



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 551 160**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2001 E 10178810 (7)**

⑰ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2295070**

④ Título: **Uso de VEGF y homólogos para tratar trastornos neurológicos**

⑩ Prioridad:

**12.04.2000 EP 00201325**  
**29.09.2000 EP 00203382**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.11.2015**

⑬ Titular/es:

**VIB VZW (50.0%)**  
Rijvisschestraat 120  
9052 Zwijnaarde, BE y  
**LIFE SCIENCES RESEARCH PARTNERS VZW (50.0%)**

⑭ Inventor/es:

**CARMELIET, PETER;**  
**COLLEN, DÉSIRÉ y**  
**OOSTHUYSE, BERT**

⑮ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 551 160 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

Uso de VEGF y homólogos para tratar trastornos neurológicos.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a disfunción neurológica y fisiológica asociada a trastornos neurológicos. En particular, la invención se refiere a la implicación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub>, por sus siglas en inglés) en la etiología de trastornos neurológicos motores. La memoria descriptiva describe un nuevo ratón transgénico mutante (VEGF<sup>m/m</sup>) con una supresión de homocigotos en el elemento responsable de la hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés) del activador de VEGF que modifica la regulación hacia arriba hipóxica de VEGF. Estos ratones padecen debilidad muscular de comienzo adulto grave debido a degeneración progresiva de las neuronas motoras medulares que es reminiscente de esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés) - un trastorno fatal con etiología desconocida. Además, la neuropatía de estos ratones no está causada por defectos vasculares, sino que es debida a señales de supervivencia mediadas por VEGF defectuosas a neuronas motoras. La presente memoria descriptiva describe la isoforma VEGF<sub>165</sub> que estimula la supervivencia de neuronas motoras por unión a neuropilin-1, un receptor que se sabe que se une a semaforina-3A que está implicada en la retracción de los axones y la muerte de las neuronas y el Receptor-2 de VEGF. La presente memoria descriptiva describe el uso de VEGF, en particular VEGF<sub>165</sub>, para el tratamiento de trastornos neurológicos y el uso de polimorfismos en el activador de VEGF para diagnóstico de los trastornos últimos.

**Antecedentes de la invención**

VEGF es un factor clave en la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) durante el desarrollo embrionario así como en una variedad de estados patológicos <sup>1, 2</sup>. Aunque VEGF estimula principalmente las células endoteliales, también puede actuar sobre otros tipos de células. Por supuesto, VEGF, receptor-1 de VEGF (VEGFR-1/Flt1) y receptor-2 de VEGF (VEGFR-2/KDR/Flik1) se han implicado recientemente en la apoplejía <sup>3, 4</sup>, isquemia <sup>5</sup> de la médula espinal y en neuropatía <sup>6</sup> isquémica y diabética, patente internacional WO 0062798. Sin embargo, las moléculas últimas actúan fundamentalmente afectando al crecimiento o función vascular y no se ha mostrado <sup>11,12</sup> un efecto directo de VEGF sobre, por ejemplo, células neuronales. Por otra parte, la relevancia *in vivo* de dicho efecto directo no está validada.

WO99/47677 y WO 99/46364 divultan el uso de VEGF-E y VEGF-D, respectivamente, para tratar trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica.

La isquemia desempeña una función esencial en la patogénesis de trastornos neurológicos, exactamente durante apoplejía y de manera crónica durante el envejecimiento y diversos trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. Las neuronas son particularmente vulnerables al estrés oxidativo por radicales libres (generado durante isquemia/revascularización) debido a su alta velocidad de consumo de oxígeno, abundante contenido en lípidos y relativa escasez de enzimas antioxidantes comparado con otros órganos <sup>16</sup>. El daño oxidativo acumulado debido a una ganancia tóxica de función de superóxido dismutasa de Cu, Zn, mutante, (SOD1) participa en la degeneración de neuronas motoras en una serie de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica familiar (ALS) <sup>17,18</sup>. ALS afecta a 5 a 10 individuos por 100.000 personas en el mundo durante la segunda mitad de su vida, es progresiva, normalmente fatal en 5 años después del comienzo de los síntomas y no es tratable <sup>17-19</sup>. Noventa a 95% de casos son esporádicos. Aunque siguen siendo desconocidos los mecanismos subyacentes a ALS esporádica, las pruebas sugieren que la lesión oxidativa, similar a la causada por mutaciones de SOD1, desempeña una función patogénica <sup>18,20,21</sup>. Como respuesta a la hipoxia, se inician respuestas de "supervivencia", incluyendo la producción de hormonas del estrés, eritropoyetina, enzimas glicolíticas y moléculas angiogénicas tales como VEGF <sup>22,23</sup>. Los factores inducibles por la hipoxia (los HIF) desempeñan una función esencial en la mediación de esta respuesta de autorregulación por unión a un elemento de respuesta a la hipoxia definido (HRE, por sus siglas en inglés) en el activador de estos genes <sup>23</sup>. La hipoxia es un regulador predominante de la expresión de VEGF ya que la inducción de la expresión de VEGF es rápida (minutos), significativa (>10 veces) y responsable de cambios mínimos en el oxígeno <sup>22,23</sup>. Sorprendentemente, se ha prestado poca atención a la posible función de la hipoxia y los HIF en la iniciación de los mecanismos de supervivencia de autorregulación en el sistema nervioso. Aunque se

han identificado<sup>24, 25</sup> diversas moléculas neurotróficas, pocas han demostrado estar reguladas por la hipoxia. Con respecto a esto, sigue desconociéndose si la regulación hipódica de VEGF proporciona neuroprotección, independientemente de su actividad angiogénica. Además, en el sistema nervioso, las neuronas motoras son un grupo de células aunque heterogéneo, bien definido, responsable de transmitir información desde el sistema nervioso central al sistema locomotor. Las neuronas motoras vertebrales se especifican por factores solubles producidos por estructuras adyacentes a la médula espinal primordial, señalizando a través de proteínas de homeodomínio. La orientación axonal está regulada por receptores de superficie celular que interactúan con ligandos extracelulares y una vez que se han formado conexiones sinápticas, la supervivencia de la neurona motora somática depende de la provisión de factores de crecimiento derivados de diana, aunque también están potencialmente implicados factores no derivados de diana, producidos por astrocitos o células de Schwann. La degeneración de las neuronas motoras somáticas conduce a profunda incapacidad y múltiples mecanismos patogenéticos incluyendo señalización del factor de crecimiento anormal, acumulación anormal de neurofilamentos, excitotoxicidad; se ha postulado que es responsable la autoinmunidad. Incluso cuando se han identificado déficits específicos, por ejemplo, mutaciones del gen de la superóxido dismutasa 1 en esclerosis lateral amiotrófica familiar y expansión de poliglutamina del receptor de andrógenos en atrofia muscular espinal y bulbar, los mecanismos por los cuales tiene lugar degeneración neuronal motora somática siguen no estando claros. Para tratar con eficacia la degeneración del sistema motor, necesitamos comprender estos mecanismos más a fondo. Aunque se ha mostrado en la técnica que VEGF tiene acciones neurotróficas sobre los ganglios cervicales superiores de ratón en cultivo y en ganglios de la raíz posterior (Sondell M. et al. *Journal of Neuroscience*, (1999) 19, 5.731), no hay disponibles estudios acerca de la posible función de VEGF sobre las neuronas motoras. La presente memoria descriptiva demuestra que VEGF tiene una función trófica para las neuronas, en particular las neuronas motoras, y desvela que la regulación hipódica defectuosa de VEGF predispone a degeneración de las neuronas. Por otra parte, la presente memoria descriptiva indica que VEGF es un agente terapéutico para el tratamiento de trastornos neurológicos motores y describe el uso de polimorfismos en el activador de VEGF para diagnóstico de trastornos neurológicos.

### Objetivos de la invención

La presente memoria descriptiva describe herramientas de investigación, diagnóstico y terapéutica para mejorar la salud y bienestar de los pacientes que padecen trastornos neurológicos. En particular, la presente memoria descriptiva describe el uso de VEGF u homólogos o fragmentos del mismo, para tratar pacientes que padecen: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad cerebral isquémica crónica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica y otros trastornos neurológicos degenerativos, en particular de neuronas motoras. Más en particular, la presente memoria descriptiva describe el uso de VEGF<sub>165</sub> para evitar la muerte de las neuronas motoras en la médula espinal. La presente memoria descriptiva también describe receptores, tales como neuropilin-1 y el receptor-2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), que se une de manera específica a VEGF y que se puede usar para identificación sistemática de otras moléculas que se unen a él. En otras palabras, la presente memoria descriptiva describe opciones terapéuticas que estimulen la supervivencia de las neuronas o que eviten la muerte de las neuronas inducida por, por ejemplo, semaforina 3A. La presente memoria descriptiva además describe un animal que se caracterice por tener una expresión de VEGF inducida por la hipoxia alterada (es decir, debilitada o no funcional) comparado con su contrapartida sin manipular y que se puede usar como una herramienta de investigación para identificación sistemática de terapéutica como se mencionó anteriormente. La presente memoria descriptiva finalmente describe polimorfismos en la región activadora de VEGF, tal como en el Elemento Responsable de la Hipoxia, que se puede usar para identificar individuos susceptibles de desarrollar un trastorno neurológico o para tratar pacientes de trastorno neurológico por terapia génica.

La presente invención proporciona contenido como se explica en uno cualquiera y todos de (i) a (xiv) a continuación:

(i) Uso de la isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para la fabricación de un medicamento para tratar cualquiera de: demencia del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos de las neuronas motoras.

(ii) Uso como se explica en (i) anteriormente, en el que dichos trastornos de las neuronas motoras son esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica.

- (iii) Uso como se explica en uno cualquiera de (i) a (ii) anteriormente, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> es suministrado como un ácido nucleico que codifica VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub>.
- (iv) Uso como se explica en (iii) anteriormente, en el que dicho ácido nucleico está contenido en un vector de expresión apropiado.
- 5 (v) Uso como se explica en (iv) anteriormente, en el que dicho vector es un plásmido, un vector adenovírico, un vector adenovírico modificado, un vector retrovírico o un liposoma.
- (vi) Uso como se explica en uno cualquiera de (i) a (v) anteriormente, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se administra por una ruta parenteral.
- (vii) Uso como se explica en (vi) anteriormente, en el que dicha ruta parenteral es intratecal.
- 10 (viii) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso como un medicamento para tratar cualquiera de: demencia del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos de las neuronas motoras.
- (ix) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en (viii) anteriormente, en el que dichos trastornos de las neuronas motoras son esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica.
- 15 (x) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en uno cualquiera de (viii) a (ix) anteriormente, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se suministra como un ácido nucleico que codifica VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub>.
- (xi) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en (x) anteriormente, en el que dicho ácido nucleico está contenido en un vector de expresión apropiado.
- 20 (xii) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en (xi) anteriormente, en el que dicho vector es un plásmido, un vector adenovírico, un vector adenovírico modificado, un vector retrovírico o un liposoma.
- (xiii) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en uno cualquiera de (viii) a (xii) anteriormente, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se administra por una ruta parenteral.
- 25 (xiv) La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A como se explica en (xiii) anteriormente, en el que dicha ruta parenteral es intratecal.

### Leyendas de las figuras

- 30 Figura 1: Elección como objetivo del gen de VEGF y debilidad muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. Estrategia para suprimir el elemento de unión de HIF-1 $\alpha$  en el activador de VEGF. Se muestra el vector que fija como objetivo pBSK.VEGF<sup>m</sup>, el alelo de VEGF de tipo natural (VEGF<sup>WT</sup>), el alelo de VEGF homólogamente recombinado (VEGF<sup>neo</sup>) y el alelo de VEGF<sup>m</sup> modificado después de Cre-remoción de la casete neo flanqueada por sitios loxP. Se indican las ondas por barras continuas. HRE: elemento responsable de la hipoxia al que se une HIF-1 alfa; el asterisco y "m" indican la supresión de HRE.

- 35 Figura 2: Función neurotrófica de VEGF.

- A, VEGF<sub>165</sub>, pero no VEGF<sub>121</sub>, protege las neuronas motoras SCN34 contra la muerte celular programada (cuantificada por oligonucleosomas) inducida por TNF-alfa (50 ng/ml). La actividad de supervivencia de VEGF<sub>165</sub> es comparable con la de bFGF o TGF- $\beta$ 1. B, VEGF<sub>165</sub> también protege las células SCN34 contra la muerte celular programada inducida por hipoxia, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o privación de suero. \*: p<0,05 frente a 0,01 ng/ml de VEGF. C, El efecto de supervivencia de VEGF<sub>165</sub> (100 ng/ml) es bloqueado por anticuerpos (Ab; 50  $\mu$ g/ml) contra VEGFR-2 (R2) y neuropilin-1 (NP1), pero no para VEGFR-1 (R1), neuropilin-2 (NP2) o IgG de control (ctr). Se indujo muerte celular programada por privación de suero (0,5%). Ninguno de los anticuerpos modificó el nivel de referencia de la muerte celular programada en ausencia de VEGF. \*: p<0,05 frente a IgG de control.

