

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 243**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2006 E 06785518 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 1904113**

54 Título: **Compuesto neuroprotector eficaz**

30 Prioridad:

23.06.2005 US 595342 P

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

03.03.2016

73 Titular/es:

**TISSUEGENE, INC. (100.0%)
209 PERRY PARKWAY, SUITE 13
GAITHERSBURG, MD 20877, US**

72 Inventor/es:

**LEE, KWAN HEE;
LEE, DUK KEUN;
YI, YOUNGSUK;
NOH, MOON JONG y
KIM, HYOUNG CHUN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 562 243 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

Compuesto neuroprotector eficaz

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

La presente invención se refiere a prevención de degeneración nerviosa.

10

2. Antecedentes Generales y Estado de la Técnica

En la técnica existe una necesidad de un compuesto neuroprotector terapéutico molecular para prevenir la degradación del sistema neurológico y células neuronales.

15

El documento WO 2006/002202 A divulga células que expresan BMP-2 y BMP-9 para uso en la regeneración nerviosa, que es diferente a la disminución de la degeneración de nervios.

El documento WO 02/07749 A divulga una composición para estimular el crecimiento de células nerviosas. Se describen conductos poliméricos de crecimiento nervioso, pero no para disminuir la degeneración del daño nervioso.

20

NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 40, nº. 4, páginas 315 - 323, agosto de 2001, (PARK *et al.*) divulga inyección de células de médula ósea transducidas con gen del GDNF, en que se observa que las células se desplazan al cerebro para su actuación.

El documento WO 01/17547 A divulga composiciones de BMP-9 que actúan como un factor de diferenciación para el fenotipo colinérgico de neuronas del SNC.

25

El documento WO 95/05846 A describe un método para prevenir la degeneración de un nervio por administración de una composición que comprende una proteína BMP.

El documento WO 03/082302 A se refiere a irradiación de células que expresan BMP antes de su trasplante.

30

The Lancet Neurology, Vol. 1, pp. 51-57, mayo de 2002, (Tuscynski) divulga terapia génica de NGF, pero no para uso en el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa o epilepsia.

El documento WO 02/07774 A divulga terapia génica de neurotrofina *in vivo*, pero no para tratar enfermedades como epilepsia o enfermedad neurodegenerativa.

35

Lo mismo se aplica para el documento WO03/056925 A, que se refiere a terapia génica de BDNF, NT-4/5 y NT-3 *in vivo*. Human Gene Therapy 13: 1263-1280, julio de 2002, (Harrington *et al.*), simplemente divulga el uso de células como vehículos.

40 Sumario de la invención

La invención se refiere a una población de células cultivadas transfectadas *in vitro* con un vector viral o plásmido recombinante generado que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína morfogenética ósea, BMP, unida de forma operativa a un promotor.

45

En particular, como se hace a modo de ejemplo en la presente solicitud, las células son neuroprotectoras con respecto a los efectos citotóxicos de amfetamina o ácido kaínico.

La célula puede ser una célula de tejido conjuntivo, tal como una célula de fibroblasto. La célula también puede ser una célula nerviosa, tal como célula glial. La célula se puede irradiar. El vector puede ser un vector viral. El vector viral puede ser un vector retroviral, vector viral adenoasociado, vector adenoviral, o vector viral del herpes.

50

La invención se refiere a prevenir la degeneración del nervio que comprende administrar, a un área cerca de un nervio lesionado, una población de células que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína BMP. La proteína BMP puede ser BMP-2, BMP-3, BMP-4 o BMP-9.

55

Además, la población de células se puede almacenar antes del trasplante tal como en DMSO al 10 % en nitrógeno líquido.

60 Breve descripción de las figuras

La presente invención se llegará a comprender de forma más completa a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación en el presente documento, y en las figuras adjuntas que se proporcionan solamente a modo de ilustración, y por lo tanto no son limitantes de la presente invención, y donde;

65

La FIGURA 1 muestra citotoxicidad inducida por metanfetamina (MAP) en células 3T3-hBMP. La caja cerrada

muestra células 3T3, 3T3-PMT-BMP3, o células 3T3-hBMP4 sin tratamiento alguno con MAP. Las cajas sombreadas muestran tratamiento con MAP 1 mM.

Las FIGURAS 2A-2F muestran fotografías microscópicas de células que corresponden a las observadas en la FIGURA 1. Las FIGS. 2A, 2B y 2C corresponden a las células 3T3 de control, 3T3-PMT-BMP3, o células 3T3-hBMP4 que no se han tratado con MAP. Las FIGS. 2D, 2E y 2F corresponden a las células 3T3 de control, 3T3-PMT-BMP3, o células 3T3-hBMP4, respectivamente, que se han tratado con MAP 1 mM como se ha indicado anteriormente en la FIG. 1.

La FIGURA 3 muestra efectos de NIH3T3-BMP4 en la pérdida neural inducida por kainita (por vía I.C.V. de 0,1 µg/cabeza) en ratones. Cada valor es la media +/- E.T.M. de 4 animales. *p < 0,001 con respecto a con, n°. de p < 0,01 con respecto a Sal + KA o 3T3+KA (ANOVA con ensayo de DMR).

Las FIGURAS 4A-4D muestran fotografías microscópicas de pérdida neural como resultado del tratamiento de ratones con kainita. La FIG. 4A muestra la sección CA3 de hipocampo de animales tratados con solución Salina de Control; la FIG. 4B muestra la sección CA3 de animales tratados con solución Salina + Kainato; la FIG. 4C muestra la sección CA3 de animales tratados solo con NIH3T3 antes de inyectarles Kainato; y la FIG. 4D muestra la sección CA3 de animales tratados con células NIH3T3 que expresan BMP4 recombinante antes de inyectarles Kainato.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

En la presente solicitud, "un" y "uno(a)" se usan para hacer referencia tanto a uno como a una pluralidad de objetos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "célula de tejido conjuntivo" o "célula de un tejido conjuntivo" incluyen células que se encuentran en el tejido conjuntivo, tales como fibroblastos, células de cartílago (condrocitos), y células óseas (osteoblastos/ osteocitos), que secretan matriz extracelular de colágeno, así como células adiposas (adipocitos) y células de músculo liso. Preferentemente, las células de tejido conjuntivo son fibroblastos, células de cartílago, y células óseas. Más preferentemente, las células de tejido conjuntivo son células de fibroblastos. Las células de tejido conjuntivo también incluyen células mesenquimales, que también se conocen como fibroblastos inmaduros. Se reconocerá que la invención se puede poner en práctica con una mezcla de cultivo de células de tejido conjuntivo, así como células de un solo tipo.

Como se usa en el presente documento, inyección de células "cerca" de un nervio lesionado o sistema neurológico hace referencia a esa área que está lo suficientemente cerca del sitio de inyección y el área de la lesión como para producir un resultado eficaz de prevención de la degeneración de las células nerviosas lesionadas en el sitio lesionado. Por lo tanto, se permite la inyección de células cerca de un nervio lesionado incluidas en el sitio de la lesión o en cualquier lugar lo suficientemente cerca para que las células inyectadas expresen el polipéptido y los polipéptidos eficaces para que produzca de forma directa o de forma indirecta el resultado de prevención de la degeneración del nervio. Para nervios periféricos, en especial en lesiones de la médula espinal, la inyección se puede hacer "corriente arriba" del sitio de la lesión ya que las células tienden a filtrarse en el sitio de la lesión.

Como se usa en el presente documento, un "promotor" puede ser cualquier secuencia de ADN que sea activa, y que controle la transcripción en una célula eucariota. El promotor puede ser activo en cualquier célula o en células tanto eucariotas como procariontes. Preferentemente, el promotor es activo en células de mamífero. El promotor se puede expresar o inducir de forma constitutiva. Preferentemente, el promotor es inducible. Preferentemente, el promotor es inducible mediante un estímulo externo. Más preferentemente, el promotor es inducible por hormonas o metales. Todavía más preferentemente, el promotor es inducible por metales pesados. Más preferentemente, el promotor es un promotor del gen de la metalotioneína. De forma análoga, algunos "elementos potenciadores", que también controlan la transcripción, se pueden insertar en la construcción de vector de ADN, y usar con la construcción de la presente invención para potenciar la expresión del gen de interés.

Como se usa en el presente documento, "marcador seleccionable" incluye un producto genético que se expresa por una célula que mantiene de forma estable el ADN introducido, y hace que la célula exprese un fenotipo alterado tal como transformación morfológica, o una actividad enzimática. El aislamiento de células que expresan un gen transfectado se consigue mediante la introducción, en las mismas células, de un segundo gen que codifica un marcador seleccionable, tal como uno que tiene una actividad enzimática que confiere resistencia a un antibiótico u otro fármaco. Algunos ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, pero no se limitan a, timidina quinasa, dihidrofolato reductasa, aminoglucósido fosfotransferasa, que confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos tales como kanamicina, neomicina y geneticina, higromicina B fosfotransferasa, xantina-guanina fosforribosil transferasa, CAD (una proteína individual que posee las primeras tres actividades enzimáticas de biosíntesis de uridina *de novo* - carbamil fosfato sintetasa, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa), adenosina desaminasa, y asparagina sintetasa (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, Capítulo 16. 1989).

