

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 332**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05762470 .2**
96 Fecha de presentación: **23.06.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1784486**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

54 Título: **REGENERACIÓN DE NERVIOS.**

30 Prioridad:
23.06.2004 US 582627 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

73 Titular/es:
TISSUEGENE, INC.
209 PERRY PARKWAY, SUITE 13
GAITHERSBURG, MD 20877, US

72 Inventor/es:
KIM, Chang Hwan y
LEE, Kwan Hee

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 376 332 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Regeneración de nervios

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención:**

10 La presente invención se refiere a la prevención de degeneración de nervios y promoción de la regeneración de nervios usando terapia basada en células.

2. Antecedentes Generales y Estado de la Técnica:

15 Se han realizado numerosos estudios sobre la regeneración de nervios para nervios lesionados. En general, el tratamiento quirúrgico clínico para lesión traumática de nervio periférico emplea una compleja serie de etapas que implican primero retirar los tejidos dañados cerca del sitio localizado de la lesión y proporcionar un ambiente que permita la regeneración del nervio periférico (Kline, J Neu-rosurg, 1989,70: 166-174). La mecánica del procedimiento quirúrgico típicamente implica directamente conectar o fusionar la parte superior e inferior del área lesionada (Kline y Judice, J Neurosurg, 1983, 58: 631-649). Métodos quirúrgicos adicionales tales como trasplante de nervio periférico (Millesi, Clin Orthop, 1988, 237: 36-42) así como tratamientos de pacientes externos más conservativos tales como mantener la estimulación eléctrica para generar contracción muscular que ayuda a inhibir la degeneración de las uniones neuromusculares mientras se espera a la regeneración voluntaria del nervio (Kim *et al.*, Korean Academy of Rehabilitation Medicine (coreano), 1999, 23: 893-8983; al-Amood *et al.*, J Physiol (Lond), 1991, 441: 243-256). Finalmente, la mayoría de estos procedimientos implican aún regímenes de terapia física exhaustivos que implican 25 terapia de ejercicio controlado y a largo plazo para evitar el debilitamiento y contracción muscular y para promover el crecimiento colateral de nervios (Pyun *et al.*, Korean Academy of Rehabilitation Medicine (coreano), 1999, 23; 1063-1075).

30 El documento US 2003/032 098 A1 describe el uso de proteína morfogenética ósea (BMP) para reparación del cartílago/hueso, formación o mantenimiento por administración directa del polipéptido o después de transfectar células fibroblásticas.

35 Patrick C. W., Tissue Engineering, vol. 7, n° 3, junio de 2001, páginas 303-311, describe la modificación exitosa por ingeniería de fibroblastos dérmicos humanos para secretar NGF. Se usó un modelo animal para ensayar con respecto a expresión o secreción de NGF, por inyección intramuscular.

40 Con frecuencia, se usan dispositivos ortopédicos mecánicos para proteger las articulaciones y evitar daño del músculo y ligamentos que rodean al área afectada (Gravois, Physical Medicine and Rehabilitation, Massachusetts: Blackwell Science, 2000, pág. 432-433). Además, diversas técnicas experimentales para la regeneración de nervios también implican el uso de tubos biosintéticos para conectar nervios o están en combinación con agentes farmacéuticos que actúan colectivamente para reducir el daño del nervio y estimular la regeneración del nervio (al-Amood *et al.*, J Physiol (Lond), 1991,441:243-256; Dumitru, In: Dumitru, editor. Electrodiagnostic medicine, 1ª ed, Philadelphia: Hanley & Belfus, 1995, pp341-384; Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15; Horowitz, Muscle Nerve, 1989, 12: 314-322; Matzuk *et al.*, Nature, 1995, 374: 360-363; Mengs, Arch Int Pharmacodyn Therp, 1984, 45 271 (2): 315-323).

Por lo tanto, existe la necesidad de regenerar o prevenir la degeneración del nervio lesionado y en particular el nervio periférico.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un uso como se define en la reivindicación 1.

La BMP puede ser BMP-2 o BMP-9. Además, el nervio puede ser nervio periférico. El vector puede ser un vector viral. El vector puede ser un vector retroviral, vector viral adenoasociado, vector adenoviral o vector viral de herpes. Además, la población de células puede almacenarse antes del trasplante tal como en DMSO 10 % en nitrógeno líquido.

Breve descripción de los dibujos

60 La presente invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada proporcionada en este documento posteriormente y los dibujos adjuntos que se proporcionan como ilustración solamente y por lo tanto no son limitantes de la presente invención, y en los que;

65 Las FIGURAS 1A-1B muestran un examen microscópico del nervio ciático de rata 2 semanas después de lesión en el grupo de BMP-9, que muestra degeneración muy grave de axones y vaina de mielina y cambios vacuolados prominentes. Las FIGURAS 1A-1B también muestran una infiltración significativa de células inflamatorias

mononucleares en el tejido blando perineural (A; tinción H y E, B; tinción con Tricromo modificado 200 X).

5 Las FIGURAS 2A-2B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 4 semanas después de lesión en el grupo de BMP-9, que muestra aproximadamente el 70 % del área lesionada está ocupada por cambio vacuolado. Se observan algunas cámaras de digestión de mielina y también se observa fibrosis endoneural leve (A; tinción H y E, B; tinción con Tricromo modificado 200 X).

10 Las FIGURAS 3A-3C muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 8 semanas después de lesión en el grupo de BMP-9, que muestra cambios vacuolados en aproximadamente el 50 % de los axones. Se infiltran varias células inflamatorias mononucleares en el espacio epineural. También está presente hemorragia focal en el haz nervioso. (A; tinción H y E X 200, B y C; tinciones con Tricromo modificado 200 X y 100 X, respectivamente).

15 Las FIGURAS 4A-4B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 8 semanas después de lesión en el grupo de BMP-9, que muestra cambios vacuolados en aproximadamente 33 % de los axones. Algunas células inflamatorias mononucleares permanecen en el espacio epineural (A y B; tinciones de Tricromo modificado 200 X)

20 Las FIGURAS 5A-5B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 2 semanas después de lesión en el grupo de BMP-2, que muestra cambios vacuolares en la mayoría de los axones. Se observa atrofia axonal y desmielinización en el centro. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

25 Las FIGURAS 6A-6B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 4 semanas después de lesión en el grupo de BMP-2, que muestra cambios vacuolares en aproximadamente la mitad de los axones. Se observa desmielinización con fibrosis endoneural leve. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

30 Las FIGURAS 7A-7B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 8 semanas después de lesión en el grupo de BMP-2, que muestra cambios vacuolados en aproximadamente la mitad de los axones. Algunas células inflamatorias mononucleares permanecen en el espacio epineural. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

35 Las FIGURAS 8A-8B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 2 semanas después de lesión en grupo de simulación, que muestra que todos los axones se degeneran y se infiltran células inflamatorias mononucleares en la periferia de los axones. También se observa fibrosis epineural. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

40 Las FIGURAS 9A-9B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 4 semanas después de lesión en grupo de simulación, que muestra que aproximadamente el 33 % de los axones se degeneran y los cambios vacuolares son prominentes. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

45 Las FIGURAS 10A-10B muestran examinación microscópica del nervio ciático de rata 8 semanas después de lesión en grupo de simulación, que muestra que aproximadamente 10-20 % de los axones se degeneran y los cambios vacuolares son prominentes. (A y B; tinciones de Tricromo modificado 100 X y 200 X, respectivamente).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 En la presente solicitud, “un” y “una” se usan para referirse tanto a uno sencillo como a una pluralidad de objetos.

50 Como se usa en este documento, la expresión “célula de tejido conectivo” o “células de un tejido conectivo” incluye células que se hallan en el tejido conectivo, tales como fibroblastos, células de cartílago (condrocitos) y células del hueso (osteoblastos/osteocitos), que secretan matriz extracelular de colágeno, así como células grasas (adipocitos) y células de músculo liso. Preferiblemente, las células de tejido conectivo son fibroblastos, células de cartílago y células de hueso. Más preferiblemente, las células de tejido conectivo son células de fibroblastos. Las células de tejido conectivo también incluyen células mesenquimales, que también se conocen como fibroblastos inmaduros. Se reconocerá que la invención puede practicarse con un cultivo mezclado de células de tejido conectivo, así como células de un tipo sencillo.

60 Como se usa en este documento, la inyección de células “cerca” de un nervio lesionado significa el área que está suficientemente cerca entre el sitio de inyección y el nervio lesionado para lograr un resultado eficaz de regeneración de nervio en el sitio lesionado. Por lo tanto, la inyección de células cerca de un nervio lesionado incluye en el sitio de lesión o en cualquier lugar suficientemente cerca para que las células inyectadas expresen el polipéptido eficaz y se permite que los polipéptidos efectúen directa o indirectamente el resultado de regeneración de nervios.

