



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 201 287**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

(86) Número de solicitud europea: **97917532 .0**

(86) Fecha de presentación : **21.03.1997**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0894004**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.02.1999**

(54) Título: **Método para mejorar la recuperación funcional de la coordinación motora, del habla o la percepción sensorial tras una isquemia o trauma del sistema nervioso central.**

(30) Prioridad: **22.03.1996 US 620444**

(73) Titular/es: **Curis, Inc.
45 Moulton Street
Cambridge, Massachusetts 02138, US
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.03.2004**

(72) Inventor/es: **Charette, Marc, F. y
Finklestein, Seth, P.**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.10.2007**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.10.2007**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

DESCRIPCIÓN

Método para mejorar la recuperación funcional de la coordinación motora, del habla o la percepción sensorial tras una isquemia o trauma del sistema nervioso central.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos y composiciones para el tratamiento de mamíferos, con inclusión de humanos, después de una lesión isquémica del sistema nervioso central.

10 Antecedentes de la invención

Se conocen actualmente numerosas proteínas identificadas y caracterizadas como factores morfogenéticos o de crecimiento, que regulan la proliferación y/o diferenciación celular de los tejidos en vertebrados, con inclusión de los mamíferos. Típicamente, estos factores de crecimiento ejercen sus efectos sobre subconjuntos específicos de células y/o tejidos. Así, por ejemplo, factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de los nervios, factores de crecimiento de los fibroblastos, diversas hormonas, y muchas otras proteínas que inducen o inhiben la proliferación o diferenciación celular han sido identificados y se ha demostrado que afectan a algún subconjunto de células o tejidos.

20 Los factores neurotróficos son polipéptidos que se requieren para el desarrollo del sistema nervioso. El primer factor neurotrófico descubierto, el factor de crecimiento de los nervios (NGF), se sabe ahora que forma parte de una gran familia de factores de crecimiento, que incluyen también BDNF, NT3, y NT4/NT5. Las proteínas dímeras definidas en la publicación PCT No. WO 94/03200 como morfogenes constituyen otra familia de proteínas que se cree desempeñan una función importante en el desarrollo neural (Jones, *et al.*, (1991) *Development* 111: 531-542; Ozkaynak, *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 25220-25227; Lein, *et al.* (1995) *Neuron* 15: 597-605).

25 Estas proteínas, a las que se hace referencia en esta memoria como "proteínas morfogénicas" o "morfogenes", son competentes para actuar como verdaderos morfogenes tisulares, capaces, por sí mismos, de inducir la proliferación y diferenciación de las células progenitoras en tejidos funcionales del cuerpo de los mamíferos. Las proteínas incluyen miembros de la familia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) que se identificaron inicialmente por su capacidad para inducir la morfogénesis ectópica de hueso endocondral.

30 Los morfogenes se clasifican generalmente en la técnica como un subgrupo de la superfamilia TGF- β de factores de crecimiento (Hogan (1996) *Genes & Development* 10, 1580-1594). Miembros de la familia formogénica de proteínas incluyen la proteína osteogénica-1 de los mamíferos (OP-1, conocida también como BMP-7, y el homólogo 60A de *Drosophila*), la proteína osteogénica-2 (OP-2, conocida también como BMP-8), la proteína osteogénica-3 (OP-3), BMP-2 (conocida también como BMP-2A o CBMP-2A, y el homólogo DPP de *Drosophila*), BMP-3, BMP-4 (conocida también como BMP-2B o CBMP-2B), BMP-5, BMP-6 y su homólogo de murino Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, GDF-3 (conocida también como Vgr-2), GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (conocida también como CDMP-1 o MP52), GDF-6 (conocida también como CDMP-2), GDF-7 (conocida también como CDMP-3), el homólogo Vgr de *Xenopus* y NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, y NEURAL. Los miembros de esta familia codifican cadenas de polipéptidos secretadas que comparten características estructurales comunes, con inclusión de su procesamiento a partir de un precursor "pro-forma" para producir una cadena polipeptídica madura competente para dimerizarse, y que contiene un dominio activo carboxi-terminal de aproximadamente 97-106 aminoácidos. Todos los miembros comparten un patrón conservado de cisteínas en este dominio y la forma activa de estas proteínas puede ser o bien un homodímero unido por disulfuro de un miembro simple de la familia, o un heterodímero de dos miembros diferentes (véase, v.g., Massague (1990) *Annu. Rev. Cell Biol.* 6: 597; Sampath, *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 13198). Véanse también los documentos U.S. 5.011.691; U.S. 5.266.683, Ozkaynak *et al.* (1990) *EMBO J.* 9: 2085-2093, Wharton *et al.* (1991) *PNAS* 88: 9214-9218, (Ozkaynak (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 25220-25227 y documento U.S. 5.266.683); Celeste *et al.* (1991) *PNAS* 87: 9843-9847); Lyons *et al.* (1989) *PNAS* 86: 4554-4558. Estas exposiciones describen las secuencias de aminoácidos y de DNA, así como las características químicas y físicas de estas proteínas morfogénicas. Véase también Wozney *et al.* (1988) *Science* 242: 1528-1534); BMP-9 (WO 93/00432, publicado el 7 de enero de 1993); DPP (Padgett *et al.* (1987) *Nature* 325: 81-84; y Vg-1 (Weeks (1987) *Cell* 51: 861-867).

55 Los morfogenes se expresan naturalmente en una diversidad de tejidos durante el desarrollo, con inclusión de los del sistema nervioso en desarrollo (Ozkaynak, *et al.* (1990) *EMBO J.* 9: 2085-2093; Ozkaynak, *et al.* (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 116-123; Ozkaynak *et al.* (1992) *supra*).

60 Las enfermedades vasculares del sistema nervioso se clasifican en primer lugar en frecuencia entre todas las enfermedades neurológicas; las mismas constituyen aproximadamente el 50 por ciento de todos los ingresos en hospitales neurológicos de las sales de adultos. La característica cardinal de la enfermedad cerebrovascular es el accidente cerebrovascular agudo, expresión que connota el desarrollo brusco y espectacular de un déficit neurológico focal. La obstrucción de una arteria nutriente que suministra un lugar del sistema nervioso central debido, por ejemplo, a un trombo o un coágulo o una insuficiencia de la circulación sistémica e hipotensión, si es grave y suficientemente prolongada, puede privar al tejido cerebral de sangre y oxígeno, conduciendo a la interrupción de la función fisiológica, la muerte de neuronas subsiguiente, y la necrosis (infarto) del lugar afectado. En el infarto hemorrágico, se produce una extravasación de sangre en el tejido cerebral, el espacio subaracnoideo, o ambos. El daño se produce como resultado de la interrupción física de la región directamente implicada y la presión de la masa de sangre sobre el tejido circundante.

ES 2 201 287 T5

El déficit neurológico en un accidente cerebrovascular agudo refleja tanto la localización como el tamaño del infarto o hemorragia en el cerebro. La hemiplegia es el signo clásico de enfermedad vascular y ocurre con los accidentes cerebrovasculares aquéllos que implican el hemisferio cerebral o el tallo cerebral. Sin embargo, dependiendo de su localización, un accidente cerebrovascular agudo puede dar lugar también a muchas otras manifestaciones acompañantes o independientes de la hemiplegia, con inclusión de entumecimiento, déficit sensorial, disfasia, ceguera, diplopia, desvanecimiento, y disartria.

Los pacientes que sufren un “accidente cerebrovascular agudo”, o cualquier otra forma de lesión cerebral isquémica, se recuperan usualmente en parte, pero a menudo quedan moderada a severamente debilitados. Por ejemplo, el infarto total de la arteria cerebral media en un humano da como resultado hemiplegia contralateral, hemi-anestesia, hemianopia homónima, afasia sensorimotora global o total (hemisferio izquierdo), y apractagnosia (hemisferio derecho). Una vez establecidos, los déficits motores, sensoriales y de lenguaje quedan usualmente estáticos o mejoran muy poco después del paso de meses o incluso años. Rara vez el paciente puede volver a comunicarse eficazmente. En la actualidad, aparte de la terapia física, no existe tratamiento alguno que mejore fiablemente la pronóstico de un paciente que ha sufrido un accidente cerebrovascular agudo o cualquier lesión análoga del sistema nervioso central.

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida al uso de un morfogén para la fabricación de un medicamento destinado a mejorar la recuperación de la función del sistema nervioso central como se define en las reivindicaciones adjuntas. La mejora clínicamente relevante puede comprender desde una mejora detectable a un restablecimiento completo de una función del sistema nervioso central deteriorada o perdida.

En particular, la invención es útil en tratamientos para mamíferos en los cuales el tejido del sistema nervioso central se ha deteriorado o perdido debido a accidente cerebrovascular agudo o a una interrupción análoga en el flujo de sangre. Los usos proporcionados en esta memoria capitalizan el descubrimiento de que la administración de un morfogén a dicho mamífero proporciona una mejora significativa en la función del sistema nervioso central, aun cuando se administre después que el tejido del sistema nervioso central se ha deteriorado. El uso implica proteínas dímeras definidas como morfogenes, inductores de estos morfogenes, o agonistas de los receptores de morfogenes correspondientes, o la implantación de células estimuladas por exposición a los morfogenes.

De acuerdo con ello, la invención caracteriza el uso de un morfogén en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que ha sufrido una lesión en el sistema nervioso central, tal como un accidente cerebrovascular agudo. Se puede administrar una dosis eficaz de medicamento al mamífero al menos seis horas después de la aparición de la lesión, por ejemplo, 12, 24, o 48 horas o incluso más tiempo después de la aparición de la lesión.

El régimen de tratamiento se lleva a cabo en términos de modo de administración, tiempo de la administración, y dosificación, de tal manera que la recuperación funcional del deterioro del sistema nervioso central se mejora. Los medicamentos preparados de acuerdo con la presente invención contendrán cantidades terapéuticamente eficaces del morfogén, inductores del morfogén o agonistas de los receptores del morfogén. Es decir, los medicamentos contendrán una cantidad que proporciona concentraciones apropiadas del agente al tejido afectado del sistema nervioso durante un tiempo suficiente para estimular un restablecimiento detectable de la función del sistema nervioso central, hasta y con inclusión de un restablecimiento completo del mismo. La cantidad eficaz de morfogén puede proporcionarse en una sola administración, en dos administraciones o en una pluralidad de administraciones. En los casos en que se proporciona la cantidad eficaz de morfogén en una pluralidad de administraciones, el morfogén se administra con preferencia al mamífero diariamente. En una realización preferida alternativa, el morfogén se administra al mamífero bisemanalmente (v.g., cada tres o cuatro días). En otra realización alternativa preferida, el morfogén se administra al mamífero una vez a la semana.

La invención puede utilizarse para tratar las consecuencias adversas de lesiones de isquemia del sistema nervioso central que son resultado de una diversidad de condiciones. Los trombos, coágulos, e hipotensión sistémica se encuentran entre las causas más comunes de un accidente cerebrovascular agudo. Otras lesiones de isquemia pueden estar causadas por hipertensión, enfermedad cerebral vascular hipertensiva, ruptura de un aneurisma, un angioma, discrasia sanguínea, insuficiencia cardíaca, parada cardíaca, choque cardiogénico, insuficiencia renal, choque séptico, traumatismo craneal, traumatismo de la médula espinal, convulsión, hemorragia procedente de un tumor, u otra pérdida de volumen y/o presión sanguínea. La administración de un morfogén de acuerdo con la invención confiere un beneficio clínico significativo, incluso cuando la administración tiene lugar un periodo importante de tiempo después de la lesión.