Como se usa en el presente documento, la "superfamilia del factor β del factor de crecimiento transformante (TGF-β)" incluye un grupo de proteínas relacionadas de forma estructural, que influye en una amplia gama de procesos de diferenciación durante el desarrollo embrionario. La familia incluye, sustancia de inhibición Mülleriana (MIS), que se necesita para el desarrollo normal del sexo masculino (Behringer, *et al.*, Nature, 345: 167, 1990), producto de gen decapentaplégico de *Drosophila* (DPP), que se necesita para la formación del eje dorsal-ventral y morfogénesis de

los discos imaginales (Padgett, *et al.*, Nature, 325: 81-84, 1987), el producto del gen Vg-1 de *Xenopus*, que se localiza en el polo vegetal de huevos (Weeks, *et al.*, Cell, 51: 861-867, 1987), las activinas (Mason, *et al.*, Biochem, Biophys. Res. Commun., 135: 957-964, 1986), que pueden inducir la formación de mesodermo y estructuras anteriores en embriones de *Xenopus* (Thomsen, *et al.*, Cell, 63: 485, 1990), y las proteínas morfogenéticas óseas (BMP, tales como BMP-2, 3, 4, 5, 6 y 7, osteogenina, OP-1) que pueden inducir formación de cartílago y hueso *de novo* (Sampath, *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 13198, 1990). Los productos genéticos del TGF- β pueden influir en una diversidad de procesos de diferenciación, que incluyen adipogénesis, miogénesis, condrogénesis, hematopoyesis, y diferenciación de células epiteliales (para una revisión, véase Massague, Cell 49: 437, 1987).

Las proteínas de la familia del TGF- β se sintetizan inicialmente como una proteína precursora grande, que posteriormente experimenta escisión proteolítica en un grupo de restos básicos de aproximadamente 110-140 aminoácidos desde el extremo C-terminal. Todas las regiones del extremo C-terminal de las proteínas se relacionan estructuralmente y los diferentes miembros de la familia se pueden clasificar en distintos subgrupos basándose en el alcance de su homología. Aunque las homologías dentro de subgrupos en particular varían de un 70 % a un 90 % de la identidad de la secuencia del aminoácido, las homologías entre subgrupos son significativamente menores, variando por lo general de un 20 % a un 50 %. En cada caso, parece que la especie activa es un dímero unido por disulfuro de fragmentos C-terminales. Para la mayoría de los miembros de la familia que se han estudiado, se ha encontrado que las especies homodiméricas son biológicamente activas, pero para otros miembros de la familia, como las inhibinas (Ung, *et al.*, Nature, 321: 779, 1986) y los TGF- β (Cheifetz, *et al.*, Cell, 48: 409, 1987), también se han detectado heterodímeros, y parece que estos tienen diferentes propiedades biológicas que los respectivos homodímeros.

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

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

Se entiende que en la descripción de una proteína por su nombre designado como anteriormente, la proteína no se limita a la secuencia exacta del tipo silvestre. Algunas variaciones en la secuencia de la proteína son aceptables de modo que otra secuencia de polipéptidos, que presenta básicamente la misma actividad que la proteína en términos de función se incluye en la misma.

Tejido Nervioso

El tejido nervioso se origina en el ectodermo embrionario bajo la influencia del notocordio. El ectodermo se induce para formar una placa neural engrosada que a continuación se diferencia y con el tiempo los extremos fusionan para formar el tubo neural a partir del que se origina el sistema nervioso central. El sistema nervioso central consiste en el cerebro, nervios craneales y médula espinal. El sistema nervioso periférico se origina a partir de células cercanas al surco neural denominado la cresta neural.

El tejido nervioso se distribuye por todo el organismo en una red compleja de comunicaciones integradas. Las células nerviosas (neuronas) se comunican con otras neuronas a través de circuitos que varían desde circuitos muy sencillos a circuitos de orden más elevado muy complejos. Las neuronas producen la transmisión e integración real del mensaje mientras que otras células del tejido nervioso, denominadas células gliales, ayudan a las neuronas mediante soporte, protección, defensa y nutrición de las neuronas. En el cerebro hay aproximadamente 10 veces más células gliales que neuronas. Las células gliales crean el microentorno necesario para la función neural y en ocasiones ayudan en el procesamiento y actividad neurales. Las neuronas son células excitables. Esto significa que cuando se estimulan de forma apropiada, se puede iniciar una acción potencial que se puede propagar a la membrana celular para transmitir información a fibras distantes. Las neuronas son unidades funcionales independientes responsables de la recepción, transmisión y procesamiento de los estímulos.

En general, las neuronas constan de tres partes; el cuerpo celular, donde se encuentran el núcleo y los orgánulos celulares; dendritas, que son protuberancias que se extienden desde el cuerpo celular que reciben estímulos del entorno o de otras neuronas; y el axón, que es una protuberancia única larga que se extiende desde el cuerpo celular para la transmisión de impulsos nerviosos a otras células. El axón por lo general se ramifica en su extremo distal y cada rama que termina en otra célula tiene un extremo bulboso. La interacción del extremo bulboso con la célula adyacente forma una estructura denominada sinapsis. Las sinapsis se especializan para recibir una señal y convertirla en un potencial eléctrico.

La mayoría de las neuronas que se encuentran en el cuerpo humano son multipolares, lo que significa que tienen más de dos protuberancias celulares siendo un axón solamente una y siendo dendritas las protuberancias restantes. Las neuronas bipolares de la retina o de la mucosa olfativa tienen una protuberancia dendrítica y un axón que surge del cuerpo celular. Las neuronas pseudounipolares que se encuentran en los ganglios de la médula espinal permiten

que los impulsos sensoriales recogidos por las dendritas se desplacen directamente al axón sin pasar por el cuerpo celular. Las neuronas también se pueden clasificar de acuerdo con su función. Las neuronas sensoriales están implicadas en la recepción y transmisión de estímulos sensoriales. Las neuronas motoras envían impulsos para el control de los músculos y las glándulas. Otras neuronas, interneuronas, actúan como mediadores entre las neuronas como parte de redes funcionales.

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

Algunas neuronas están envueltas en un material aislante denominado mielina. Este material rico en lípidos está formado por células gliales: células de Schwann en el sistema nervioso periférico y por oligodendrocitos en el sistema nervioso central. El aislamiento permite la conducción más rápida del nervio por reducción del área de superficie de la membrana que se debe despolarizar. En las neuronas mielinizadas, el impulso nervioso salta de un segmento desmielinizado a otro por toda la longitud del axón. La vaina de mielina y la falta de cuerpos de células neuronales dentro del tejido los que hacen que algún tejido nervioso parezca de color blanco al igual que en los nervios periféricos grandes y en la sustancia blanca del cerebro. Otras células gliales, denominadas astrocitos, participan en integridad estructural, nutrición neuronal y mantenimiento del microambiente del tejido nervioso. Los astrocitos se encuentran en comunicación directa entre sí a través de uniones comunicantes y pueden afectar a la supervivencia de las neuronas en su cuidado por la regulación del entorno local. Las células ependimarias revisten la médula espinal y los ventrículos del cerebro y secretan el líquido cefalorraquídeo. Otras células gliales pequeñas, denominadas microglía, son células fagocíticas que están implicadas en inflamación y reparación en el sistema nervioso central adulto.

El tejido nervioso es un tejido excitable que es capaz de recibir y transmitir impulsos eléctricos. El tipo de célula central se llama neurona. Por lo general, las neuronas tienen un cuerpo celular, dendritas que reciben entradas, y un axón que transmite potenciales eléctricos.

Las neuronas se pueden clasificar como neuronas sensoriales, motoras, secretoras o de asociación. A menudo se clasifican por velocidad de conducción, diámetro y la presencia o ausencia de aislamiento de lipoproteína especializada denominada mielina. Las fibras de Tipo A son fibras mielinizadas y pueden conducir impulsos a 12 - 120 m/seg. Las fibras de Tipo B también son fibras mielinizadas pero solamente transmiten impulsos a 3-5 m/seg. Las fibras de tipo C son fibras desmielinizadas, con diámetro pequeño y muy lentas (2,5 m/seg). Un ejemplo de una fibra de Tipo A es una neurona motora que inerva el gastrocnemio. Un ejemplo de una fibra de Tipo B es una neurona eferente preganglionar autónoma y un ejemplo de una fibra de Tipo C lenta es una neurona sensorial que lleva información sobre el dolor difuso.

Las neuronas sensoriales se adaptan para detectar ciertos tipos de información del entorno. Estas incluyen mecanorreceptores que perciben cosas tales como presión o estiramiento, termorreceptores, fotorreceptores de la retina, y quimiorreceptores tales como las papilas gustativas o las del olfato. Por lo general, las neuronas de asociación o interneuronas se encuentran en la médula espinal y el cerebro donde conectan las neuronas aferentes sensoriales con las neuronas motoras o secretoras eferentes.

Las neuronas se comunican entre sí a través de una estructura denominada sinapsis. Un axón termina en uno o más botones terminales que contienen numerosas vesículas pequeñas. Estas vesículas pequeñas están llenas de sustancias químicas denominadas neurotransmisores. La acetilcolina es el neurotransmisor que se encuentra más a menudo en la sinapsis aunque dependiendo de la neurona se pueden usar otros agentes químicos tales como norepinefrina, serotonina y GABA. Cuando un impulso se desplaza por el axón y alcanza los botones terminales, las vesículas se fusionan con la membrana neuronal y se libera el neurotransmisor. Los agentes químicos se difunden a través de la hendidura sináptica estrecha a receptores específicos para el agente químico en la membrana postsináptica de la neurona receptora.