65 Como se usa en este documento, un “promotor” puede ser cualquier secuencia de ADN que esté activa y controle la transcripción en una célula eucariota. El promotor puede estar activo en una o ambas de células eucariotas y procariontas. Preferiblemente, el promotor está activo en células de mamífero. El promotor puede expresarse de forma constitutiva o ser inducible. Preferiblemente, el promotor es inducible. Preferiblemente, el promotor es

inducible por un estímulo externo. Más preferiblemente, el promotor es inducible por hormonas o metales. Aun más preferiblemente, el promotor es inducible por metales pesados. Más preferiblemente, el promotor es un promotor del gen de metalotioneína. De forma similar, pueden insertarse “elementos potenciadores”, que también controlan la transcripción, en la construcción de vector de ADN y usarse con la construcción de la presente invención para potenciar la expresión del gen de interés.

Como se usa en este documento, “marcador seleccionable” incluye un producto génico que se expresa por una célula que mantiene de forma estable el ADN introducido y provoca que la célula exprese un fenotipo alterado tal como transformación morfológica o una actividad enzimática. Se consigue aislamiento de células que expresan un gen transfectado por introducción en las mismas células de un segundo gen que codifica un marcador seleccionable, tal como uno que tiene una actividad enzimática que confiere resistencia a un antibiótico u otro fármaco. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero sin limitación, timidina quinasa, dihidrofolato reductasa, aminoglucósido fosfotransferasa, que confiere resistencia a antibióticos de aminoglucósido tales como kanamicina, neomicina y geneticina, higromicina B fosfotransferasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, CAD (una proteína sencilla que posee las tres primeras actividades enzimáticas de biosíntesis de uridina de *novo*, carbamil fosfato sintetasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa), adenosín desaminasa y asparagín sintetasa (Sambrook *et al.* Molecular Cloning, capítulo 16, 1989).

Como se usa en este documento, la “superfamilia de factor de crecimiento transformante β ” (TFG- β) abarca un grupo de proteínas relacionadas estructuralmente, que afecta a una amplia serie de procesos de diferenciación durante el desarrollo embrionario. La familia incluye sustancia inhibidora Mulleriana (MIS), que se requiere para el desarrollo del sexo masculino normal (Behringer, *et al.*, Nature, 345:167, 1990), producto génico de *Drosophila* Depentaplégico (DPP), que se requiere para formación del eje dorsoventral y morfogénesis de los discos imaginales (Padgett, *et al.*, Nature, 325:81-84, 1987), el producto génico de *Xenopus* Vg-1, que se localiza en el polo vegetal de los huevos (Weeks, *et al.*, Cell, 51:861-867, 1987), las activinas (Mason, *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 135:957-964, 1986), que puede inducir la formación de mesodermo y estructuras anteriores de embriones de *Xenopus* (Thomsen, *et al.*, Cell, 63:485, 1990) y las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, tales como BMP-2, 3, 4, 5, 6 y 7, osteogenina, OP-1) que pueden inducir formación de cartílago y hueso *de novo* (Sampath, *et al.*, J. Biol. Chem., 265:13198, 1990). Los productos génicos de TGF- β pueden influir en una diversidad de procesos de diferenciación, incluyendo adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, hematopoyesis y diferenciación de células epiteliales (para una revisión, véase Massague, Cell 49:437,1987).

Las proteínas de la familia de TGF- β se sintetizan inicialmente como una proteína precursora grande, que posteriormente experimenta escisión proteolítica en un grupo de restos básicos de aproximadamente 110-140 aminoácidos del extremo C-terminal. Las reacciones C-terminales de las proteínas están todas relacionadas estructuralmente y los diferentes miembros de la familia pueden clasificarse en distintos subgrupos basándose en el alcance de su homología. Aunque las homologías dentro de subgrupos particulares varían del 70 % al 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos, las homologías entre subgrupos son significativamente menores, variando generalmente de solamente 20 % a 50 %. En cada caso, la especie activa parece ser un dímero ligado a disulfuro de fragmentos C-terminales. Para la mayoría de los miembros de la familia que se han estudiado, se ha descubierto que la especie homodimérica es biológicamente activa, pero con respecto a otros miembros de la familia, como las inhibinas (Ung, *et al.*, Nature, 321:779, 1986) y los TGF- β (Cheifetz, *et al.*, Cell, 48:409,1987), también se han detectado heterodímeros y parece que estos tienen diferentes propiedades biológicas que los homodímeros respectivos.

Los miembros de la superfamilia de genes de TGF- β incluyen TGF- β 3, TGF- β 2, TGF- β 4 (pollo), TGF- β 1, TGF- β 5 (*Xenopus*), BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, OP-1/BMP-7, BMP-8, BMP-9, *Drosophila* 60A, *Drosophila* DPP, Vgr1, GDF-1, *Xenopus* Vgf, Inhibina- β A, Inhibina- β B, Inhibin- α y MIS. Muchos de estos genes se analizan en Massague, Ann. Rev. Biochem. 67:753-791, 1998.

Preferiblemente, el miembro de la superfamilia de genes de TGF- β es TGF- β . Más preferiblemente, el miembro es TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 o BMP-9.

Se entiende que al describir una proteína por su nombre designado como anteriormente, la proteína no se limita a la secuencia exacta del tipo silvestre. Es aceptable variación en la secuencia de la proteína de modo que otra secuencia polipeptídica, que muestre sustancialmente la misma actividad que la proteína con respecto a función se abarca por la misma.

Tejido Nervioso

El tejido nervioso deriva del ectodermo embrionario bajo la influencia de la notocorda. Se induce que el ectodermo forme una placa neural engrosada que después se diferencia y los extremos se fusionan con el tiempo para formar el tubo neural a partir del que deriva todo el sistema nervioso central. El sistema nervioso central consiste en el cerebro, los nervios craneales y la médula espinal. El sistema nervioso periférico deriva de células junto al surco neural denominadas la cresta neural.

El tejido nervioso se distribuye a lo largo del cuerpo en una red de comunicaciones integrada compleja. Las células nerviosas (neuronas) se comunican con otras neuronas en circuitos que varían de muy simples a circuitos de mayor orden muy complejos. Las neuronas realizan la transmisión del mensaje en sí misma y la integración mientras que otras células de tejido nervioso llamadas células gliales asisten a las neuronas mediante soporte, protección, defensa y nutrición de las neuronas. Existen aproximadamente 10 veces más células gliales que neuronas en el cerebro. Las células gliales crean el microambiente necesario para la función neuronal y en ocasiones ayudan en el procesamiento y actividad neural. Las neuronas son células excitables. Esto significa que cuando se estimulan de forma apropiada, puede iniciarse un potencial de acción que puede propagarse a lo largo de la membrana celular para transmitir información a células distantes. Las neuronas son unidades funcionalmente independientes responsables de la recepción, transmisión y procesamiento de estímulos.

En general, las neuronas consisten en tres partes; el cuerpo celular, en el que se localizan el núcleo y los orgánulos celulares; dendritas, que son protuberancias que se extienden desde el cuerpo celular que reciben estímulos del ambiente o de otras neuronas; y el axón, que es un protuberancia sencilla larga que se extiende desde el cuerpo celular para la transmisión de impulsos nerviosos a otras células. El axón habitualmente se ramifica en su extremo distal y cada rama que termina en otra célula tiene un extremo bulboso. La interacción del bulbo final con la célula adyacente forma una estructura llamada sinapsis. Las sinapsis están especializadas en recibir una señal y en convertirla en un potencial eléctrico.

La mayoría de las neuronas halladas en el cuerpo humano son multipolares, lo que significa que tienen más de dos protuberancias celulares siendo solamente una un axón y siendo el resto de protuberancias dendritas. Las neuronas bipolares de la retina o la mucosa olfatoria tienen una protuberancia dendrítica y un axón que sale del cuerpo celular. Las neuronas pseudounipolares halladas en los ganglios de la médula espinal permiten que los impulsos sensoriales captados por las dendritas viajen directamente al axón sin pasar a través del cuerpo celular. Las neuronas también pueden clasificarse de acuerdo con su función. Las neuronas sensoriales están implicadas en la recepción y transmisión de estímulos sensoriales. Las neuronas motoras envían impulsos para controlar los músculos y glándulas. Otras neuronas, interneuronas, actúan como intermediarios entre las neuronas como parte de redes funcionales.

Las sinapsis son uniones celulares funcionales especializadas para propagar señales celulares. La mayoría de las sinapsis son sinapsis químicas en las que las vesículas en la terminal presináptica contienen un mensajero químico que se libera a la hendidura sináptica cuando se estimula la membrana presináptica. El mensajero químico se difunde a través de la hendidura sináptica para unirse a receptores en la membrana postsináptica. Esto induce un cambio en el estado de polarización de la membrana postsináptica que efectúa la acción celular. Un tipo especial de sinapsis es la unión neuromuscular. Se conocen más de 35 neurotransmisores y la mayoría son moléculas pequeñas (óxido nítrico, acetilcolina), catecolaminas (norepinefrina, serotonina) o péptidos neuroactivos (endorfina, vasopresina). Una vez usados, los neurotransmisores se retiran rápidamente por rotura enzimática, difusión o endocitosis por la célula presináptica.