Generalmente, los morfogenes útiles en la invención son proteínas dímeras que inducen morfogénesis de una o más células, tejidos u órganos eucariotas (v.g., de mamífero). De interés particular en esta memoria son los morfogenes que inducen morfogénesis al menos de tejido óseo o neural. Los morfogenes comprenden un par de polipéptidos que, una vez plegados, adoptan una configuración suficiente para que la proteína dímera resultante suscite respuestas morfogenéticas en células y tejidos que exhiben receptores específicos para dicho morfogén. Es decir, los morfogenes inducen generalmente una cascada de sucesos que incluye la totalidad de los siguientes en un entorno morfogénicamente permisivo: estimulación de la proliferación de células progenitoras; estimulación de la diferenciación de células progenitoras; estimulación de la proliferación de células diferenciadas; y soporte del crecimiento y mantenimiento de células diferenciadas. Las células “progenitoras” son células no comprometidas que son competentes para diferenciarse en uno o más tipos específicos de células diferenciadas, dependiendo de su repertorio genómico y de la

especificidad tisular del entorno permisivo en el cual se induce la morfogénesis. Los morfogenes pueden retardar o mitigar adicionalmente la aparición de la pérdida del fenotipo y/o la función tisular asociada a la senescencia o a la inactividad. Los morfogenes pueden, aún más, estimular la expresión fenotípica de células diferenciadas, con inclusión de la expresión de las propiedades metabólicas y/o funcionales, v.g., secretoras de las mismas. Adicionalmente,

5 los morfogenes pueden inducir la rediferenciación de células comprometidas en condiciones de entorno apropiadas. Como se ha indicado anteriormente, los morfogenes que inducen la proliferación y/o diferenciación de al menos un tejido neural, y/o soportan el crecimiento, el mantenimiento y/o las propiedades funcionales del tejido neural, son particularmente interesantes en esta invención. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/15323, WO 93/04692 y WO 94/03200 para exposiciones más detalladas en cuanto a las propiedades morfogenes tisulares de estas proteínas.

10 Tal como se utilizan en esta memoria, los términos "morfogén", "morfogén óseo", "proteína morfogénica ósea", "BMP", "proteína morfogénica" y "proteína morfogenética" abarcan todos ellos la clase de proteínas tipificadas por la proteína osteogénica-1 humana (hOP-1). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para hOP-1 se proporcionan en SEQ ID Nos: 4 y 5, respectivamente. Para facilidad de descripción, la hOP-1 se cita en esta memoria más adelante

15 como una proteína osteogénica representativa. No obstante, será apreciado por el experto que posea una experiencia ordinaria en la técnica, que OP-1 es meramente representativa de la subclase TGF- β de morfogenes tisulares verdaderos competentes para actuar como proteínas morfogenéticas, y no tiene por objeto limitar la descripción. Otras proteínas conocidas y útiles incluyen BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-15, GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, NEURAL y variantes de aminoácidos morfogénicamente activos de las mismas. Así, en una realización, proteínas morfogénicas preferidas incluyen, pero sin carácter limitante, OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5, y BMP-6. Adicionalmente, como será apreciado por los expertos que posean una experiencia ordinaria en la técnica, una cualquiera de las proteínas morfogénicas citadas en esta memoria podría utilizarse también como secuencia de referencia.

25 En otra realización preferida dentro de las reivindicaciones, las proteínas útiles en la invención incluyen variantes de especies biológicamente activas (filogenéticas) de cualquiera de las proteínas citadas en las reivindicaciones, con inclusión de variantes conservadoras de secuencias de aminoácidos, proteínas codificadas por variantes de secuencias nucleotídicas degeneradas, y proteínas morfogénicamente activas que comparten el esqueleto conservado de siete cisteínas que se define en esta memoria y que es codificado por una secuencia de DNA competente para hibridarse en condiciones estándar de severidad para dar una secuencia de DNA que codifica una proteína morfogénica descrita en esta memoria, incluyendo, sin limitación, OP-1 y BMP-2 o BMP-4. En una realización preferida, la secuencia de referencia es OP-1.

30 En otra realización adicional, los morfogenes útiles en la invención pueden definirse como proteínas morfogénicamente activas que tienen una cualquiera de las secuencias genéricas definidas en esta memoria, con inclusión de OPX. OPX contiene las homologías entre las diversas especies de las proteínas osteogénicas OP-1 y OP-2, y está descrito por la secuencia de aminoácidos presentada más adelante en esta memoria y en SEQ ID No: 3. Con fines ilustrativos, la secuencia Genérica 9 es una secuencia de 96 aminoácidos que contiene el esqueleto de seis cisteínas definido por hOP-1 (residuos 335-431 de SEQ ID No: 5) y en la cual los residuos restantes contienen las homologías de OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-15, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, UNIVIN, NODAL, DORSALIN, NEURAL, SCREW y ADMP. Es decir, cada uno de los residuos distintos de cisteína se selecciona independientemente del residuo correspondiente en este grupo de proteínas citado. Con fines ilustrativos, la secuencia Genérica 10 es una secuencia de 102 aminoácidos que incluye una secuencia de 5 aminoácidos añadida al término N de la secuencia genérica 9 y define el esqueleto de siete cisteínas definido por hOP-1 (330-431, SEQ ID No: 5). Con fines ilustrativos, las secuencias Genéricas 7 y 8 son secuencias de 96 y 102 aminoácidos, respectivamente, que contienen o bien el esqueleto de seis cisteínas (Secuencia Genérica 7) o el esqueleto de siete cisteínas (Secuencia Genérica 8) definido por hOP-1 y en el cual los residuos restantes distintos de cisteína contienen las homologías de: OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 y GDF-1.

45 Como se contempla en esta memoria, la familia de proteínas morfogénicas descritas en esta memoria incluye formas más largas de una proteína dada, así como variantes de especies filogenéticas, v.g. variantes de especies y variantes alélicas, y mutantes biosintéticos, con inclusión de mutantes y variantes por adición y delección en el terminal C, tales como aquéllos que pueden alterar el esqueleto conservado de cisteínas C-terminales, con tal que la alteración permita todavía que la proteína forme una especie dímera que tenga una conformación capaz de inducir formación de tejido neural en un mamífero cuando se proporciona a un sitio morfogénicamente permisivo en un mamífero. Adicionalmente, las proteínas morfogénicas útiles en la invención pueden incluir formas que tienen patrones de glicosilación variables y términos N variables, pueden ser existentes naturalmente o derivadas por biosíntesis, y pueden producirse por expresión de DNA recombinante en células huésped procariotas o eucariotas. Las proteínas son activas como una especie individual (v.g., como homodímeros, con inclusión de quimeras), o combinadas como una especie mixta, con inclusión de heterodímeros.

50 De interés particular en esta memoria son los morfogenes que, cuando se proporcionan al tejido neural de un mamífero, inducen o mantienen el estado normal de diferenciación y crecimiento de dicho tejido. En una realización demostrativa preferida actualmente, los presentes morfogenes inducen o reinducen una cascada de desarrollo de sucesos celulares y moleculares que culmina en la formación de tejido del sistema nervioso central de los vertebrados. En otras realizaciones demostrativas preferidas, los presentes morfogenes inducen análogamente la formación de otros te-

jidos corporales de vertebrados (v.g. de aves o de mamíferos), tales como, pero sin carácter limitante, hueso, cartílago, médula ósea, ligamento, dentina dental, periodontio, hígado, riñón, pulmón, corazón o revestimiento gástrico-intestinal. Las presentes demostraciones pueden realizarse en el contexto de tejido embrionario en desarrollo, o en un sitio de herida aséptica sin cicatrizar en tejido post-embriónico. Los morfogenes particularmente preferidos inducen o desencadenan una cascada patrón de formación en un embrión de mamífero o ave en desarrollo que culmina en la formación de uno o más elementos del sistema nervioso central o periférico integrados funcionalmente. Tales morfogenes pueden ser utilizados para tratar un mamífero afectado de lesión isquémica del sistema nervioso central.

Una concentración “eficaz” es suficiente para promover la regeneración o el mantenimiento de tejido neural y/o inhibir la pérdida adicional del mismo. Los morfogenes endógenos o administrados pueden actuar como factores endocrinos, paracrinos o autocrinos. Es decir, los morfogenes endógenos pueden ser sintetizados por las células en las cuales se inducen las respuestas morfogenéticas, por células vecinas, o por células de un tejido distante, en cuyo caso el morfogén endógeno secretado es transportado al sitio de morfogénesis, v.g., por el torrente sanguíneo del individuo.

Los morfogenes útiles en la invención se pueden administrar por cualquier vía de administración que sea compatible con el agente seleccionado, con inclusión de las vías intravenosa, subcutánea, intramuscular, oftálmica, intraperitoneal, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, oral, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intransal o administración por aerosol, y pueden formularse con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado para la vía de administración. Adicionalmente, diversos factores de crecimiento, hormonas, enzimas, composiciones terapéuticas, antibióticos, u otros agentes bioactivos pueden co-administrarse con el morfogén. Así, diversos factores de crecimiento conocidos, tales como NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α , TGF- β , así como enzimas, inhibidores enzimáticos y/o factores quimioatrayentes/quimiotácticos, pueden combinarse con el morfogén y suministrarse al lugar del defecto.

El uso de un morfogén para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la invención estimula ventajosamente el restablecimiento de la función del sistema nervioso central incluso cuando se efectúa horas, o incluso días, después de una lesión isquémica del sistema nervioso central. La invención mejora así significativamente las opciones de tratamiento disponibles cuando se produce una lesión isquémica del sistema nervioso central y no se diagnostica o se trata antes de la muerte del tejido implicado.

Los métodos, materiales y ejemplos preferidos que se describirán a continuación son simplemente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente, y de las reivindicaciones.