- 45 **Descripción detallada de la invención**

La presente memoria descriptiva muestra que la supresión del elemento responsable de la hipoxia en el

activador de VEGF suprime eficazmente la inducción hipódica de VEGF. Basándose en la función conocida de VEGF en la angiogénesis, se anticipó que los ratones VEGF<sup>m/m</sup> padecerían angiogénesis mediada por VEGF debilitada. Los defectos vasculares parecen por supuesto contribuir a la letalidad de los embriones de VEGF<sup>m/m</sup> pero sorprendentemente, no hay signos de insuficiencia vascular en ratones

5 VEGF<sup>m/m</sup> supervivientes en las condiciones de referencia. Además, la neuropatía que se observa en ratones VEGF<sup>m/m</sup> adultos tampoco es debida a insuficiencia vascular debido a los siguientes hallazgos: (i) el número, diferenciación y ultraestructura de las células endoteliales en la médula espinal, nervios periféricos y músculos de esos ratones son normales; (ii) la perfusión endoneurial es normal sin signos de filtración; (iii) la tinción con pimonidazol de médulas espinales después de hipoxia es comparable con 10 ratones sin manipular; (iv) no hay infartos o microangiopatía, típicamente encontrados en pacientes diabéticos con neuropatía isquémica<sup>47</sup>; (v) las lesiones de los axones no sólo están presentes en el centro (propenso a isquemia), sino también en la periferia de los nervios; (vi) la degeneración de las 15 neuronas motoras se extiende con frecuencia en la proximidad inmediata de los capilares normales y (vii) se excluyen otras causas de isquemia incluyendo insuficiencia cardiaca, anemia o insuficiencia pulmonar.

La presente memoria descriptiva describe un nuevo modelo de ratón transgénico con una regulación hacia arriba hipódica debilitada de VEGF y caracterizado por tener una predisposición a degeneración progresiva de las neuronas motoras de comienzo adulto con características neuropatológicas, reminiscente de esclerosis lateral amiotrófica. En este nuevo modelo de ratón la neuropatía no es

20 producida por defectos vasculares, sino por privación de neuronas motoras a partir del efecto neurotrófico de VEGF. Debería aclararse, sin embargo, que la presente memoria descriptiva no sólo describe un nuevo ratón transgénico, sino también cualquier animal transgénico no humano (tal como una rata, perro, conejo, primate no humano, etc.) que se caracterice por tener una expresión de VEGF inducida por la hipoxia debilitada o no funcional comparado con sus contrapartidas de tipo natural. El

25 contenido de la presente memoria descriptiva tiene implicaciones médicas significativas. Primero, la etiología genética de trastornos degenerativos de las neuronas motoras sigue sin determinar. En menos de 2% de casos de ALS, las mutaciones en el gen SOD1 subyace a la enfermedad, pero la patogénesis del 98% restante sigue siendo desconocido. Nuestros hallazgos indican que la regulación anormal de los genes - no función - de VEGF constituye un nuevo factor de riesgo para la degeneración de las neuronas

30 motoras y fuerza a investigar alteraciones genéticas que afecten a la regulación de los genes de VEGF. Incluso en pacientes de ALS con una mutación de SOD1, las diferencias determinadas genéticamente en la regulación del gen de VEGF pueden explicar la significativa variabilidad fenotípica intrafamiliar. Segundo, no hay tratamiento médico para ALS hasta la fecha. Nuestros datos demuestran que VEGF

35 tiene valor terapéutico para trastornos de las neuronas motoras. La accesibilidad de un modelo animal con características de ALS familiar (expresión transgénica de SOD1 mutante) proporciona una herramienta de investigación esencial. Nuestros hallazgos también indican que VEGF<sub>165</sub> protege las neuronas corticales contra N-metil-D-aspartato. Tercero, el presente modelo de ratón VEGF<sup>m/m</sup> de

40 degeneración de las neuronas motoras de comienzo adulto refleja diversas características clínicas y neuropatológicas de ALS (atrofia muscular progresiva debido a degeneración de las neuronas motoras espinales, caracterizada por inclusiones de neurofilamentos en el pericarion e hinchazones de los axones<sup>17-19,32-34</sup>). El ratón VEGF<sup>m/m</sup> es, por lo tanto, un modelo adecuado para la evaluación de estrategias terapéuticas. Cuarto, nuestros datos influyen en la precaución contra el uso a largo plazo de antagonistas de VEGF (siendo ensayado en la actualidad para tratamiento de cáncer, diabetes y artritis reumatoide), ya que pueden predisponer a degeneración de las neuronas motoras.

45 La presente memoria descriptiva también indica que VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, se puede usar para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos neurológicos y más específicamente para el tratamiento de neuropatías y más específicamente para el tratamiento de trastornos de las neuronas motoras e incluso más específicamente para el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica. Según la memoria descriptiva VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, se pueden usar para fabricar un medicamento para evitar la muerte de las neuronas motoras en la médula espinal. En particular, la isoforma VEGF<sub>165</sub> se puede usar para el tratamiento de trastornos de las neuronas motoras.

50 Por "trastornos neurológicos" se quiere decir cualquier disfunción biológica o muerte de neuronas presente en el sistema nervioso central. Una lista no limitada de dichos trastornos comprende demencia, demencia del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedades de priones, neuropatías y trastornos de las neuronas motoras. Las "neuropatías" se caracterizan por muerte celular neuronal de neuronas motoras o neuronas

sensoriales y por lo tanto neuronopatías se puede subdividir en trastornos neurológicos motores y sensoriales. La Enfermedad de las Neuronas Motoras (MND, por sus siglas en inglés) o trastornos de las neuronas motoras es un grupo de enfermedades (trastornos) que implica la degeneración de las células del asta anterior, nervios en el sistema nervioso central que controla la actividad muscular. Esto conduce a un debilitamiento gradual y eventualmente pérdida de la musculatura (atrofia). Las enfermedades de la neurona motora se clasifican según implicación de neuronas motoras superiores (UMM, por sus siglas en inglés) y/o neurona motora inferior (LMN, por sus siglas en inglés). Las neuronas motoras superiores se originan en el cerebro, en particular, el córtex motor, y realizan sinapsis directamente o indirectamente en neuronas motoras inferiores. Las neuronas motoras superiores se refieren con más precisión como neuronas premotoras y son responsables de transportar de comandos descendentes para movimiento. Las neuronas motoras inferiores son divisibles en dos categorías: neuronas motoras viscerales y somáticas. Las neuronas motoras viscerales son neuronas autónomas preganglionares que regulan la actividad de las neuronas ganglionares, que inervan glándulas, vasos sanguíneos y músculo liso. Las neuronas motoras somáticas inervan el músculo esquelético e incluyen primero, células de asta anterior, que como el nombre implica, están situadas en el asta anterior de la médula espinal y segundo, neuronas motoras inferiores situadas en el núcleo nervioso craneal. La esclerosis lateral amiotrófica o ALS es la forma más frecuente (considerando alrededor de 80% de todos los casos) de los trastornos de las neuronas motoras. ALS se conoce como enfermedad de Lou Gehrig, denominada después del famoso jugador de béisbol yanqui. Los síntomas iniciales de ALS son debilidad en las manos y piernas y con frecuencia fasciculaciones de los músculos afectados. Cualquiera que sea el miembro afectado primero, finalmente se ven afectadas las cuatro extremidades. El daño a las neuronas motoras superiores produce debilidad muscular, espasticidad y reflejos de los tendones profundos hiperactivos. El daño de las neuronas motoras inferiores produce debilidad muscular con atrofia, fasciculaciones, flacidez y reflejos de los tendones profundos disminuidos. ALS presenta características de neuronas motoras tanto superiores como inferiores de los nervios craneales, por lo tanto los síntomas se aíslan a la cabeza y el cuello. Algunos pacientes también presentarán implicación de UMM de los nervios craneales y si esta es la única manifestación se refiere como parálisis pseudobulbar. La atrofia muscular espinal o atrofia muscular progresiva es una MND que no implica los nervios craneales y se debe a degeneración de las neuronas motoras inferiores. El síndrome de Shy-Drager se caracterizaba por hipotensión postural, incontinencia, transpiración, rigidez muscular y temblor y por la pérdida de neuronas de los núcleos torácicos en la médula espinal de los que se originan las fibras simpáticas. Las lesiones destructivas de la médula espinal dan como resultado pérdida de células del asta anterior. Esto se observa en mielomeningocele y en siringomielia, en que se forma un quiste grande lleno de fluido en el centro de la médula espinal cervical. La infección por el virus de la poliomielitis también destruye las células del asta anterior. Los tumores de la médula espinal pueden dañar localmente las células del asta anterior por crecimiento dentro del cordón (gliomas) o por compresión de la médula espinal desde fuera (meningiomas, schwannomas, carcinoma metastásico, linfomas). Las células del ganglio de la raíz posterior se pueden dañar por herpes simple y virus de la varicela zoster. Dichas infecciones se asocian con sarpullido vesicular en las regiones cutáneas suministradas por esas neuronas. Una pérdida similar de neuronas sensoriales se observa en ataxia - telangiectasia, un trastorno asociado a ataxia cerebelar progresiva y telangiectasias simétricas de la piel y conjuntiva. La pérdida neuronal de ganglios autónomos se observa en neuropatías amiloideas y en la diabetes. Se desarrolló un número normal de capilares en el músculo esquelético de VEGF<sup>m/m</sup>, pero se redujo su tamaño de paso. Con independencia de si los capilares más pequeños fueron la causa o la consecuencia del crecimiento muscular reducido, la oxigenación fue normal y no hubo signos de isquemia en músculo de VEGF<sup>m/m</sup>, que indicó que la perfusión igualaba los requerimientos metabólicos de las fibras musculares. VEGF puede inducir vasodilatación que podía dar como resultado remodelación vascular estructural (Laitinen M. et al. (1997) *Hum Gene Ther* 8, 1.737) pero los niveles de VEGF en músculo VEGF<sup>m/m</sup> normoxico e hipoxico fueron normales. Los niveles de VEGF e IGF-1 reducido normales pueden sugerir que se vio afectado principalmente el crecimiento de las fibras musculares y no de los vasos. Por el contrario, se redujo la perfusión neuronal por 50 % en ratones de VEGF<sup>m/m</sup>, a pesar de un número, tamaño y diferenciación, normales, de los capilares y una respuesta vasoreactiva hipercápnica normal. Queda por determinar por qué se reduce la perfusión en algunos pero no en otros órganos en ratones de VEGF<sup>m/m</sup> y si esos déficits de perfusión específicos de los órganos se relacionan con la referencia reducida variablemente y los niveles de VEGF hipoxicos en estos órganos. Por el contrario, el músculo esquelético donde se expande la vasculatura casi 10 veces, la red vascular neuronal se expande menos pero principalmente se remodela después del nacimiento (Feher G. et al. (1996) *Brain Res Dev Brain Res* 91, 209). VEGF ha estado implicado en la remodelación del plexo capilar primitivo (deficientemente perfusionado) en el nacimiento para una vascular perfusionada funcionalmente en el adulto (Ogunshola et al. (2000) *Brain*

*Res Dev Brain Res* 119, 139). Una cuestión intrigante es, por lo tanto, si los niveles de VEGF neuronales reducidos en ratones de VEGF<sup>m/m</sup> reducían la perfusión neuronal vía remodelación vascular debilitada. Con independencia del mecanismo, la hipoperfusión neuronal en ratones de VEGF<sup>m/m</sup> podía haber contribuido al crecimiento atrofiado e infertilidad, por ejemplo por secreción deficiente de factores

5 hipotalámicos. Los ratones con defectos hipotalámicos o de la pituitaria son más pequeños y estériles (Chandrashekhar V. et al. (1996) *Biol Reprod* 54, 1.002). Los niveles en plasma de IGF-1 reducidos son consistentes con dicha hipótesis. Aunque una reducción de la perfusión neuronal por 50% no predispuso a los ratones VEGF<sup>m/m</sup> a infartos neuronales, probablemente causó isquemia neuronal crónica. Los 10 modelos animales de isquemia de la médula espinal crónica no están disponibles, pero la isquemia de la médula espinal grave produce degeneración de las neuronas motoras significativa (Lang-Lazdunski, L. et 15 al. (2000) *Stroke* 31, 208). Los déficits de perfusión cerebral inducidos quirúrgicamente ocasionaron defectos cognitivos pero evitó la disfunción motora de las ratas y causó de manera variable signos histológicos de pérdida neuronal (Ohta H. et al (1997) *Neuroscience* 79, 1.039). No está disponible un modelo animal de isquemia neuronal crónica espontánea, sin embargo. La presente memoria descriptiva describe un modelo para isquemia de la médula espinal crónica.

El modelo de ratón de VEGF<sup>m/m</sup> promete ser fructífero para estudiar las consecuencias de la insuficiencia neurovascular sobre la función cognitiva y en el progreso de los trastornos neurodegenerativos. La 20 presente memoria descriptiva además describe un modelo para disfunción cognitiva y el modelo de ratón VEGF<sup>m/m</sup> útil para criar modelos de ratón actuales conocidos en la técnica para los trastornos neurodegenerativos, por ejemplo modelos para enfermedad de Alzheimer (Bornemann et al. (2000) *Ann NY Acad Sci* 908, 260, Van Leuven F. (2000) *Prog Neurobiol* 61, 305, Sommer B. et al. (2000) *Rev Neurosci* 11, 47).