La interacción del neurotransmisor con el receptor provoca un cambio en el potencial de la membrana que puede inducir un nuevo impulso de la neurona postsináptica. La enzima acetilcolinesterasa está presente en la sinapsis para descomponer la acetilcolina y terminar el estímulo. Otros neurotransmisores o bien se descomponen o realizan una copia de respaldo en la neurona presináptica para terminar el estímulo.

En el sistema nervioso central muchas neuronas pueden converger en una sola neurona. Cuando cada una de las neuronas presinápticas libera neurotransmisor en su sinapsis con la neurona postsináptica, se producen potenciales de membrana locales que se integran y se suman. Estas señales entrantes pueden ser de inhibición o de

estimulación. Si el potencial de membrana sumada resultante alcanza el umbral mínimo para esa neurona, entonces se iniciará un potencial de acción.

5 Los potenciales de acción se desplazan en una dirección alejándose del cuerpo celular mediante conducción saltatoria. Las neuronas más rápidas se cubren en las vainas de mielina colocadas en segmentos discretos separados por nódulos de membrana neural desnuda denominados nódulos de Ranvier. En la conducción saltatoria, el potencial eléctrico salta de lóbulo a nódulo, reduciendo de este modo el área de la membrana implicada en la conducción del potencial de acción y aceleración de la conducción.

10 Las células no neuronales que se encuentran en el sistema nervioso se denominan células gliales. Los astrocitos son los más numerosos y proporcionan soporte y nutrición a las neuronas. La microglía son células fagocíticas pequeñas específicas del tejido neural. Las células que recubren el sistema ventricular y el canal central de la médula espinal y producen líquido cefalorraquídeo se denominan células ependimarias. En el sistema nervioso central, un oligodendrocito forma segmentos de las vainas de mielina de múltiples neuronas. En el sistema nervioso
15 periférico, cada segmento de la vaina de mielina está formado por una sola célula de Schwann.

Sistema nervioso central

20 El sistema nervioso central (SNC) consiste en el cerebro y la médula espinal. Las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) protegen y nutren el SNC además de la protección proporcionada por la estructura ósea del cráneo y las vértebras. El líquido cefalorraquídeo se encuentra en el espacio subaracnoideo, canal central de la columna vertebral y los ventrículos del cerebro. La piamadre es la capa más interna y es adherente al tejido nervioso. Entre la piamadre y la duramadre se encuentra la capa aracnoides. La duramadre fibrosa dura se encuentra justo debajo del cráneo.

25 El cerebro se puede dividir en 3 áreas básicas del prosencéfalo, mesencéfalo y tronco cerebral. El prosencéfalo incluye el tálamo, hipotálamo, ganglios basales, y cerebro. El cerebro es responsable del pensamiento consciente, interpretación de las sensaciones, todos los movimientos voluntarios, facultades mentales y las emociones.

30 El tejido cerebral se puede dividir en áreas estructurales y funcionales. La superficie del cerebro tiene convoluciones en giros (crestas) y surcos (hendiduras). Las áreas sensoriales y motoras corticales se pueden asignar al giro post central y el surco central, respectivamente. El área sensorial recibe información sensorial desde el lado opuesto del cuerpo que se proyecta después del procesamiento talámico. Las partes del cuerpo con más terminaciones nerviosas sensoriales se representan por área sensorial más cortical. El área motora controla los movimientos
35 musculares voluntarios de las partes del cuerpo contralaterales, pero las áreas de asociación son importantes para el inicio del movimiento.

40 El cerebro es la parte más grande del encéfalo y se divide en dos hemisferios, derecho e izquierdo, que tiene varios lóbulos. El lóbulo frontal contiene el área motora, área del lenguaje de Broca, áreas de asociación, y funciones de inteligencia y comportamiento. El lóbulo parietal contiene áreas sensoriales y función en la sensación y el oído. Las áreas de asociación visual primaria se encuentran en el lóbulo occipital y el lóbulo temporal contiene áreas de asociación auditiva, olfato y almacenamiento de memoria.

45 El tálamo se encuentra entre la corteza cerebral y el tronco cerebral. Toda la información sensorial, excepto el sentido del olfato se procesa aquí antes de ser proyectada a otras áreas del encéfalo. El hipotálamo se sitúa debajo del tálamo y es el responsable del procesamiento de los estímulos internos y el mantenimiento del entorno interno. Aquí se manipulan el control de la presión arterial inconsciente momento a momento, temperatura, ritmo cardíaco, respiración, metabolismo del agua, osmolalidad, hambre y actividades neuroendocrinas. Los núcleos de las células neuroendocrinas que liberan oxitocina y ADH de la pituitaria posterior se encuentra en el hipotálamo.

50 Los ganglios basales (núcleo caudado, globo pálido, sustancia negra, núcleo subtalámico, núcleo rojo) son grupos de neuronas incrustadas dentro de cada hemisferio del cerebro. Están involucrados en el control del control del motor complejo, procesamiento de la información y movimientos intencionales totales inconscientes.

55 El tronco cerebral incluye el bulbo raquídeo y puente de Varolio. El bulbo raquídeo contiene áreas funcionales importantes y centros de paso de transmisión para el control de los reflejos de respiración, cardíacos y vasomotores. El puente de Varolio contiene el centro neumotáxico que está implicado en la regulación de la respiración.

60 El cerebelo se encuentra por encima del tronco cerebral y usa la información sensorial procesada en otro lugar con respecto a la posición del cuerpo, movimiento, la postura y equilibrio. Los movimientos no se inician en el cerebelo, pero son necesarios para el movimiento coordinado.

Sistema nervioso periférico

65 El sistema nervioso periférico incluye nervios, ganglios, nervios espinales y craneales situados fuera del cerebro y médula espinal. Los doce nervios craneales surgen de los núcleos situados en el tronco cerebral y se desplazan a

lugares específicos que transportan impulsos para controlar diversas funciones autónomas como olfato, vista, salivación, ritmo cardíaco y sensación cutánea. Los nervios craneales se mezclan a menudo porque llevan componentes sensoriales y motores pero pueden tener solamente fibras motoras o sensoriales. La siguiente tabla enumera los nervios craneales y sus funciones.

5

Tabla 1 - Nervios Craneales

Número	Nombre	Función
I	Olfativo	Sensación de olfato
II	Óptico	Visión
III	Motor Ocular Interno	Control motor de algunos músculos oculares y párpado
IV	Troclear	Control motor de algunos músculos oculares
V	Trigémino	Músculos de masticación y alguna sensación facial
VI	Motor Ocular Externo	Control motor de algunos músculos oculares
VII	Facial	Control motor de músculos faciales, salivación. Sensaciones de gusto y cutáneas.
VIII	Acústico	Equilibrio, sentido estático y audición
IX	Glossofaríngeo	Salivación, sensaciones cutáneas, gusto y de vísceras
X	Vago	Control motor del corazón y vísceras, sensación del tórax, faringe y vísceras abdominales
XI	Accesorio	Impulsos motores a la faringe y hombro
XII	Hipogloso	Control motor de la lengua, algunos músculos esqueléticos, algunas vísceras, sensación cutánea y de vísceras

10 La división sensorial del sistema nervioso periférico recibe información de diversos tipos de receptores, la procesa y la envía al sistema nervioso central. La información sensorial puede provenir de fuentes internas como en la propiocepción (sentido de la posición de las articulaciones y los músculos) o fuentes externas como en la sensación de presión o calor en la piel. Las áreas de la piel inervadas por nervios espinales específicos se denominan dermatomas. Las fibras aferentes recogen información sensorial y se desplazan hacia la médula espinal, convergen en el tálamo, y por último terminan en la corteza sensorial del cerebro. Aquellas áreas con más receptores sensoriales, es decir, las yemas de los dedos o los labios, corresponden a un área mayor en la corteza sensorial del cerebro. Las fibras que transportan información propioceptiva se dispersan también en el cerebelo. Casi todos los sistemas sensoriales transmiten impulsos a partes del tálamo. La corteza cerebral está implicada en la percepción consciente y la interpretación de estímulos sensoriales.

20 Las informaciones motoras a músculos y glándulas se producen a través de los sistemas eferentes autónomos y somáticos. La inervación del SNC de las articulaciones, tendones y músculos se desplaza a través del sistema eferente somático. Algunas respuestas musculares se manipulan a través de los reflejos espinales. Un ejemplo de esto es el reflejo de retirada observado cuando el dedo hace contacto con una estufa caliente. El movimiento para retirar el dedo se produce a través de un reflejo espinal sencillo mucho antes de que la sensación de dolor llegue al encéfalo. Es evidente que este es un mecanismo de protección para evitar una lesión mayor. Las informaciones motoras a glándulas y músculo liso por lo general se producen a través del sistema autónomo.

30 La mayoría de los órganos reciben información de las dos ramas del sistema nervioso autónomo. Por lo general una rama será excitatoria, mientras que la otra es inhibitoria en ese órgano o tejido. La rama simpática del sistema autónomo actúa para preparar el cuerpo para el estrés fisiológico. La estimulación de la rama simpática es como pisar el acelerador en la que el cuerpo se prepara para correr o luchar como respuesta. Se observan efectos tales como un aumento del ritmo cardíaco, dilatación de las vías respiratorias y movilización de glucosa a partir de reservas de glucógeno. Los nervios simpáticos surgen a partir de la 1ª vertebral torácica a la 4ª vértebra lumbar. Tienen una neurona preganglionar corta que termina en uno de los ganglios de la cadena que se encuentran a lo largo de la columna vertebral. La acetilcolina es el neurotransmisor en la sinapsis con la neurona postganglionar larga que se desplaza a continuación hacia el tejido diana, donde la norepinefrina se libera en la mayoría de las terminaciones nerviosas simpáticas. Unas pocas neuronas postganglionares simpáticas, tales como las que inervan glándulas sudoríparas o vasculatura del músculo esquelético, liberan acetilcolina.