35 Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 presenta la identidad de secuencia de aminoácidos porcentual y homología porcentual de la secuencia de aminoácidos (“semejanza”) que comparten y diversos miembros de la familia de proteínas morfogénicas que se definen en esta memoria con OP-1 en el dominio C-terminal de siete cisteínas;

las Figs. 2A-2B son gráficos de líneas que representan registros de colocación de los miembros anteriores (2A) y colocación de los miembros posteriores (2B) de miembros afectados (izquierdos) de animales tratados con OP-1 (10 mg/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en 8 inyecciones = 80 mg/animal; N = 7; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 7, cuadrados vacíos);

las Figs. 3A-3B son gráficos de líneas que representan registros del balancín de equilibrio (3A) y del reflejo postural (3B) en animales tratados con OP-1 (10 mg/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en 8 inyecciones = 80 mg/animal; N = 7; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 7 animales, cuadrados vacíos);

la Fig. 4 es un gráfico de líneas que representa el peso corporal de animales tratados con OP-1 (10 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en 8 inyecciones: 80 μ g/animal; N = 7; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 7; cuadrados vacíos);

las Figs. 5A-5B son gráficos de líneas que representan los registros de colocación de los miembros anteriores sin (5A) y con (5B) colocación de los bigotes de los miembros afectados (izquierdos) de animales tratados con OP-1 a dosis alta (10 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en dos inyecciones N = 20 μ g/animal; N = 9 animales, cuadrados llenos), animales tratados con OP-1 a dosis baja (1 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en dos inyecciones: 2 μ g/animal; N = 8 animales; cuadrados vacíos), y animales tratados con vehículo (N = 9, círculos vacíos);

la Fig. 6 es un gráfico de líneas que representa registros de colocación de los miembros posteriores de los miembros afectados (izquierdos) de animales tratados con OP-1 a dosis alta (10 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en dos inyecciones = 20 μ g/animal; N = 9 animales; cuadrados llenos), animales tratados con OP-1 a dosis baja (1 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en dos inyecciones = 2 μ g/animal; N = 8 animales; cuadrados vacíos), y animales tratados con vehículo (N = 9, círculos vacíos);

la Fig. 7 es un gráfico de líneas que representa el peso corporal de animales tratados con OP-1 a dosis alta (10 μ g/inyección intracisternal; OP-1 total suministrada en dos inyecciones = 20 μ g/animal; N = 9 animales; cuadrados

ES 2 201 287 T5

llenos), animales tratados con OP-1 a dosis baja ($1 \mu\text{g}$ /inyección intracisternal; OP-1 total suministrada = $2 \mu\text{g}$ en dos inyecciones/animal; N = 8 animales; cuadrados vacíos) y animales tratados con vehículo (N = 9, círculos vacíos);

5 las Figs. 8A-8B son gráficos de líneas que representan registros de colocación de los miembros anteriores sin (8A) y con colocación (8B) de los bigotes de los miembros afectados (izquierdos) de animales tratados con OP-1 ($10 \mu\text{g}$ /inyección intracisternal; J = 6 animales; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 8, cuadrados vacíos);

10 la Fig. 9 es un gráfico de líneas que representa los registros de colocación de los miembros posteriores de los miembros afectados (izquierdos) de animales tratados con OP-1 ($10 \mu\text{g}$ /inyección intracisternal; N = 6 animales; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 8, cuadrados vacíos); y

15 la Fig. 10 es un gráfico de líneas que representa el peso corporal de los animales tratados con OP-1 ($10 \mu\text{g}$ /inyección intracisternal; N = 6 animales; cuadrados llenos) y animales tratados con vehículo (N = 8, cuadrados vacíos).

15 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A. General

20 La presente invención depende, en parte, del descubrimiento sorprendente de que la recuperación funcional subsiguiente a un accidente isquémico del sistema nervioso central se aumenta significativamente por la administración de un morfogén, incluso cuando se administra después que el tejido afectado ha sucumbido a la lesión y después que la función del sistema nervioso central se ha deteriorado o perdido. De modo sumamente sorprendente, la práctica de la invención no afecta (v.g., reduce) el volumen o la extensión del tejido afectado (infartado). Así pues, la invención se capitaliza en el descubrimiento de que el restablecimiento funcional de la coordinación motora del sistema nervioso central puede lograrse a pesar de la pérdida de tejido que ocupaba originalmente el lugar de un accidente cerebrovascular agudo. El restablecimiento significativo (detectable; clínicamente relevante) de la función de coordinación motora del CNS puede obtenerse incluso con una sola administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un morfogén.

30 La invención caracteriza el uso de un morfogén para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un mamífero que ha sufrido una lesión isquémica del sistema nervioso central, tal como una lesión por accidente cerebrovascular agudo. Se puede llevar a cabo la administración de un morfogén al mamífero afectado al menos seis horas después de la aparición de la lesión, por ejemplo 12, 24, 48 horas, o incluso más tiempo después de la lesión. No se ha establecido todavía un tiempo final práctico en la ventana terapéutica en la que puede practicarse la invención. La invención puede utilizarse para tratar una o más consecuencias adversas de una lesión isquémica del sistema nervioso central que surjan a consecuencia de una diversidad de condiciones. Trombos, coágulos, e hipotensión sistémica se encuentran entre las causas más comunes del accidente cerebro vascular agudo. Otras lesiones isquémicas pueden estar causadas por hipertensión, enfermedad vascular cerebral hipertensiva, ruptura de un aneurisma, un angioma, discrasia sanguínea, insuficiencia cardíaca, parada cardíaca, choque cardiogénico, insuficiencia renal, choque séptico, traumatismo craneal, traumatismo de la médula espinal, convulsión, hemorragia procedente de un tumor, u otra pérdida de volumen o presión sanguínea. Estas lesiones conducen a la interrupción de la función fisiológica, la muerte de neuronas subsiguiente, y la necrosis (infarto) de las áreas afectadas. El término “accidente cerebrovascular agudo” connota los déficits neurológicos bruscos y espectaculares resultantes asociados con cualquiera de las lesiones que anteceden.

45 Los términos “isquemia” o “episodio isquémico”, tal como se utilizan en esta memoria, significan cualquier circunstancia que dé como resultado un suministro deficiente de sangre a un tejido. Así, un episodio isquémico del sistema nervioso central es resultado de una insuficiencia o interrupción en el suministro de sangre a un lugar del encéfalo tal como, pero sin carácter limitante, un lugar del cerebro, cerebelo o tallo cerebral. La médula espinal, que forma también parte del sistema nervioso central, es igualmente susceptible de isquemia como resultado del flujo sanguíneo disminuido. Un episodio isquémico puede estar causado por un estrangulamiento u obstrucción de un vaso sanguíneo, 50 como sucede en el caso de un trombo o coágulo. Alternativamente, el episodio isquémico puede ser resultado de cualquier forma de función cardíaca comprometida, con inclusión de parada cardíaca, como se describe anteriormente. En los casos en que la deficiencia es suficientemente grave y prolongada, puede conducir a la interrupción de la función fisiológica, la muerte subsiguiente de neuronas y la necrosis (infarto) de las áreas afectadas. La extensión y el tipo de anormalidad neurológica resultante de la lesión dependen de la localización y el tamaño del infarto o el foco de isquemia. En los casos en que la isquemia está asociada a un accidente cerebrovascular agudo, la misma puede tener una extensión global o focal.

60 La expresión “isquemia focal”, tal como se utiliza en esta memoria con referencia al sistema nervioso central, significa la condición que resulta del bloqueo de una sola arteria que suministra sangre al cerebro o la médula espinal, dando como resultado la muerte de todos los elementos celulares (pan-necrosis) en el territorio suministrado por dicha arteria.

65 La expresión “isquemia global”, tal como se utiliza en esta memoria con referencia al sistema nervioso central, significa la condición que se produce como resultado de una disminución general de flujo sanguíneo al encéfalo total, al prosencéfalo, o a la médula espinal, que causa la muerte retardada de neuronas, particularmente aquéllas que se encuentran en lugares metabólicamente activos, a todo lo largo de estos tejidos. La patología en cada uno de estos casos es muy diferente, como lo son correlatos clínicos. Los modelos de isquemia focal se aplican a pacientes con infarto cerebral focal, mientras que los modelos de isquemia global son análogos a la parada cardíaca, y otras causas de hipotensión sistémica.

B. Propiedades Bioquímicas, Estructurales y Funcionales de las Proteínas Morfogénicas Útiles

Como se ha indicado anteriormente, una proteína es morfogénica como se define en esta memoria si induce la cascada de desarrollo de sucesos celulares y moleculares que culminan en la formación de nuevo tejido orgánicamente específico. Los morfogenes son generalmente competentes para inducir una cascada de sucesos que incluye la totalidad de los siguientes, en un entorno morfogénicamente permisivo: estimulación de la proliferación de células progenitoras; estimulación de la diferenciación de células progenitoras; estimulación de la proliferación de células diferenciadas; y soporte del crecimiento y mantenimiento de células diferenciadas. En condiciones apropiadas, los morfogenes son competentes también para inducir la rediferenciación de células comprometidas, particularmente de células que se han extraviado de su camino de diferenciación “normal”. Detalles del modo en que los morfogenes útiles en esta invención fueron identificados por primera vez, así como una descripción del modo de producir, utilizar y ensayar los mismos en relación con la actividad morfogénica se exponen en numerosas publicaciones, que incluyen los documentos U.S. 5.011.691 y 5.266.683, y las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 92/15323; WO 93/04692; y WO 94/03200. Como se describe en dichos lugares, los morfogenes pueden purificarse a partir de material procedente de fuentes naturales o producirse por recombinación a partir de células huésped procariotas o eucariotas, utilizando las secuencias genéticas descritas en dichos documentos. Alternativamente, pueden identificarse secuencias morfogénicas nuevas siguiendo los procedimientos que se describen en dichos lugares.

Las proteínas existentes naturalmente identificadas y/o apreciadas en esta memoria como proteínas morfogénicas tisulares verdaderas y útiles en los métodos y composiciones de la invención forman un subgrupo diferenciado dentro de la agrupación evolutiva imprecisa de proteínas afines por la secuencia conocida como la superfamilia o familia de supergenes TGF- β . Los morfogenes existentes naturalmente comparten homología sustancial de secuencia de aminoácidos en sus regiones (dominios) C-terminales. Típicamente, los morfogenes existentes naturalmente mencionados con anterioridad se traducen como un precursor, que tiene una secuencia de péptido de señal N-terminal, típicamente de longitud menor que aproximadamente 35 residuos, seguida por un dominio “pro” que se escinde para dar la proteína madura, que incluye el dominio C-terminal biológicamente activo. El péptido de señal se escinde rápidamente después de la traducción, en un sitio de escisión que puede predecirse en una secuencia dada utilizando el método de Von Heijne (1986) *Nucleic Acids Research* 14, 4683-4691. El dominio pro es aproximadamente tres veces mayor que el dominio C-terminal maduro totalmente procesado. En condiciones naturales, la proteína se secreta como un dímero maduro y el dominio pro escindido puede asociarse con ella para formar un complejo proteínico, que presumiblemente mejora la solubilidad de la proteína dímera madura. Típicamente, la forma compleja de un morfogén es más soluble que la forma madura en condiciones fisiológicas.

La proteína morfogénica de fuentes naturales en su forma nativa madura, típicamente es un dímero glicosilado, que tiene típicamente un peso molecular aparente de aproximadamente 30-36 kDa como se determina por SDS-PAGE. Cuando se reduce, la proteína de 30 kDa da lugar a dos subunidades polipeptídicas glicosiladas que tienen pesos moleculares aparentes comprendidos en el intervalo de aproximadamente 16 kDa y 18 kDa. La proteína dímera no glicosilada, que tiene también actividad morfogénica, tiene típicamente un peso molecular aparente en el intervalo de aproximadamente 27 kDa. Cuando se reduce, la proteína de 27 kDa da lugar a dos polipéptidos no glicosilados que tienen pesos moleculares comprendidos típicamente en el intervalo de aproximadamente 14 kDa a 16 kDa.

En realizaciones preferidas, cada una de las cadenas polipeptídicas de una proteína morfogénica dímera como se define en esta memoria comprende una secuencia de aminoácidos que comparte una relación definida con una secuencia de aminoácidos de un morfogén de referencia. En una realización, las cadenas polipeptídicas morfogenes preferidas comparten una relación definida con una secuencia presente en la OP-1 humana morfogénicamente activa, SEQ ID NO: 5. Sin embargo, una cualquiera o más de las proteínas morfogénicas existentes naturalmente o procedentes de biosíntesis descritas en esta memoria podrían ser utilizadas análogamente como secuencia de referencia. Las cadenas de polipéptidos morfogénicos útiles en esta invención comparten una relación definida con al menos el dominio C-terminal de siete cisteínas de la OP-1 humana, residuos 330-431 de SEQ ID NO: 5. Es decir, las cadenas polipeptídicas preferidas en una proteína dímera con actividad morfogénica tisular comprenden cada una una secuencia que corresponde a una secuencia de referencia o es funcionalmente equivalente a la misma.