Un flujo sanguíneo nervioso disminuido en el cerebro puede conducir a isquemia cerebral. La isquemia cerebral es un proceso de muerte celular neuronal retardada y no un suceso instantáneo. Un flujo 25 sanguíneo cerebral disminuido inicia una serie de sucesos (la "cascada isquémica") que puede conducir a destrucción celular. El objetivo de neuroprotección es para intervenir en el proceso que experimentan las neuronas isquémicas como parte de la ruta común final de la muerte celular. La cascada isquémica se ha estudiado intensamente, y aunque no han sido delineados completamente, se reconocen ciertos 30 aspectos reproducibles. La cantidad normal de perfusión a la materia gris del cerebro humano es 60 a 70 ml/100 g de tejido cerebral/min. Cuando disminuye la perfusión a <25 ml/100 g/min, la neurona ya no puede mantener la respiración aeróbica. Las mitocondrias se fuerzan a cambiar a respiración anaeróbica y se generan grandes cantidades de ácido láctico. Este subproducto metabólico se acumula en las 35 regiones extracelulares y ocasiona un cambio local en el nivel de pH. Este cambio fundamental en el entorno que rodea a las células isquémicas ha sido confirmado en seres humanos por espectroscopia de resonancia magnética y por tomografía computerizada de emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés). Muchos estudios se han centrado en la apoplejía como un modelo para la isquemia cerebral. Sin embargo, las reducciones recientemente crónicas en flujo sanguíneo cerebral se ha observado que 40 están asociadas con el envejecimiento y los trastornos neurodegenerativos progresivos que pueden precipitar el fallo cognitivo (Bennet et al. (1998) *Neuroreport* 9, 161). Por ejemplo, las anormalidades del flujo sanguíneo cerebral regional para las regiones frontal y temporal en pacientes deprimidos con 45 deficiencia cognitiva (Dolan et al. (1992) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 9, 768, Ritchie et al. (1999) *Age Ageing* 28, 385). En la enfermedad de Alzheimer (EA), un ejemplo de un trastorno neurodegenerativo, una perfusión cerebral disminuida se origina en la microvasculatura que afecta al suministro óptimo de glucosa y oxígeno y da como resultado un fallo de las rutas metabólicas en las células cerebrales tales 50 como en las rutas biosintética y sináptica. Se propone que se requiere que se presenten dos factores antes de que se exprese disfunción cognitiva y neurodegeneración en cerebro de EA, envejecimiento avanzado, y la presencia de una afección específica que disminuya además la perfusión cerebral (de la Torre (1999) *Acta Neuropathol* 98, 1). Además en la EA una hipoperfusión cerebral umbral crítica es una autoperpetuación, insuficiencia circulatoria contenida y progresiva que desestabilizará las neuronas, sinapsis, neurotransmisión y función cognitiva, creando en su secuela un proceso neurodegenerativo caracterizado por la formación de placas seniles, ovillos neurofibrilares y angiopatía amiloide.

Comisión se refiere al proceso implicado en el conocimiento, o el acto de conocer, que en su integridad incluye percepción y juicio. La cognición incluye cada proceso mental que se puede describir como una experiencia de conocimiento como se distingue de una experiencia de sentimientos o de voluntad. 55 Incluye, en pocas palabras, todos los procesos de conciencia por los cuales se construye el conocimiento, incluyendo percepción, reconocimiento, concibimiento y razonamiento. La esencia de la cognición es el juicio, en que un cierto objeto se distingue de otros objetos y se caracteriza por algún

concepto o conceptos. Los trastornos cognitivos o disfunción cognitiva son trastornos en el proceso mental relacionado con la cognición. Una visión general de los trastornos cognitivos (también denominados trastornos amnésicos) se puede encontrar en Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV™) (ISBN 0890420629).

- 5 Según la memoria descriptiva el nuevo modelo de ratón VEGF<sup>m/m</sup> se puede usar para identificar y/o ensayar moléculas para prevenir y/o tratar isquemia neuronal o trastornos neurodegenerativos y/o disfunción cognitiva.

Además, la presente memoria descriptiva describe además que VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, se pueden usar para la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar 10 isquemia neuronal tal como isquemia cerebral. Además, VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, se pueden usar para la fabricación de un medicamento para prevenir y/o tratar disfunción cognitiva.

Se describen con detalle VEGF y homólogos tales como VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PLGF en Neufeld 15 G. et al, *Faseb Journal*, 13, 9-22, 1999, Korpelainen E. I. et al, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 159-164, 1998 y en Joukov, V. et al.. *J. Cell. Physiol.* 173, 211-215, 1997. En particular, algunos de los genes VEGF, homólogos, fragmentos y derivados de los mismos se describen en GenBank Access Nos. NM 003376 ("Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA"); NM 003377 ("Homo sapiens vascular endothelial growth factor B (VEGFB) mRNA"); NM 005429 ("Homo sapiens vascular endothelial growth factor C (VEGFC) mRNA"); NM 004469 ("Homo sapiens c-fos induced growth factor (vascular 20 endothelial growth factor D) (FIGF) mRNA"); AF 024710 ("Homo sapiens vascular growth factor (VEGF<sub>165</sub>) mRNA, 3'UTR, mRNA sequence"); y patentes de EE.UU. Nos. 6.013.780 ("VEGF<sub>145</sub> expression vectors"); 5.935.820 ("Polynucleotides encoding vascular endothelial growth factor 2"); 5.607.918 ("Vascular endothelial growth factor-B and ADN coding therefore"). Los ácidos nucleicos 25 preferidos codifican los polipéptidos del factor de crecimiento angiogénico ya mencionado, así como sus homólogos y alelos y fragmentos funcionalmente equivalentes o variantes de lo anterior. Por ejemplo, VEGF 1 humano (VEGF A) existe en cuatro isoformas principales, phVEGF<sub>121</sub>; phVEGF<sub>145</sub>; phVEGF<sub>165</sub>; y phVEGF<sub>189</sub>. Preferiblemente, el ácido nucleico de VEGF presenta la secuencia de nucleótidos que 30 codifica un polipéptido de factor de crecimiento angiogénico humano intacto, es decir, la secuencia codificadora completa del gen que codifica un VEGF humano; sin embargo la memoria descriptiva también describe el uso de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de un VEGF intacto.

Homólogos y alelos del ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos indicadas para los genes VEGF, tales como los mencionados en la presente memoria, se describen también en la presente memoria descriptiva. Además, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden incluir ácidos 35 nucleicos que codifiquen los polipéptidos de VEGF con las secuencias indicadas en las bases de datos públicas y/o bibliografía, pero que difieren de las secuencias de ácidos nucleicos que se encuentran en la naturaleza en secuencia de codones debido a la degeneración del código genético. La memoria descriptiva también describe fragmentos funcionalmente equivalentes, variantes y análogos, aislados, de los ácidos nucleicos anteriores; proteínas y péptidos codificados por cualquiera de los ácidos nucleicos 40 anteriores y complementos de los ácidos nucleicos anteriores. "Funcionalmente" significa que los fragmentos, variantes y análogos deben tener la capacidad para tratar un trastorno de las neuronas y en particular un trastorno de las neuronas motoras.

El término "derivados" se refiere a cualquier variante, mutante o composición de péptidos de VEGF, que 45 retiene la capacidad, o se puede usar, para tratar trastornos degenerativos de las neuronas motoras como se definió anteriormente. El último término también incluye modificaciones post-traduccionales de las secuencias de aminoácidos de VEGF tales como glucosilación, acetilación, fosforilación, modificaciones con ácidos grasos y similares. Se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo aminoácidos no naturales), secuencias de aminoácidos con uniones sustituidas, péptidos que contienen enlaces disulfuro entre restos cisteína, secuencias de aminoácidos biotinilados así como otras 50 modificaciones conocidas en la técnica. El término, así, incluye cualquier proteína o péptido que tenga una secuencia de restos de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia mostrada específicamente en la presente memoria en que uno o más restos han sido sustituidos de manera conservativa con un resto biológicamente equivalente. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la 55 sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y

asparagina, entre glicina y serina, la sustitución de un resto básico tal como lisina, arginina o histidina por otro o la sustitución de un resto ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro. La expresión "sustitución conservadora" también incluye el uso de un resto químicamente derivatizado en vez de un resto no derivatizado siempre que la proteína o péptido resultante sea biológicamente equivalente a la proteína o péptido descrito en la presente memoria.

"Derivado químico" se refiere a una proteína o péptido que tiene uno o más restos derivatizados químicamente por reacción de un grupo lateral funcional. Ejemplos de dichas moléculas derivatizadas, incluyen pero no se limitan a, esas moléculas en que los grupos amino libres han sido derivatizados para formar hidrocloruros de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivatizar para formar O-acil u O-alquil-derivados. El nitrógeno de imidazol de histidina se puede derivatizar para formar N-imbencilhistidina. También se incluyen como derivados químicos esas proteínas o péptidos, que contienen uno o más derivados de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza de los veinte aminoácidos clásicos. Por ejemplo: se puede sustituir prolina por 4-hidroxiprolina; lisina se puede sustituir por 5-hidroxilisina; histidina se puede sustituir por 3-metilhistidina; serina se puede sustituir por homoserina y lisina se puede sustituir por ornitina. Las proteínas o péptidos descritos en la presente memoria también incluyen cualquier proteína o péptido que tenga una o más adiciones y/o supresiones o restos relativos a la secuencia de un péptido cuya secuencia se conoce en la presente memoria, siempre que el péptido sea equivalente biológicamente a las proteínas o péptidos descritos en la presente memoria. Cuando se usa porcentaje de identidad de secuencia con referencia a polipéptidos (es decir, homólogos), se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticos con frecuencia difieren por sustitución de aa conservadora, donde los restos de aa son sustituidos por otros restos de aa con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y por lo tanto no cambian las propiedades funcionales del polipéptido. En el caso de que las secuencias difieran en sustituciones conservadoras, la identidad de las secuencias en porcentaje se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son conocidos para los expertos en la materia. Típicamente esto implica puntuar una sustitución conservadora como un desajuste parcial más bien que total, incrementando de ese modo el porcentaje de identidad de la secuencia. Así, por ejemplo (y como se describe en la patente internacional WO 97/31116 a Rybak et al), donde se proporciona una puntuación de 1 a un aa idéntico y se proporciona una puntuación de cero a una sustitución no conservadora, se proporciona una puntuación entre cero y 1 a una sustitución conservadora. Con respecto a esto, se debería aclarar que los polipéptidos, o partes de los mismos, que comprenden una secuencia de aa con al menos 55%, preferiblemente 75%, más preferiblemente 85% o lo más preferiblemente 90% de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de VEGF o partes de la misma, se describen en la presente memoria descriptiva. También se debería aclarar que los polipéptidos que son inmunológicamente reactivos con anticuerpos surgidos contra VEGF o partes del mismo, se describen en la presente memoria.

El término "fragmentos de VEGF" se refiere a cualquier fragmento, incluyendo cualquier modificación de dicho fragmento como se describió anteriormente, que retenga la capacidad, o se pueda usar, para tratar trastornos de las neuronas y en particular trastornos de las neuronas motoras. Los términos "composición farmacéutica" o "medicamento" o "uso para la fabricación de un medicamento para tratar" se refiere a una composición que comprende VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, como se describió anteriormente y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambos términos se pueden usar indistintamente) para tratar enfermedades como se indicó anteriormente. Portadores o recipientes adecuados conocidos para los expertos son: disolución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5% en disolución salina, sustancias que aumentan la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición tales como proteínas, polisacáridos, poli (ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. El "medicamento" se puede administrar por cualquier método adecuado dentro del conocimiento del experto. La vía de administración preferida es por vía parenteral. En la administración parenteral, el medicamento descrito en la presente memoria se formulará en una forma inyectable de dosis unitaria tal como una disolución, suspensión o emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables, como se definió anteriormente. Sin embargo, la dosis y el modo de administración dependerán del individuo. En general, el medicamento se administra de manera

que la proteína, el polipéptido, péptido, descrito en la presente memoria, se pueda proporcionar a una dosis entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, lo más preferiblemente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferiblemente, se proporciona como una dosis de bolo. También se puede usar infusión continua e incluye suministro subcutáneo continuo vía una minibomba osmótica. Si es así, el

5 medicamento se puede infusionar a una dosis entre 5 y 20 µg/kg/minuto, más preferiblemente entre 7 y 15 µg/kg/minuto.

Según la memoria descriptiva la infusión con una composición que puede comprender VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo es intratecal. La administración intratecal se puede realizar por ejemplo mediante implante quirúrgico de una bomba y haciendo funcionar un catéter a la 10 columna vertebral. Se debería mencionar que la administración intratecal de VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo es un aspecto particularmente importante descrito en la presente memoria. Por supuesto, como se ha demostrado que VEGF presenta un aspecto neurotrófico sobre las neuronas y más en particular sobre las neuronas motoras, la administración intratecal es una manera 15 preferida. Esto contrasta con la patente internacional WO 0062798 donde se tiene por objetivo angiogénesis terapéutica para tratar la neuropatía periférica isquémica.

En vez de suministrar VEGF o un homólogo, derivado o fragmento del mismo, como una proteína a un paciente con necesidad de tratamiento de un trastorno de las neuronas o más en particular un trastorno de las neuronas motoras, también se puede suministrar a dicho paciente un ácido nucleico que codifique VEGF o un homólogo, derivado o fragmento del mismo. En ese caso el ácido nucleico que codifica 20 VEGF u homólogo, derivado o fragmento del mismo, se puede acoplar de manera operativa a un activador que pueda expresar dicho factor de crecimiento angiogénico en una célula diana (por ejemplo, una célula endotelial, una célula nerviosa, una célula muscular, una neurona, una neurona motora). Con frecuencia, el ácido nucleico está contenido en un vector de expresión apropiado (por ejemplo, plásmido, vector adenovírico, vector adenovírico modificado, vector retrovírico, liposoma) para modificar 25 genéticamente con más eficacia la célula diana y conseguir expresión de dicho factor de crecimiento angiogénico. Por ejemplo, en la patente internacional WO 9831395 se describe completamente la transferencia selectiva de genes a neuronas motoras.