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

TGF- β , activinas, y BMP son proteínas implicadas en diferenciación celular, crecimiento y formación de órganos durante el desarrollo. La BMP es un miembro de la superfamilia de TGF- β junto con factores de crecimiento/diferenciación (GDF), proteínas osteogénicas (OP), y sustancia inhibidora Mülleriana/hormona antiMülleriana (MIS/AMH) (Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15). Históricamente, en 1965, Urist (Urist, MR: Bone, formation by autoinduction, Science, 1965, 150 (698): 893-899) observaron el fenómeno de osificación embrionaria y otros procesos similares a la osificación endocondral después de insertar la matriz ósea desmineralizada en el músculo de roedores y conejos. Después de la implantación, las células mesenquimales diferenciadas se desplazan a los tejidos óseos insertados por quimiotaxis, seguido de mitosis y condensación. Los condroblastos, que se derivan de células mesenquimales, a continuación secretan matriz extracelular, que permitía la formación del molde de cartilago. Esta matriz extracelular se vasculariza a través de células hematopoyéticas y endoteliales. Localmente empezaban a aparecer osteoblastos y osteoclastos y el cartilago absorbido se transformaba en tejidos óseos. Después de 21 días, se formaron huesecillos con núcleo de médula de hueso (Wang *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA, 1988, 85: 9484-9488). El componente, que estaba asociado con este proceso de cambio de la matriz ósea desmineralizada, se describió como proteína morfogenética ósea (BMP).

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

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

Con el fin de sacar provecho a la actividad biológica de BMP, es necesario entender la regulación de la expresión génica de BMP y el mecanismo de dimerización de BMP en la célula. Aunque no se sabe mucho sobre la expresión génica de BMP, se sabe que se puede regular mediante la proteína básica de hélice-bucle-hélice (bHLH) (Ebara *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 1997, 240: 136-141). Esta proteína bHLH está formada por 3 dominios, con dos dominios externos que actúan como activadores transcripcionales positivos y el dominio central que actúa como un regulador negativo. Entre estos dominios, el factor de transcripción de USF reconoce la caja E (la secuencia de ADN que varía de 246~265 pb) y tiene un papel importante en la regulación de la expresión de BMP en el ratón. La BMP también se ha visto involucrada en la regulación de la ruta de muerte celular.

Las actividades biológicas de BMP están estrictamente reguladas en diversos puntos de tiempo más allá del nivel de la transcripción, e incluso por vía extracelular. Se cree que, fuera de las células, los receptores de BMP que actúan como proteínas inhibitorias, reaccionan fácilmente con las BMP y como respuesta al aumento de actividad de BMP, pueden provocar un aumento de la producción de señales de retroalimentación negativa por último conducen a su regulación (Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15). En el interior, las células están reguladas tanto por la transducción de señales como por las proteínas Smad represoras, lo que significa que BMP es capaz de regular de forma positiva la expresión de las proteínas Smad represoras (Ebara y Nakayama, Spine, 2002, 16S: S10-S15).

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

Receptor para BMP

La BMP se une a dos tipos diferentes (tipo I y II) de receptores de serina-treonina quinasa. En mamíferos se han confirmado dos receptores de tipo I y un receptor de tipo II (Kawabata *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9: 49-61). En los mamíferos, el receptor de tipo I tiene isoformas A y B y, aunque son estructuralmente similares, presentan un comportamiento diferente en su activación de las proteínas Smad (Imamura *et al.*, Nature, 1997, 389: 549-551). Para la transducción de señales, se necesitan receptores de tipo I y II para formar un complejo. El receptor de tipo I se activa con el receptor de tipo II y la señal se transduce en las células por el receptor de tipo I. La señal en las células se transduce por proteínas Smad. Smad1, Smad5 y Smad8 pertenecen a la misma estructura y transducen la señal de BMP. Smad2 y Smad3 transducen señales de TGF- β y activina. Estos Smad forman

complejo heteromérico y se translocan en el núcleo para activar diversos genes. Smad6, Tob, Ski y Smurf1 están involucrados en la regulación negativa de estos genes. Entre estos, Smad6 reprime la transcripción de BMP y también tiene un papel en la retroalimentación negativa de la ruta de señalización de BMP (Bai *et al.*, J Biol Chem, 2000, 275: 8267-8270). Tob es un miembro de la familia de proteínas antiproliferativas y está implicado en la regulación negativa de la señal de BMP/Smad (Yoshida *et al.*, Cell, 2000, 103: 1085-1097). La oncoproteína Ski reprime la expresión de genes señalización de BMP y sensibles a BMP, y reprime la activación de BMP mediante la reacción directamente con el complejo de Smad, que es una característica de la BMP (Wang *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 14394-14399). Smurf1 pertenece a la familia Hect de la ubiquitina ligasa e inhibe la transducción de señales de BMP mediante unión de forma selectiva con el Smad regulado por receptor (Zuh *et al.*, Nature, 1999, 400: 687-693).

Alguna investigación adicional sobre la función de la familia BMP de proteínas está en desarrollo y parece que están involucradas en el esquema de formación básica del cuerpo incluyendo el sistema nervioso (Farkas *et al.*, J Neurosci, 1999, 92: 227-235), ojos (Mohans *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39: 2626-2636), pulmón, riñón, próstata, órganos reproductores y folículos pilosos durante la etapa embrionaria. Por ejemplo, se ha informado que la formación de los dedos y espacios entre dedos se debe a la apoptosis de las células entre los dedos causada por BMP (Zou y Niswander, Science, 1996, 272: 738). La BMP participa en formación, diferenciación y curación del sistema esquelético durante la etapa embrionaria. En el sistema esquelético después del nacimiento, la BMP está presente en el colágeno del estroma cerebral, células de periostio y células mesenquimales de la matriz llena de elementos que forman la sangre. La BMP también se ha aislado a partir de osteosarcoma y condrosarcoma (Lianjia e Yan, Clin Orthop, 1990, 257: 249-256). Después de una fractura, la BMP se difunde en la matriz ósea absorbida, activa a las células osteoprecursoras, y a su vez produce más BMP. La distribución de BMP depende del momento del tratamiento y la ubicación de la fractura y se puede complicar aún más debido a reacciones recíprocas. También se ha realizado investigación sobre BMP en una diversidad de otros tejidos para estudiar su efecto protector o regenerador, y se ha demostrado que tiene un efecto protector sobre la función del músculo cardíaco en isquemia y reperfusión del músculo cardíaco (Lefer *et al.*, J Mol Cell Cardiol, 1992, 24: 585-593), en el sistema nervioso extendido, en experimentos de inducción de isquemia cerebral después de inyección de BMP en la cavidad abdominal y efectos regeneradores en riñones dañados (Ripamonti y Duneas, Plast Reconstr Surg, 1998, 101: 227-239).

Terapia de Proteína BMP

La presente memoria descriptiva incluye la administración de proteína BMP al sitio de la degeneración nerviosa para reconstituir el nervio o para prevenir su degeneración adicional. BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-9 son preferentes.

Composición Terapéutica

La presente memoria descriptiva se refiere al tratamiento de afección neurodegenerativa del cerebro o epilepsia que se caracterizan por neurodegeneración. De esta manera, la población terapéutica de células cultivadas se puede administrar a pacientes humanos que padecen cualquiera, o son propensos a padecer la enfermedad, proporcionando compuestos que inhiben la degeneración neuronal. En particular, la enfermedad se asocia con trastorno neurodegenerativo del cerebro, pérdida de células nerviosas, en particular en el hipocampo y la corteza cerebral, neurotransmisores reducidos, degeneración cerebrovascular, nervios aplastados en la columna vertebral, y/o pérdida de capacidad cognitiva.

En la técnica se conoce generalmente la formulación de compuestos terapéuticos y de forma conveniente se puede hacer referencia a Pharmaceutical Sciences de Remington, 17^a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA. Por ejemplo, se pueden administrar de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal al día. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. El compuesto activo se puede administrar de una manera conveniente tal como por las rutas oral, intravenosa (cuando es hidrosoluble), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o supositorio o mediante implantes (por ejemplo, usando moléculas de liberación lenta por la vía intraperitoneal o mediante el uso de células, por ejemplo, monocitos o células dendríticas sensibilizadas *in vitro* y transferidas de forma adoptiva al receptor). Dependiendo de la vía de administración, el péptido se puede necesitar para revestir un material para protegerlo de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos ingredientes.

Por ejemplo, la baja lipofilia de los péptidos les permitirá ser destruidos en el tracto gastrointestinal por enzimas capaces de escindir enlaces peptídicos y en el estómago por hidrólisis ácida. Con el fin de administrar péptidos por otra administración distinta a la parenteral, se pueden revestir, o administrar con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, algunos péptidos se pueden administrar en un adyuvante, coadministrar con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Algunos adyuvantes contemplados en el presente documento incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como polioxietileno éter y n-hexadecil polietileno éter. Algunos inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DEP) y trasilol. Algunos liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales.