Secuencias funcionalmente equivalentes incluyen configuraciones funcionalmente equivalentes de residuos cisteína dispuestos dentro de la secuencia de referencia, con inclusión de inserciones o delecciones de aminoácidos que alteran la configuración lineal de estas cisteínas, pero no deterioran en un grado importante su relación en la estructura plegada de la proteína morfogénica dímera, con inclusión de su capacidad para formar tales enlaces disulfuro intra- o inter-cadenas que puedan ser necesarios para la actividad morfogénica. Por ejemplo, se han descrito morfogenes existentes naturalmente en los cuales está presente al menos una delección (de un solo residuo; BMP-2) o inserción (de cuatro residuos; GDF-1) interna pero no anula la actividad biológica. Secuencias funcionalmente equivalentes incluyen adicionalmente aquéllas en las cuales uno o más residuos de aminoácidos difieren del residuo correspondiente de una secuencia de referencia, v.g., el dominio C-terminal de siete cisteínas (al que se hace referencia también en esta memoria como el esqueleto conservado de siete cisteínas) de la OP-1 humana, con tal que esta diferencia no destruya la actividad morfogénica tisular. De acuerdo con ello, se prefieren sustituciones conservadoras e aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácidos que son “sustituciones conservadoras” para residuos correspondientes en una secuencia de referencia son aquéllos que son física o funcionalmente análogos a los residuos de referencia correspondientes, v.g. que tienen tamaño, forma, carga eléctrica y propiedades químicas análogas, con inclusión de la capacidad para formar enlaces covalentes o enlaces de hidrógeno, o ambos. Sustituciones conservadoras particularmente preferidas son aquéllas que satisfacen los criterios definidos para una mutación puntual

aceptada en Dayhoff *et al.*, (1978), *5 Atlas of Protein Sequence and Structure*, Suppl. Ed3, Cap. 22 (pp. 354-352), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. 20007, cuya doctrina se incorpora por referencia en esta memoria. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen: Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente la sustitución de un aminoácido por otro con características análogas, v.g. sustituciones dentro de los grupos siguientes: valina, glicina;

5 glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. La expresión “variación conservadora” incluye también el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido paterno no sustituido con tal que los anticuerpos generados para el polipéptido sustituido inmunorreaccionen también con el polipéptido no sustituido. Como se describe en otro lugar de esta memoria, la clase de proteínas morfogénicas útiles en la invención está tipificada por la proteína osteogénica humana (hOP-1). Otras proteínas morfogénicas útiles en la práctica de la invención incluyen las formas morfogénicamente activas de OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, DPP, Vgr, la proteína 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP-10, BMP-11, BMP-13, BMP-15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP o NEURAL y variantes de la secuencia de aminoácidos de las mismas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En una realización preferida actualmente, la proteína osteogénica incluye una cualquiera de: OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2,

10 BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, y variantes y homólogos de la secuencia de aminoácidos de las mismas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, con inclusión de homólogos de especie, de las mismas.

15 Publicaciones que describen estas secuencias, así como sus propiedades químicas y físicas, incluyen: *OP-1* y *OP-2*; U.S. 5.011.691, U.S. 5.266.683, Ozkaynak *et al.* (1990) *EMBO J.* 9: 2085-2093; *OP-3*: WO 94/10203 (PCT US93/10520); *BMP-2*, *BMP-3*, *BMP-4*: WO 88/00205, Wozney *et al.* (1988) *Science* 242: 1528-1534); *BMP-5* y *BMP-6*: Celeste *et al.* (1991) *PNAS* 87: 9843-9847; *Vgr-1*: Lyons *et al.* (1989) *PNAS* 86: 4554-4558, *DPP*: Padgett *et al.* (1987) *Nature* 325: 81-84; *Vg-1*: Weeks (1987) *Cell* 51: 861-867; *BMP-9*: WO 95/33830 (PCT/US95/07084); *BMP-10*: WO 94/26893 (PCT/US94/05290); *BMP-11*: WO 94/26892 (PCT/US94/05288); *BMP-12*: WO 95/16035 (PCT/US94/14030); *BMP-13*: WO 95/16035 (PCT/US94/14030); *GDF-1*: WO 92/00382 (PCT/US91/04096); y Lee *et al.* (1991) *PNAS* 88: 4250-4254; *GDF-8*: WO 94/21681 (PCT/US94/03019); *GDF-9*: WO 94/15966 (PCT/US94/00685); *GDF-10*: WO 95/10539 (PCT/US94/11440); *GDF-11*: WO 96/01845 (PCT/US95/08543); *BMP-15*: WO 96/36710 (PCT/US96/06540); *MP121*: WO 96/01316 (PCT/EP 95/02552); *GDF-5 (CDMP-1, MP52)*: WO 94/15249 (PCT/US94/00657) y WO 96/14335 (PCT/US94/12814) y WO 93/16099 (PCT/EP 93/00350); *GDF-6 (CDMP-2, BMP-13)*: WO 95/01801 (PCT/US94/07762) y WO 96/14335 y WO 95/10635 (PCT/US94/14030); *GDF-7 (CDMP-3, BMP-12)*: WO 95/10802 (PCT/US94/07799) y WO 95/10635 (PCT/US94/14030). En otra realización, proteínas útiles incluyen construcciones biosintéticas biológicamente activas, con inclusión de nuevas proteínas morfogénicas biosintéticas y proteínas químéricas diseñadas utilizando secuencias procedentes de dos o más morfogenes conocidos. Véanse también las construcciones biosintéticas expuestas en el documento U.S. Pat. 5.011.691, (v.g., COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7, y COP-16).

35 En ciertas realizaciones preferidas, proteínas morfogénicas útiles incluyen aquéllas en las cuales las secuencias de aminoácidos comprenden una secuencia que comparte al menos 60% de identidad de aminoácidos con la secuencia de referencia preferida de OP-1 humana, y todavía más preferiblemente al menos 65% de identidad de secuencia de aminoácidos con ella.

40 En ciertas realizaciones, un polipéptido que se sospeche es funcionalmente equivalente a un polipéptido morfogénico de referencia se alinea con el mismo utilizando el método de Needleman, *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453, implementado convenientemente por programas de ordenador tales como el programa Align (DNAstar, Inc.). Como se ha indicado anteriormente, lagunas internas e inserciones de aminoácidos en la secuencia candidato se ignoran para los propósitos de cálculo de la relación definida, expresada convencionalmente como un nivel de homología o identidad de la secuencia de aminoácidos, entre las secuencias candidato y de referencia. La expresión “homología de secuencia de aminoácidos” se entiende en esta memoria que incluye tanto identidad como semejanza de la secuencia de aminoácidos. Las secuencias homólogas comparten residuos de aminoácidos idénticos y/o análogos, en los cuales los residuos análogos son sustituciones conservadoras para o “mutaciones puntuales permitidas” de, los residuos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia alineada. Así pues, una secuencia polipeptídica candidata que comparte 60% de homología de aminoácidos con una secuencia de referencia es una en la cual cualquier 70% de los residuos alineados son idénticos a, o son sustituciones conservadoras de, los residuos correspondientes en una secuencia de referencia. En una realización actualmente preferida, la secuencia de referencia es OP-1.

55 La Fig. 1 expone la homología (semejanza) porcentual de secuencia de aminoácidos y la identidad porcentual dentro del dominio C-terminal de siete cisteínas de diversos miembros representativos de la familia TGF- β , utilizando OP-1 como la secuencia de referencia. Las homologías porcentuales indicadas en la figura se calculan con las secuencias alineadas siguiendo esencialmente el método de Needleman, *et al.*, (1970) *J. Mol. Biol.*, 48: 443-453, calculado utilizando el Programa Align (DNAstar, Inc.). Las inserciones y delecciones respecto a la secuencia del morfogén de referencia, en este caso el dominio C-terminal de siete cisteínas biológicamente activo o esqueleto de hOP-1, se ignoran para los propósitos de cálculo.

60 Como resulta evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica que revise las secuencias de las proteínas enumeradas en Fig. 1, pueden hacerse cambios significativos de aminoácidos con respecto a la secuencia de referencia en tanto que se retenga la actividad morfogénica. Por ejemplo, si bien la secuencia de la proteína GDF-1 comparte sólo aproximadamente 50% de identidad de aminoácidos con la secuencia de hOP-1 descrita en esta memoria, la secuencia de GDF-1 comparte más de 70% de homología de secuencia de aminoácidos con la secuencia de hOP-1, donde el término “homología” se define como anteriormente. Además, GDF-1 contiene una inserción de

ES 2 201 287 T5

4 aminoácidos (Gly-Gly-Pro-Pro) entre los dos residuos correspondientes a los residuos 372 y 373 de OP-1 (SEQ ID NO: 5). Análogamente, BMP-3 tiene un residuo “extra”, una valina, insertado entre los dos residuos correspondientes a los residuos 385 y 386 de hOP-1 (SEQ ID NO: 5). Asimismo, BMP-2 y BMP-4 han “perdido” ambos el residuo de aminoácido correspondiente al residuo 389 de OP-1 (SEQ ID NO: 5). Ninguna de estas “desviaciones” de la secuencia de referencia parece interferir con la actividad biológica.

En otras realizaciones preferidas, la familia de polipéptidos morfogénicos útiles en la presente invención, y sus miembros, están definidos por una secuencia genérica de aminoácidos. La Secuencia Genérica 7 (SEQ ID NO: 1) y la Secuencia Genérica 8 (SEQ ID NO: 2) se mencionan en esta memoria con fines ilustrativos solamente y se describen más adelante. Así, contienen las homologías compartidas entre los miembros de la familia de proteínas preferida identificados hasta la fecha, que incluyen al menos OP-1, OP-2, OP-3, CBMP-2A, CBMP-2B, BMP-3, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1, Y GDF-1. Las secuencias de aminoácidos para estas proteínas se describen en esta memoria y/o en la técnica, como se ha resumido anteriormente. Las secuencias genéricas incluyen tanto la identidad de aminoácidos compartida por estas secuencias en el dominio C-terminal, definido por los esqueletos de seis y siete cisteínas (Secuencias Genéricas 7 y 8, respectivamente), como los residuos alternativos para las posiciones variables dentro de la secuencia. Las secuencias genéricas proporcionan un esqueleto de cisteínas apropiado en el cual pueden formarse enlaces disulfuro inter- o intramoleculares, y contienen ciertos aminoácidos críticos que influyen probablemente en la estructura terciaria de las proteínas plegadas. Adicionalmente, las secuencias genéricas permiten una cisteína adicional en la posición 36 (Secuencia Genérica 7) o la posición 41 (Secuencia Genérica 8), abarcando con ello las secuencias morfogénicamente activas de OP-2 o OP-3.

