de sustancias, trastornos por déficit de atención, trastornos psicóticos y una infección por sars-cov-2.

La presente invención se refiere además al uso de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, para tratar y/o prevenir los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por la dieta en un individuo que lo necesita, que comprende la administración a dicho individuo de una proteína HIP/PAP, un derivado de la misma, o una composición que la comprende, de acuerdo con la invención.

La invención se describe a continuación con mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos que se dan únicamente a modo de ilustración.

Todas las referencias a porcentajes son porcentajes por peso a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Inyecciones en animales

Los animales fueron anestesiados con isoflurano y colocados en un aparato de cirugía estereotáctica de World Precision Instruments. Se hizo una incisión en la superficie sagital del cráneo. Se inyectaron ratones APP/PS1 de seis meses de edad (denominados transgénicos o Tg) en el hipocampo derecho e izquierdo (HPC) ($X=+/-2.7$, $Y=-.7$, $Z=-3$ de bregma), así como en la corteza derecha e izquierda ($X=+/-2$, $Y=-2$, $Z=-3$ de bregma) con 2 microlitros de cápside vacía de rAAV9 (vehículo transgénico, Tg Veh, $n=8$) o rAAV9-hHIP/PAP (rAAV9-HIP/PAP (ver Fig. 6A) Tg HIP/PAP, $n=8$) a 5×10^{11} $\mu\text{g} / \text{mL}$. Se utilizaron compañeros de camada no transgénicos (Ntg $n=10$) como controles para la línea de base del comportamiento. Seis meses después de la cirugía, los animales se sometieron a pruebas de comportamiento durante 2 semanas. Al final de las pruebas de comportamiento, los animales fueron sacrificados y se recolectó tejido.

Análisis de comportamiento

Antes de la eutanasia, los ratones fueron probados en una batería de tareas de comportamiento que incluían campo abierto, reconocimiento de objetos novedosos, laberinto en cruz elevado y laberinto de agua de brazo radial. Se utilizó un grupo de ratones de tipo salvaje de la misma edad para la comparación. Las tareas se realizaron de menos estresantes (campo abierto) a más estresantes (RAWM) como se describe a continuación.

El análisis de las medidas se realizó mediante ANOVA de una o dos vías. Se realizaron mediciones repetidas en tareas como el laberinto de agua que requieren múltiples entrenamiento/pruebas. Se utilizaron comparaciones de medias post-hoc HSD de Tukey para medidas ANOVA significativas utilizando GraphPad Prism. La prueba de Grubb se utilizó para determinar valores atípicos.

Campo abierto

El campo abierto se utilizó como prueba estándar de actividad general. Los animales fueron monitorizados durante 15 min en un campo abierto de 40 cm cuadrados con software de seguimiento de video (ANY-Maze, Stoelting, IL), bajo iluminación moderada.

Los niveles generales de actividad se evaluaron mediante mediciones de actividad horizontal y vertical.

Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

Los ratones se colocaron en una arena de 40 x 40 cm monitorizada y cuantificada por seguimiento de video (ANY-Maze, Stoelting, IL). Dos objetos similares en escala al ratón se colocaron a lo largo de la línea central de la arena aproximadamente a 3-5 cm de la pared exterior.

A cada animal se le dieron tres pruebas de aclimatación de 5 minutos cada una con un intervalo entre pruebas de 5 minutos.

Después de cada prueba, las señales de la arena y el objeto se limpiaron con etanol al 70 % para minimizar las señales olfativas. Después de las pruebas de aclimatación, uno de los objetos aclimatados fue reemplazado por un objeto novedoso. A los animales se les dio una prueba exploratoria de 5 minutos durante la cual la exploración de objetos fue monitorizada mediante grabación de video.

La memoria de trabajo se evaluó por el tiempo dedicado a explorar objetos nuevos y familiares.