Los compuestos activos también se pueden administrar por vía parenteral o por vía intraperitoneal. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una inyectabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede producir con varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir con el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante incorporación de los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, si fuera necesario, seguido de esterilización en estado filtrado. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de los diversos principios activos estériles en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferentes son las técnicas de secado al vacío y de liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada en estado estéril del mismo.

30 Cuando los péptidos se protegen de forma adecuada como se ha descrito anteriormente, el compuesto activo se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible que se pueda asimilar, o se pueden cerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o se puede formar un comprimido por compresión, o se puede incorporar directamente en el alimento de la dieta. Para administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Tales composiciones y preparaciones deberían contener al menos un 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede variar, por supuesto, y puede estar de forma conveniente entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferentes de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que la forma unitaria de dosificación oral contenga entre aproximadamente 0,1 µg y 2000 mg de compuesto activo.

45 Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante tal como goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria, o aroma de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, ésta puede contener, además de materiales del tipo mencionado anteriormente, un vehículo líquido. Como revestimientos pueden estar presentes otros materiales diversos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas se pueden revestir con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como un agente edulcorante, metil y propil parabenos como conservantes, un colorante y agente de sabor tal como sabor a cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debería ser farmacéuticamente puro y básicamente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

60 Como se usa en el presente documento, "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes de revestimientos antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar algunos principios activos complementarios.

65 Para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos

5 mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas y dependen directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico en particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de un material activo de este tipo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos que tienen una patología en la que se altera la salud corporal.

10 El principio activo principal se formula para la administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma unitaria de dosificación. Una forma de dosificación unitaria puede contener, por ejemplo, el compuesto activo principal en cantidades que varían de 0,5 µg a aproximadamente 2000 mg. Expresado en proporciones, el compuesto activo está generalmente presente en cantidades desde aproximadamente 0,5 µg/ml de vehículo. En el caso de composiciones que contienen principios activos complementarios, las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis habitual y forma de administración de dichos principios.

15

Sistemas de administración

20 Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar un compuesto como se describe en el presente documento, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías de administración intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización.

30

35 En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticas de forma local en el área que necesita el tratamiento; esto se puede conseguir mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, en conjunto con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra una proteína, incluyendo un anticuerpo o un péptido, se debe tener cuidado de usar materiales a los que la proteína no se absorba. En otra realización, el compuesto o composición se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma. En otra realización más, el compuesto o composición se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba. En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos. En otra realización más, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica.

45

50 Se dice que una composición es "farmacológica o fisiológicamente aceptable" si su administración la puede tolerar un animal receptor y de otro modo es adecuada para su administración a dicho animal. Se dice que dicho agente se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

Terapia Génica

55 En una realización específica, se administran ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el polipéptido de la superfamilia de TGF para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o por trastornos asociados con degeneración neural a modo de terapia génica. Terapia génica se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o que se puede expresar. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

60 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel *et al.*, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3: 87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11 (5): 155-215 (1993). Algunos métodos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Krieglner, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

65

En un aspecto preferente, las secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar una proteína que pertenece a polipéptido de la superfamilia de TGF, en que las secuencias de ácidos nucleicos forman parte de vectores de expresión que expresan los polipéptidos en un hospedador adecuado. En particular, tales secuencias de ácidos nucleicos tienen promotores unidos de forma operativa a la región que codifica el polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejido. En otra realización en particular, se usan moléculas de ácido nucleico en que las secuencias que codifican polipéptido y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que estimulan la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo de expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smities, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342: 435-438 (1989).

La administración de los ácidos nucleicos a un paciente se puede realizar de forma directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o vectores que portan ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, y a continuación se trasplantan en el paciente. Estos dos enfoques se conocen, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácidos nucleicos se administran directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el producto codificado. Esto se puede realizar mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante su construcción como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y mediante la administración el mismo de modo que llegue a ser intracelular, por ejemplo, por infección usando retrovirales u otros vectores virales defectuosos o atenuados, o mediante inyección directa de ADN desnudo, o revestimiento con líquidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, encapsulamiento en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o mediante su administración en unión ha un péptido que se sabe que entra en el núcleo, mediante su administración a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)) (que se puede usar para dirigir tipos celulares que expresan de forma específica los receptores), etc. En otra realización, se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico se puede dirigir *in vivo* para absorción y expresión específica de células, mediante dirección a un receptor específico. Como alternativa, el ácido nucleico se podía introducir por vía intracelular y se puede incorporar dentro del ADN de la célula hospedadora para expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smities, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); Zijlstra *et al.*, Nature 342: 35-438 (1989)).

En una realización específica, se usa en vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido a usar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen a un paciente. Algunos ejemplos de vectores virales que se pueden usar son vectores retrovirales, vectores adenovirales y virus adenoasociados. Los vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetado correcto del genoma viral e integración en el ADN de la célula hospedadora.

Algunos adenovirus son especialmente vehículos atractivos para administración de genes a epitelios respiratorios porque infectan de forma natural los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de que son capaces de infectar a células que no están en división. Además, también se han propuesto algunos virus adenoasociados (AAV) para uso en terapia génica.

Otro enfoque para la terapia génica implica la transferencia de un gen a células en cultivo tisular con métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico, o infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable con respecto a las células. A continuación, las células se colocan selección para aislar las células que se han aceptado y que expresan el gen transferido. A continuación, esas células se administran a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Tal introducción se puede realizar con cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita, transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contienen las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia de gen mediada por cromosoma, transferencia de gen mediada por microcélula, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en células y se pueden usar de acuerdo con la presente invención, con la condición de que no se alteren ni el desarrollo ni las funciones fisiológicas necesarias de las células receptoras. La técnica debería proporcionar transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que la célula pueda expresar el ácido nucleico y preferentemente su progenie celular pueda heredarlo y expresarlo.

Algunas células en las que se puede introducir un ácido nucleico con fines de terapia génica incluyen cualquier tipo de célula deseada, disponible, e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o precursoras, en particular células madre o precursoras hematopoyéticas, por ejemplo, las que se obtienen de médula ósea,

sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferente, la célula usada para terapia génica es autóloga para el paciente. Como alternativa, el paciente puede ser autólogo.

5 En una realización específica, el ácido nucleico a introducir para fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido de forma operativa a la región de codificación, de modo que la expresión del ácido nucleico se puede controlar mediante el control de la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

10 En particular, cuando las células NIH3T3 se transducen con gen que codifica BMP-3 o BMP-4 y se exponen al agente citotóxico metanfetamina, las células mueren en menos ocasiones. Además, cuando los ratones expuestos a la neurotoxina kainato se trataban con células NIH3T3 transducidas con gen que codifica BMP-4, se producía neuroprotección.

15 Ejemplos

EJEMPLO I - MATERIALES Y MÉTODOS

20 Materiales

Para este estudio se han usado ratas maduras de raza Sprague-Dawley (16~18 semanas de edad) con un peso de 400 ± 10 g. La razón para el uso de ratas maduras es que es más fácil observar cambios debido a la regeneración nerviosa y cambios fisiológicos en comparación con ratas en estado de crecimiento.

25 Métodos

Técnicamente es difícil inyectar proteína funcional BMP en nervios periféricos. Por lo tanto, en este estudio, se transfectoron directamente fibroblastos de rata que producen BMP2, BMP4, BMP9 y factor neurotóxico derivado de línea de células gliales (GDNF) en los nervios periféricos de modo que BMP2, BMP9, y GDNF se secretan de forma local. Un total de 60 ratas se dividieron en 5 grupos. Cada grupo consistía en 12 ratas con nervios lesionados. El primer grupo era un grupo de control con ratas cuyos nervios lesionados se trataron con fibroblasto no modificado sin transgén. El segundo grupo (grupo de BMP2) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de BMP-2, y el tercer grupo (grupo de BMP4) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado como gen con el transgén de BMP-4. El cuarto grupo (grupo BMP9) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de BMP-9. El quinto grupo (grupo de GDNF) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de GDNF. El examen histológico de los tejidos se realizó 2, 4, y 8 semanas después del tratamiento sacrificando 2 ratas de cada grupo y extrayendo nervios ciáticos de ambas extremidades. También se realizó estudio de conducción motora del nervio con nervios viáticos de las extremidades mediante el ajuste del valor de la medida inicial original antes del experimento y midiendo la conducción nerviosa cada semana hasta 8 semanas después de la cirugía.

Lesión del nervio

45 La rata de color blanco se anestesió por inyección de hidrato de cloral al 4 % en una concentración de 300 mg/kg en la cavidad abdominal. Se rasuró el pelo de las regiones posterior y femoral de la pata derecha antes de su fijación en posición boca abajo. Después de esterilizar la región femoral con potadina y alcohol al 70 %, se hizo una incisión de forma vertical de aproximadamente 1~1,5 cm de epidermis alrededor de la parte central de la región femoral y el bíceps femoral se empujó hacia fuera para exponer el nervio ciático. Se produjeron lesiones en el nervio de acuerdo con DeKoning *et al.* (De Koning *et al.*, J Neurol Sci, 1986, 74: 237-246) por incisión en la piel entre el muslo y la articulación de la rodilla total hasta 2~2,5 cm de longitud y exfoliando los músculos de la articulación de la rodilla posterior y total para exponer el nervio ciático y a continuación realizar una lesión del nervio expuesto a hernia ciática por aplastamiento con un fórceps hemostático (Crile, 15 cm) durante 30 segundos. El fórceps se pudo ajustar en tres niveles diferentes de mantenimiento de la fuerza y para aplicar el mismo nivel de mantenimiento de la lesión del nervio en áreas fijas, se marcó una línea de color negro en el fórceps a 5 cm desde el extremo permitiendo lesiones por aplastamiento en el área fijada mediante el nivel de mantenimiento más fuerte. Después de retirar el fórceps hemostático, el primer grupo o grupo de control se inyectó con tampón con 0,05 ml de fibroblasto no modificado (unidad: 5 x 10⁵ células/50 µl) a 2 mm del área de la lesión del nervio usando aguja ultrafina (calibre 30). El segundo y el tercer grupos experimentales se inyectaron con fibroblastos modificados genéticamente que secretan BMP2, BMP4, BMP9 BDNF, respectivamente, con el mismo método antes de sutura y esterilización de la zona de la herida.