La presente memoria descriptiva describe que la isoforma de VEGF<sub>165</sub>, pero no la isoforma de VEGF<sub>121</sub>, proporciona neuroprotección vía unión a neuropilin-1 y VEGFR-2.

30 Además, la presente memoria descriptiva describe los inhibidores de Sema3A, una molécula que está implicada en la muerte celular programada<sup>43</sup> neuronal y retracción<sup>44</sup> de axones y presenta unión de VEGF<sub>165</sub> a neuropilin-1<sup>9</sup> se puede fabricar y usar para el tratamiento de trastornos de las neuronas. Neuropilin-1 también se une a Sema3A, implicado en la repulsión de las proyecciones motoras durante 35 el desarrollo<sup>11-15</sup>, Neuropilin-1 y Sema3A se expresan en el asta motriz después del nacimiento, pero su función sigue siendo enigmática. Un reciente estudio *in vitro* sugirió una función para Sema3A en la muerte celular programada de neuronas<sup>43</sup> simpáticas y cerebelares, mientras se sugirió que la regulación hacia abajo de Sema3A era un requisito previo para la regeneración axonal después de lesión<sup>44</sup> del nervio.

40 Según la memoria descriptiva se pueden administrar VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo para la prevención de pérdida neuronal o más específicamente de pérdida neuronal motora en la médula espinal en, por ejemplo, indicaciones quirúrgicas donde se puede esperar una agresión isquémica a las neuronas o neuronas motoras. Se requiera la iniciación de rutas neuroprotectoras durante la hipoxia, ya que estas neuronas motoras postmitóticas vitales no se pueden regenerar después de una agresión hipoxica letal. Con respecto a esto, sólo se han caracterizado algunas moléculas 45 neuroprotectoras tales como NGF, bFGF, TGFβ1<sup>52-54</sup>. La presente memoria descriptiva indica claramente que VEGF es un potente agente neuroprotector, ya que la regulación de su expresión por la hipoxia es rápida (minutos), significativa (> 10 veces) y sensible a pequeños cambios en el oxígeno. La ausencia de respuestas de VEGF neuroprotectoras en ratones VEGF<sup>m/m</sup> - incluso aunque puedan tener lugar sólo de manera transitoria, pero repetitivamente - puede explicar por qué las neuronas motoras en 50 estos ratones degeneran por último después de miniagresiones subletales acumulativas de hipoxia.

Neuropilin-1 (NP-1), un receptor para la isoforma VEGF<sub>165</sub><sup>9,10</sup> para la semaforina 3A (Sema3A) neorrepelente<sup>11-13</sup> se demuestra que es esencial para guiar las proyecciones neuronales durante el diseño embrionario<sup>11-15</sup>. Sin embargo, no se conoce si NP-1 y/o Sema3A presentan alguna función en la función neuronal después del nacimiento. En otro aspecto, la presente memoria descriptiva describe

métodos para identificar compuestos o moléculas que se unen en el receptor de neuropilin y VEGFR-2 y estimulan la supervivencia de neuronas y más en particular neuronas motoras. En esta memoria descriptiva los resultados muestran que VEGF<sub>165</sub>, por unión a neuropilin-1 y VEGFR-2, media la supervivencia de neuronas motoras de NSC34. Ambos receptores se expresan en las neuronas motoras

5 en columnas vertebrales adultas *in vivo* y son accesibles por lo tanto a VEGF<sub>165</sub>, producido por la propia neurona motora o por otras células cercanas. Neuropilin-1 y VEGFR-2 actúan como receptores conjuntos en la estimulación de la movilidad <sup>9,10</sup> celular endotelial y también cooperan en la mediación de la supervivencia neuronal. Estos métodos también se refieren como "ensayos de detección sistemática de fármacos" o "bioensayos" y típicamente incluyen la etapa de identificación sistemática en un candidato/ compuesto de ensayo o agente de la capacidad para interactuar con (por ejemplo, unión a) 10 neuropilin-1 y VEGFR-2. Los compuestos o agentes candidato, que presentan esta capacidad, se pueden usar como fármacos para tratar trastornos degenerativos. Los compuestos candidato/de ensayo tales como moléculas pequeñas, por ejemplo moléculas orgánicas pequeñas, y otros candidatos fármacos se pueden obtener, por ejemplo, a partir de bibliotecas combinatorias así de productos naturales.

15 La memoria descriptiva también describe métodos para identificar compuestos o agentes que se pueden usar para tratar neuronas degenerativas. Estos métodos también se refieren como "ensayos de detección sistemática de fármacos" o "bioensayos" y típicamente incluyen la etapa de identificar sistemáticamente la capacidad de un compuesto o agente candidato/de ensayo para interactuar con (por ejemplo, unirse a) neuropilin-1 y VEGFR-2. Los compuestos o agentes candidato/de ensayo que 20 presentan esta capacidad, se pueden usar como fármacos para tratar trastornos las neuronas degenerativas. Los compuestos candidato/de ensayo tales como moléculas pequeñas, por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas, y otros candidatos fármacos se pueden obtener, por ejemplo, de bibliotecas combinatorias y de productos naturales. Además, la memoria descriptiva describe ensayos 25 para detección sistemática de compuestos candidato/de ensayo que interactúan con (por ejemplo, se unen a) neuropilin-1 y VEGFR-2 para formar un complejo y detectar la formación de un complejo, en que se indica la capacidad del compuesto candidato para interactuar con neuropilin-1 y VEGFR-2 por la presencia de un compuesto candidato del complejo. La formación de complejos entre neuropilin-1 y el 30 compuesto candidato o se puede cuantificar, por ejemplo, usando inmunoensayos clásicos. Neuropilin-1 empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijado a un soporte sólido, en suspensión sobre una superficie celular o situado intracelularmente. Además, la memoria descriptiva describe 35 ensayos de detección sistemática para identificar compuestos candidato/de ensayo que estimulen neuropilin-1 y VEGFR-2 o inhiban la unión de sema3A a neuropilin-1 y/o VEGFR-2. Típicamente, los ensayos son ensayos sin células que incluyen las etapas de combinar neuropilin-1 y VEGFR-2 descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos y un compuesto candidato/de ensayo, por ejemplo, en condiciones en las que de no ser por la presencia del compuesto candidato, neuropilin-1 y VEGFR-2 o una porción biológicamente activa de los mismos interactúa con (por ejemplo, se une a) la molécula o 40 el anticuerpo diana y detectar la formación de un complejo que incluye neuropilin-1 que incluye la molécula o anticuerpo diana. La detección de formación de complejo puede incluir cuantificación directa del complejo.

45 Para realizar los ensayos de detección sistemática de fármacos ya descrita anteriormente, es factible inmovilizar neuropilin-1 y VEGFR-2 o su molécula o sus moléculas diana para facilitar la separación de los complejos de formas no complejas de una o ambas de las proteínas, así como para adaptarse a la automatización del ensayo. La interacción (por ejemplo, unión de) de neuropilin-1 y VEGFR-2 a una molécula diana se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los agentes 50 reaccionantes. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microtípulo, tubos de ensayo y tubos de microcentrifugación. Según la memoria descriptiva, se puede proporcionar una proteína de fusión que añada un dominio que permita que la proteína se ligue a una matriz. Por ejemplo, neuropilin-1-His marcado se puede adsorber sobre placas de microtípulo de Ni-NTA (Paborsky et al., 1996) o fusiones de neuropilin-1-ProtA adsorbido a IgG, que se combinan después con los lisados celulares (por ej., <sup>35</sup>S marcado) y el compuesto candidato y la mezcla incubada en condiciones que conducen a la formación de complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de incubación, se lavan las placas para retirar cualquier etiqueta no ligada y se determina directamente la matriz inmovilizada y radiomarcada, o se disocian en el sobrenadante después de los complejos. Alternativamente, los 55 complejos se pueden disociar de la matriz, separados por SDS-PAGE y el nivel de proteína neuropilin-1 que se une encontrada en la fracción de perlas es cuantificada a partir del gel usando técnicas electroforéticas clásicas. Otras técnicas para inmovilizar proteína sobre matrices también se pueden usar

en los ensayos de detección sistemática de fármacos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede inmovilizar neuropilin-1 y VEGFR-2 o sus moléculas diana utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Se puede preparar estreptavidina, neuropilin-1 biotinilado y VEGFR-2 a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ej., estuche de biotinilación, 5 Pierce Chemicals, Rockford, IL.) y se inmoviliza en los pozos de placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reaccionan con neuropilin-1 pero que no interfieren con la unión de la proteína a su molécula diana se puede derivatizar a los pozos de la placa, y neuropilin-1 y VEGFR-2 atrapados en los pozos por conjugación de anticuerpo. Como se describió antes, las preparaciones de una proteína que se une a neuropilin-1 y un compuesto candidato 10 se incuban en los pozos de la placa que presentan neuropilin-1 y la cantidad de complejo atrapada en el pozo se puede cuantificar. Los métodos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con la molécula diana de neuropilin-1 y molécula diana de VEGFR-2 o que son 15 reactivos con neuropilin-1 y VEGFR-2 y compiten con la molécula diana útil, así como ensayos ligados a enzima que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada a la molécula diana. Otra técnica para detección sistemática de fármacos que proporciona identificación sistemática de alto rendimiento de compuestos con afinidad de unión adecuada a neuropilin-1 y VEGFR-2 se describe con detalle en "Determination of Amino Acid Sequence Antigenicity" por Geysen HN, patente internacional 20 WO 84/03564, publicada el 13/09/84. En resumen, se sintetizan grandes números de compuestos de ensayo de péptidos pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tales como, alfileres de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos de ensayo de proteínas con fragmentos de neuropilin-1 y/o VEGFR-2 y se lavan. Después se detecta neuropilin-1 ligada por métodos conocidos en la técnica. También se pueden recubrir directamente sobre placas, neuropilin-1 y/o VEGFR-2 purificados para uso en las técnicas de identificación sistemática de fármacos ya mencionadas. Alternativamente, se 25 pueden usar anticuerpos de no neutralización para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido. Esta memoria descriptiva también describe el uso de ensayos de identificación sistemática de fármacos competitivos en que los anticuerpos de neutralización capaces de unirse a neuropilin-1 y/o VEGFR-2 compiten específicamente con un compuesto de ensayo para unir neuropilin-1 y/o VEGFR-2. De esta manera, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de cualquier proteína, que 30 comparta uno o más determinantes antigenicos con neuropilin-1 y VEGFR-2.

Hasta aquí, no se han relacionado mutaciones genéticas del gen de VEGF, dando como resultado interrupción génica, con la enfermedad humana, probablemente debido a que la ausencia de incluso un único alelo de VEGF es embriónicamente letal<sup>1,2,26</sup>. Recientemente, sin embargo, se ha demostrado que la regulación hipódica debilitada de VEGF constituye un factor de riesgo para cardiopatía isquémica<sup>27</sup>. Si esta regulación génica de VEGF anormal - no función - puede predisponer a trastornos patológicos, es sin embargo desconocido. Según la memoria descriptiva, los polimorfismos en la región reguladora del gen de VEGF, que tienen una influencia sobre la regulación hipódica de dicho gen, se pueden detectar y usar diagnósticamente para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar una neuropatía o más específicamente una neuropatía motora cuando se exponen a breves períodos de isquemia. La 35 transcripción inducida por la hipoxia de ARNm de VEGF está mediada, al menos en parte, por la unión de factor 1 inducible de la hipoxia (HIF-1) a un sitio de unión de HIF-1 localizado en el activador de VEGF. Por la detección de polimorfismos que influyen en la regulación hipódica del gen de VEGF 40 también se quiere decir polimorfismos en el factor de transcripción de HIF-1, factores de tipo HIF-1 adicionales, reguladores aguas arriba de HIF-1 y factores de transcripción de tipo HIF-1 que comprenden 45 el sensor de oxígeno, factores adicionales que se unen a la región no traducida 5' y 3' del ARNm de VEGF y en el sitio de entrada ribosómica interna presente en la región no traducida 5' de VEGF (Neufeld G. et al. FASEB J. 13, 9-22, 1999).

Se han desarrollado diversos procedimientos para escanear genes para detectar polimorfismos en genes. En términos de uso actual, muchos de los métodos para escanear o identificar sistemáticamente genes emplean electroforesis en gel en placas o capilar para la etapa de separación y detección en los ensayos. Algunos de estos métodos comprenden polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP, por sus siglas en inglés) (Orita et al., "Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Stranded Conformation Polymorphisms," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2.766 (1989)), 50 electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE, por sus siglas en inglés) (Abrams et al., "Comprehensive Detection of Single Base Changes in Human Genomic DNA Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and a GC Clamp," Genomics 7, 463 (1990)), escisión química de desajuste (CCM, 55 por sus siglas en inglés) (J. A. Saleeba & R. G. H. Cotton, "Chemical Cleavage of Mismatch to Detect

Mutations," Metods in Enzymology 217, 286 (1993)), escisión de desajuste enzimática (EMC, por sus siglas en inglés) (R. Youil et al., "Screening for Mutations by Enzyme Mismatch Cleavage with T4 Endonuclease VII," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 87 (1995)) y polimorfismo de longitud de fragmentos "cleavase" (CFLP, por sus siglas en inglés). Otros métodos más enfocados en el uso de espectrometría

5 de masas como una herramienta de análisis genético. La espectrometría de masas requiere muestras de minuto, proporciona información extremadamente detallada acerca de las moléculas que se están analizando incluyendo alta precisión de masa y se automatiza fácilmente. La patente de EE.UU. 5.965.363 describe análisis de ácidos nucleicos mediante análisis de espectrometría de masas.