Laberinto de agua de brazo radial e inversión

El laberinto de agua del brazo radial contenía 6 senderos de natación (brazos) que irradiaban desde un área central abierta con una plataforma de escape oculta ubicada al final de uno de los brazos. La piscina estaba rodeada de varias señales extra-laberinto para permitir la

navegación espacial. En cada prueba, se permitió que el ratón nadara hasta 60 segundos para encontrar la plataforma de escape. La plataforma se ubicó en el mismo brazo en cada ensayo.

El primer día, los ratones recibieron 15 pruebas alternando entre una plataforma visible (sobre el agua) y una plataforma oculta (debajo del agua). El segundo día, los ratones recibieron 15 pruebas adicionales y todas las pruebas utilizaron una plataforma oculta. El brazo de inicio se varió para cada prueba, de modo que los ratones se basaron en señales espaciales para resolver la tarea en lugar de aprender reglas motoras (es decir, el segundo brazo a la derecha).

El brazo objetivo para cada ratón era diferente para evitar señales de olor que revelaran el brazo objetivo. La entrada en un brazo incorrecto (las cuatro extremidades dentro del brazo) se calificó como un error. No hacer una entrada de brazo dentro de los 15 segundos también se anotó como un error. Los errores de los bloques de 3 ensayos consecutivos se promediaron para el análisis de los datos. Se consideró que los ratones con un promedio de 1 error o menos al final del día 2 habían alcanzado el criterio de aprendizaje.

Al tercer día, se realizó una prueba de inversión con la plataforma de la portería colocada en el brazo a 180° de la ubicación original. A los ratones se les dieron 15 pruebas, todas con una plataforma oculta. Los animales fueron monitorizados con software de seguimiento de video (Ethovision, Noldus).

Laberinto en cruz elevado

La prueba de laberinto en cruz elevado es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad.

La prueba se basa en la aversión natural de los ratones a las áreas abiertas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio espontáneo natural en entornos novedosos. Los ratones se colocaron en la unión de un laberinto de cuatro brazos compuesto por dos brazos abiertos sin paredes y dos brazos cerrados por paredes de 15.25 cm de altura, 30 cm de largo y 5 cm de ancho.

Los animales fueron monitorizados durante 5 min con un software de seguimiento de video (ANY-Maze, Stoelting, IL), bajo iluminación moderada. El comportamiento similar a la ansiedad se evaluó mediante mediciones del número de entradas/duración en brazos abiertos versus cerrados.

Cuanto más tiempo pasan los ratones en los brazos cerrados, más ansiosos están, lo cual es un comportamiento normal observado en los ratones de control no transgénicos.

Resultados

i) Campo abierto

No hubo diferencias en la actividad general entre los ratones de control no transgénicos y los ratones transgénicos, independientemente del tratamiento. La sobreexpresión de HIP/PAP en el cerebro de ratones APP/PS1 no indujo ningún cambio visible en la actividad locomotora (ver Figuras 1A (Campo abierto – Distancia recorrida), 1B (Campo abierto – Tiempo inmóvil))

ii) Prueba de reconocimiento de objetos novedosos (NOR)

Tras la exposición al nuevo objeto, los ratones de control no transgénicos pasaron significativamente más tiempo con el nuevo objeto en comparación con el familiar, lo que sugiere una memoria corta de los ensayos anteriores. Por el contrario, los ratones transgénicos, independientemente del tratamiento, pasaron la misma cantidad de tiempo con ambos objetos, lo que sugiere una deficiencia en la memoria corta. La sobreexpresión de HIP/PAP en el cerebro de ratones APP/PS1 no rescató el efecto genotipo en la memoria corta observada durante el reconocimiento de objetos novedosos (ver Figura 2).

(iii) Laberinto de agua del brazo radial

Los ratones APP/PS1 tratados con vehículo cometieron significativamente más errores al tratar de llegar a la plataforma que los ratones de control no transgénicos, como lo demuestra el mayor número de errores en los bloques (Fig. 3A) y los errores totales durante el día 2 (Fig. 3B). Estos resultados son indicativos de disfunción cognitiva, especialmente en el aprendizaje y la memoria. Los ratones APP/PS1 tratados con HIP/PAP cometieron significativamente menos errores que los ratones APP/PS1 tratados con vehículo, lo que indica un rescate en la función cognitiva para esta prueba (ver Figuras 3A y 3B).

iv) Reversión

Como era de esperar, los ratones de control APP/PS1 cometieron significativamente más errores que los compañeros de camada no transgénicos (ver Figura 4B). No hubo rescate visible en ratones APP/PS1 tratados con HIP/PAP (ver Figura 4A).