Ensayo de Conducción Nerviosa

65 El ensayo de conducción nerviosa se realizó después de anestesiarse la raza con hidrato de cloral al 4 %. El electrodo de registro de actividad se puso en el músculo de la pantorrilla para estimular la muesca ciática, el electrodo de

referencia se colocó en el pie, y el electrodo de tierra se colocó entre el electrodo de estimulación y el electrodo de registro. El electrodo similar a un parche rehusó como el electrodo de registro y el electrodo de tierra se colocó por debajo de la piel mediante el uso de un electrodo de aguja. El ensayo de conducción nerviosa se realizó usando KeyPoint (Dantec, Dinamarca). La frecuencia, tasa de impresión de registro, y registro de sensibilidad en este estudio se establecieron como 2~10.000 Hz, 2 mseg/división, 5 mV/división, respectivamente. Los ensayos de conducción nerviosa se realizaron cada 2 semanas. Las medidas se tomaron desde el principio del experimento y siguieron en las semanas 2, 4, 6, y 8 siguientes. La latencia y la amplitud durante los ensayos se midieron mediante la amplitud entre la medida inicial y el punto del electrodo negativo. Para el estudio de conducción nerviosa se seleccionaron 5 ratas de cada grupo y se obtuvieron 10 medidas de ambos. Las temperaturas del laboratorio y las ratas se mantuvieron a 25 °C y 30 °C, respectivamente.

Examen Patológico/Histológico del Tejido

El examen de los tejidos nerviosos de ratas se realizó para observar la curación natural después de la lesión mediante examen de nervios normales antes de su lesión desde el comienzo del experimento. Se usaron cuatro (4) ratas (8 nervios) para observar la regeneración de los nervios con células que carecían del procedimiento de transgén. Se seleccionan de forma aleatoria 2 ratas (4 nervios) de cada grupo y los tejidos se examinaron después de 2, 4, y 8 semanas. Para el examen del tejido, se exfoliaron nervios ciáticos de aproximadamente 2 cm del área de la lesión por aplastamiento en ratas anestesiadas. Los cambios en los tejidos del nervio se observaron con microscopía óptica después de ser fijados con solución tamponada de formaldehído y a continuación se tiñeron con tintes de hematoxilina-eosina (H y E) y tricromo modificado (MT).

La amplitud máxima del potencial de acción y los cambios durante la latencia del músculo compuesto de cada grupo se analizaron por comparación con el grupo de referencia a las 2, 4, 6 y 8 semanas después de la lesión del nervio, y se realizó análisis estadístico con el programa SPSS-PC. Las comparaciones entre cada grupo se realizaron con ANOVA y ensayo de t y el nivel de significancia se estableció en 0,05. Los grados de lesión y regeneración se determinaron con datos histológicos del modo que interpretó un patólogo.

EJEMPLO II - CAMBIOS EN EL PESO

Inicialmente, las ratas tenían un peso en el intervalo de 400 ± 10 g. Los cambios de peso posteriores se muestran en la Tabla 2. No se observó diferencia entre cada grupo en la semana 2, pero el grupo de BMP9 mostraba algunas diferencias ($p < 0,05$) en comparación con otros grupos en las semanas 4 y 6. En la semana 8, no había diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p > 0,05$) (Tabla 1).

Tabla 2. Cambios del Peso Corporal en Grupos Experimentales

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Sham	$380,7 \pm 29,0$	$365,0 \pm 57,7$	$430,0 \pm 57,7$	$460,0 \pm 46,2$
BMP2	$370,6 \pm 24,8$	$368,3 \pm 74,7$	$382,5 \pm 141,5$	$470,0 \pm 40,9$
BMP4	$375,3 \pm 23,6$	$369,3 \pm 76,9$	$395,5 \pm 85,5$	$490,0 \pm 50,8$
BMP9	$366,8 \pm 34,2$	$442,0 \pm 79,8$	$505,0 \pm 77,6$	$508,0 \pm 60,6$
GDNF	$378,4 \pm 22,7$	$398,2 \pm 64,2$	$422,3 \pm 89,5$	$498,0 \pm 55,9$

EJEMPLO III - Cambios de Latencia

Los datos de la medida inicial medidos de forma aleatoria a partir de cada grupo antes del experimento presentaban una latencia de $1,44 \pm 0,11$ mseg. Las latencias después del traumatismo presentaban diferencias entre el grupo de control, los grupos de BMP2, BMP4, BMP9 y GDNF a las semanas 2 y 4, pero carecían de significancia estadística ($p > 0,05$). Las latencias de los grupos de BMP2 y BMP9 se redujeron de forma significativa en comparación con el grupo de control en la semana 6 ($p < 0,05$). Sin embargo, no se produjo diferencia en las latencias entre los 5 grupos en la semana 8 ($p > 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Cambio de Latencia en Grupos

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Sham	$1,30 \pm 0,11$	$1,29 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,21$	$1,10 \pm 0,0$
BMP2	$1,24 \pm 0,14$	$1,25 \pm 0,07$	$1,08 \pm 0,07^*$	$1,04 \pm 0,04$
BMP4	$1,25 \pm 0,13$	$1,26 \pm 0,08$	$1,07 \pm 0,05^*$	$1,14 \pm 0,03,$
BMP9	$1,19 \pm 0,12$	$1,23 \pm 0,10$	$1,06 \pm 0,03^*$	$1,15 \pm 0,07$
GDNF	$1,22 \pm 0,14$	$1,24 \pm 0,05$	$1,09 \pm 0,06^*$	$1,15 \pm 0,05$

EJEMPLO IV - Cambios de Amplitud

Los datos de la medida inicial medidos de forma aleatoria a partir de cada grupo antes del experimento presentaban una amplitud de $23,9 \pm 4,3$ mV. La amplitud del grupo de BMP9 aumentaba de forma significativa en comparación con el grupo de control en las semanas 2 y 4 después del traumatismo ($p < 0,05$). Los grupos de BMP2 y BMP9 presentaban diferencias significativas en comparación con el grupo de control en la semana 6 ($p < 0,05$) y se mostraban diferencias significativas en el orden de los grupos de BMP9, BMP2 y de control en la semana 8 ($p < 0,05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Cambios de Amplitud

	2ª semana	4ª semana	6ª semana	8ª semana
Sham	$3,98 \pm 1,52$	$6,17 \pm 1,27$	$6,33 \pm 1,27$	$6,3 \pm 1,31$
BMP2	$6,14 \pm 1,51$	$7,51 \pm 1,29$	$9,00 \pm 1,69^*$	$7,17 \pm 0,50^*$
BMP4	$6,54 \pm 1,52$	$8,51 \pm 1,31^*$	$8,90 \pm 1,59^*$	$7,35 \pm 0,60^*$
BMP9	$6,79 \pm 1,34^*$	$9,53 \pm 4,47^*$	$9,47 \pm 1,22^*$	$10,26 \pm 2,27^*$
GDNF	$6,94 \pm 1,53$	$9,51 \pm 3,29$	$10,10 \pm 1,69^*$	$11,17 \pm 1,80^*$

EJEMPLO V - Observaciones Histológicas y Patológicas

El examen histológico del tejido nervioso de ratas seleccionadas de forma aleatoria de cada grupo presentaba cambios similares a los de los resultados del examen de fisiología del nervio. El grupo de control presentaba la tasa de recuperación más lenta ya que los axones de los tejidos nerviosos no se regeneraban y permanecía la reacción inflamatoria. Los grupos transfectados con fibroblastos modificados genéticamente que secretan BMP2, BMP4, BMP9, o GDNF no presentaban ninguna diferencia significativa en comparación con el grupo de control en el estadio inicial, y todos los grupos presentaban indicaciones patológicas graves causadas por daño de los nervios por aplastamiento tales como cambios vacuolares e infiltración de monocitos inflamatorios, sangrado de la vena del epineurio en la semana 2. Para el grupo de control, estos síntomas persistieron durante 8 semanas. Sin embargo, para el grupo de BMP2, el tamaño de la inflamación y los cambios vacuolares se redujeron de forma significativa y solamente la mitad de ellos presentaban estos síntomas en las semanas 4 y 8. Para los grupos de BMP4, BMP9 o GDNF, estos efectos eran más acusados en las semanas 4 y 8, y solamente un tercio de ellos presentaban pérdida de axón, cambios vacuolares. La inflamación era muy leve.

EJEMPLO VI**Materiales**

Para este estudio se han usado ratas maduras de raza Sprague-Dawley (16~18 semanas de edad) con un peso de 400 ± 10 g. La razón para el uso de ratas maduras es que es más fácil observar cambios debido a la regeneración nerviosa y cambios fisiológicos en comparación con ratas en estado de crecimiento.