Secuencia Genérica 7 (SEQ ID NO: 1)

25			Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa
			1				S		
	Xaa	Gly	Trp	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro
30			10					15	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Ala	Xaa	Tyr	Cys	Xaa
			20					25	
	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
35			30					35	
	Xaa	Xaa	Xaa	Asn	His	Ala	Xaa	Xaa	Xaa
			40					45	
	Xaa								
40			50					55	
	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa
			60					65	
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa
45			70					75	
	Xaa	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa
			80					85	
	Xaa	Met	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys
			90					95	

donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados definidos como sigue: “Res”. significa “residuo” y Xaa en res. 2 = (Tyr o Lys); Xaa en res. 3 = Val o Ile); Xaa en res. 4 = (Ser, Asp o Glu); Xaa en res. 6 = (Arg, Gln, Ser, Lys o Ala); Xaa en res. 7 = (Asp o Glu); Xaa en res. 8 = (Leu, Val, o Ile); Xaa en res. 11 = (Gln, Leu, Asp, His, Asn o Ser); Xaa en res. 12 = (Asp, Arg, Asn o Glu); Xaa en res. 13 = (Trp o Ser); Xaa en res. 14 = (Ile o Val); Xaa en res. 15 = (Ile o Val); Xaa en res. 16 = (Ala o Ser); Xaa en res. 18 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro o Arg); Xaa en res. 19 = (Gly o Ser); Xaa en res. 20 = (Tyr o Phe); Xaa en res. 21 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu o Gly); Xaa en res. 23 = (Tyr, Asn o Phe); Xaa en res. 26 = (Glu, His, Tyr, Asp, Gln, Ala, o Ser); Xaa en res. 28 = (Glu, Lys, Asp, Gln o Ala); Xaa en res. 30 = (Ala, Ser, Pro, Gln, Ile o Asn); Xaa en res. 31 = (Phe, Leu o Tyr); Xaa en res. 33 = (Leu, Val, o Met); Xaa en res. 34 = (Asn, Asp, Ala, Thr o Pro); Xaa en res. 35 = (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala o Lys); Xaa en res. 36 = (Tyr, Cys, His, Ser o Ile); Xaa en res. 37 = (Met, Phe, Gly o Leu); Xaa en res. 38 = (Asn, Ser o Lys); Xaa en res. 39 = (Hal, Ser, Gly o Pro); Xaa en res. 40 = (Thr, Leu, o Ser); Xaa en res. 44 = (Ile, Val o Thr); Xaa en res. 45 = (Val, Leu, Met o Ile); Xaa en res. 46 = (Gln o Arg); Xaa en res. 47 = (Thr, Ala o Ser); Xaa en res. 48 = (Leu o Ile); Xaa en res. 49 = (Val o Met); Xaa en res. 50 = (His, Asn o Arg); Xaa en res. 51 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala o Val); Xaa en res. 52 = (Ile, Met, Asn, Ala, Val, Gly o Leu); Xaa en res. 53 = (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly o Phe); Xaa en res. 54 = (Pro, Ser, o Val); Xaa en res. 55 = (Glu, Asp, Asn, Gly, Val, Pro o Lys); Xaa en res. 56 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Gly, Ile o His); Xaa en res. 57 = (Val, Ala o Ile); Xaa en res. 58 = (Pro o Asp); Xaa en res. 59 = (Lys, Leu o Glu); Xaa en res. 60 = (Pro, Val o Ala); Xaa en res. 63 = (Ala o Val); Xaa en res. 65 = (Thr, Ala o Glu); Xaa en res. 66 = (Gln, Lys, Arg o Glu); Xaa en res. 67 = (Leu, Met o Val); Xaa en res. 68 = (Asn, Ser, Asp, o Gly); Xaa en res. 69 = (Ala, Pro o Ser); Xaa en res. 70 = (Ile, Thr, Val o Leu); Xaa en res. 71 = (Ser, Ala o Pro); Xaa en res. 72 = (Val,

ES 2 201 287 T5

Leu, Met o Ile); Xaa en res. 74 = (Tyr o Phe); Xaa en res. 75 = (Phe, Tyr, Leu o His); Xaa en res. 76 = (Asp, Asn o Leu); Xaa en res. 77 = (Asp, Glu, Asn, Arg o Ser); Xaa en res. 78 = (Ser, Gln, Asn, Tyr o Asp); Xaa en res. 79 = (Ser, Asn, Asp, Glu o Lys); Xaa en res. 80 = (Asn, Thr o Lys); Xaa en res. 82 (Ile, Val o Asn); Xaa en res. 84 = (Lys o Arg); Xaa en res. 85 = (Lys, Asn, Gln, His, Arg o Val); Xaa en res. 86 = (Tyr, Glu o His); Xaa en res. 87 = (Arg, Gln, Glu o Pro); Xaa en res. 88 = (Asn, Glu, Trp o Asp); Xaa en res. 90 = (Val, Thr, Ala o Ile); Xaa en res. 92 = (Arg, Lys, Val, Asp, Gln, o Glu); Xaa en res. 93 = (Ala, Gly, Glu o Ser); Xaa en res. 95 = (Gly o Ala) y Xaa en res. 97 = (His o Arg).

La Secuencia Genérica 8 (SEQ ID NO: 2) incluye la totalidad de la Secuencia Genérica 7 (SEQ ID NO: 1) e incluye adicionalmente la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 8) en su término N

10

SEQ ID NO: 8

15

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
	1			5

De acuerdo con ello, comenzando con el residuo 7, cada "Xaa" en la Secuencia Genérica 8 es un aminoácido especificado definido como para la Secuencia Genérica 7, con la distinción de que cada número de residuo descrito para la Secuencia Genérica 7 está desplazado por cinco en la Secuencia Genérica 8. Así, "Xaa" en res. 2 = (Tyr o Lys)"

20 en la Secuencia Genérica 7 se refiere a Xaa en res. 7 en la Secuencia Genérica 8. En la Secuencia Genérica 8, Xaa en res. 2 = (Lys, Arg, Ala o Gln); Xaa en res. 3 = (Lys, Arg o Met), Xaa en res. 4 = (His, Arg o Gln); y Xaa en res. 5 = (Glu, Ser, His, Gly, Arg, Pro, Thr, o Tyr).

Las Secuencias Genéricas 9 y 10 son secuencias compuestas de aminoácidos de las proteínas siguientes: OP-1 humana, OP-2 humana, OP-3 humana, BMP-2 humana, BMP-3 humana, BMP-4 humana, BMP-5 humana, BMP-6 humana, BMP-8 humana, BMP-9 humana, BMP-10 humana, BMP-11 humana, *Drosophila* 60A, Xenopus Vg-1, erizo de mar UNIVIN, CDMP-1 humana (GDF-5 de ratón), CDMP-2 humana (GDF-6 de ratón, BMP-13 humana), CDMP-3 humana (GDF-7 de ratón, BMP-12 humana), GDF-3 de ratón, GDF-1 humana, GDF-1 de ratón, DORSALIN de pollo, *Drosophila* dpp, *Drosophila* SCREW, NODAL de ratón, GDF-8 de ratón, GDF-8 humana, GDF-9 de ratón, GDF-10 de ratón, GDF-11 humana, GDF-11 de ratón, BMP-15 humana, y BMP-3b de rata. Análogamente a la Secuencia Genérica 7, la Secuencia Genérica 9 se muestra con fines ilustrativos y contiene el esqueleto C-terminal de seis cisteínas y, análogamente a la Secuencia Genérica 8, la Secuencia Genérica 10 contiene el esqueleto de siete cisteínas.

35

Secuencia Genérica 9 (SEQ ID NO: 6)

35

	Xaa									
	1				5					10
40	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa
					15					20
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa
45					25					30
	Xaa									
					35					40
50	Xaa									
					45					50
55	Xaa									
					55					60
	Xaa	Cys	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
60					65					70
	Xaa	Xaa	Leu	Xaa						
					75					80
	Xaa									
65					85					90
	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa			
				95						

ES 2 201 287 T5

donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados definidos como sigue: "Res". significa "residuo" y Xaa en res. 1 = (Phe, Leu, o Glu); Xaa en res. 2 = (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val o Glu); Xaa en res. 3 = (Val, Ile, Leu o Asp), Xaa en res. 4 = (Ser, Asp, Glu, Asn o Phe), Xaa en res 5 = (Phe o Glu); Xaa en res. 6 = (Arg, Gln, Lys, Ser, Glu, Ala o Asn); Xaa en res. 7 = (Asp, Glu, Leu, Ala o Gln); Xaa en res. 8 = (Leu, Val, Met, Ile o Phe); Xaa en res. 9 = (Gly, His o Lys); Xaa en res. 10 = (Trp o Met); Xaa en res. 11 = (Gln, Leu, His, Glu, Asn, Asp, Ser o Gly); Xaa en res. 12 = (Asp, Asn, Ser, Lys, Arg, Glu o His); Xaa en res. 13 = (Trp o Ser); Xaa en res. 14 = (Ile o Val); Xaa en res. 15 = (Ile o Val); Xaa en res. 16 = (Ala, Ser, Tyr o Trp); Xaa en res. 18 = (Glu, Lys, Gln, Met, Pro, Leu, Arg, His o Lys); Xaa en res. 19 = (Gly, Glu, Asp, Lys, Ser, Gln, Arg o Phe); Xaa en res. 20 = (Tyr o Phe); Xaa en res. 21 = (Ala, Ser, Gly, Met, Gln, His, Glu, Asp, Leu, Asn, Lys o Thr); Xaa en res. 22 = (Ala o Pro); Xaa en res. 23 = (Tyr, Phe, Asn, Ala o Arg); Xaa en res. 24 = (Tyr, His, Glu, Phe o Arg); Xaa en res. 26 = (Glu, Asp, Ala, Ser, Tyr, His, Lys, Arg, Gln o Gly); Xaa en res. 28 = (Glu, Asp, Leu, Val, Lys, Gly, Thr, Ala o Gln); Xaa en res. 30 = (Ala, Ser, Ile, Asn, Pro, Glu, Asp, Phe, Gln o Leu); Xaa en res. 31 = (Phe, Tyr, Leu, Asn, Gly o Arg); Xaa en res. 32 = (Pro, Ser, Ala, o Val); Xaa en res. 33 = (Leu, Met, Glu, Phe o Val); Xaa en res. 34 = (Asn, Asp, Thr, Gly, Ala, Arg, Leu o Pro); Xaa en res. 35 = (Ser, Ala, Glu, Asp, Thr, Leu, Lys, Gln o His); Xaa en res. 36 = (Tyr, His, Cys, Ile, Arg, Asp, Asn, Lys, Ser, Glu o Gly); Xaa en res. 37 = (Met, Leu, Phe, Val, Gly o Tyr); Xaa en res. 38 = (Asn, Glu, Thr, Pro, Lys, His, Gly, Met, Val o Arg); Xaa en res. 39 = (Ala, Ser, Gly, Pro o Phe); Xaa en res. 40 = (Thr, Ser, Leu, Pro, His o Met); Xaa en res. 41 = (Asn, Lys, Val, Thr o Gln); Xaa en res. 42 = (His, Tyr o Lys); Xaa en res. 43 = (Ala, Thr, Leu o Tyr); Xaa en res. 44 = (Ile, Thr, Val, Phe, Tyr, Met o Pro); Xaa en res. 45 = (Val, Leu, Met, Ile o His); Xaa en res. 46 = (Gln, Arg o Thr); Xaa en res. 47 = (Thr, Ser, Ala, Asn o His); Xaa en res. 48 = (Leu, Asn o Ile); Xaa en res. 49 = (Val, Met, Leu, Pro o Ile); Xaa en res. 50 = (His, Asn, Arg, Lys, Tyr o Gln); Xaa en res. 51 = (Phe, Leu, Ser, Asn, Met, Ala, Arg, Glu, Gly o Gln); Xaa en res. 52 = (Ile, Met, Leu, Val, Lys, Gln, Ala o Tyr); Xaa en res. 53 = (Asn, Phe, Lys, Glu, Asp, Ala, Gln, Gly, Leu o Val); Xaa en res. 54 = (Pro, Asn, Ser, Val o Asp); Xaa en res. 55 = (Glu, Asp, Asn, Lys, Arg, Ser, Gly, Thr, Gln, Pro o His); Xaa en res. 56 = (Thr, His, Tyr, Ala, Ile, Lys, Asp, Ser, Gly o Arg); Xaa en res. 57 = (Val, Ile, Thr, Ala, Leu o Ser); Xaa en res. 58 = (Pro, Gly, Ser, Asp o Ala); Xaa en res. 59 = (Lys, Leu, Pro, Ala, Ser, Glu, Arg o Gly); Xaa en res. 60 = (Pro, Ala, Val, Thr o Ser); Xaa en res. 61 = (Cys, Val o Ser); Xaa en res. 63 = (Ala, Val o Thr); Xaa en res. 65 = (Thr, Ala, Glu, Val, Gly, Asp o Tyr); Xaa en res. 66 = (Gln, Lys, Glu, Arg o Val); Xaa en res. 67 = (Leu, Met, Thr o Tyr); Xaa en res. 68 = (Asn, Ser, Gly, Thr, Asp, Glu, Lys o Val); Xaa en res. 69 = (Ala, Pro, Gly o Ser); Xaa en res. 70 = (Ile, Thr, Leu o Val); Xaa en res. 71 = (Ser, Pro, Ala, Thr, Asn o Gly); Xaa en res. 72 = (Val, Ile, Leu o Met); Xaa en res. 74 = (Tyr, Phe, Arg, Thr, Tyr o Met); Xaa en res. 75 = (Phe, Tyr, His, Leu, Ile, Lys, Gln o Val); Xaa en res. 76 = (Asp, Leu, Asn o Glu); Xaa en res. 77 = (Asp, Ser, Arg, Asn, Glu, Ala, Lys, Gly o Pro); Xaa en res. 78 = (Ser, Asn, Asp, Tyr, Ala, Gly, Met, Glu, Asn o Lys); Xaa en res. 79 = (Ser, Asn, Glu, Asp, Val, Lys, Gly, Gln o Arg); Xaa en res. 80 = (Asn, Lys, Thr, Pro, Val, Ile, Arg, Ser o Gln); Xaa en res. 81 = (Val, Ile, Thr o Ala); Xaa en res. 82 = (Ile, Asn, Val, Leu, Tyr, Asp o Ala); Xaa en res. 83 = (Leu, Tyr, Lys o Ile); Xaa en res. 84 = (Lys, Arg, Asn, Tyr, Phe, Thr, Glu o Gly); Xaa en res. 85 = (Lys, Arg, His, Gln, Asn, Glu o Val); Xaa en res. 86 = (Tyr, His, Glu o Ile); Xaa en res. 87 = (Arg, Glu, Gln, Pro o Lys); Xaa en res. 88 = (Asn, Asp, Ala, Glu, Gly o Lys); Xaa en res. 89 = (Met o Ala); Xaa en res. 90 = (Val, Ile, Ala, Thr, Ser o Lys); Xaa en res. 91 = (Val o Ala); Xaa en res. 92 = (Arg, Lys, Gln, Asp, Glu, Val, Ala, Ser o Thr); Xaa en res. 93 = (Ala, Ser, Glu, Gly, Arg o Thr); Xaa en res. 95 = (Gly, Ala o Thr); Xaa en res. 97 = (His, Arg, Gly, Leu o Ser). Adicionalmente, después de res. 53 en rBMP-3b y mGDF-10 existe un Ile; después de res. 54 en GDF-1 existe un T; después de res. 54 en BMP-3 existe un V; después de res. 78 en BMP-8 y Dorsalin existe un G; y después de res. 37 en hDGF-1 existe Pro, Gly, Gly, Pro.