Algunas neuronas están envueltas en un material aislante llamado mielina. Este material rico en lípidos está formado por las células gliales: células de Schwann en el sistema nervioso periférico y por oligodendrocitos en el sistema nervioso central. El aislamiento permite una conducción nerviosa más rápida reduciendo el área de superficie de membrana que debe despolarizarse. En las neuronas mielinizadas el impulso nervioso salta de un segmento no mielinizado a otro a lo largo de la extensión del axón. Es la vaina de mielina y falta de cuerpos de células neuronales dentro del tejido lo que hace que algunos tejidos nerviosos aparezcan blancos como en los grandes nervios periféricos y la materia blanca del cerebro. Otras células gliales, llamadas astrocitos, están implicadas en la integridad estructural, nutrición neuronal y mantenimiento del microambiente del tejido nervioso. Los astrocitos están en comunicación directa entre sí mediante uniones comunicantes y pueden afectar a la supervivencia de las neuronas a su cargo mediante la regulación del ambiente local. Las células ependimales revisten la médula espinal y los ventrículos del cerebro y secretan el fluido cerebroespinal. Otras células gliales pequeñas, llamadas microglía, son células fagocíticas que están implicadas en la inflamación y reparación en el sistema nervioso central adulto.

El tejido nervioso es un tejido excitable que es capaz de recibir y transmitir impulsos eléctricos. El tipo celular central se llama neurona. Las neuronas habitualmente tienen un cuerpo celular, dendritas que reciben aportaciones y un axón que transmite potenciales eléctricos.

Las neuronas pueden clasificarse como neuronas sensoriales, motoras, secretoras o de asociación. Con frecuencia se clasifican por velocidad de conducción, diámetro y presencia o ausencia de aislamiento lipoproteico especializado llamado mielina. Las fibras de tipo A están mielinizadas y pueden conducir impulsos a 12 - 120 m/seg. Las de tipo B también son fibras mielinizadas pero solamente transmiten impulsos a 3-5 m/seg. Las fibras de tipo C no están mielinizadas, son pequeñas en diámetro y muy lentas (2,5 m/seg). Un ejemplo de una fibra de tipo A es una neurona motora que inerva el gastrocnemio. Una neurona eferente preganglionar autónoma es un ejemplo de una fibra de tipo B y una neurona sensorial que porte información acerca de dolor difuso es un ejemplo de una fibra de tipo C lenta.

Las neuronas sensoriales se adaptan para detectar ciertos tipos de información del ambiente. Estas incluyen

mecanorreceptores que sienten cosas como presión o estiramiento, termorreceptores, fotorreceptores en la retina y quimiorreceptores tales como la papila gustativa o las de olfacción. Las neuronas de asociación o interneuronas se encuentran habitualmente en la médula espinal y el cerebro en los que conectan diferentes neuronas aferentes sensoriales con neuronas secretoras o motoras eferentes.

5 Las neuronas se comunican entre sí mediante una estructura llamada sinapsis. Un axón termina en uno o más botones terminales que contienen numerosas vesículas pequeñas. Estas vesículas pequeñas están llenas de sustancias químicas llamadas neurotransmisores. La acetilcolina es más frecuentemente el neurotransmisor en la sinapsis aunque pueden usarse otros agentes químicos como norepinefrina, serotonina y GABA dependiendo de la neurona. Cuando un impulso viaja a lo largo del axón y alcanza los botones terminales las vesículas se fusionan con la membrana neuronal y el neurotransmisor se libera. El agente químico difunde después a través de la hendidura sináptica estrecha a receptores específicos para el agente químico en la membrana postsináptica de la neurona receptora.

15 La interacción del neurotransmisor con el receptor provoca un cambio en el potencial de membrana que puede inducir un nuevo impulso de la neurona postsináptica. La enzima acetilcolinesterasa está presente en la sinapsis para romper acetilcolina y terminar el estímulo. Otros neurotransmisores se rompen o se vuelven a captar en la neurona presináptica para terminar el estímulo.

20 En el sistema nervioso central muchas neuronas pueden converger en una neurona sencilla. Cuando cada una de las neuronas presinápticas libera neurotransmisor a su sinapsis con la neurona postsináptica, se producen potenciales de membrana locales que se integran y se suman. Estas señales entrantes pueden ser inhibitorias o estimuladoras. Si el potencial de membrana sumado resultante alcanza el umbral mínimo para esa neurona, entonces se iniciará un potencial de acción.

25 Los potenciales de acción viajan en una dirección opuesta al cuerpo celular por conducción saltatoria. Las neuronas más rápidas están cubiertas de vainas de mielina dispuestas en segmentos discretos separados por nodos de membrana neuronal desnuda llamados nodos de Ranvier. En la conducción saltatoria, el potencial eléctrico salta de nodo a nodo, reduciendo de este modo el área de membrana implicada en la conducción del potencial de acción y acelerando la conducción.

30 Las células no neuronales halladas en el sistema nervioso se llaman células gliales. Los astrocitos son las más numerosas y proporcionan soporte y alimento de las neuronas. La microglía son células fagocíticas pequeñas específicas de tejido neuronal. Las células que revisten el sistema ventricular y el canal central de la médula espinal y realizan el fluido cerebroespinal se llaman células ependimales. En el sistema nervioso central, un oligodendrocito forma segmentos de las vainas de mielina de múltiples neuronas. En el sistema nervioso periférico, cada segmento de la vaina de mielina se realiza por una única célula de Schwann.

Sistema nervioso central

40 El sistema nervioso central (SNC) consiste en el encéfalo y la médula espinal. Las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) protegen y alimentan al SNC además de la protección proporcionada por el cráneo y las vértebras. Se encuentra fluido cerebroespinal en el espacio subaracnoideo, canal central de la columna vertebral y los ventrículos del encéfalo. La piamadre es la capa más interior y está adherente al tejido nervioso. Entre la duramadre y la piamadre está la capa aracnoides. La duramadre fibrosa dura queda justo debajo del cráneo.

50 El encéfalo puede dividirse en 3 áreas básicas de prosencéfalo, encéfalo medio y tronco encefálico. El prosencéfalo incluye el tálamo, hipotálamo, ganglios basales y cerebro. El cerebro es responsable del pensamiento consciente, interpretación de las sensaciones, todos los movimientos voluntarios, facultades mentales y las emociones.

55 El tejido cerebral puede dividirse en áreas estructurales y funcionales. La superficie del cerebro está circunvolucionada en giros (circunvoluciones) y cisuras (surcos). Las áreas sensorial y motora corticales pueden mapearse en la circunvolución central posterior y cisura central, respectivamente. El área sensorial recibe información sensorial del lado opuesto del cuerpo que se proyecta después de procesamiento talámico. Las partes del cuerpo con más extremos nerviosos sensoriales se representan por más área sensorial cortical. El área motora controla los movimientos musculares voluntarios de las partes del cuerpo contralaterales pero las áreas de asociación son importantes para el inicio del movimiento.

60 El cerebro es la mayor parte del encéfalo y se divide en dos hemisferios, derecho e izquierdo, que tienen varios lóbulos. El lóbulo frontal contiene el área motora, área del habla de Broca, áreas de asociación y funciones en la inteligencia y en el comportamiento. El lóbulo parietal contiene áreas sensoriales y función en el tacto y el oído. Las áreas de asociación visual primarias se localizan en el lóbulo occipital y el lóbulo temporal contiene áreas para asociación auditiva, olfato y almacenamiento de la memoria.

65 El tálamo se localiza entre el córtex cerebral y el tronco encefálico. Todas las aportaciones sensoriales excepto el sentido del olfato se procesan aquí antes de proyectarse a otras áreas del encéfalo. El hipotálamo se localiza debajo

del tálamo y es responsable del procesamiento de estímulos internos y el mantenimiento del ambiente interno. El control inconsciente a cada momento de la presión sanguínea, temperatura, ritmo cardíaco, respiración, metabolismo del agua, osmolalidad, hambre y actividades neuroendocrinas se controlan aquí. Los núcleos de las células neuroendocrinas que liberan oxitocina y ADH de la hipófisis posterior se localizan en el hipotálamo.

5 Los ganglios basales (núcleo caudado, globo pálido, sustancia negra, núcleo subtalámico, núcleo rojo) son grupos de neuronas incluidos dentro de cada hemisferio del cerebro. Están implicados en el control del control motor complejo, procesamiento de información y movimientos voluntarios amplios inconscientes.