Además, según la memoria descriptiva, el Elemento de Respuesta de Hipoxia (HRE) se puede usar para 10 el tratamiento de trastornos de las neuronas o más específicamente trastornos de las neuronas motoras.

VEGF u homólogos, derivados o fragmentos del mismo, se pueden poner bajo control hipóxico realizando corte y empalme de dichos genes en uno o más elementos HRE. Estas construcciones se

15 pueden usar después en terapia génica. Terapia génica significa el tratamiento por el suministro de ácidos nucleicos terapéuticos a las células del paciente. Esto se revisa extensamente en Lever y Goodfellow 1995; Br. Med Bull., 51, 1-242; Culver 1995; Ledley, F. D. 1995. Hum. Gene Ther. 6, 1.129.

Para conseguir terapia génica debe haber un método de suministro de genes a las células del paciente y 20 métodos adicionales para asegurar la producción eficaz que cualquier gen terapéutico. Hay dos propuestas generales para conseguir el suministro génico; estas son suministro no vírico y suministro

génico mediado por virus. El mejor sistema de suministro génico mediado por virus usa retrovirus defectuosos en replicación para introducir de manera estable genes en las células del paciente.

La presente invención se ilustrará ahora por referencia a los siguientes ejemplos que explican realizaciones ventajosas en particular. Sin embargo, se debería observar que estas realizaciones son ilustrativas y no se pueden interpretar como que restringen la invención de ningún modo.

## Ejemplos

### 25 1. Supresión fijada como objetivo del sitio de unión de HIF en el activador de VEGF

La supresión fijada como objetivo en el activador de VEGF del elemento responsable de la hipoxia (HRE), es decir, el sitio de unión para los factores inducibles por hipoxia (HIF)<sup>23</sup>, se consiguió usando

30 fijación como objetivo mediada por Cre/loxP- (Fig. 1) y se confirmó por análisis de tipo Southern. La inducción hipóxica debilitada de VEGF en células madre embrionarias, homocigotos para la supresión de HRE (VEGF<sup>m/m</sup>), se confirmó por análisis de tipo Northern y por mediciones de liberación de VEGF

durante hipoxia de 36 h (19 ± 5 pg/ml después de normoxia frente a 45 ± 6 pg/ml después de hipoxia en células de VEGF<sup>+/+</sup>, n=6, p<0,05; 11 ± 2 pg/ml después de normoxia frente a 13 ± 3 pg/ml después de hipoxia en células de VEGF<sup>m/m</sup>, n=6; p=NS). La supresión del sitio de unión de HIF en el gen de VEGF

35 fue tan eficaz como la supresión del gen de HIF-1 $\alpha$  mismo<sup>28</sup> en la supresión de regulación hacia arriba hipóxica de VEGF (13 ± 4 pg/ml después de normoxia frente a 14 ± 2 pg/ml después de hipoxia en células de HIF-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup>; n=6; p=NS). Se recuperaron embriones de VEGF<sup>m/m</sup> a una frecuencia mendeliana normal. De los ratones VEGF<sup>m/m</sup>, 30% murieron antes de nacer y otro 30% dentro de los primeros días

postnatales, mientras el 40% restante sobrevivió más de 12 meses. Aquí, se describe el fenotipo de los ratones VEGF<sup>m/m</sup> supervivientes; los fenotipos embrionarios y neonatales se indicarán por separado.

### 40 2. Coordinación motora y realización muscular en ratones de VEGF<sup>m/m</sup>

Los ratones VEGF<sup>m/m</sup> parecieron normales hasta 4 meses, pero después de eso desarrollaron síntomas de enfermedad de las neuronas motoras. Llegaron a ser progresivamente menos móviles y presentaron signos de debilidad muscular grave y parálisis parcial de las extremidades. Más allá de los seis meses,

45 los ratones mutantes fueron demasiado débiles para darse la vuelta cuando se ponían sobre su lomo, golpeando sus patas mientras caminaban y tenían una marcha anadina y escoliosis. Cuando se alzaron por sus colas, contrajeron de manera reflexiva sus extremidades al tronco y permanecieron inmóviles, mientras los ratones sin manipular extendieron sus extremidades y luchaban. Los ratones VEGF<sup>m/m</sup>

desarrollaron una piel gruesa sugestiva de aseo disminuido y parecieron delgados a lo largo de sus flancos y patas. Notablemente, cuando se mantuvieron ratones VEGF<sup>m/m</sup> de dos meses asintomáticos en una cámara hipóxica (10% de O<sub>2</sub>), desarrollaron signos neurológicos (dificultad en volverse, contractura refleja cuando se alzaban por la cola) en dos semanas, indicando que la hipoxia aceleraba

50 acusadamente el comienzo y el progreso del fenotipo. Más allá de 4 a 6 meses, los ratones VEGF<sup>m/m</sup> realizaron significativamente menos bien que los compañeros de camada sin manipular en una serie de ensayos<sup>29</sup> de coordinación motora y de realización muscular, incluyendo el ensayo de la rueda de andar,

el ensayo de eje oscilante y ensayo de la huella (distancia entre las almohadillas centrales de la parte trasera de la pata :  $65 \pm 5$  mm para ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $45 \pm 5$  mm para ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p<0,05). Comparado con ratones VEGF<sup>+/+</sup>, los ratones VEGF<sup>m/m</sup> fueron significativamente menos activos por la noche (número de vueltas a la rueda de andar :  $5.400 \pm 600$  para ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $2.700 \pm 400$  para ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p<0,05) y para períodos mucho más cortos (minutos de actividad intensa:  $150 \pm 40$  para ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $14 \pm 6$  para VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p<0,05). En el ensayo de "rejilla" (los ratones se ponen sobre una rejilla, que se vuelve con posterioridad al revés), se cuelgan cinco de siete ratones VEGF<sup>+/+</sup> sobre la rejilla durante al menos un minuto. Dos ratones VEGF<sup>+/+</sup> se mueven tan activamente que se caen de la rejilla después de 23 y 45 segundos. Por el contrario, cuatro de seis ratones VEGF<sup>m/m</sup> de 20 semanas cayeron ya fuera de la rejilla después de 8 segundos, y sólo dos ratones mutantes consiguieron sostenerse en la rejilla no moviéndose en absoluto. Cuando se ensaya su resistencia a la rejilla (los ratones se fuerzan a colgarse con sus extremidades anteriores sobre un hilo horizontal), todos los ratones VEGF<sup>+/+</sup> (n = 7) se agarraron inmediatamente al hilo con sus patas traseras. Por el contrario, los ratones VEGF<sup>m/m</sup> tuvieron dificultades para agarrarse al hilo con sus patas traseras, se colgaron inmóviles y se dejaron caer. Cuando finalmente tuvieron éxito (cinco de seis ratones), los ratones VEGF<sup>m/m</sup> no podían sostenerse en el hilo y se cayeron. Los ratones VEGF<sup>m/m</sup> también realizaron peor en el ensayo de "eje oscilante de rotación", usado para evaluar cuánto tiempo podían estar los ratones en un eje oscilante antes de caerse: todos salvo un ratón VEGF<sup>+/+</sup> (n=8) permanecieron en el eje durante al menos dos minutos (tiempo de análisis), mientras los seis ratones VEGF<sup>m/m</sup> cayeron después de menos de un minuto ( $53 \pm 20$  s). El umbral de dolor, una función sensorial medida como la respuesta lametón de la pata en un ensayo<sup>29</sup> de placa caliente fue normal en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (el tiempo para lamerse las patas delanteras o traseras para ambos genotipos fue  $7 \pm 1$  s y  $10 \pm 2$  s, respectivamente; n=6; p=NS). Sin embargo, los ratones VEGF<sup>+/+</sup> saltaron fuera de la caja después de  $100 \pm 20$  s, mientras los ratones VEGF<sup>m/m</sup> estaban demasiado débiles para escapar durante este periodo.

### 3. Atrofia muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Los músculos esqueléticos en ratones VEGF<sup>m/m</sup> de más de 4 meses mostraron signos de atrofia neurogénica. El peso húmedo de los músculos flexores plantar y posterior fue  $170 \pm 14$  mg y  $92 \pm 19$  mg en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $94 \pm 5$  mg y  $58 \pm 18$  mg en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (n=3; p<0,05). Inicialmente, un número variable de fibras fueron atróficas, pero en animales más viejos, la mayoría de las fibras musculares fueron gravemente atróficas, "anguladas" o "alargadas", características de fibras denervadas. El tamaño de las fibras musculares disminuyó por más del 50% en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (área transversal:  $1.700 \pm 200 \mu\text{m}^2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $700 \pm 100 \mu\text{m}^2$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=8; p<0,05). Se observó comúnmente regeneración de las fibras musculares, identificadas por su núcleo vesicular localizado centralmente, tamaño más pequeño e inmunorreactividad a desmina, en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. La tinción con miosina ATPasa reveló atrofia de todos los tipos de fibra (tipo-I, -IIa y -IIb). En vez del patrón de tablero de ajedrez típico de todos los tipos de fibra en los ratones VEGF<sup>+/+</sup>, se observó agrupación de fibras de un tipo similar, un signo de re-inervación, en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. Los husillos musculares - implicados en el control reflejo -estuvieron presentes en ambos genotipos (número de husillos/sección de cuádriceps:  $3,9 \pm 0,9$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $4,5 \pm 0,8$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=5; p=NS). Cambios miopáticos (disgregación de sarcolema, necrosis de fibras, pérdida de fibras musculares, niveles elevados de creatina cinasa en plasma o fibrosis) no se detectaron en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. La atrofia muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup> no se parecía a las características degenerativas de las miopatías primarias. Por supuesto, no hubo pérdida de fibras musculares y, debido a encogimiento, la densidad de las fibras musculares aumentó en los ratones VEGF<sup>m/m</sup> ( $1.250 \pm 190$  células/mm<sup>2</sup>) cuando se compara con los ratones VEGF<sup>+/+</sup> ( $720 \pm 80$  células/mm<sup>2</sup>; p<0,05). A diferencia de las miopatías, no hubo signos de necrosis de fibras, lisis de sarcómero o rotura del sarcolema (análisis ultraestructural; tinción con tintina y desmina normal; ausencia de albúmina intracelular), infiltración de grasa, fibrosis (tinción con rojo sirio) o calcificación distrófica. Los niveles en plasma de creatina cinasa (liberada en muerte de miocitos) fueron normales en ratones VEGF<sup>m/m</sup> de 8 meses ( $88 \pm 20$  U/ml en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $94 \pm 9$  U/ml en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=5; p=NS). Además, se confirmó atrofia para músculo esquelético y no para cardíaco y no fue producido por trastornos sistémicos. La atrofia se confinó a fibras musculares esqueléticas, puesto que no se vieron afectados cardiomiositos (área transversal:  $130 \pm 10 \mu\text{m}^2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $125 \pm 8 \mu\text{m}^2$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=5; p=NS). Los cambios estructurales en las fibras musculares tampoco fueron debidos a enfermedad infecciosa (informe de salud sin patógenos), trastornos inflamatorios de tejido conjuntivo o vasos sanguíneos (no signos de vasculitis), trastornos metabólicos (niveles de glucosa en plasma normales) o anomalías de

almacenamiento en glucógeno o lípidos.

#### 4. Degeneración de neuronas motoras en ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Se obtuvieron pruebas para un proceso neurodegenerativo por análisis de la médula espinal y los nervios periféricos. La tinción Nissl reveló un número comparable de neuronas en el asta motriz en la médula espinal a edad joven (12 semanas) en ambos genotipos (neuronas con una sección de citoplasma/asta motriz claramente identificable:  $110 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $107 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=3; p=NS), que indica que la supresión del sitio de unión de HIF en el activador de VEGF de por sí no causaba desarrollo neuronal anormal. Sin embargo, más allá de 7 meses, se detectaron menos neuronas en el asta motriz en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (neuronas/sección de asta motriz:  $110 \pm 3$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $98 \pm 4$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=8; p<0,05). La inmunotinción para colina acetiltransferasa (ChAT), un marcador de neuronas motoras, reveló 30% menos de neuronas motoras en ratones VEGF<sup>m/m</sup> que en ratones VEGF<sup>+/+</sup> (ChAT- sección de neuronas/ médula espinal positiva:  $26 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $18 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=4; p=0,05). A diferencia de los ratones VEGF<sup>+/+</sup>, los cuerpos celulares neuronales (pericaria) y los axones proximales de las neuronas motoras en ratones VEGF<sup>m/m</sup> contenían inclusiones de neurofilamento fosforilado (NF<sub>P</sub>), una señal de contraste de enfermedad<sup>31</sup> de neuronas motoras (número de sección neuronas/médula espinal positiva NF<sub>P</sub>: ninguna en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $7 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=6; p<0,05). Estas neuronas motoras positivas NF<sub>P</sub> fueron menores en tamaño ( $250 \pm 20 \mu\text{m}^2$ ) que las neuronas motoras negativas NF<sub>P</sub> en ratones VEGF<sup>+/+</sup> ( $500 \pm 40 \mu\text{m}^2$ ; n= 4, p<0,05). La complejidad y existencia de axones positivos de neurofilamento desfosforilado (NF) y de dendritas positivas de MAP-2 fue comparable en ambos genotipos, incluso a pesar de que muchas neuronas en ratones VEGF<sup>m/m</sup> tendieron a acumular desfosforilado NF en su pericario. Las hinchazones de los axones focales ("esferoides"), también encontradas en pacientes<sup>33,34</sup> de ALS, tuvieron lugar en la médula espinal en ratones VEGF<sup>m/m</sup> pero no en ratones VEGF<sup>+/+</sup> (número de axones hinchados/sección de la médula espinal a las 31 semanas: ninguno en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $17 \pm 1$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7). Los axones hinchados con axoplasma denso se localizaron principalmente en el asta motriz, mientras que la médula espinal posterior o los tractos córticoespinales aparecieron relativamente libres. Una fracción de estos axones hinchados fue inmunorreactiva para sinaptotifina, un signo de transporte axonal debilitado y para ubiquitina, que une proteínas dañadas en condiciones neurodegenerativas tales como ALS<sup>35</sup>. Con frecuencia contenían inclusiones de neurofilamentos, como se reveló por tinción de Bielschowsky e inmunotinción para neurofilamento fosforilado (NF<sub>P</sub>). Comparado con ratones VEGF<sup>+/+</sup>, se observó consistentemente una astrocitosis reactiva importante en la médula espinal de ratones VEGF<sup>m/m</sup> pero sólo de manera característica en el asta motriz. Numerosos astrocitos hipertróficos acumulados en las zonas motriz e intermedia (GFAP-área positiva en materia gris:  $0,8 \pm 0,4 \%$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $7 \pm 1 \%$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=4; p<0,05) y en la materia blanca motriz (GFAP-área positiva en materia blanca:  $8 \pm 3 \%$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $31 \pm 2 \%$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=4; p<0,05).