La Secuencia Genérica 10 (SEQ ID NO: 7) se muestra con fines ilustrativos e incluye la totalidad de la Secuencia Genérica 9 (SEQ ID NO: 6) e incluye adicionalmente la secuencia siguiente (SEQ ID NO: 9) en su término N:

45

SEQ ID NO: 9

50

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

De acuerdo con ello, comenzando con el residuo 6, cada "Xaa" en la Secuencia Genérica 10 es un aminoácido especificado definido como para la Secuencia Genérica 9, con la distinción de que cada número de residuo descrito para la Secuencia Genérica 9 está desplazado en cinco en la Secuencia Genérica 10. Así, "Xaa en res. 1 = (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val o Glu)" en la Secuencia Genérica 9 se refiere a Xaa en res. 6 en la Secuencia Genérica 10. En la Secuencia Genérica 10, Xaa en res. 2 = (Lys, Arg, Gln, Ser, His, Glu, Ala o Cys); Xaa en res. 3 = (Lys, Arg, Met, Lys, Thr, Leu, Tyr o Ala); Xaa en res. 4 = (His, Gln, Arg, Lys, Thr, Leu, Val, Pro o Tyr); y Xaa en res. 5 = (Gln, Thr, His, Arg, Pro, Ser, Ala, Gln, Asn, Tyr, Lys, Asp o Leu).

60

Basándose en la alineación de los morfogenes existentes naturalmente dentro de la definición de la Secuencia Genérica 10, debería estar claro que pueden tolerarse lagunas y/o inserciones de uno o más residuos de aminoácidos (sin anulación de la actividad biológica) al menos entre o con implicación de los residuos 11-12, 42-43, 59-60, 68-69 y 83-84.

65

Como se ha indicado anteriormente, ciertas secuencias de polipéptidos morfogénicos actualmente preferidas útiles en esta invención tienen más de 60% de identidad, preferiblemente más de 65% de identidad, con la secuencia de aminoácidos que define la secuencia de referencia preferida de hOP-1. Estas secuencias particularmente preferidas incluyen variantes equivalentes alélicas y filogenéticas de las proteínas OP-1 y OP-2 dentro del alcance de las reivin-

ES 2 201 287 T5

dicaciones adjuntasG, con inclusión de la proteína 60A de *Drosophila*, así como las proteínas estrechamente afines BMP-5, BMP-6 y Vgr-1. De acuerdo con ello, en ciertas realizaciones particularmente preferidas, proteínas morfogénicas útiles incluyen proteínas activas que comprenden pares de cadenas de polipéptidos dentro de la secuencia genérica de aminoácidos a la que se hace referencia en esta memoria como "OPX" (SEQ ID NO: 3), que define el esqueleto de siete cisteínas y contiene las homologías entre varias variantes identificadas de OP-1 y OP-2. De acuerdo con ello, cada "Xaa" en una posición dada en OPX se selecciona independientemente de los residuos que existen en la posición correspondiente en la secuencia del C-terminal de OP-1 u OP-2 humana o de ratón. Específicamente, cada "Xaa" se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define a continuación:

10

	Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa Asp Trp
	1 5 10 15
	Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Xaa Phe Pro
	20 25 30 35
	Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa
	40 45 50 55
	Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala
	60 65 70
	Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Ile Leu Xaa Lys Xaa Arg
	75 80 85 90
	Asn Met Val Val Xaa Ala Cys Gly Cys His
	95 100

30 donde Xaa en res. 2 = (Lys o Arg); Xaa en res. 3 = (Lys o Arg); Xaa en res. 11 = (Arg o Gln); Xaa en res. 16 = (Gln o Leu); Xaa en res. 19 = (Ile o Val); Xaa en res. 23 = (Glu o Gln); Xaa en res. 26 = (Ala o Ser); Xaa en res. 35 = (Ala o Ser); Xaa en res. 39 = (Asn o Asp); Xaa en res. 41 = (Tyr o Cys); Xaa en res. 50 = (Val o Leu); Xaa en res. 52 = (Ser o Thr); Xaa en res. 56 = (Phe o Leu); Xaa en res. 57 = (Ile o Met); Xaa en res. 58 = (Asn o Lys); Xaa en res. 60 = (Glu, Asp o Asn); Xaa en res. 61 = (Thr, Ala o Val); Xaa en res. 65 = (Pro o Ala); Xaa en res. 71 = (Gln o Lys); Xaa en res. 73 = (Asn o Ser); Xaa en res. 75 = (Ile o Thr); Xaa en res. 60 = (Phe o Tyr); Xaa en res. 82 = (Asp o Ser); Xaa en res. 84 = (Ser o Asn); Xaa en res. 89 = (Lys o Arg); Xaa en res. 91 = (Tyr o His); y Xaa en res. 97 = (Arg o Lys).

40 En otra realización preferida adicional, las proteínas morfogénicamente activas útiles dentro del alcance de las reivindicaciones tienen cadenas polipeptídicas con secuencias de aminoácidos que comprenden una secuencia codificada por un ácido nucleico que se hibrida, en condiciones de hibridación de severidad baja, media o alta, a DNA o RNA que codifica secuencias de morfogenes de referencia, v.g., secuencias C-terminales que definen los dominios conservados de siete cisteínas de OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 60A, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7 y análogas. Tal como se utiliza en esta memoria, condiciones de hibridación de severidad alta se definen como hibridación de acuerdo con técnicas conocidas en formamida al 40%, 5 X SSPE, 5 X solución Denhardt, y 0,1% SDS a 37°C durante una noche, y lavado en 0,1 X SSPE, 0,1% SDS a 50°C. Las condiciones de severidad estándar están bien identificadas en los textos de clonación estándar de biología molecular. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a Edición, compilado por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (compilador D.N. Grover, 1985), *Oligonucleotide Synthesis* (compilador M.J. Gait, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (compiladores B.D. Hames & S.J. Higgins, 1984); y B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

50

55 De acuerdo con ello, las proteínas morfogénicas útiles en los materiales y métodos de esta invención pueden incluir proteínas que comprenden cualquiera de las cadenas polipeptídicas descritas anteriormente, sea aisladas a partir de fuentes existentes naturalmente, o producidas por DNA recombinante u otras técnicas de síntesis, e incluyen variantes equivalentes alélicas y filogenéticas de estas proteínas, así como variantes biosintéticas (mutéfnas) de las mismas, y diversas construcciones truncadas y de fusión. Los mutantes de delección o adición están contemplados también como activos, con inclusión de aquéllos que pueden alterar el dominio C-terminal conservado de seis o siete cisteínas, con la condición de que la alteración no interrumpa funcionalmente la relación de estas cisteínas en la estructura plegada. De acuerdo con ello, tales formas activas se consideran como equivalentes de las construcciones descritas específicamente que se exponen en esta memoria. Las proteínas pueden incluir formas que tienen patrones de glicosilación variables, términos N variables, una familia de proteínas afines que tienen regiones de homología de secuencia de aminoácidos, y formas activas truncadas o mutadas de proteínas naturales o biosintéticas, producidas por expresión de DNA recombinante en células huésped.