10 El tronco encefálico incluye el bulbo raquídeo y el puente troncoencefálico. El bulbo raquídeo contiene importantes áreas funcionales y centros de relevo para el control de la respiración, reflejos cardíacos y vasomotores. El puente troncoencefálico contiene el centro neumotáctico que está implicado en la regulación de la respiración.

15 El cerebelo queda por encima del tronco encefálico y usa información sensorial procesada en otro lugar acerca de la posición del cuerpo, movimiento, postura y equilibrio. Los movimientos no se inician en el cerebelo pero este es necesario para el movimiento coordinado.

Sistema nervioso periférico

20 El sistema nervioso periférico incluye nervios, ganglios, nervios espinales y craneales localizados fuera del cerebro y de la médula espinal. Los doce nervios craneales surgen de núcleos localizados en el tronco encefálico y viajan a localizaciones específicas llevando impulsos para controlar diversas funciones autónomas como olfato, visión, salivación, ritmo cardíaco y sensación cutánea. Los nervios craneales con frecuencia se mezclan por que portan componentes sensoriales y motores pero pueden tener solamente fibras motoras o sensoriales. La siguiente lista
25 enumera los nervios craneales y sus funciones.

Tabla 1 - Nervios Craneales

Número	Nombre	Función
I	Olfatorio	Sentido del olfato
II	Óptico	Visión
III	Oculomotor	Control motor de algunos músculos del ojo y párpados
IV	TrocLEAR	Control motor de algunos músculos del ojo
V	Trigeminal	Músculos de masticación y alguna sensación facial
VI	Abducente	Control motor de algunos músculos del ojo
VII	Facial	Control motor de músculos faciales, salivación. Músculos y sensaciones cutáneas.
VIII	Acústico	Equilibrio, sentido estático y audición
IX	Glosofaríngeo	Salivación, sensaciones de la piel, gusto y vísceras
X	Vago	Control motor del corazón y vísceras, sensación desde el tórax, faringe y vísceras abdominales
XI	Accesorio	Impulsos motores a la faringe y hombro
XII	Hipoglosal	Control motor de la lengua, algunos músculos esqueléticos, algunas vísceras, sensación de la piel y vísceras

30 La división sensorial del sistema nervioso periférico toma aportaciones de diversos tipos de receptores, las procesa y las envía al sistema nervioso central. Las aportaciones sensoriales pueden venir de fuentes internas como en la propiocepción (sentido de posición de las articulaciones y músculos) o de fuentes externas como la sensación de presión o calor en la piel. Las áreas de la piel inervadas por nervios finales específicos se llaman dermatomas. Las fibras aferentes recogen información sensorial y viajan por la médula espinal, convergen en el tálamo y finalmente terminan en el córtex sensorial del cerebro. Las áreas con más receptores sensoriales, es decir las puntas de los
35 dedos o los labios, corresponden a una mayor área en el córtex sensorial del encéfalo. Las fibras que portan información propioceptiva se dispersan también al cerebelo. Casi todos los sistemas sensoriales transmiten impulsos a partes del tálamo. El córtex cerebral está implicado en la percepción consciente y en la interpretación de los estímulos sensoriales.

40 La información motora a músculos y glándulas se produce mediante los sistemas autónomos y somáticos eferentes. La inervación del SNC de las articulaciones, tendones y músculos viaja mediante el sistema eferente somático.

Algunas respuestas musculares se controlan mediante reflejos espinales. Un ejemplo de esto es el reflejo de retirada visto cuando el dedo entra en contacto con una estufa caliente. El movimiento para retirar el dedo se produce mediante un reflejo espinal sencillo mucho antes de que la sensación de dolor alcance el cerebro. Claramente este es un mecanismo protector para evitar lesión adicional. Las informaciones motoras a glándulas y músculo liso habitualmente se producen mediante el sistema autónomo.

La mayoría de los órganos reciben información de ambas ramas del sistema nervioso autónomo. Una rama generalmente será excitadora mientras que la otra es inhibidora en ese órgano o tejido. La rama simpática del sistema autónomo actúa para preparar el cuerpo para estrés fisiológico. La estimulación de la rama simpática es como pisar el acelerador porque el cuerpo se prepara para correr o luchar en respuesta. Se ven efectos tales como aumento del ritmo cardíaco, dilatación de las vías respiratorias y movilización de glucosa de almacenes de glucógeno. Los nervios simpáticos surgen de la 1ª vértebra torácica a la 4ª lumbar. Tienen una neurona preganglionar corta que termina en uno de los ganglios en cadena que están a lo largo de la columna vertebral. La acetilcolina es el neurotransmisor en la sinapsis con la neurona postganglionar larga que viaja después al tejido diana en el que se libera norepinefrina en la mayoría de los extremos de nervios simpáticos. Varias neuronas postganglionares simpáticas, tales como las que inervan las glándulas sudoríparas o vasculatura del músculo esquelético, liberan acetilcolina.

La rama parasimpática actúa para contrarrestar a la rama simpática mediante neuronas que surgen de las regiones craneal y sacra del SNC. Por ejemplo, la estimulación parasimpática constriñe las vías respiratorias y reduce el ritmo cardíaco. Regula las actividades de reposo tales como digestión, micción y erección. Las neuronas preganglionares largas liberan acetilcolina en sinapsis cercanas al órgano final. Las neuronas postganglionares cortas también liberan acetilcolina en el tejido efector.

25 **Regeneración de Células Nerviosas Dañadas por Células Productoras de Mielina**

En un aspecto de la invención, para que se produzca degeneración de los nervios deben suceder dos acontecimientos. En primer lugar, las células que producen factor de regeneración deben ser viables así como las células nerviosas que reciben el beneficio de la terapia. La segunda es que debe producirse mielinización de las neuronas. A este respecto, puede usarse una diversidad de diferentes tipos celulares para efectuar este fenotipo. Por ejemplo, puede usarse una mezcla de células inductoras de viabilidad celular y células productoras de mielina juntas para regenerar el nervio.

Se contempla especialmente que la mielinización de las células nerviosas es especialmente aplicable a la curación de daño de la médula espinal regenerando los nervios dañados. A este respecto, puede usarse una proteína tal como neurregulina axonal 1 (Nrg1) (Michailov *et al.*, Science, 304, 700-703, 30/4/2004), cuya expresión induce mielinización y expresarse en una célula nerviosa, tal como pero sin limitación célula de Schwann, sola o junto con otra célula del mismo tipo o célula de diferente tipo, tal como una célula de tejido conectivo incluyendo pero sin limitación células fibroblásticas que pueden expresar Nrg1.

40 **Efecto de BMP en la Regeneración del Nervio y Protección de Degeneración del Nervio**

Un aspecto particular y ejemplificado de la invención se refiere a determinar el efecto de las proteínas funcionales de BMP-2 y BMP-9 en la regeneración después de lesión del nervio en rata. Se usaron treinta y seis ratas de cepa Sprague-Dawley (peso, 400±10 g), que se dividieron en 3 grupos (control, BMP-2 y BMP-9). Se observa aquí que por grupo de BMP-2 o BMP-9, se refiere al grupo de animales al que se inyectarán células que expresan BMP-2 o BMP-9 después de que se realice el daño nervioso a estas ratas Sprague-Dawley no inyectadas. Usando unas pinzas hemostáticas, se realizaron lesiones de aplastamiento en nervios ciáticos. En el grupo de control, se inyectó solamente tampón con fibroblastos no modificados. En los grupos de BMP-2 y BMP-9, se inyectó tampón con fibroblastos modificados genéticamente (BMP-2: fibroblasto secretor de BMP-2, BMP-9: fibroblasto secretor de BMP-9). Después de la compleción de la inyección, se evaluaron los efectos en la regeneración por 1) estudio de conducción motora del nervio ciático registrado en los músculos gastro-sóleo y 2) estudio histológicos en el nervio ciático con tinción de hematoxilina-eosina y Tricromo modificado.

El estudio de conducción nerviosa reveló duraciones significativamente cortas en los grupos de BMP-2 y BMP-9 en comparación con el grupo de control a 1 semana y se mostró posteriormente que las amplitudes eran mayores en el grupo de BMP-9 en las semanas 4 y 6, en comparación con otros grupos ($p < 0,05$). En la semana 8, no hubo diferencia aparente de tiempo de espera entre todos los grupos, pero las amplitudes fueron mayores en el grupo de BMP-9.