#### 5. Degeneración de axones en ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Se encontraron signos de degeneración Walleriana y pérdida significativa de axones grandes. Algunas fibras se reemplazaron completamente por los macrófagos activados más numerosos, láminas de mielina de fagocitosis interrumpida (número de células positivas F4/80/mm<sup>2</sup>:  $150 \pm 27$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $340 \pm 20$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=6; p<0,05). La fibrosis endoneurial y la expresión de GFAP, un marcador de células de Schwann denervadas, fueron más importantes en nervios mutantes.

#### 6. Electrofisiología de ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Los registros electromiográficos (EMG) durante el descanso y la contracción muscular revelaron claros signos de denervación y reinervación. La actividad espontánea difusa (potenciales de fibrilación, aislados o salva de ondas agudas positivas), junto con potenciales de acción de la unidad motora polifásica (MUAP, por sus siglas en inglés) de amplitud normal y potenciales satélites inestables fueron observados en el músculo gastrocnemius superficial, los músculos paravertebrales y el diafragma en ratones VEGF<sup>m/m</sup> pero no en VEGF<sup>+/+</sup>. En el diafragma, se puso de manifiesto la denervación por una captación reducida de MUAP durante la inspiración en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (número de MUAP por un estallido inspiratorio:  $124 \pm 20$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $56 \pm 4$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p<0,05). Comparado con el patrón bi o trifásico normal de MUAP en ratones VEGF<sup>+/+</sup>, se detectaron MUAP polifásicas de larga duración de manera regular. La duración de estallidos inspiratorios en ratones VEGF<sup>m/m</sup> permaneció normal ( $2.300 \pm 230 \text{ ms}$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $2.100 \pm 300 \text{ ms}$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7;

p=NS) y la amplitud de la MUAP del diafragma más grande se conservó en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (las MUAP con una amplitud > 200  $\mu$ V por estallidos inspiratorios:  $14 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $11 \pm 4$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS), consistente con un proceso acumulable de denervación y reinervación. Por el contrario a la inervación de placas terminales individuales por un único axón terminal, los axones terminales en los ratones VEGF<sup>m/m</sup> con frecuencia más ramificados que los delgados (presumiblemente no mielinizados) salieron para dos o más placas terminales. Las latencias de potenciales de acción muscular del compuesto (medidas desde el sitio de estimulación al sitio de registro) aumentaron algo en ratones mutantes ( $810 \pm 36$   $\mu$ s en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $1.030 \pm 44$   $\mu$ s en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p<0,05), compatible con la pérdida axonal. La función de los nervios sensoriales pareció electrofisiológicamente normal: las amplitudes de los potenciales de acción de nervios sensoriales (SNAP) fueron  $100 \pm 7$   $\mu$ V en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $120 \pm 14$   $\mu$ V en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (n=5; p=NS) y las velocidades de conducción de los nervios sensoriales fueron  $33 \pm 2$  m/s en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $30 \pm 2$  m/s en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (n=5; p=NS). Estos hallazgos son consistentes con un trastorno neurogénico puramente motor.

## 15 7. Crecimiento vascular normal en ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Debido a la función angiogénica conocida de VEGF, se examinaron en ratones VEGF<sup>m/m</sup> defectos vasculares. Sin embargo, no hubo signos de insuficiencia vascular en el músculo esquelético, nervios periféricos o médula espinal. (i) En el músculo, debido a la atrofia, las densidades capilares fueron mayores en ratones VEGF<sup>m/m</sup> que en VEGF<sup>+/+</sup> (capilares/mm<sup>2</sup>:  $1.200 \pm 150$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $1.740 \pm 150$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=5; p<0,05). La fluoroangiografía<sup>6</sup> del diafragma reveló vascularización comparable en ambos genotipos. (ii) Los nervios esciáticos en ratones VEGF<sup>m/m</sup> tuvieron una densidad similar de vasa nervorum (capilares/mm<sup>2</sup>:  $90 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $100 \pm 7$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS), se perfusionaron normalmente (unidades de perfusión de flujo sanguíneo por láser doppler:  $150 \pm 15$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $190 \pm 12$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=5; p=NS) y contenían una densidad comparable y un patrón de vasos peri y endoneurales sin signos de filtración u obstrucción (fluoroangiografía). La degeneración axonal tuvo lugar en la periferia así como en el centro de nervios VEGF<sup>m/m</sup>, que argumenta contra neuropatía isquémica, que es típicamente más grave en el centro<sup>37</sup>. (iii) En la médula espinal, las densidades capilares fueron comparables en los dos genotipos en la masa gris (capilares/mm<sup>2</sup>:  $380 \pm 17$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $390 \pm 13$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS) y en la masa blanca (capilares/mm<sup>2</sup>:  $170 \pm 12$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $170 \pm 11$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS), con densidades similares en las astas motriz y posterior. Las células endoteliales de ambos genotipos expresaron características de barrera sanguínea - cerebral (tipo I de transportador de glucosa; Glut-1). No se detectaron signos de microangiopatía<sup>38</sup> isquémica o diabética en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. Los signos característicos de neuropatía isquémica (depósitos amiloides, vasculitis inflamatoria) o neuropatía diabética (hialinización de microvasos endoneurales, engrosamiento de membrana basal capilar, salida del pericit, obstrucción del paso debido a hiperplasia/hipertrofia endotelial, neovascularización, infarto nervioso) no se detectaron en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. La debilidad muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup> no fue debida a oxigenación disminuida, ni a niveles reducidos de la hemoglobina portadora de O<sub>2</sub> (perfil hematológico normal). Además, la determinación ecocardiográfica del acortamiento de la fibra circunferencial (VC<sub>F</sub>, una medida de la contractilidad) reveló que los ratones VEGF<sup>m/m</sup> presentaban función cardíaca normal durante las condiciones de referencia ( $15 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $17 \pm 3$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; p=NS) y después de tensión de dobutamina ( $27 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $26 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; p=NS). No hubo tampoco desequilibrio metabólico en ratones mutantes (electrolitos normales; niveles de glucosa en plasma:  $200 \pm 10$  mg/dl en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $180 \pm 16$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS). Después de exposición a hipoxia (10% de O<sub>2</sub>; 24 h), neuronas motoras en ambos genotipos teñidas de manera comparable para el primonidazol marcador de hipoxia. La debilidad muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup> no fue debida a oxigenación disminuida, anemia, desequilibrio metabólico, disfunción cardíaca o desarrollo vascular anormal en otros órganos. Colectivamente, no hubo signos de insuficiencia vascular o isquemia en ratones VEGF<sup>m/m</sup>.

## 50 8. Expresión de VEGF y neuropilin-1 en la médula espinal

La exposición de ratones VEGF<sup>+/+</sup> a hipoxia (10% de O<sub>2</sub>; 24 h) reguló hacia arriba la expresión de VEGF en la médula espinal (pg/mg de proteína:  $15 \pm 1$  en normoxia frente a  $94 \pm 20$  en hipoxia; n=7; p<0,05), pero sólo mínimamente en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (pg/mg de proteína:  $9 \pm 2$  en normoxia frente a  $15 \pm 2$  en hipoxia; n=7; p=0,06). La inducción hipoxica de LDH-A (otro gen inducible de hipoxia) en médulas espinales de VEGF<sup>m/m</sup> no fue anulada (LDH-A/10<sup>3</sup> copias de ARNm de *hprt*:  $230 \pm 100$  durante normoxia frente a  $1.100 \pm 400$  durante hipoxia; n=7; p<0,05), que confirma la especificidad de fijar como objetivo

genes. Se obtuvieron resultados similares en el cerebro. Por el contrario, se redujeron los niveles de VEGF en el músculo esquelético después de hipoxia (pg/mg de proteína:  $40 \pm 10$  en normoxia y  $22 \pm 9$  en hipoxia en células de VEGF<sup>+/+</sup>, n=7, p<0,05 frente a  $52 \pm 6$  en normoxia y  $23 \pm 4$  en hipoxia en ratones VEGF<sup>m/m</sup>, n=7; p<0,05), consistente con observaciones previas de que la expresión de VEGF en la respuesta a hipoxia es específica del tejido <sup>39</sup>.

### 9. Función neurotrófica de VEGF y neuropilin-1

La muerte celular programada de células neuronales se ha implicado en diversos trastornos neurodegenerativos, incluyendo ALS <sup>24, 33</sup>. Una posible función neuroprotectora de VEGF, independientemente de su efecto angiogénico, se estudió usando células NSC34, una estirpe celular <sup>40</sup> de neuronas motoras murinas, en respuesta a diversos estímulos apoptóticos. Los factores de supervivencia de neuronas motoras conocidos (bFGF <sup>41</sup>, TGF $\beta$ -1<sup>42</sup>) protegieron las células NSC34 contra muerte celular programada inducida por TNF- $\alpha$  (Fig. 5a). Las concentraciones fisiológicas de VEGF<sub>165</sub> también protegieron las neuronas motoras contra muerte celular programada inducida por TNF- $\alpha$ , hipoxia, estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y privación de suero. Notablemente, VEGF<sub>121</sub> (que no se une a NP-1 <sup>10</sup>) no rescató neuronas motoras. La implicación de NP-1 se demostró por la neutralización parcial del efecto de supervivencia de VEGF<sub>165</sub> por anticuerpos, bloqueando NP-1 pero no por anticuerpos que bloquen NP-2. El efecto neurotrófico de VEGF<sub>165</sub> también fue parcialmente bloqueado por anticuerpos para VEGFR-2 pero no para VEGFR-1, al tiempo que se consiguió la neutralización completa por la combinación de tanto anticuerpos de VEGFR-2 como de NP-1. Se sabe que NP-1 se une a semaforina III/collapsina-1 (Sema3A), implicada en repulsión y diseño de proyecciones sensoriales y motoras en la médula espinal durante el desarrollo <sup>11-15</sup>. Se sugirió recientemente que Sema3A fomentaba la muerte celular programada de neuronas <sup>43</sup> simpáticas y cerebelares y evitaba la regeneración axonal después de lesión nerviosa en el adulto <sup>44</sup> (y, por lo tanto, podía estar implicada en la retracción de axones y muerte de neuronas motoras en ratones VEGF<sup>m/m</sup>). La exposición de ratones sin manipular a hipoxia (10% de O<sub>2</sub>; 24 h) aumentó ligeramente la expresión de Sema3A en la médula espinal. Las neuronas motoras SCN34 también expresaron Sema3A. Así, las neuronas motoras expresan tanto un factor neuroprotector (VEGF<sub>165</sub>) así como un factor neurorepulsivo/apoptótico (Sema3A), que son antagonistas recíprocos para unión a NP-1.