60 Las proteínas morfogénicas óseas contempladas en esta memoria pueden ser expresadas por cDNA intacto o truncado o por DNAs sintético en células huésped procariotas o eucariotas, y pueden purificarse, escindirse, replegarse, y dimerizarse para formar composiciones morfogénicamente activas. Células huésped preferidas actualmente incluyen, sin limitación, procariotas, con inclusión de *E. coli*, y eucariotas, con inclusión de levadura, y células de mamífero,

tales como células CHO, COS y BSC. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica apreciará que pueden utilizarse ventajosamente otras células huésped. Descripciones detalladas de las proteínas morfogénicas útiles en la práctica de esta invención, con inclusión del modo de producir, utilizar y ensayar las mismas en lo referente a actividad, se exponen en numerosas publicaciones, con inclusión de las citadas en esta memoria, cuyas descripciones 5 se incorporan por referencia en esta memoria. De acuerdo con ello, utilizando textos y procedimientos estándar de biología molecular, y el conocimiento disponible en la técnica, el técnico en ingeniería genética/biólogo molecular experto puede aislar genes a partir de cDNA o genotecas genómicas de diversas especies biológicas diferentes, que codifican secuencias de aminoácidos apropiadas, o construir DNAs a partir de oligonucleótidos, y puede expresarlos luego en diversos tipos de células huésped, con inclusión tanto de procariotas como de eucariotas, para producir 10 grandes cantidades de proteínas activas capaces de estimular la morfogénesis de tejido neural en un mamífero.

C. Mamíferos Elegibles para Tratamiento

Como cuestión general, la presente invención puede aplicarse al tratamiento de cualquier individuo mamífero 15 afectado con un accidente isquémico del sistema nervioso central. El método puede practicarse con mamíferos en los cuales el accidente isquémico se produjo al menos seis horas antes del comienzo del tratamiento, por ejemplo tanto como doce, veinticuatro o cuarenta y ocho horas o más antes del tratamiento. La práctica de la invención confiere un beneficio clínico significativo al mamífero afectado, en el sentido de que la invención confiere beneficiosalemente un restablecimiento detectable y clínicamente significativo de la función de coordinación motora del sistema nervioso 20 central como se define en esta memoria. La invención es adecuada para el tratamiento de cualquier primate, preferiblemente un primate superior tal como un humano. Adicionalmente, la invención puede emplearse en el tratamiento de mamíferos domesticados que se mantienen como animales de compañía de los humanos (v.g., perros, gatos, caballos), que tienen valor comercial significativo (v.g., cabras, cerdos, ovejas, ganado vacuno, animales para la práctica de deportes o de tiro), que tienen valor científico importante (v.g., especímenes cautivos o libres de especies en peligro, 25 o variedades de animales endogámicos o transformados por ingeniería genética), o que tienen valor por cualquier otra razón. Una persona con experiencia ordinaria en las técnicas médicas o veterinarias está entrenada para reconocer si un mamífero está afectado con una lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central. Por ejemplo, ensayos de rutina y/o evaluación de diagnóstico clínico o veterinaria revelarán si el mamífero ha sufrido un deterioro o pérdida 30 de una función del sistema nervioso central (v.g., neurológica). Indicaciones clínicas y no clínicas, así como la experiencia acumulada, con relación a los métodos de tratamiento descritos en esta memoria y otros métodos, deberían informar adecuadamente al técnico experto en cuanto a decidir si un individuo dado está afectado con una lesión isquémica del sistema nervioso central y si cualquier tratamiento particular es el más adecuado para las necesidades del individuo.

D. Formulaciones y Métodos de Tratamiento

Los morfogenes útiles en la invención pueden administrarse por cualquier ruta que sea compatible con el morfogén, inductor, o agonista particular empleado. Así, una administración apropiada puede ser oral o parenteral, con inclusión de las rutas de administración intravenosa e intraperitoneal. Adicionalmente, la administración puede hacerse por 40 inyecciones periódicas de un bolus del morfogén, inductor o agonista, o puede hacerse de modo más continuado por administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que puede ser externo (v.g., una bolsa i.v.) o interno (v.g. un implante bioerosionable, o una colonia de células implantadas productoras de morfogenes).

Los agentes terapéuticos útiles en la invención (v.g., morfogenes) pueden proporcionarse a un individuo por cualquier medio adecuado, directamente (v.g., localmente, como por inyección, implante o administración tópica a un lugar de tejido) o sistémicamente (v.g., por vía parenteral u oral). En los casos en que el agente debe proporcionarse por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, subcutánea, intramolecular, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o por administración en aerosol, el agente comprende preferiblemente parte de una solución acuosa. 45 La solución es fisiológicamente aceptable, de tal modo que, además del suministro del agente deseado al paciente, la solución no afecta desfavorablemente de ningún otro modo al balance de electrólitos y/o de volumen del paciente. Así, el medio acuoso para el agente puede comprender solución salina fisiológica normal (v.g., NaCl al 9,85%, 0,15M, pH 7-7,4).

55 Si se desea, un morfogén dado u otro agente puede hacerse más soluble por asociación con una molécula adecuada. Por ejemplo, la asociación del dímero del morfogén maduro con el dominio pro da como resultado la forma pro del morfogén que típicamente es más soluble o dispersable en soluciones fisiológicas que la forma madura correspondiente. De hecho, se cree que los morfogenes endógenos son transportados (v.g., secretados y circulados) en el cuerpo del mamífero en esta forma. La forma soluble de la proteína puede obtenerse a partir de un medio de cultivo de células de mamífero secretoras de morfogenes, v.g., células transfectadas con ácido nucleico codificante y competente para expresar el morfogén. Alternativamente, una especie soluble puede formularse por complejación del dímero del polipéptido maduro morfogénicamente activo (o un fragmento del mismo) con un dominio pro de morfogén o un fragmento del mismo mejorador de la solubilidad. Fragmentos de dominio pro de mejoradores de la solubilidad pueden ser cualquier fragmento N-terminal, C-terminal o interno de la región pro de un miembro de la familia de morfogenes que forma 60 complejos con el dímero del polipéptido maduro para mejorar la estabilidad y/o disolubilidad del complejo resultante no covalente o covalente. Típicamente, fragmentos útiles son los escindidos en el sitio proteolítico Arg-Xaa-Xaa-Arg. Una descripción detallada de formas complejas solubles de proteínas morfogénicas, que incluye el modo de producir, ensayar y utilizar las mismas, se describe en WO 94/03600 PCT/US93/07189). En el caso de OP-1, fragmentos de 65

ES 2 201 287 T5

dominio pro útiles incluyen el dominio pro intacto (residuos 30-292) y fragmentos 48-292 o 158-292, todos ellos de Se. ID No. 5. Otra molécula capaz de mejorar la solubilidad y particularmente útil para administraciones orales, es la caseína. Por ejemplo, la adición de 0,2% de caseína aumenta la solubilidad de la forma activa madura de OP-1 en un 80%. Otros componentes encontrados en la leche y/o diversas proteínas del suero pueden ser también útiles.

Soluciones útiles para administración parenteral pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, descritos, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Gennaro, A., compilador), Mack Pub., 1990. Formulaciones de los agentes terapéuticos de la invención pueden incluir, por ejemplo, polialquilen-glicoles tales como polietilen-glicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y análogos. Formulaciones para administración directa, en particular, pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad para contribuir al mantenimiento del agente en el locus deseado. Polímeros biocompatibles, preferiblemente bioreabsorbibles, que incluyen, por ejemplo, ácido hialurónico, colágeno, fosfato tricálcico, polibutirato, lactida, y polímeros de glicolida y copolímeros lactida/glicolida, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación del agente *in vivo*. Otros sistemas de suministro parenteral potencialmente útiles para estos agentes incluyen partículas de copolímeros etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para administración por inhalación contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones aceitosas que contengan, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril-éter, glicocolato y desoxicolato, o soluciones aceitosas para administración en la forma de gotas nasales, o como un gel para aplicación intranasal. Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir también glicocolato para administración bucal, metoxisalicilato para administración rectal, o ácido cútrico para administración vaginal. Los supositorios para administración rectal pueden prepararse también por mezcla del morfogén, inductor o agonista con un excipiente no irritante tal como manteca de cacao u otras composiciones que son sólidas a la temperatura ambiente y líquidas a las temperaturas del cuerpo.

Pueden prepararse formulaciones para administración tópica a la superficie de la piel por dispersión del morfogén, inductor o agonista con un vehículo dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, ungüento o jabón. Son particularmente útiles los vehículos capaces de formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir su eliminación. Para administración tópica a superficies de tejidos internos, el agente puede dispersarse en un adhesivo tisular líquido u otra sustancia conocida que mejore la adsorción a una superficie tisular. Por ejemplo, pueden utilizarse ventajosamente hidroxipropilcelulosa o soluciones de fibrinógeno/trombina. Alternativamente, pueden utilizarse soluciones de recubrimiento de tejidos, tales como formulaciones que contengan pectina.

Alternativamente, los agentes descritos en esta memoria pueden administrarse por vía oral. La administración oral de proteínas como material terapéutico no se practica generalmente, dado que la mayoría de las proteínas son fácilmente degradadas por las enzimas digestivas y los ácidos en el sistema digestivo de los mamíferos antes que puedan ser absorbidas en el torrente sanguíneo. En cambio, los morfogenes descritos en esta memoria son típicamente estables en medio ácido y resistentes a las proteasas (véase, por ejemplo, el documento U.S. Pat. No. 4.968.590). Adicionalmente, al menos un morfogén, OP-1 ha sido identificado en extracto de glándula mamaria, calostro y leche de 57 días. Además, el OP-1 purificado a partir de extracto de glándula mamaria es morfogénicamente activo y se detecta también en el torrente sanguíneo. La administración materna, por vía de la leche ingerida, puede ser una ruta de suministro natural de las proteínas de la superfamilia TGF- β . Letterio, *et al.* (1994), *Science* 264: 1936-1938, consignan que TGF- β está presente en la leche de murino, y que TGF- β radiomarcada es absorbida por la mucosa gastrointestinal de las formas juveniles lactantes. La TGF- β marcada ingerida aparece rápidamente en forma intacta en los tejidos corporales de las crías, con inclusión de pulmón, corazón e hígado. Finalmente, el morfogén en forma soluble, *v.g.*, el morfogén maduro asociado con el dominio pro, es morfogénicamente activo. Estos descubrimientos, así como los expuestos en los ejemplos que se dan más adelante, indican que la administración oral y parenteral son medios viables para administrar las proteínas de la superfamilia TGF- β , con inclusión de los morfogenes, a un individuo. Adicionalmente, si bien las formas maduras de ciertos morfogenes descritos en esta memoria son por lo general escasamente solubles, la forma de morfogén encontrada en la leche (así como el extracto de glándula mamaria y el calostro) es fácilmente soluble, probablemente por asociación de la forma madura, morfogénicamente activa con parte o la totalidad del dominio pro de la secuencia polipeptídica de longitud total expresada y/o por asociación con uno o más componentes de la leche. De acuerdo con ello, los compuestos proporcionados en esta invención pueden asociarse con moléculas capaces de mejorar su solubilidad *in vitro* o *in vivo*.

Los compuestos proporcionados por esta invención pueden asociarse también con moléculas capaces de dirigir el morfogén, inductor o agonista al tejido deseado. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, u otra proteína de fijación que interacciona específicamente con una molécula de la superficie de las células del tejido deseado. Moléculas de direccionamiento útiles pueden diseñarse, por ejemplo, utilizando la tecnología del sitio de fijación de una sola cadena expuesta, por ejemplo, en el documento U.S. Pat. No. 5.091.513. Las moléculas de direccionamiento pueden estar asociadas covalente o no covalentemente con el morfogén, inductor o agonista.