En el estudio histológico, todos los grupos mostraron degeneración grave (mostrando una respuesta inflamatoria, pérdida de axones y cambios vacuolares) la semana 2. En el grupo de control, la degeneración persistió en las semanas 4 y 8, pero en el grupo de BMP-2, el tamaño de inflamación y los cambios vacuolares se redujeron significativamente y del que solamente la mitad del grupo mostró estos hallazgos. En el grupo de BMP-9, estos cambios se redujeron aun más mostrando solamente un tercio de ellos pérdida de axón y cambios vacuolares y la inflamación fue leve. Los efectos de estas proteínas funcionales en la regeneración del nervio después de

lesión por aplastamiento fueron significativos en estas ratas. Estos resultados muestran la regeneración del nervio después de lesión del nervio, incluyendo lesión del nervio periférico.

5 TGF- β , activinas y BMP son proteínas implicadas en la diferenciación celular, crecimiento y formación de órganos durante el desarrollo. BMP es un miembro de la superfamilia de TGF- β junto con factores de crecimiento/diferenciación (GDF), proteínas osteogénicas (OP) y hormona anti-Mulleriana/sustancia inhibidora Mulleriana (MIS/AMH) (Ebara y Nakayama, Spine, 2002,16S: S10-S 15). Históricamente, en 1965, Urist (Urist, MR: Bone, formation by autoinduction, Science, 1965, 150(698): 893-899) observó el fenómeno de osificación embrionaria y otros procesos similares a osificación endocondrial después de insertar matriz ósea desmineralizada en el músculo de roedores y conejos. Después de la implantación, las células mesenquimales no diferenciadas migraron a los tejidos óseos insertados por quimiotaxis, seguido de mitosis y condensación. Los condroblastos, que derivan de células mesenquimales, secretaron después matriz extracelular, lo que permitió la formación del molde de cartílago. Esta matriz extracelular se vascularizó a través de células hematopoyéticas y endoteliales. Comenzaron a aparecer osteoblastos y osteoclastos localmente y el cartílago absorbido se transformó en tejidos óseos. Después de 21 días, se formó huesecillo con núcleo medular de hueso (Wang *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA, 1988, 85: 9484-9488). El componente, que se asoció con este proceso de cambio de la matriz ósea desmineralizada, se describió como proteína morfogenética ósea (BMP).

20 En 1988, Wang *et al.* (Wang *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA, 1988, 85: 9484-9488) aislaron tres polipéptidos con los pesos moleculares de 16 kDa, 18 kDa y 30 kDa cada uno de huesos bovinos. Wozney *et al.* (Wozney, Mol Rep Dev, 1992, 32: 160-167) identificaron posteriormente ARN humanos y ADN correspondientes usando estos polipéptidos como sondas. Estudios de seguimiento han revelado la presencia de al menos 16 BMP endógenas (Wozney y Rosen, Clin Orthop, 1998, 346: 26-37).

25 Excepto BMP1 (procolágeno C-proteasa), todas son miembros de la superfamilia del gen de factor de crecimiento transformante (TGF)- β (Wozney y Rosen, Clin Orthop, 1998, 346: 26-37). Estructuralmente, las BMP se producen como una forma precursora grande compuestas de un péptido señal de 15-25 aminoácidos, un prodominio con 50-375 aminoácidos y extremo maduro carboxilo terminal con 100-125 aminoácidos. Este último tiene 7 restos de cisteína bien conservados, lo que permite la dimerización peptídica después de que la región carboxi terminal se escinda del precursor por procesamiento proteolítico (Croteau *et al.*, 1999; 22: 686-695). Cada proteína BMP madura activa existe como un homodímero ligado por disulfuro compuesto de los mismos monómeros o heterodímero ligado por disulfuro compuesto de dos tipos diferentes de monómeros (Sampath *et al.*, J Biol Chem, 1990, 265: 13198-13250). Resulta interesante que la dimerización de la proteína se ha ligado a su actividad y como tales se ha mostrado que los heterodímeros, BMP2 y BMP7 son morfógenos más fuertes que el homodímero compuesto del mismo monómero (Kawabata *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9: 49-61; Sampath *et al.*, J Biol Chem, 1990, 265: 13198-13250).

40 Para aprovechar la actividad biológica de BMP, es necesario entender la regulación de la expresión génica de BMP y el mecanismo de dimerización de BMP en la célula. Aunque no se conoce mucho acerca de la expresión génica de BMP, se sabe que puede regularse por proteína hélice-bucle-hélice básica (bHLH) (Ebara *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240:136-141). Esta proteína bHLH está compuesta de 3 dominios, actuando dos dominios exteriores como activadores transcripcionales positivos y actuando el dominio central como un regulador negativo. Entre estos dominios, la caja E (la secuencia de ADN que varía de 246 a 275 pb) se reconoce por el factor de transcripción USF y tiene un papel importante en la regulación de la expresión de BMP en el ratón. BMP también se ha implicado en la regulación de la ruta de muerte celular.

50 Las actividades biológicas de BMP están reguladas de forma estrecha en diversos puntos temporales más allá del nivel transcripcional e incluso de forma extracelular. Se cree que fuera de las células, los receptores de BMP que actúan como proteínas inhibitoras, reaccionan fácilmente con BMP y en respuesta a la actividad aumentada de BMP, pueden inducir producción potenciada de señales de retroalimentación negativa que conducen en última instancia a su regulación (Ebara y Nakayama, Spine, 2002,16S: S10-S15). Dentro, las células se regulan tanto por traducción de señal como por proteínas Smad represivas, lo que significa que BMP es capaz de regular positivamente la expresión de proteínas Smad represivas (Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15).

55 En el nivel extracelular, las células se controlan por proteínas de unión a BMP tales como noggina y condrina, que inhiben la unión de BMP al receptor celular. La gastrulación ondulada (Tsg) potencia la función de la condrina (Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15). La folisatina se une a las proteínas OP-1/BMP-7 y BMP-4 y reprime BMP. (Matzuk *et al.*, Nature, 1995, 374: 360-363).

60 Receptor para BMP

BMP se une a dos tipos diferentes (tipo I y tipo II) de serina-treonina quinasas receptoras. Se han confirmado dos receptores de tipo I y uno de tipo II en mamíferos (Kawabata *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9: 49-61). En mamíferos, el receptor de tipo I tiene las isoformas A y B y aunque son estructuralmente similares, muestran diferente comportamiento en su activación de las proteínas Smad (Imamura *et al.*, Nature, 1997, 389: 549-551). Para la transducción de señal, los receptores de tipo I y tipo II necesitan formar un complejo. El receptor de tipo I se activa

por receptor de tipo II y la señal se transduce en células por el receptor de tipo II. La señal en las células se transduce por proteínas Smad. Smad1, Smad5 y Smad8 pertenecen a la misma estructura y transducen la señal de BMP. Smad2 y Smad3 transducen señales de TGF- β y activina. Estas Smad forman complejo heteromérico y se translocan al núcleo para activar diversos genes. Smad6, Tob, Ski y Smurfl están implicadas en la regulación negativa de estos genes. Entre estas, Smad6 reprime la transcripción de BMP y también tiene un papel en la retroalimentación negativa de la ruta de señalización de BMP (Bai *et al.*, J Biol Chem, 2000, 275: 8267-8270). Tob es un miembro de la familia de proteínas antiproliferativas y está implicada en la regulación negativa de la señal de BMP/Smad (Yoshida *et al.*, Cell, 2000, 103: 1085-1097). La oncoproteína Ski reprime la expresión de señalización de BMP y genes sensibles a BMP y reprime la activación de BMP reaccionando directamente con el complejo Smad, que es una característica de BMP (Wang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 14394-14399). Smurfl pertenece a la familia Hect de ubiquitina ligasa e inhibe transducción de señal de BMP uniéndose selectivamente con Smad regulado por receptor (Zuh *et al.*, Nature, 1999, 400: 687-693).

Está en curso investigación adicional sobre la función de la familia BMP de proteínas y parece que está implicada en el esquema de formación corporal básica incluyendo el sistema nervioso (Farkas *et al.*, J Neurosci, 1999, 92: 227-235), ojos (Mohans *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 2626-2636), pulmón, riñón, próstata, órgano reproductor y folículos pilosos durante la etapa embrionaria. Por ejemplo, se ha indicado que la formación de los dedos y espacios entre los dedos se debe a apoptosis de células entre los dedos causada por BMP (Zou y Niswander, Science, 1996, 272: 738).

BMP está implicada en la formación, diferenciación y curación del sistema esquelético durante la etapa embrionaria. En el sistema esquelético después del nacimiento, BMP está presente en el colágeno del estroma cerebral, células del periostio y células mesenquimales de la matriz llena de elementos formadores de sangre. La BMP también se ha aislado de osteosarcoma y condrosarcoma (Lianjia y Yan, Clin Orthop, 1990, 257: 249-256). Después de la fractura, BMP se difunde en la matriz de hueso absorbida, activa las células osteoprogenitoras y a su vez produce más BMP. La distribución de BMP depende del tiempo del tratamiento y de la localización de la fractura y puede complicarse adicionalmente debido a reacciones recíprocas. La investigación de BMP también se lleva a cabo en una diversidad de otros tejidos para estudiar su efecto protector o regenerativo y se ha demostrado que tiene un efecto protector en la función del músculo cardíaco en isquemia y perfusión de músculo cardíaco (Lefer *et al.*, J Mol Cell Cardiol, 1992, 24: 585-593), en el sistema nervioso extendido en experimentos induciendo isquemia cerebral después de inyectar BMP en la cavidad abdominal y efectos regenerativos en riñones dañados (Ripamonti y Duneas, Plast Reconstr Surg, 1998, 101: 227-239).