Métodos

Para evitar la posibilidad de formación de cáncer, se inyectaron células de Schwann irradiadas para obtener resultados máximos así como más seguros. Por lo tanto, en este estudio, las células de Schwann de rata que producen BMP2, BMP4, y GDNF se irradiaron con una potencia de 15Gy y se transfectaron directamente en los nervios periféricos de modo que BMP2, BMP4, y GDNF se secretan de forma local. Un total de 60 ratas se dividieron en 5 grupos. Cada grupo consistía en 12 ratas con nervios lesionados. El primer grupo era un grupo de control con ratas cuyos nervios lesionados se trataron con fibroblasto no modificado sin transgén. El segundo grupo (grupo de BMP2) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de BMP-2, y el tercer grupo (grupo de BMP4) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de BMP-4. El cuarto grupo (grupo de GDNF) estaba formado por ratas con nervios lesionados, que se trataron con fibroblasto modificado genéticamente con el transgén de GDNF. El examen histológico de los tejidos se realizó 2, 4, y 8 semanas después del tratamiento sacrificando 2 ratas de cada grupo y extrayendo nervios ciáticos de ambas extremidades.

Lesión del nervio

La rata de color blanco se anestesió por inyección de hidrato de cloral al 4 % en una concentración de 300 mg/kg en la cavidad abdominal. Se rasuró el pelo de las regiones posterior y femoral de la pata derecha antes de su fijación en posición boca abajo. Después de esterilizar la región femoral con potadina y alcohol al 70 %, se hizo una incisión de forma vertical de aproximadamente 1~1,5 cm de epidermis alrededor de la parte central de la región femoral y el biceps femoral se empujó hacia fuera para exponer el nervio ciático. Se produjeron lesiones en el nervio de acuerdo con DeKoning *et al.* (De Koning *et al.*, J Neurol Sci, 1986, 74: 237-246) por incisión en la piel entre el muslo y la

articulación de la rodilla total hasta 2~2,5 cm de longitud y exfoliando los músculos de la articulación de la rodilla posterior y total para exponer el nervio ciático y a continuación realizar una lesión del nervio expuesto a hernia ciática por aplastamiento con un fórceps hemostático (Crile, 15 cm) durante 30 segundos. El fórceps se pudo ajustar en tres niveles diferentes de mantenimiento de la fuerza y para aplicar el mismo nivel de mantenimiento de la lesión del nervio en áreas fijas, se marcó una línea de color negro en el fórceps a 5 cm desde el extremo permitiendo lesiones por aplastamiento en el área fijada mediante el nivel de mantenimiento más fuerte. Después de retirar el fórceps hemostático, el primer grupo o grupo de control se inyectó con tampón con 0,05 ml de fibroblasto no modificado (unidad: 5×10^5 células/50 μ l) a 2 mm del área de la lesión del nervio usando aguja ultrafina (calibre 30). El segundo y el tercer grupos experimentales se inyectaron con fibroblastos modificados genéticamente que secretan BMP2, BMP4, GDNF, respectivamente, con el mismo método antes de sutura y esterilización de la zona de la herida.

Ensayo de Nervio Periférico

Se tomaron medidas a partir del comienzo del experimento y siguieron a las 2, 4, 6, 8 semanas siguientes. La latencia y el umbral durante los ensayos se midieron con el ensayo de Randall Selitto para umbral mecánico, o baño de agua caliente (49 °C) para latencia térmica. Las temperaturas del laboratorio y de las ratas se mantuvieron a 25 °C y 30 °C, respectivamente.

20 Análisis de Datos

La latencia máxima y el umbral de cada grupo se analizaron por comparación con grupo de referencia a las 2, 4, 6 y 8 semanas después de la lesión del nervio, y se realizó análisis estadístico con el programa SPSS-PC. Las comparaciones entre cada grupo se realizaron con ANOVA y ensayo de t y el nivel de significancia se estableció en 0,05.

EJEMPLO VII - Cambios de Latencia Térmica

Los datos de la medida inicial medidos de forma aleatoria a partir de cada grupo antes del experimento presentaban una latencia de $12,44 \pm 3,13$ seg. Las latencias después del traumatismo presentaban diferencias entre el grupo de control, los grupos de BMP2, BMP4, y GDNF. Las latencias de los grupos de BMP2, BMP4, y GDNF se redujeron de forma significativa en comparación con el grupo de control en la semana 6 ($p < 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Cambio de Latencia en Grupos

	3 ^{er} Día	6 ^o Día	9 ^o Día	12 ^o Día
Sham	$11,25 \pm 1,17$	$12,29 \pm 1,04$	$12,85 \pm 1,21$	$11,10 \pm 2,09$
BMP2,	$10,28 \pm 2,15$	$8,27 \pm 3,05$	$7,08 \pm 1,07^*$	$8,04 \pm 3,34$
BMP4	$11,17 \pm 1,16$	$10,28 \pm 2,56$	$9,07 \pm 2,95$	$7,14 \pm 2,23^*$
GDNF	$7,25 \pm 1,15^*$	$6,52 \pm 2,18^*$	$7,09 \pm 2,06^*$	$6,15 \pm 2,05^*$

35 EJEMPLO VIII -Cambios del umbral Mecánico

Los datos de la medida inicial medidos de forma aleatoria a partir de cada grupo antes del experimento presentaban un umbral de $12,1 \pm 1,0$ g. El umbral del grupo de GDNF disminuía de forma significativa en comparación con el grupo de control el Día 6 y 9 después del traumatismo ($p < 0,05$). Los grupos de BMP2 y BMP4 presentaban diferencias significativas en comparación con el grupo de control el Día 9 ($p < 0,05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Cambios de Amplitud

	3 ^{er} Día	6 ^o Día	9 ^o Día	12 ^o Día
Sham	$10,59 \pm 1,52$	$9,37 \pm 1,57$	$10,31 \pm 1,20$	$11,3 \pm 1,01$
BMP2,	$9,14 \pm 1,51$	$7,41 \pm 1,19$	$7,00 \pm 1,39^*$	$10,17 \pm 0,50$
BMP4	$8,54 \pm 1,52$	$8,61 \pm 1,01$	$6,90 \pm 1,54^*$	$9,35 \pm 0,40$
GDNF	$6,84 \pm 1,01^*$	$6,31 \pm 1,19^*$	$5,10 \pm 1,09^*$	$8,17 \pm 1,80$

45 EJEMPLO IX - Observaciones Histológicas y Patológicas

El examen histológico del tejido nervioso de ratas seleccionadas de forma aleatoria de cada grupo presentaba cambios similares a los de los resultados del examen de fisiología del nervio. El grupo de control presentaba la tasa de recuperación más lenta ya que los axones de los tejidos nerviosos no se regeneraban y permanecía la reacción inflamatoria. Los grupos transfectados con fibroblastos modificados genéticamente que secretan BMP2, BMP4, o GDNF no presentaban ninguna diferencia significativa en comparación con el grupo de control en el estadio inicial, y todos los grupos presentaban indicaciones patológicas graves causadas por daño de los nervios por aplastamiento tales como cambios vacuolares e infiltración de monocitos inflamatorios, sangrado de la vena del epineurio en la semana 2. Para el grupo de control, estos síntomas persistieron durante 8 semanas. Sin embargo, para el grupo de

BMP2, el tamaño de la inflamación y los cambios vacuolares se redujeron de forma significativa y solamente la mitad de ellos presentaban estos síntomas en las semanas 4 y 8. Para los grupos de BMP4, BMP9 o GDNF, estos efectos eran más acusados en las semanas 4 y 8, y solamente un tercio de ellos presentaban pérdida de axón, cambios vacuolares. La inflamación era muy leve.

5 **EJEMPLO X - Efectos neuroprotectores de BMP-3 como respuesta a citotoxicidad inducida por metanfetamina (MAP)**

10 Se usó DMEM se usó como un medio de cultivo para células NIH 3T3 (control), BMP3 o BMP4. La exposición a una dosis elevada (1 mM) de metanfetamina (MAP) durante 24 horas indujo citotoxicidad significativa en las células 3T3 (véase la /sombreada en la Fig. 1 sobre el Grupo "3T3"; y la fotografía D representativa. La viabilidad celular era de aproximadamente un 40 % en comparación con las células 3T3 solas (Fig. 1, barra cerrada sobre "3T3"; y fotografía A representativa. La viabilidad celular era aproximadamente de un 100 %. 3T3 + MAP con respecto a 3T3 solo, $P < 0,01$ (ensayo de t de Student).

15 La citotoxicidad inducida por MAP no se observaba de forma significativa en el tratamiento de BMP-3 más MAP (véase la Fig. 1, barras cerradas y sombreadas sobre el Grupo "3T3-PMT-BMP3"; la fotografía B representativa muestra 3T3/BMP-3 solo, y la fotografía E representativa muestra 3T3/BMP-3 expuesto a MAP. 3T3 + MAP con respecto a 3T3/BMP3 + MAP, $P < 0,01$ (ensayo de t de Student).

20 Sin embargo, BMP4 no evitaba la citotoxicidad inducida por MAP (véase la Fig. 1, barras cerradas y sombreadas sobre el Grupo "3T3-hBMP4". La barra cerrada indica 3T3/BMP-4 solo; fotografía C representativa. La barra sombreada indica células 3T3/BMP-4 tratadas con MAP; fotografía F representativa. 3T3/BMP4 solo con respecto a 3T3/BMP4 + MAP, $P < 0,01$ (ensayo de t de Student). La población de células / cada pocillo era aproximadamente de 300.000.