(v) Laberinto en cruz elevado

Como se muestra en la Figura 5A, los ratones de control no transgénicos pasaron significativamente más tiempo en los brazos cerrados que en los brazos abiertos, exhibiendo una cantidad normal de ansiedad y miedo al espacio abierto, un mecanismo de defensa fisiológico. Por el contrario, los ratones transgénicos tratados con vehículos pasaron la misma cantidad de tiempo en ambos brazos, lo que indica un déficit en el comportamiento similar a la ansiedad (Figura 5A). Además, al comparar el tiempo pasado en brazos cerrados, los ratones transgénicos tratados con vehículos pasaron significativamente menos tiempo en brazos cerrados en comparación con los controles no transgénicos, lo que indica desinhibición del comportamiento y un mayor comportamiento de toma de riesgos (Figura 5B). El tratamiento con HIP/PAP en ratones transgénicos rescató un comportamiento similar a la ansiedad normal, como lo demuestra el aumento significativo del tiempo pasado en brazos cerrados en comparación con los brazos abiertos. Además, el aumento del tiempo de permanencia en brazos cerrados observado tras el tratamiento con HIP/PAP fue significativo contra los ratones transgénicos tratados con vehículos, pero no contra los ratones no transgénicos, argumentando a favor de un fenotipo rescatado, en lugar de un efecto ansiogénico (Figura 5A).

Conclusión

La sobreexpresión de HIP/PAP en un modelo de ratón transgénico mejoró significativamente la memoria durante el laberinto de agua del brazo radial (RAWM) rescatando déficits cognitivos durante esta prueba. También se rescató un déficit en el comportamiento similar a la ansiedad tras el tratamiento con HIP/PAP durante el laberinto en cruz elevado en comparación con los ratones tratados con vehículos transgénicos. En consecuencia, el tratamiento con HIP/PAP permite restaurar en ratones una respuesta normal a una situación ansiogénica. El tratamiento con HIP/PAP normalizó el comportamiento similar a la ansiedad que se perdió en los ratones de control transgénicos.

De hecho, los ratones de control no transgénicos pasaron significativamente más tiempo en los brazos cerrados que en los brazos abiertos, exhibiendo una cantidad normal de ansiedad y miedo al espacio abierto, un mecanismo de defensa fisiológico. Por el contrario, los ratones de control APP/PS1 pasaron la misma cantidad de tiempo en ambos brazos, lo que indica un déficit en el comportamiento similar a la ansiedad. Además, al comparar el tiempo pasado en brazos cerrados, los ratones de control APP/PS1 pasaron significativamente menos

tiempo en brazos cerrados en comparación con los controles no transgénicos, lo que indica desinhibición del comportamiento y un mayor comportamiento de toma de riesgos.

El tratamiento con HIP/PAP en ratones transgénicos rescató un comportamiento similar a la ansiedad normal, como lo demuestra el aumento significativo del tiempo pasado en brazos cerrados en comparación con los brazos abiertos.

Esta diferencia no fue significativa frente a los ratones no transgénicos, argumentando a favor de un fenotipo rescatado, en lugar de un efecto ansiogénico.

Esta mejora en la cognición no se asoció con una disminución de la patología amiloide en el hipocampo, como lo indican niveles similares de placas amiloides teñidas de A β y rojo congo (Fig. 7). Sin embargo, el análisis de western blot del hipocampo reveló un aumento significativo en la enzima antioxidante dismutasa-1 sódica (SOD-1) y hemo oxigenasa-1 (HO-1) en comparación con ratones no transgénicos y de control APP/PS1 (Fig. 8 A, C, D) y una tendencia hacia el aumento en los niveles de catalasa (Fig. 8 A, B, $p = 0.06$).