### 10. Perfusion neuronal anormal en ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Se examinó si la debilidad muscular y la neuropatía fueron causadas por insuficiencia vascular. En el músculo esquelético de VEGF<sup>m/m</sup>, sólo se pudo detectar una reducción en el tamaño del paso capilar, pero las mediciones de presión parcial de oxígeno microvascular revelaron que los capilares más pequeños no causaban isquemia muscular. En gran medida, la relación capilar a músculo fue normal cuando se desarrollaron los primeros signos de atrofia muscular neurogénica, que muestra que la angiogénesis disminuida no era la causa de degeneración de las neuronas motoras. En su lugar, la ligera disminución de esta relación en ratones VEGF<sup>m/m</sup> viejos con atrofia muscular grave de más de siete meses puede ser el resultado de denervación muscular, como se observó en pacientes con atrofia muscular por denervación (Carpenter *et al.* (1.982) *Muscle Nerve* 5, 250). Además, el etiquetado de PCNA fracasó en la detección de diferencias fenotípicas en proliferación endotelial en músculo esquelético a todas las edades y fluoroangiografía (Schratzberger P. *et al.* (2.000) *Nat Med* 6, 405) del diafragma reveló vascularización comparable en ambos genotipos. No se pudieron detectar defectos vasculares estructurales obvios en tejido neuronal pero, sorprendentemente, se redujo la perfusión neuronal por 50% en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. En nervios esciáticos, ambos genotipos presentaron una densidad comparable de vasa nervorum (capilares/mm<sup>2</sup>:  $90 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $100 \pm 7$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS) y diseño de vasos peri y endoneurales sin signos de filtración u obstrucción (fluoroangiografía). En la médula espinal, las densidades capilares fueron comparables en ambos genotipos en la materia gris (capilares/mm<sup>2</sup>:  $380 \pm 17$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $390 \pm 13$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS) y en la materia blanca (capilares/mm<sup>2</sup>:  $170 \pm 12$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $170 \pm 11$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=7; p=NS), con densidades similares en las astas motriz y posterior. Las células endoteliales en ratones VEGF<sup>m/m</sup> expresaron características de barrera sanguínea - cerebral (tipo 1 de transportador de glucosa; Glut-1), pero no se detectaron signos ultraestructurales de microangiopatía diabética (Boulton A. J. *et al.* (1.998) *Med Clin North Am* 82, 909). Debido a la inaccesibilidad y el pequeño tamaño de la médula espinal, se cuantificó el flujo sanguíneo en el cerebro usando microesferas. El flujo sanguíneo cerebral de referencia fue  $0,9 \pm 0,1$  ml/min/g en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $0,5 \pm 0,1$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup> (n=8; p<0,05). Los ratones VEGF<sup>m/m</sup>, sin embargo, fueron capaces de aumentar su flujo sanguíneo cerebral como respuesta a hipercapnia (7,5% de CO<sub>2</sub>), cuando se mide

usando láser doppler (% de aumento de flujo:  $43 \pm 3$  % en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $39 \pm 6$  % en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=10; p=NS). El déficit de perfusión neuronal pareció ser específico ya que la perfusión renal era normal en ratones VEGF<sup>m/m</sup> ( $1,5 \pm 0,2$  ml/min/g en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $1,8 \pm 0,3$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; n=8; p=NS). Se debería aclarar que los signos característicos de la neuropatía diabética (hialinización de micro vasos en dos neurales, engrosamiento de la membrana basal capilar, salida del pericit, obstrucción del paso debido a hiperplasia/hipertrofia endotelial, neovascularización, infarto nervioso) no se detectaron en ratones VEGF<sup>m/m</sup>. Además, la debilidad muscular en ratones VEGF<sup>m/m</sup> no era debida a oxigenación disminuida, ni a niveles reducidos de la hemoglobina portadora de O<sub>2</sub> (perfil hematológico normal). Además, la determinación ecocardiográfica del acortamiento de la fibra circunferencial (VCF, una medida de contractilidad) reveló que los ratones VEGF<sup>m/m</sup> presentaban función cardiaca normal durante las condiciones de referencia ( $15 \pm 2$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $17 \pm 3$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; p=NS) y después de estrés de dobutamina ( $27 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $26 \pm 6$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>; p=NS). Tampoco hubo desequilibrio metabólico en ratones mutantes (electrolitos normales; niveles de glucosa en plasma:  $200 \pm 10$  mg/dl en ratones VEGF<sup>+/+</sup> frente a  $180 \pm 16$  en ratones VEGF<sup>m/m</sup>, n=7; p=NS). En conclusión, la debilidad muscular y la neuropatía en ratones VEGF<sup>m/m</sup> no fueron debidas a niveles de saturación de oxígeno reducidos en la sangre, anemia, desequilibrio metabólico o disfunción cardiaca.

## Materiales y métodos

### 1. Generación de ratones VEGF<sup>m/m</sup>

Se aisló el gen de VEGF de murina (129/SvJ; Genome Systems Inc., St. Louis, Missouri) y se cartografió previamente<sup>26</sup>. La supresión del sitio de unión del HIF-1alfa en el activador de VEGF se consiguió por construcción de un vector fijado como objetivo, pBSK.VEGF<sup>m</sup>, en que se suprimió el elemento de respuesta (HRE) del HIF-1alfa de TACGTGGG de tipo natural, que elimina la unión<sup>23</sup> de HIF-1 alfa. Este vector contenía una casete de neomicina fosfotransferasa (neo), flanqueada por sitios *loxP* para permitir la eliminación posterior por Cre-recombinasa (Fig. 1a). Después de electroporación de pBSK.VEGF<sup>m</sup>, se identificaron clones de células ES recombinadas, que contenían tanto la supresión del sitio de unión de HIF-1 alfa como la neocasete flanqueada por sitios (VEGF<sup>+/neo</sup>) por análisis de tipo Southern y secuenciación (Fig. 1a). Se obtuvieron células ES de VEGF<sup>neo/neo</sup> por cultivo de células ES de VEGF<sup>+/neo</sup> en alta selección de G418 (1.800 µg/ml) y se usaron para obtener células ES de VEGF<sup>m/m</sup> por expresión transitoria de la Cre-recombinasa. Las sondas para el análisis de tipo Southern incluyeron: sonda A (0,7 kb de fragmento *PstI/BstEII*) y sonda B (1 kb de fragmento PCR, multiplicado de ADN genómico, usando como cebador de sentido directo 5'-TTA TCA GAA TTC ATT CCC GAG GCC TGG GGA GAG TTG GG-3' y como cebador de sentido inverso 5'-ATA AAG AAT TCG GAA GGT CAC AGC CCT TCG GTG G-3'). Se indican los digeridos de restricción analítica usados para identificación de clones de células ES recombinantes. Se usaron los clones de ES de VEGF<sup>+/neo</sup> fijados como objetivo para generar ratones químéricos vía agregación con una mórula, que fueron lecho del ensayo con hembras suizas para transmisión de línea germinal. No se obtuvieron crías viables de VEGF<sup>+/neo</sup>, presumiblemente debido a la presencia de la expresión del gen de VEGF inactivado oscilante en vez inactivado neogénico y causó letalidad haploinsuficiente. Sin embargo, cuando se cruzaron ratones químéricos con ratones pgk:Cre, se obtuvieron crías viables de VEGF<sup>+/m</sup>, que se cruzaron para obtener crías de VEGF<sup>m/m</sup> homocigóticas. Se han descrito todos los métodos de cultivo de ES, selección y agregación de diploides<sup>26</sup>.

### 2. Expresión génica, morfología, ensayos de realización motora, torque y electromiografía.

Se realizaron ensayos de tipo Western y Northern, RT-PCR de tiempo real cuantitativa, histología, microscopía electrónica, inmunotinción, solas o junto con hibridación *in situ* y análisis morfométrico como se describió previamente<sup>4,26,56</sup>. Se usaron los siguientes anticuerpos para inmunotinción: Glut-1 (C-20; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA), VEGF (Santa Cruz), desmina (D33; Dako S/A, Glostrup, Dinamarca), ChAT (AB144; Chemicon, Biognost, Wevelgem), NF (SM32; Sternberger Monoclonals Inc., Lutherville, Maryland), NF<sub>P</sub> (SMI 31; Sternberger Monoclonals Inc.), calretinina (Swant, Bellinzona, Suiza), MAP2 (Sigma, Bornem, Bélgica), GFAP (Z0334; Dako S/A), ubiquitina (Z0458; Dako S/A), sinaptofisina (A0010; Dako S/A), F4/80 (A3-1; Serotec Ltd Oxford, R U), hidrocloruro de pimonidazol (Hipoxisonda -1; Natural Pharmacia International Inc., Belmont, MD), BrdU (Beckton Dickinson, Bruselas, Bélgica). Se realizó tinción histoquímica (miosina ATPasa, Nissl, Bielschowsky) usando protocolos clásicos. Todas las tinciones se realizaron sobre secciones de 7 µm de espesor, excepto para ChAT (40 µm), Nissl (15 µm) y miosina ATPasa (15 µm). Se realizó análisis RT-PCR en tiempo real cuantitativo como se describió

previamente<sup>56</sup>. Los niveles de expresión relativos de estos genes se calcularon dividiendo sus señales por las señales obtenidas para el gen *HPRT*. Se realizaron ensayos de coordinación motora y realización muscular (ensayo de la huella, ensayo de colgadura, ensayo de rejilla, ensayo de eje oscilante)<sup>29</sup>, registros electromiográficos en ratones anestesiados<sup>58</sup> y análisis<sup>56</sup> ecocardiográfico, como se describe.

- 5 Se aprobaron todos los procedimientos animales por el comité ético. Para fluoroangiografía<sup>6</sup>, se inyectaron por vía intravenosa 500 µl de dextrano fluorescente al 5% (peso molecular de 2x10<sup>6</sup> dalton; Sigma) en ratones anestesiados con uretano. Después de 5 minutos, se perfusiónaron ratones con 1,9 ml de dextrano fluorescente y 100 µl de adenocor (Sanofi Pharma, Bruselas, Bélgica) y los nervios esciáticos se analizaron inmediatamente por microscopía confocal. Las mediciones por láser doppler de flujo sanguíneo (unidades de perfusión sanguínea) por nervios esciáticos se realizó en ratones anestesiados usando una sonda de flujo de aguja (ADIInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) a intervalos de 1 mm por un segmento nervioso de 5 mm. El análisis de gases sanguíneos, química clínica y perfil hematológico se realizó usando técnicas clásicas en el Hospital de la Universidad (Leuven, Bélgica).
- 10

15 **3. Cultivo celular y análisis de supervivencia.**

Se cultivaron células SCN-34 como se describe<sup>40</sup>. Los anticuerpos de bloqueo para NP-1 y NP-2 fueron un regalo de Dr. A. Kolodkin y los anticuerpos de VEGFR-2 (DC101) del Dr. P. Bohlen, (Imclone). Para estudios de muerte celular programada, se cultivaron células SCN-34 en matraces T75 recubiertos con gelatina al 0,1 % en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal bovino al 10% (Life Technologies, Paisley, R U), 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM, heparina (100 µg/ml) y suplemento de crecimiento celular endotelial (30 µg/ml). Se indujo la muerte celular programada por enriquecimiento de TNF-alfa (50 ng/ml; R&D, Abingdon, R U), retirada de factores de crecimiento (0,1% o 0,5% de suero fetal bovino) o tratamiento con hipoxia (2% de O<sub>2</sub>) o 2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. VEGF<sub>121</sub> y VEGF<sub>165</sub> fueron de R&D. Se cuantificó la muerte celular programada midiendo fragmentos de ADN asociados a histona citoplasmática (mono y oligonucleosomas) usando un inmunoensayo de enzimas fotométrico (Cell Detection ELISA, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). La determinación de niveles de VEGF se realizó usando ELISA comercialmente disponibles (R&D).

**Referencias**

1. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395 (2000).
2. Ferrara, N. & Alitalo, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5, 1359-1364 (1999).
3. van Bruggen, N. et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 104, 1613-1620 (1999).
4. Plate, K.H., Beck, H., Danner, S., Allegrini, P.R. & Wiessner, C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 654-666 (1999).
5. Hayashi, T. et al. Expression of angiogenic factors in rabbit spinal cord after transient ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25, 63-71 (1999).
6. Schratzberger, P. et al. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 6, 405-413 (2000).
7. Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19, 5731-5740 (1999).
8. Sondell, M., Lundborg, G. & Kanje, M. Vascular endothelial growth factor stimulates schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Res* 846, 219-228 (1999).
9. Miao, H.Q. et al. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 146, 233-242 (1999).
10. Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G. & Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745 (1998).
11. Fujisawa, H. & Kitsukawa, T. Receptors for collapsin/semaphorins. *Curr Opin Neurobiol* 8, 587-592 (1998).
12. He, Z. & Tessier-Lavigne, M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751 (1997).
13. Yu, H.H. & Kolodkin, A.L. Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22, 11-14 (1999).

14. Raper, J.A. Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10, 88-94 (2000).
15. Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A.W. & Guthrie, S. Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207 (1997).
16. Knight, J.A. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann Clin Lab Sci* 27, 11-25 (1997).
17. Bromberg, M.B. Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a critical review. *Curr Opin Neurol* 12, 581-588 (1999).
18. Robberecht, W.L. & de Jong, J.M.B.V. Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis: pathogenic mechanism or epiphenomenon? in *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. (eds. Brown, R.H.J., Meininger, V. & Swash, M.) 211-222 (Martin Dunitz Ltd., London, 2000).
19. Green, S.L. & Tolwani, R.J. Animal models for motor neuron disease. *Lab Anim Sci* 49, 480-487 (1999).
20. Beal, M.F. et al. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis [see comments]. *Ann Neurol* 42, 644-654 (1997).
21. Ferrante, R.J. et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69, 2064-2074 (1997).
22. Dor, Y. & Keshet, E. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 7, 289-294 (1997).
23. Semenza, G.L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 59, 47-53 (2000).
24. Kilpatrick, T.J. & Soili-Hanninen, M. Molecular mechanisms regulating motor neuron development and degeneration. *Mol Neurobiol* 19, 205-228 (1999).
25. Pettmann, B. & Henderson, C.E. Neuronal cell death. *Neuron* 20, 633-647 (1998).
26. Carmeliet, P. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vascular endothelial growth factor allele. *Nature* 380, 435-439 (1996).
27. Schultz, A. et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 100, 547-552 (1999).
28. Carmeliet, P. et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485-490 (1998).