25 **EJEMPLO XI - El tratamiento con BMP4 evitaba de forma significativa la degeneración neural inducida con kainato en ratones**

30 El kainato (KA) es una neurotoxina excitatoria, que se reconoce bien como un modelo de epilepsia del lóbulo temporal humano. Además, es una herramienta útil *in vivo* para la medida del cambio neurodegenerativo. La pérdida neural inducida por KA se realiza a través de la activación del receptor de KA. El receptor de KA se ubica principalmente en la región CA3 del hipocampo. Los animales que recibían solución salina presentaban una capa de células piramidales intacta (arquitectura celular) en el hipocampo. Los animales que recibían solución salina más KA presentaban una pérdida neural significativa (0,001 con respecto a Control/Solución Salina) en el área de CA3 (la población de células del área similar a C al lado izquierdo se veía significativamente reducida). La inyección intracerebroventricular (I.C.V.) con células 3T3 no influía en la pérdida neural inducida por KA (I.C.V.) del área de CA3. Sin embargo, I.C.V. con células 3T3 que expresan BMP4 de forma recombinante aproximadamente 6 horas después de KA (I.C.V.) atenuaban de forma significativa ($P < 0,01$ con respecto a Sal + KA) la pérdida neural dentro de la vía de CA3. Por lo tanto, BMP 4 es un factor protector como respuesta a la degeneración del hipocampo inducida por KA.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Población de células cultivadas transfectadas *in vitro* con un vector viral o plásmido recombinante generado que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína morfogenética ósea, BMP, unida de forma operativa a un promotor, para uso en el tratamiento de una afección neurodegenerativa del cerebro, o epilepsia, mediante protección de la degeneración del nervio, donde el tratamiento comprende inyección de las células transfectadas a un área cerca de un nervio lesionado, de modo que la expresión de la secuencia de ADN dentro del área del nervio lesionado causa atenuación de la degeneración del nervio.
- 10 2. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la BMP es BMP-2, BMP-3, BMP-4 o BMP-9.
- 15 3. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la célula es una célula de tejido conjuntivo.
4. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde la célula es una célula de fibroblasto.
- 20 5. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la célula es una célula nerviosa.
6. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la célula es una célula glial.
- 25 7. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la célula se irradia.
8. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el vector es un vector viral.
- 30 9. Población de células cultivadas para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde el vector es vector retroviral, vector viral adenoasociado, vector adenoviral o vector viral del herpes.

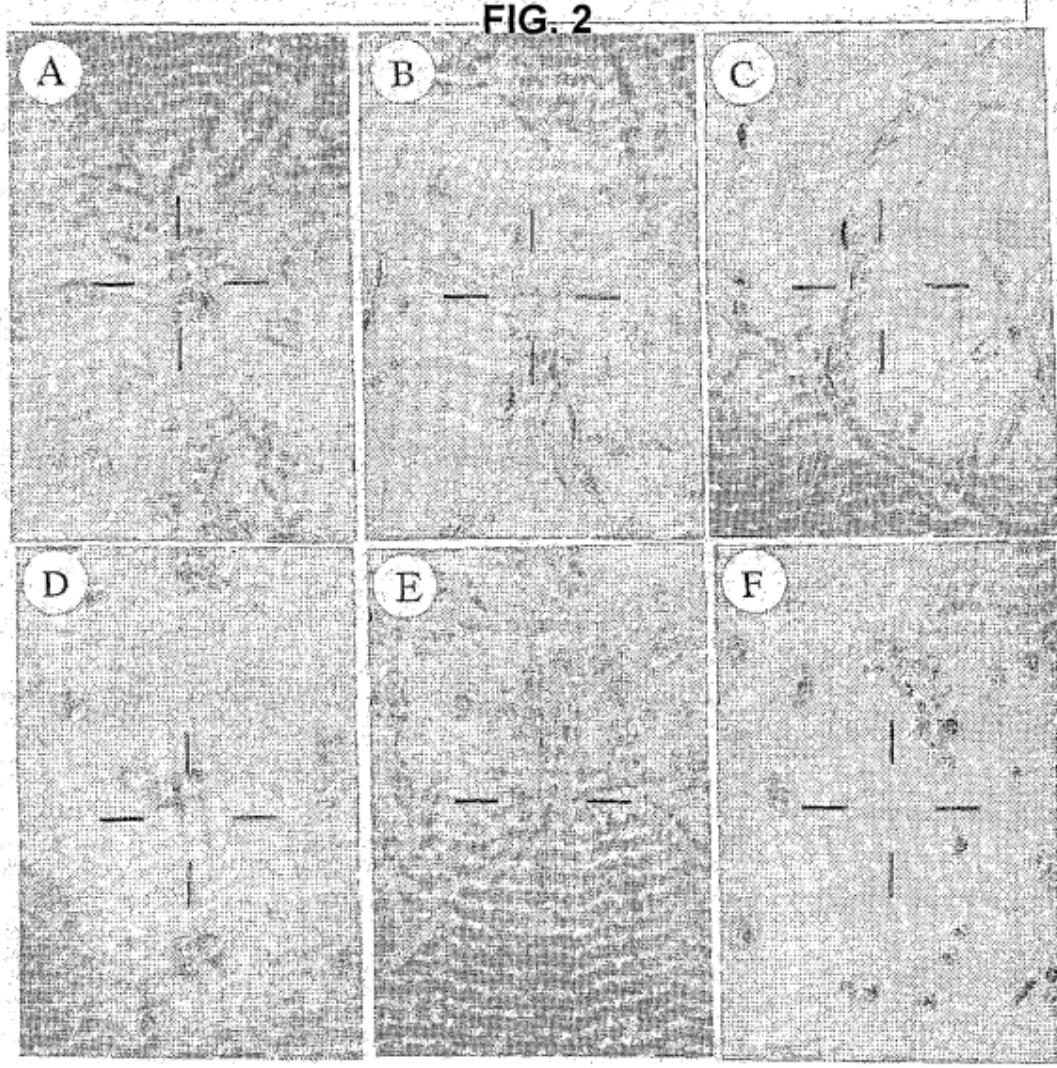
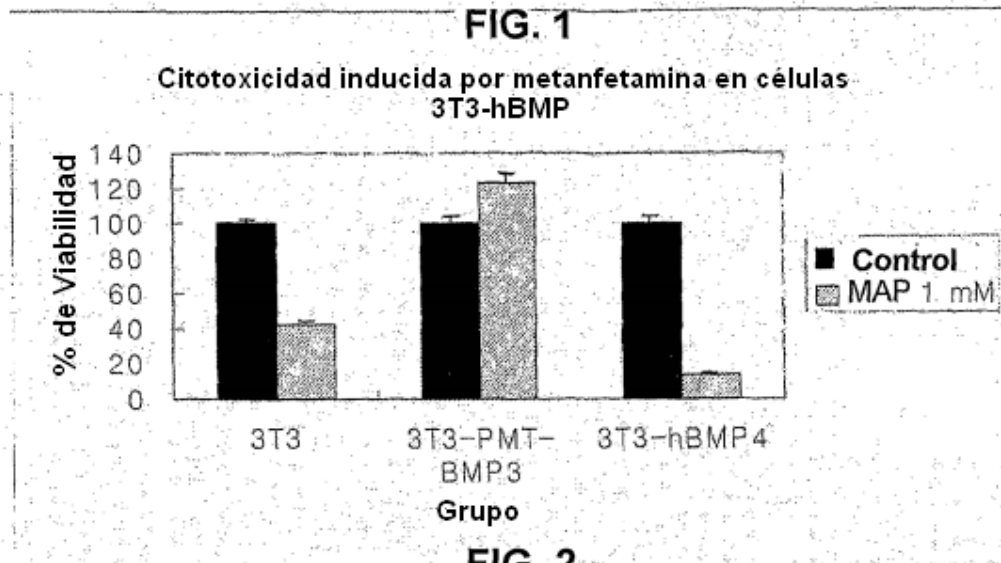


FIG. 3

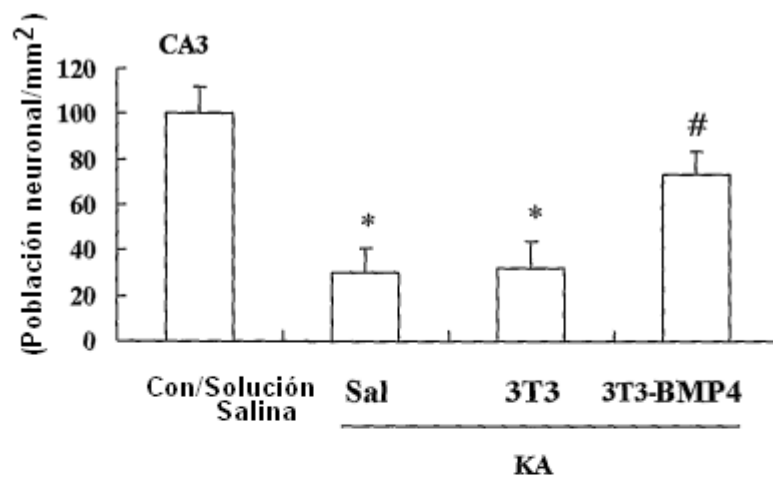


FIG. 4