Estos datos muestran que el efecto antioxidante de HIP/PAP está sorprendentemente en su lugar en el cerebro y contribuye a los efectos beneficiosos inesperados de HIP/PAP sobre la cognición.

Expresión de HIP/PAP

El tejido de los ratones se recolectó a los 12 meses de edad (después de 6 meses de extracción) después de la batería de pruebas de comportamiento.

La expresión de HIP/PAP se midió mediante tinción de hemaglutinina (HA) en el cerebro (Fig. 6C) y se midió la concentración de HIP/PAP en la corteza (Fig. 6D) con HIP/PAP ELISA humana (R&D Systems, Minneapolis, EUA).

No se detectó tinción positiva de HA en los controles (Fig. 6B) y no se detectó HIP/PAP en el plasma (no se muestra).

Ejemplo 2

HIP/PAP cruza la barrera hematoencefálica (BBB) a partir de la inyección periférica de inyecciones de rHIP/PAP o rAAV. Los estudios farmacocinéticos realizados en el ratón utilizando [3H]-rHIP/PAP, demostraron niveles significativos de radiactividad detectados no solo en el plasma (18.20 $\pm$ 15.82 ng/g) y el hígado (64.22 $\pm$ 11.73 ng/g) sino también en el cerebro (85.57 $\pm$ 11.55 ng/g), 24 horas después de la administración intravenosa de 1 mg/kg de [3H]-rHIP/PAP.

Además, se analizó el tejido cerebral de ratones no transgénicos a los que se les administró rHIP/PAP por vía subcutánea a través de bombas ALZET a la dosis de 43 µg/día durante un mes.

Se recolectaron el cerebro y el plasma y se evaluaron los niveles de rHIP/PAP a través de ELISA (Abcam, R&D systems).

Se encontraron niveles significativos de rHIP/PAP en el cerebro y el plasma después de un mes (Fig. 9A).

Además, se estableció la penetrancia cerebral de un rHIP/PAP marcado con fluorescencia utilizando un sistema de *imágenes in vivo* (IVIS, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) y vivotag 680 (Revvity, Waltham, MA, EUA). Treinta minutos después de la inyección cardíaca de rHIP/PAP-680 o albúmina sérica bovina (BSA)-680 de control, se encontró una fuerte señal en el cerebro de los animales inyectados con rHIP/PAP-680 pero no con BSA-680, lo que indica el cruce de la BBB de rHIP/PAP (Fig. 9B).

Por lo tanto, se estableció un cruce significativo de la barrera hematoencefálica de HIP/PAP después de la administración subcutánea o intravenosa de la proteína.

rAAV9-HIP/PAP periférico

rAAV9-HIP/PAP se inyectó periféricamente por vía intravenosa o intramuscular (miembro posterior). Después de un mes de expresión, se encontraron niveles significativos de rHIP/PAP en el plasma (Fig. 9C) y el cerebro (Fig. 9D) de ratones inyectados.

Los niveles de rHIP/PAP en el cerebro un mes después de la inyección periférica fueron similares a los niveles observados después de la inyección central (Fig. 9D), lo que hace relevante el uso de la inyección periférica para este objetivo. No se detectó ninguna señal de rHIP/PAP en animales de control (no se muestra).

Ejemplo 3 – Pruebas realizadas en un modelo de dieta alta en grasas de ratones de tipo salvaje no transgénicos

Los ratones no transgénicos de 6 meses fueron alimentados *ad libitum* con una dieta de control (n = 6), una dieta alta en grasas al 60 % de kcal/grasa (HFD, n = 5) o HFD después de 2 semanas después de la inyección intracraneal de 2 microlitros de rAAV9-hHIP/PAP (n = 4) a 5×10^{11} µg/mL en el hipocampo derecho e izquierdo (HPC) (X = +/- 2.7 Y = -2.7, Z = -3 de bregma), así como corteza derecha e izquierda (X = +/-2 Y = -2, Z = -3 de bregma).