29. Tilson, H.A. & Mitchell, C.L. Neurobehavioral techniques to assess the effects of chemicals on the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24, 425-450 (1984).
30. Hamelmann, E. *et al.* Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 766-775 (1997).
31. Lee, M.K. & Cleveland, D.W. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19, 187-217 (1996).
32. Dal Canto, M.C. & Gurney, M.E. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145, 1271-1279 (1994).
33. Martin, L.J., Price, A.C., Kaiser, A., Shaikh, A.Y. & Liu, Z. Mechanisms for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and in models of motor neuron death. *Int J Mol Med* 5, 3-13 (2000).
34. Bernstein, M. & Lichtman, J.W. Axonal atrophy: the retraction reaction. *Curr Opin Neurobiol* 9, 364-370 (1999).
35. Lowe, J., Mayer, R.J. & Landon, M. Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol* 3, 55-65 (1993).
36. Kawamura, Y., Okazaki, H., O'Brien, P.C. & Dych, P.J. Lumbar motoneurons of man: I) number and diameter histogram of alpha and gamma axons of ventral root. *J Neuropathol Exp Neurol* 36, 853-860 (1977).
37. Mackenzie, M.L. & Allt, G. The vasa nervorum: microcorrosion casts for scanning electron microscopy. *Acta Anat* 136, 319-324 (1989).
38. Boulton, A.J. & Malik, R.A. Diabetic neuropathy. *Med Clin North Am* 82, 909-929 (1998).

39. Marti, H.H. & Risau, W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15809-15814 (1998).
40. Cashman, N.R. et al. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* 194, 209-221 (1992).
41. Grothe, C. & Wewetzer, K. Fibroblast growth factor and its implications for developing and regenerating neurons. *Int J Dev Biol* 40, 403-410 (1996).
42. Iwasaki, Y., Shiojima, T., Tagaya, N., Kobayashi, T. & Kinoshita, M. Effect of transforming growth factor beta 1 on spinal motor neurons after axotomy. *J Neurol Sci* 147, 9-12 (1997).
43. Shirvan, A. et al. Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *J Neurochem* 73, 961-971 (1999).
44. Pasterkamp, R.J., Giger, R.J. & Verhaagen, J. Regulation of semaphorin III/collapsin-1 gene expression during peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 153, 313-327 (1998).
45. Gerber, H.P. et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159 (1999).
46. Benjamin, L.E., Hemo, I. & Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF- B and VEGF. *Development* 125, 1591-1598 (1998).
47. Dyck, P.J. & Giannini, C. Pathologic alterations in the diabetic neuropathies of humans: a review. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 1181-1193 (1996).
48. Nohl, H., Staniak, K. & Gille, L. Imbalance of oxygen activation and energy metabolism as a consequence or mediator of aging. *Exp Gerontol* 32, 485-500 (1997).
49. Copin, J.C. et al. Oxygen deprivation but not a combination of oxygen, glucose, and serum deprivation induces DNA degradation in mouse cortical neurons in vitro: attenuation by transgenic overexpression of CuZn-superoxide dismutase. *J Neurotrauma* 13, 233-244 (1996).
50. Ochiai-Kanai, R., Hasegawa, K., Takeuchi, Y., Yoshioka, H. & Sawada, T. Immunohistochemical nitrotyrosine distribution in neonatal rat cerebrocortical slices during and after hypoxia. *Brain Res* 847, 59-70 (1999).
51. Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. & Jelkmann, W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 94, 1561-1567 (1999).

52. Yun, J.K., McCormick, T.S., Judware, R. & Lapetina, E.G. Cellular adaptive responses to low oxygen tension: apoptosis and resistance. *Neurochem Res* 22, 517-521 (1997).
53. Lorez, H., Keller, F., Ruess, G. & Otten, U. Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci Lett* 98, 339-344 (1989).
54. Klempert, N.D. *et al.* Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 13, 93-101 (1992).
55. Takahashi, T. *et al.* Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69 (1999).
56. Carmeliet, P. *et al.* Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms
57. Gorselink, M. *et al.* Accurate measurements of in situ isometric contractile properties of hind limb plantar and dorsal flexor muscle complex of intact mice. *Eur. J. Physiol.* 439, 665-670 (2000).
58. Kennel, P.F. *et al.* Electromyographical and motor performance studies in the pmn mouse model of neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 3, 137-147 (1996).
59. de Lima, A.D., Merten, M.D. & Voigt, T. Neuritic differentiation and synaptogenesis in serum-free neuronal cultures of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 382, 230-246 (1997).
60. de Hoop, M.J., Meyn, L. & Dotti, C.G. Culturing hippocampal neurons and astrocytes from fetal brain. *Cell Biology: a laboratory handbook.* , Vol. 1 154-163 (Academic Press, 1998).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnol

<120> USO DE VEGF Y HOMÓLOGOS PARA TRATAR TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

<130> VIB-024-EP-DIV1

<140>

<141>

<150> 00201325.8

<151> 2000-04-12

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de sentido directo

<400> 1

ttatcagaat tcattcccgaa ggcctgggaa gagttggg

38

<210> 2

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: cebador de sentido inverso

<400> 2

ataaagaatt cggaaggtaa cagcccttcg gtgg

34

### REIVINDICACIONES

1. Uso de la isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para la fabricación de un medicamento para tratar cualquiera de: demencia del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos de las neuronas motoras.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos trastornos de las neuronas motoras son esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se suministra como un ácido nucleico que codifica VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub>.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicho ácido nucleico está contenido en un vector de expresión apropiado.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicho vector es un plásmido, un vector adenovírico, un vector adenovírico modificado, un vector retrovírico o un liposoma.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se administra por una ruta parenteral.
- 15 7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicha ruta parenteral es intratecal.
8. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso para tratar cualquiera de: demencia del lóbulo frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y trastornos de las neuronas motoras.
- 20 9. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según la reivindicación 8, en el que dichos trastornos de las neuronas motoras son esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades de tipo esclerosis lateral amiotrófica.
10. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se suministra como un ácido nucleico que codifica VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub>.
- 25 11. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según la reivindicación 10, en el que dicho ácido nucleico está contenido en un vector de expresión apropiado.
12. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según la reivindicación 11, en el que dicho vector es un plásmido, un vector adenovírico, un vector adenovírico modificado, un vector retrovírico o un liposoma.
- 30 13. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que dicho VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> se administra por una ruta parenteral.
14. La isoforma VEGF<sub>145</sub> o VEGF<sub>189</sub> de VEGF-A para uso según la reivindicación 13, en el que dicha ruta parenteral es intratecal.

Figura 1

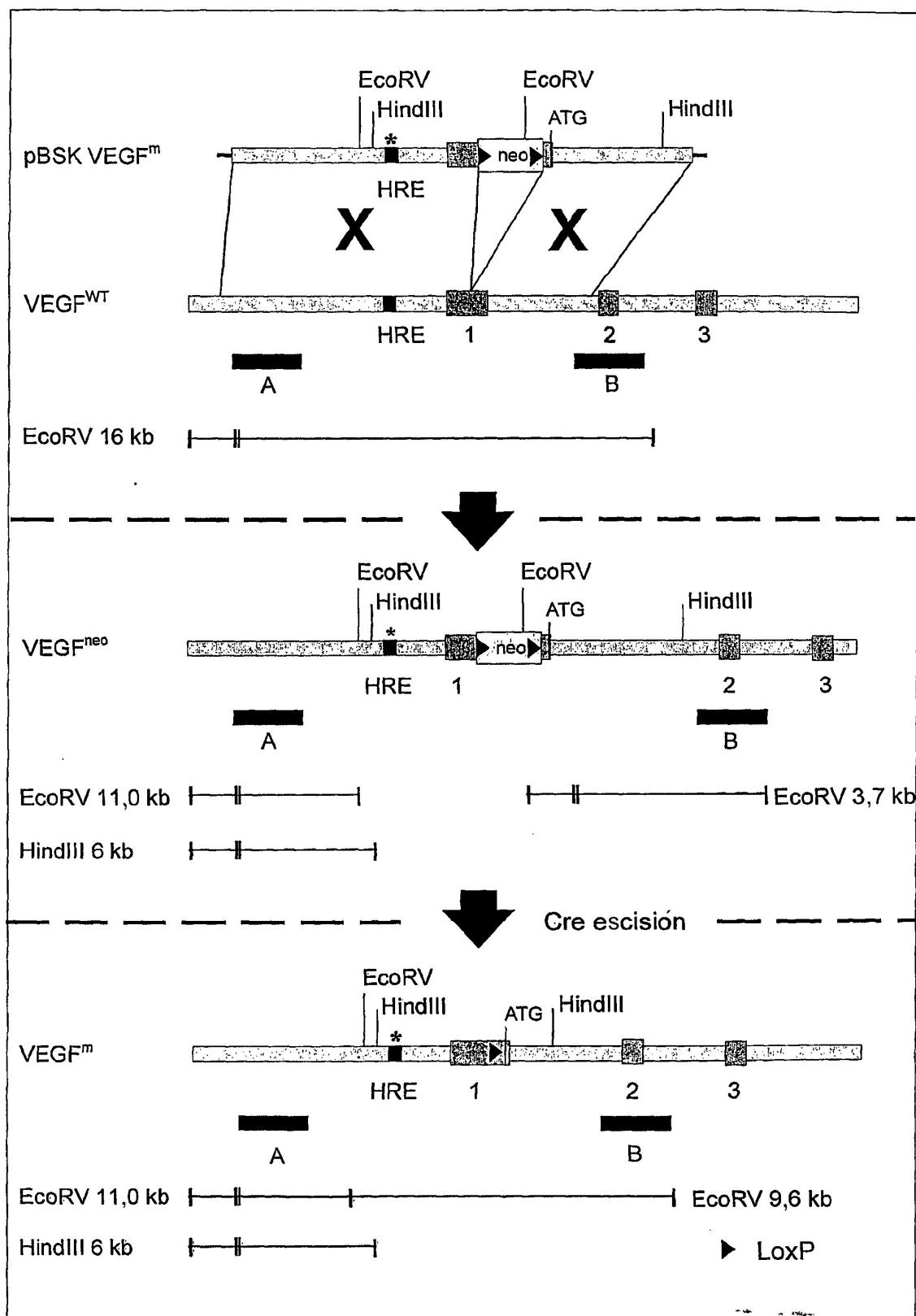


Figura 2

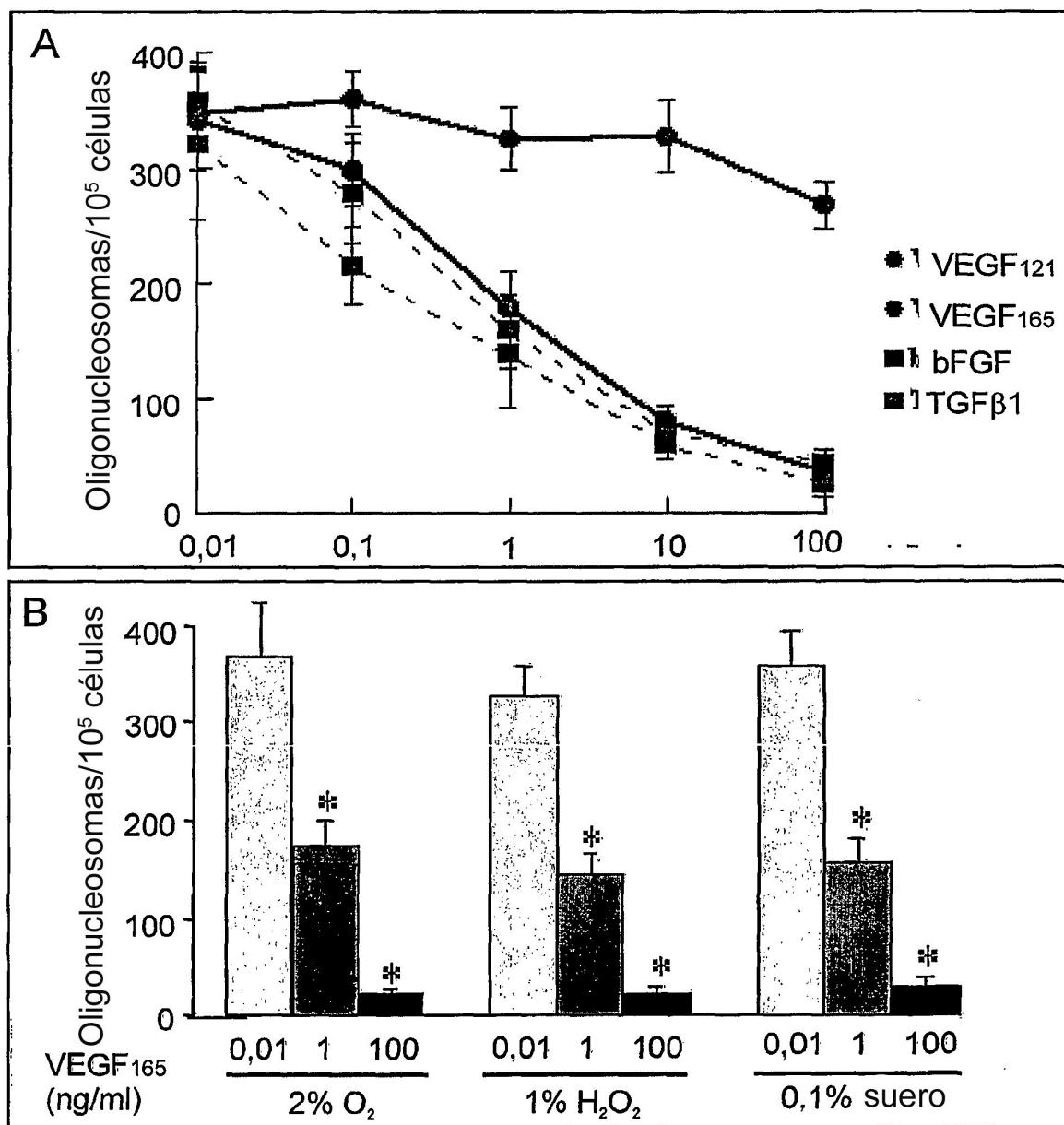


Figura 2