La presente solicitud muestra que BMP, que está implicada en la diferenciación de nervio periférico, cura ventajosamente nervio dañado en comparación con el proceso de curación de grupos no tratados.

Métodos *in vivo* y *ex vivo*

La presente invención no se limita a métodos *ex vivo* de suministro génico al sitio de interés. También se contemplan métodos *in vivo*. También debe observarse que puede usarse cualquier vector siempre que sea capaz de expresar la proteína deseada dentro del sitio de inyección. El vector puede ser un plásmido o cualquier número de vectores virales siempre que se emplee de forma útil para expresar el gen de interés.

EJEMPLOS

EJEMPLO I-MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se han usado ratas de cepa Sprague-Dawley maduras (16 - 18 semanas de edad) con pesos de 400 \pm 10 g para este estudio. La razón para usar ratas maduras es que es más fácil observar cambios debido a la regeneración de nervios y cambios fisiológicos en comparación con ratas en la etapa de crecimiento.

Métodos

Es técnicamente difícil inyectar proteína BMP funcional en nervios periféricos. Por lo tanto, en este estudio, se transfectaron directamente fibroblastos de rata que producían BMP2 y BMP9 en los nervios periféricos de modo que se secretara BMP2 y BMP9 localmente. Se dividió un total de 36 ratas en 3 grupos. Cada grupo consistía en 12 ratas con nervios lesionados. El primer grupo fue un grupo de control con ratas cuyos nervios lesionados se trataron con fibroblastos no modificados sin transgén. El segundo grupo (grupo de BMP2) se compuso de ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblastos modificados genéticamente con transgén BMP-2 y el tercer grupo (grupo de BMP9) se compuso de ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblastos modificados genéticamente con transgén BMP-9. La examinación histológica de tejidos se realizó 2, 4 y 8 semanas después del tratamiento sacrificando dos ratas de cada grupo y recogiendo nervios ciáticos de ambas extremidades. También se realizó estudio de conducción motora de los nervios con nervios ciáticos de extremidades estableciendo el valor de línea basal original antes del experimento y midiendo la conducción de los nervios cada dos semanas hasta 8 semanas

después de la cirugía.

Lesión del nervio

5 Se anestesió a la rata inyectando hidrato de cloral 4 % en una concentración de 300 mg/kg en la cavidad abdominal. Se retiró el pelo de las regiones posterior y femoral de la extremidad derecha antes de fijarse en posición postrada. Después de esterilizar la región femoral con potadina y alcohol 70 %, se hizo una incisión de aproximadamente 1-1,5 cm de epidermis alrededor de la parte central de la región femoral verticalmente y se tiró del bíceps femoral hacia fuera para exponer el nervio ciático. Se realizaron lesiones en el nervio de acuerdo con (De Koning *et al.*, J Neurol Sci, 1986, 74: 237-246) haciendo una incisión en la piel entre el muslo y articulación de rodilla total a 2-2,5 cm de longitud y exfoliando los músculos de la articulación de rodilla total y posterior para exponer el nervio ciático y lesionando después el nervio expuesto en herniación ciática aplastándolo con pinzas hemostáticas (Crile, 15 cm) durante 30 segundos. Las pinzas pudieron ajustarse a tres niveles diferentes de esfuerzo de retención y para aplicar el mismo nivel de retención para la lesión del nervio en áreas fijadas, se marcó una línea negra en las pinzas a 5 cm del extremo permitiendo lesiones por aplastamiento en el área fijada por el nivel de retención más fuerte. Después de retirar las pinzas hemostáticas, se inyectó al primer grupo o al de control tampón con 0,05 ml de fibroblastos no modificados (unidad: 5×10^5 células/50 μ l) dentro de 2 mm del área de lesión del nervio usando aguja ultrafina (calibre 30). Se inyectó al segundo y tercer grupos experimentales fibroblastos modificados genéticamente que secretaban BMP2 y BMP9, respectivamente, por el mismo procedimiento antes de suturar y esterilizar el área herida.

Ensayo de Conducción del Nervio

25 Se realizó ensayo de conducción del nervio después de anestesiarse la rata con hidrato de cloral 4 %. El electrodo de registro de actividad se colocó en el músculo del gemelo para estimular la escotadura ciática, se colocó el electrodo de referencia en el pie y el electrodo de masa se colocó entre el electrodo de estimulación y el electrodo de registro. Se usó electrodo de tipo parche y el electrodo de registro y el electrodo de masa se pusieron bajo la piel usando un electrodo de aguja. El ensayo de conducción del nervio se realizó usando KeyPoint (Dantec, Dinamarca). La frecuencia, velocidad de impresión de registro y sensibilidad del registro en este estudio se ajustaron como 2-10.000 Hz, 2 mseg/división, 5 mV/división, respectivamente. Se realizaron ensayos de conducción del nervio cada 2 semanas. Se tomaron mediciones desde el comienzo del experimento y se siguieron en las semanas 2, 4, 6 y 8 posteriores. Se midieron el tiempo de espera y la amplitud durante los ensayos por la amplitud entre la línea basal y el punto de electrodo negativo. Se seleccionaron 5 ratas de cada grupo para el estudio de conducción del nervio y se obtuvieron 10 mediciones de cada una. Las temperaturas del laboratorio y las ratas se mantuvieron a 25 °C y 30 °C, respectivamente.

Examinación Tisular Patológica/Histológica

40 Se llevó a cabo examinación de los tejidos nerviosos de las ratas para observar la curación natural después de la lesión examinando nervios normales antes de que se lesionaran desde el comienzo del experimento. Se usaron cuatro (4) ratas (8 nervios) para observar la regeneración de los nervios con células sin el procedimiento del transgén. Se seleccionaron aleatoriamente 2 ratas (4 nervios) de cada grupo y los tejidos se examinaron después de 2, 4 y 8 semanas. Para la examinación del tejido, se exfoliaron aproximadamente 2 cm de los nervios ciáticos del área de lesión por aplastamiento en ratas anestesiadas. Los cambios en los tejidos nerviosos se observaron con microscopía óptica después de fijarse con solución de formaldehído tamponada y después se tiñeron con hematoxilina-eosina (H y E) y tinciones de tricromo modificadas (MT).

Análisis de los Datos

50 2, 4, 6 y 8 semanas después de la lesión del nervio, la amplitud máxima del potencial de acción y cambios durante el tiempo de espera del músculo compuesto de cada grupo se analizó por comparación con el grupo de referencia y se llevó a cabo análisis estadístico por el programa SPSS-PC. Se realizaron comparaciones entre cada grupo por ANOVA y ensayo de t y el nivel de significación se estableció a 0,05. Los grados de lesión y regeneración se determinaron por datos histológicos como se interpretó por un patólogo.

EJEMPLO II - Cambios de Peso

60 Inicialmente, las ratas pesaban en el intervalo de 400 ± 10 gramos. Los cambios de pesos posteriores se muestran en la Tabla 2. No se observó diferencia entre cada grupo la semana 2, pero el grupo BMP9 mostró algunas diferencias ($p < 0,05$) en comparación con otros grupos las semanas 4 y 6. En la semana 8 no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p > 0,05$) (Tabla 2).