El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron una vez a la semana durante todo el estudio.

El análisis del comportamiento para evaluar los efectos de la dieta sobre la actividad locomotora, la cognición y la ansiedad se realizó después de 10 semanas de dieta.

5

Resultados

Después de 10 semanas de dieta, se observó un aumento de peso significativo en los ratones alimentados con una HFD en comparación con los alimentados con una dieta de control (Fig. 10A), independientemente del tratamiento.

10

Durante el laberinto en cruz elevado como se detalló anteriormente, los ratones bajo dieta controlada pasaron significativamente más tiempo en brazos cerrados que en brazos abiertos, exhibiendo una respuesta fisiológica normal al comportamiento de ansiedad (Fig. 10B).

15

Sin embargo, los ratones que recibieron HFD durante 10 semanas pasaron la misma cantidad de tiempo en ambos brazos, mostrando un déficit en el comportamiento de ansiedad.

Por el contrario, los ratones que recibieron una HFD y fueron tratados con HIP/PAP mostraron un comportamiento similar al de los ratones de control alimentados con la dieta de control, con un aumento significativo del tiempo de permanencia en brazos cerrados en comparación con los brazos abiertos.

20

En conjunto, estos resultados demuestran que:

- la dieta fue efectiva para inducir la obesidad, que no se previno con la administración cerebral de HIP/PAP; y

- El fenotipo de obesidad indujo un déficit de ansiedad, que se previno en los ratones tratados con HIP/PAP.

25

Estos resultados confirman un papel beneficioso para HIP/PAP en el comportamiento cognitivo y relacionado con la ansiedad y, en consecuencia, es muy interesante en los déficits cognitivos y de ansiedad inducidos por la dieta.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP de la que se ha eliminado el péptido señal N-terminal de 26 aminoácidos

EE PQRELPSARIRCPK GSKAYGSHCYALFLSPKSWTDADLACQKRPSGNLVSVLSGAE
 5 GSFVSSLVKSIGNSYSYVWIGLHDPTQGTEPN GEGWEWSSSDVMNYFAWERNPSTIS
 SPGHCASLSRSTAFLRWKDYN CNVRLPYVCKFTD

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP de la que se han eliminado el péptido señal N-terminal de 26 aminoácidos y el propéptido de 11 aminoácidos en la posición N-terminal

10 IRC PKGSKAYGSHCYALFLSPKSWTDADLACQKRPSGNLVSVLSGAEGSFVSSLVKSI
 GNSYSYVWIGLHDPTQGTEPN GEGWEWSSSDVMNYFAWERNPSTISSPGHCASLSRS
 TAFLRWKDYN CNVRLPYVCKFTD

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP de la que se ha eliminado el péptido señal N-terminal de 26 aminoácidos y se ha añadido una metionina en
 15 posición N-terminal

MEEPQRELPSARIRCPK GSKAYGSHCYALFLSPKSWTDADLACQKRPSGNLVSVLSG
 AEGSFVSSLVKSIGNSYSYVWIGLHDPTQGTEPN GEGWEWSSSDVMNYFAWERNPST
 ISSPGHCASLSRSTAFLRWKDYN CNVRLPYVCKFTD

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la proteína HIP/PAP completa

20 MLPPMALPSVSWMLLSCLMLLSQVQGEEPQRELPSARIRCPK GSKAYGSHCYALFLS
 PKSWTDADLACQKRPSGNLVSVLSGAEGSFVSSLVKSIGNSYSYVWIGLHDPTQGTE
 PNGEGWEWSSSDVMNYFAWERNPSTISSPGHCASLSRSTAFLRWKDYN CNVRLPYV
 CKFTD

Las secuencias de aminoácidos se divulgan en la presente especificación que sirven
 25 como referencias. Las mismas secuencias también se presentan en una lista de secuencias
 formateada de acuerdo con los requisitos estándar a los efectos de las cuestiones de patentes.
 En caso de discrepancia de secuencia con la lista de secuencias normalizada, las secuencias
 descritas en la presente especificación serán la referencia.