Tabla 2. Cambios de Peso Corporal en Grupos Experimentales

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Simulación	380,7±29,0	365,0±57,7	430,0±57,7	460,0±46,2
BMP2	370,6±24,8	368,3±74,7	382,5±141,5	470,0±40,9
BMP9	366,8±34,2	442,0±79,8	505,0±77,6	508,0±60,6

EJEMPLO III - Cambios de Tiempos de Espera

5 Los datos de línea basal medidos aleatoriamente de cada grupo antes del experimento mostraron un tiempo de espera de $1,44 \pm 0,11$ mseg. Los tiempos de espera después del traumatismo mostraron diferencias entre el grupo de control, grupo de BMP2 y grupo de BMP9 en las semanas 2 y 4, pero carecieron de significación estadística ($p > 0,05$). Los tiempos de espera de los grupos de BMP2 y BMP9 se acortaron significativamente en comparación con el grupo de control en la semana 6 ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencia en los tiempos de espera entre los 3 grupos en la semana 8 ($p > 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Cambio de Tiempo de Espera en los Grupos

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Simulación	1,30±0,11	1,29±0,04	1,25±0,21	1,10±0,0
BMP2	1,24±0,14	1,25±0,07	1,08±0,07*	1,04±0,04
BMP9	1,19±0,12	1,23±0,10	1,06±0,03*	1,15±0,07

EJEMPLO IV - Cambios de Amplitud

15 Los datos de línea basal medidos aleatoriamente de cada grupo antes del experimento mostraron amplitud de $23,9 \pm 4,3$ mV. La amplitud del grupo de BMP9 aumentó significativamente en comparación con el grupo de control en las semanas 2 y 4 después del traumatismo ($p < 0,05$). Los grupos BMP2 y BMP9 mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo de control en la semana 6 ($p < 0,05$) y se mostraron diferencias significativas en el orden de BMP9, BMP2 y los grupos de control en la semana 8 ($p < 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Cambios de Amplitud

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Simulación	3,98±1,52	6,17±1,27	6,33±1,27	6,3±1,31
BMP2	6,14±1,51	7,51±1,29	9,00±1,69*	7,17±0,50*
BMP9	6,79±1,34*	9,53±4,47*	9,47±1,22*	10,26±2,27*

EJEMPLO V - Observaciones Histológicas y Patológicas

25 La examinación histológica de tejido nervioso de ratas seleccionadas aleatoriamente de cada grupo mostró cambios similares a los resultados de la examinación fisiológica del nervio como se muestra de la Figura 1 a la Figura 10. El grupo de control mostró la tasa de recuperación más lenta puesto que no se recuperaron los axones de los tejidos nerviosos y permaneció reacción inflamatoria. Los grupos transfectados con fibroblastos modificados genéticamente que secretaban BMP2 o BMP9 no mostraron ninguna diferencia significativa en comparación con el grupo de control en la etapa temprana y todos los grupos mostraron indicaciones patológicas graves causadas por daño por aplastamiento de los nervios tales como cambios vacuolares e infiltración de monocitos inflamatorios, hemorragia de vena del epineuro en la semana 2. Para el grupo de control, estos síntomas persistieron durante 8 semanas. Sin embargo, para el grupo de BMP2, el tamaño de la inflamación y los cambios vacuolares se redujeron significativamente y solamente la mitad de ellos mostraron estos síntomas en las semanas 4 y 8. Para el grupo de BMP9, estos efectos fueron más prominentes en las semanas 4 y 8 y solamente un tercio de ellos mostraron pérdida de axón y cambios vacuolares y mostraron adicionalmente inflamación muy leve.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de población de células nerviosas cultivadas transfectadas *in vitro* con un vector plasmídico o viral recombinante generado que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína morfogenética ósea (“BMP”) ligada operativamente a un promotor, para la preparación de un medicamento para regenerar o evitar la degeneración de un nervio lesionado, en el que las células nerviosas transfectadas se trasplantan a un área cerca del nervio lesionado, de modo que la expresión de la secuencia de ADN dentro del área cerca del nervio lesionado provoque regeneración del nervio.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el factor de crecimiento transformante es BMP-2 y BMP-9.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nervio es nervio periférico.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el vector es un vector viral, en particular vector retroviral, vector viral adenoasociado, vector adenoviral o vector viral de herpes.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población de células se almacena antes del trasplante.
- 20 6. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población de células transfectadas se almacena en DMSO 10 % en nitrógeno líquido antes del trasplante.

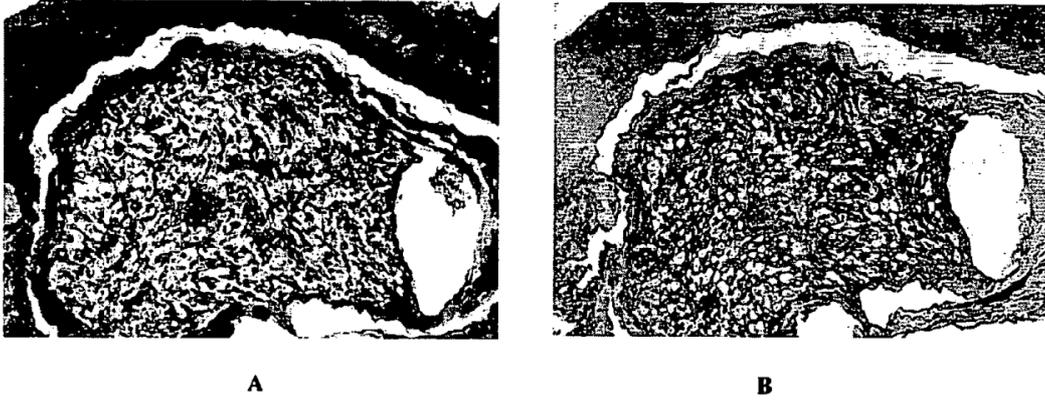


Figura 1

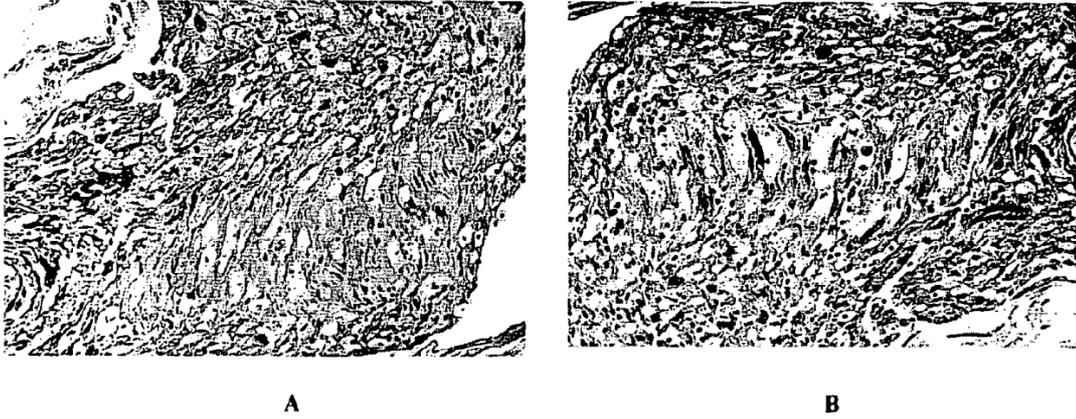
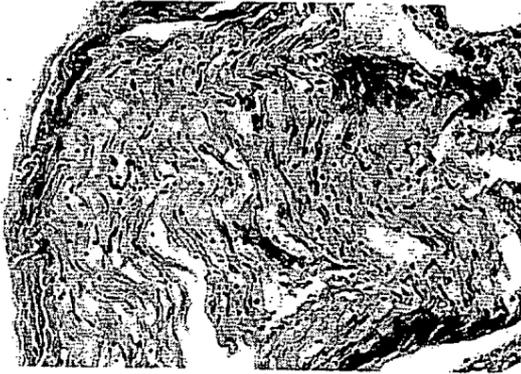


Figura 2



A

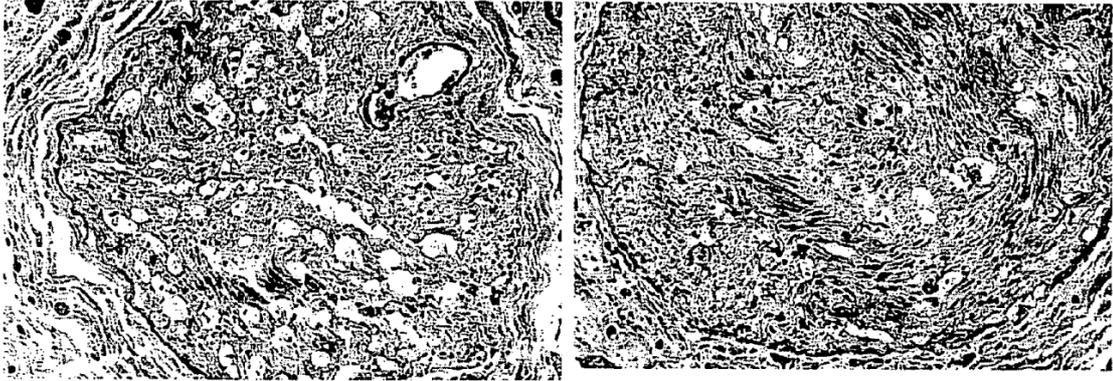


B



C

Figura 3



A

B

Figura 4

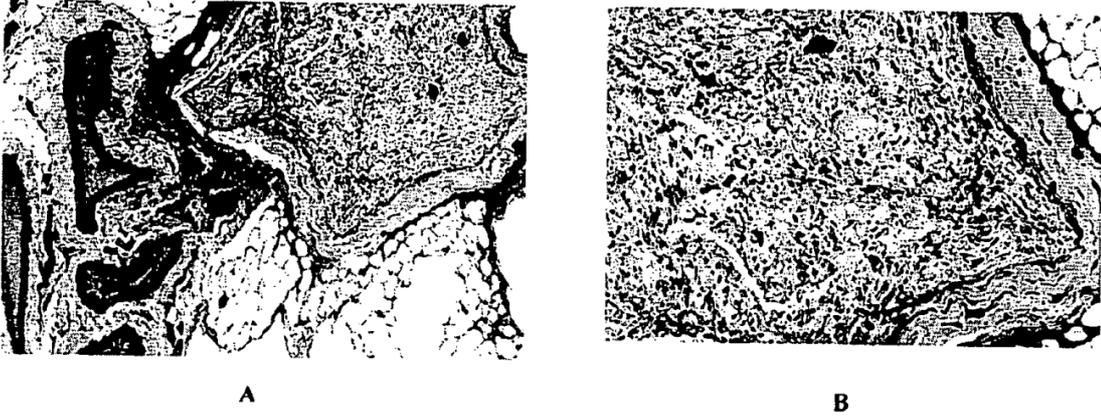
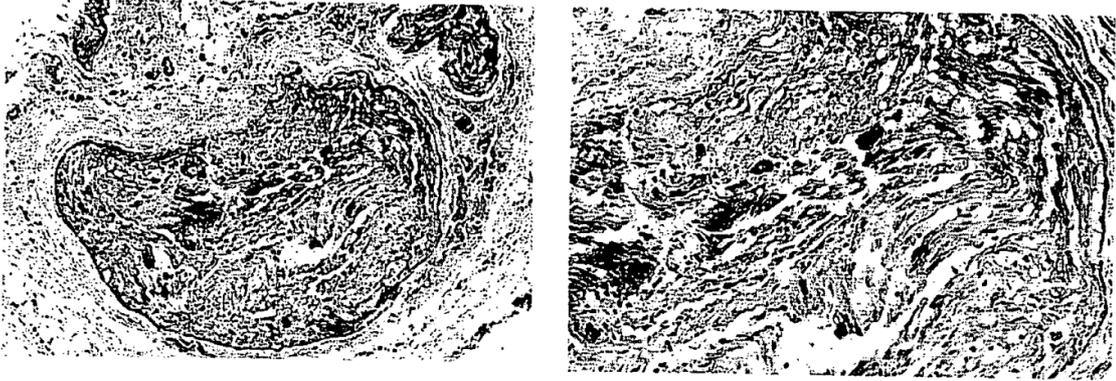


Figura 5



A

B

Figura 6

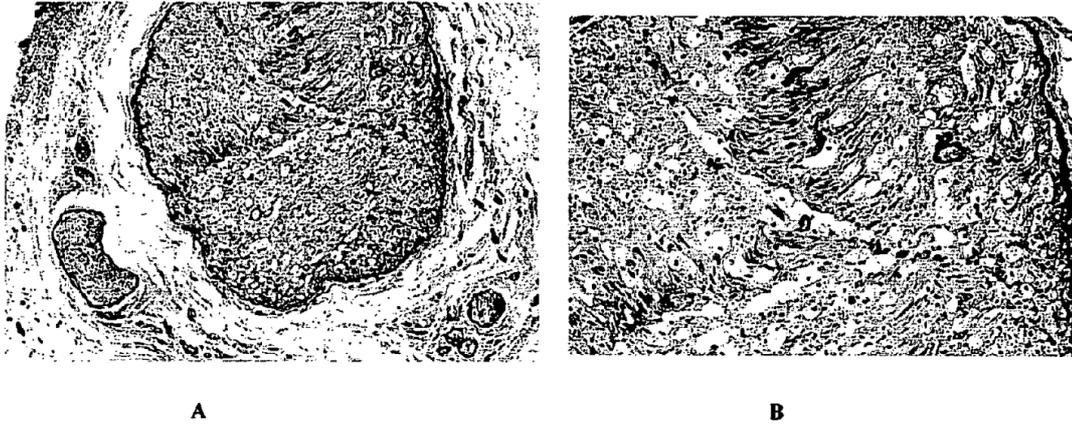


Figura 7

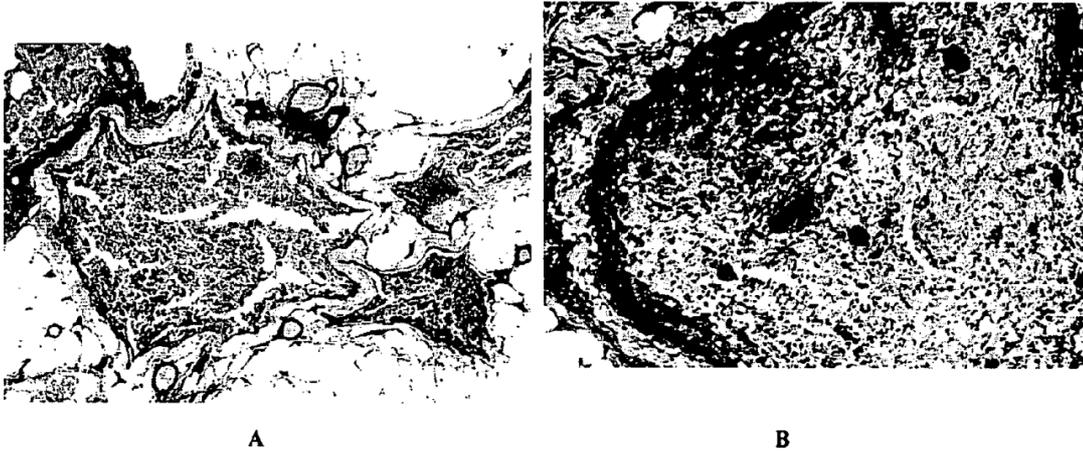


Figura 8

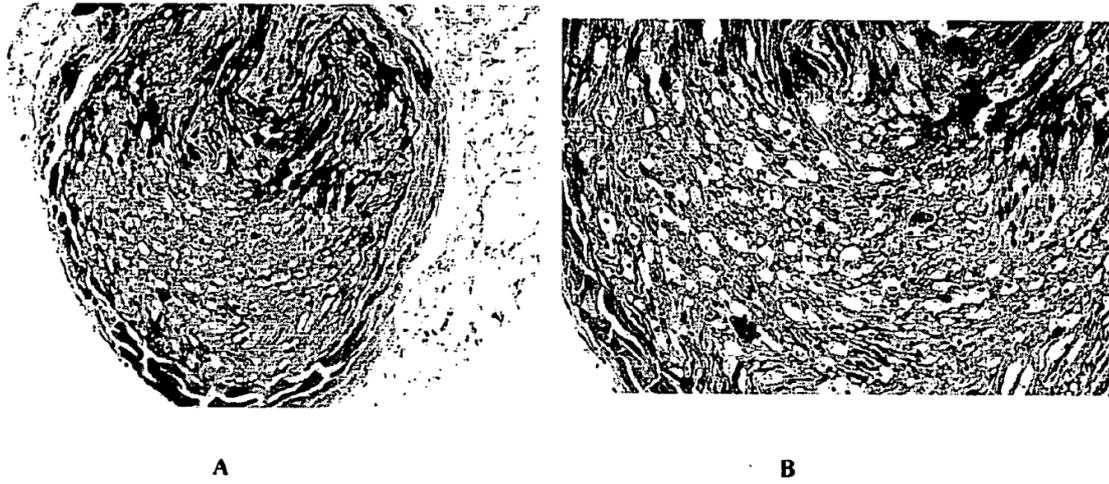
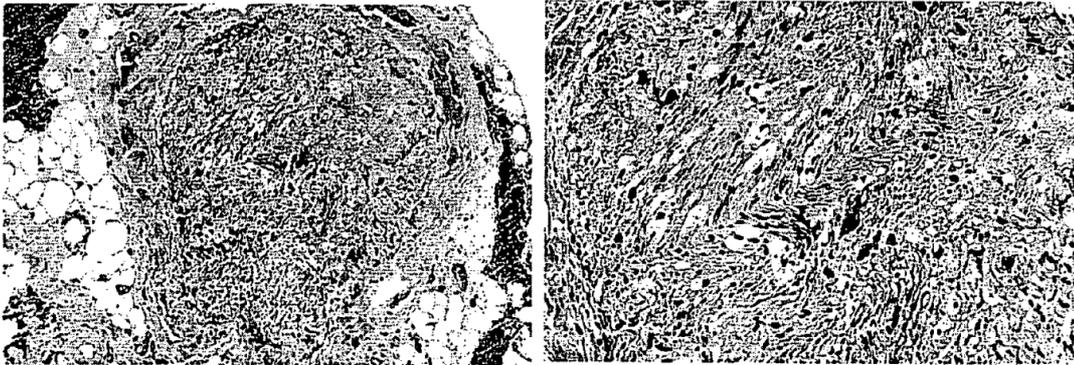


Figura 9



A

B

Figura 10