Como será apreciado por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, las composiciones formuladas contienen cantidades terapéuticamente eficaces del morfogén. Es decir, aquéllas contienen una cantidad que proporciona concentraciones apropiadas del agente al tejido del sistema nervioso afectado durante un tiempo suficiente para estimular un restablecimiento detectable de la función del sistema nervioso central, hasta y con inclusión de un restablecimiento total de la misma. Como será apreciado por los expertos en la técnica, estas concentraciones variarán dependiendo de varios factores, que incluyen la eficacia biológica del agente seleccionado, las características químicas (*v.g.*, carácter hidrófobo) del agente específico, la formulación del mismo, con inclusión de una mezcla con uno o más excipientes, la ruta de administración, y el tratamiento propuesto, con inclusión de si el ingrediente activo se adm-

nistrará directamente a un sitio tisular, o si se administrará sistémicamente. La dosificación preferida a administrar es probable que dependa también de variables tales como la condición de los tejidos enfermos o deteriorados, y del estado global de salud del mamífero particular. Como una cuestión general, son suficientes dosificaciones simples, diarias, bisemanales o semanales de 0,00001-1000 mg de un morfogén, siendo preferibles 0,0001-100 mg, y siendo 5 aún más preferible 0,001 a 10 mg. Como alternativa, se puede emplear ventajosamente una dosificación simple, diaria, bisemanal o semanal de 0,01-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, más preferiblemente 0,01-10 mg/kg de peso corporal. La dosis eficaz actual puede administrarse en una sola dosis o en una pluralidad (dos o más) de dosis parciales, según 10 se desee o se considere apropiado en las circunstancias específicas. Puede utilizarse una inyección de tipo bolus o formulación de infusión difusible. Si se desea, para facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, puede ser aconsejable la implantación de un "stent" (dilatador) (v.g., intravenoso, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular). En el Ejemplo 2 dado más adelante, la administración intracisternal de 6-240 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del morfogén de referencia (hOP-1) confería niveles claramente detectables de restablecimiento de la función deteriorada del sistema nervioso central. Debe indicarse que no se producen en ningún caso lesiones patológicas obvias inducidas por el morfogén cuando se 15 administra el morfogén maduro (v.g., OP-1, 20 mg) diariamente a ratas en crecimiento normal durante 21 días consecutivos. Además, las inyecciones sistémicas de 10 mg de morfogén (v.g., OP-1) inyectadas diariamente durante 10 días a ratones normales recién nacidos no producen anormalidad flagrante alguna.

Los morfogenes útiles en la invención pueden, por supuesto, administrarse solos o en combinación con otras moléculas que se sepa son beneficiosas en el tratamiento de las condiciones descritas en esta memoria. Por ejemplo, diversos 20 factores de crecimiento bien conocidos, hormonas, enzimas, composiciones terapéuticas, antibióticos, u otros agentes bioactivos pueden administrarse también con el morfogén. Así, diversos factores de crecimiento conocidos tales como NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α , y TGF- β , así como enzimas, inhibidores de enzimas, antioxidantes, agentes anti-inflamatorios, agentes de barrido de radicales libres, antibióticos y/o factores quimioatrayentes/quimiotácticos, 25 pueden incluirse en la presente formulación administrable de morfogén. Para facilitar la absorción por el tejido del sistema nervioso central, los morfogenes pueden derivatizarse o conjugarse a un resto lipófilo o a una sustancia que sea transportada activamente a través de la barrera hematoencefálica.

La práctica de la invención, con inclusión de aspectos y realizaciones preferidos adicionales de la misma, se comprenderá todavía más plenamente a partir de los ejemplos que siguen, que se presentan en esta memoria únicamente 30 para ilustración y no deben interpretarse como limitantes de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1

Preparación de Soluciones de Proteínas morfogénicas Solubles para Administración In Vivo

35 A. Soluciones Acuosas

Si bien las proteínas morfogénicas dímeras maduras definidas típicamente en esta memoria son sustancialmente 40 sólo escasamente solubles en los tampones fisiológicos, aquéllas pueden solubilizarse para formar soluciones inyectables. Una solución acuosa ilustrativa que contiene un morfogén puede prepararse, por ejemplo, disolviendo o dispersando el morfogén en etanol al 50% que contiene acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA) o HCl al 0,1%, o en un disolvente equivalente. Se añade luego un volumen de la solución resultante, por ejemplo, a 10 volúmenes de 45 solución salina tamponada con fosfato (PBS), que puede incluir adicionalmente 0,1-0,2% de seroalbúmina humana (HSA) o una proteína vehículo análoga. La solución resultante se agita tumultuosamente con preferencia durante un tiempo prolongado para producir una formulación de morfogén fisiológicamente aceptable.

En otra realización, el morfogén, con inclusión de OP-1, puede solubilizarse por reducción del pH de la solución. En una formulación preferida actualmente, la proteína se solubiliza en tampón de acetato 0,2 mM, de pH 4,5, que 50 contiene 5% de manitol, para hacer la solución más isotónica. Se contemplan otros medios estándar que están dentro de la experiencia en la técnica para crear formulaciones fisiológicamente aceptables.

B. Formulaciones de Complejos Solubles

Otra forma actualmente preferida del morfogén útil en esta invención, que tiene solubilidad mejorada en soluciones acuosas, es una proteína morfogénica dímera que comprende al menos el dominio C-terminal de siete cisteínas 55 característico de la familia de morfogenes, complejado con un péptido que comprende una región pro de un miembro de la familia de morfogenes, o un fragmento mejorador de la solubilidad de la misma, o una especie alélica u otra variante de secuencia de la misma. El fragmento mejorador de la solubilidad puede ser cualquier fragmento N-terminal o C-terminal de la región pro de un miembro de la familia de morfogenes que se compleja con el dímero del polipéptido maduro para mejorar la estabilidad del complejo soluble. Preferiblemente, la proteína morfogénica dímera 60 está complejada con dos péptidos de la región pro.

Como se describe anteriormente y en la solicitud publicada WO 94/03600, cuyas doctrinas se incorporan en esta memoria por referencia, la forma compleja soluble puede aislarla del medio de cultivo de células (o de un fluido corporal) en condiciones apropiadas. Alternativamente, el complejo puede formularse *in vitro*.

Complejos de morfogenes solubles pueden aislarla de medios acondicionados utilizando un protocolo cromatográfico simple de tres pasos realizado en ausencia de desnaturizantes. El protocolo implica hacer pasar el medio (o

el fluido corporal) por una columna de afinidad, seguido por cromatografías de intercambio iónico y de filtración con gel generalmente como se describe en WO 94/03600. La columna de afinidad descrita a continuación es una columna Zn-IMAC. El ejemplo utilizaba OP-1 y no tiene por objeto ser limitante. El presente protocolo tiene aplicabilidad general para la purificación de una diversidad de morfogenes, todos los cuales se prevé que pueden aislarse utilizando sólo modificaciones menores del protocolo descrito a continuación. Un protocolo alternativo que se considera tiene también utilidad incluye una columna de inmunoafinidad, creada utilizando procedimientos estándar y, por ejemplo, utilizando anticuerpos específicos para un dominio pro de un morfogén dado (complejado, por ejemplo, a una columna de Sepharose conjugada con proteína A). Protocolos para el desarrollo de columnas de inmunoafinidad están perfectamente descritos en la técnica (véase, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, M. Deutscher, compilador, Academic Press, San Diego, 1990, particularmente las secciones VII y XI de la misma).

En este ejemplo, OP-1 se expresó en células de mamífero (CHO, ovario de hámster chino) como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, la solicitud internacional US90/05903 (WO 91/05802). El medio acondicionado de células CHO que contiene 0,5% de FBS se purifica inicialmente utilizando Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC). El complejo OP-1 soluble procedente del medio acondicionado se fija muy selectivamente a la resina Zn-IMAC y se requiere una concentración alta de imidazol (imidazol 50 mM, pH 8,0) para la elución eficaz del complejo fijado. La OP-1 soluble purificada por Zn-IMAC se aplica a continuación a una columna de intercambio de acción de S-Sepharose equilibrada en NaPO₄ 20 mM (pH 7,0) con NaCl 50 mM. La proteína se aplica luego a una columna de Sephadryl S-200HR equilibrada en TBS. Utilizando sustancialmente el mismo protocolo, pueden aislarse también morfogenes solubles de uno o más fluidos corporales, con inclusión de suero, fluido cerebroespinal o fluido peritoneal.

En el complejo de OP-1 soluble se eluye con un peso molecular aparente en 110 kDa. Esto está perfectamente de acuerdo con la composición predicha del complejo de OP-1 soluble con un dímero maduro de OP-1 (35-36 kDa) asociado con dos dominios pro (39 kDa cada uno). La pureza del complejo final puede comprobarse haciendo pasar la fracción apropiada por un gel de poliacrilamida al 15% reducido.

Como una alternativa a la purificación de complejos solubles a partir de medios de cultivo o de un fluido corporal, pueden formularse complejos solubles a partir de dominios pro purificados y especies dímeras maduras. La formación satisfactoria de los complejos requiere aparentemente asociación de los componentes en condiciones desnaturalizantes suficientes para relajar la estructura plegada de estas moléculas, sin afectar a los enlaces disulfuro. Preferiblemente, las condiciones desnaturalizantes imitan el entorno de una vesícula intracelular suficientemente para que el dominio pro escindido tenga una oportunidad de asociarse con la especie dímera madura en condiciones de plegado relajadas. La concentración del desnaturalizante en la solución se reduce de nuevo de una manera controlada, preferiblemente de modo escalonado, a fin de permitir el replegado apropiado del dímero y las regiones pro al tiempo que se mantiene la asociación del dominio pro con el dímero. Desnaturalizantes útiles incluyen urea o hidrocloruro de guanidina (GuHCl) 4-6 M, en soluciones tamponadas de pH 4-10, preferente pH 6-8. El complejo soluble se forma luego por dialización controlada o dilución en una solución que tiene una concentración final de desnaturalizante menor que urea o GuHCl 0,1-2 M, preferiblemente urea o GuHCl 1-2 M, que puede diluirse luego preferiblemente en un tampón fisiológico. Procedimientos y consideraciones de purificación/renaturalización de proteínas están perfectamente descritos en la técnica, y detalles para el desarrollo de un protocolo adecuado de renaturalización pueden ser identificados fácilmente por cualquier persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica. Un texto útil sobre la materia es *Guide to Protein Purification*, M. Deutscher, compilador, Academic Press, San Diego, 1990, en particular la sección V. La formación de complejos puede favorecerse también por adición de una o más proteínas chaperona.

La estabilidad del complejo de morfogén soluble altamente purificado en un tampón fisiológico, v.g., solución salina tamponada con Tris (TBS) y solución salina tamponada con fosfato (PBS), puede mejorarse por cualquiera de diversos medios, que incluyen una cualquiera o más de tres clases de aditivos. Estos aditivos incluyen aminoácidos básicos (v.g., L-arginina, lisina y betaina); detergentes no iónicos (v.g., Tween 80 o Nonidet P-120); y proteínas portadoras (v.g., seroalbúmina y caseína). Concentraciones útiles de estos aditivos incluyen aminoácido básico 1-100 mM, preferiblemente 10-70 mM, con inclusión de 50 mM; detergente no iónico 0,01-1,0%, preferiblemente 0,05-0,2%, con inclusión de 0,1% (v/v); y proteína portadora 0,01-1,0%, preferiblemente 0,05-0,2%, con inclusión de 0,1% (p/v).

55 Ejemplo 2

Modelo de Accidente Cerebrovascular Agudo que Implica Oclusión Quirúrgica de la Arteria Cerebral

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCA) es un modelo plenamente aceptado de un episodio isquémico focal o accidente cerebrovascular agudo (Gotti, et al., (1990) *Brain Res.* 522: 290-307). Se produce una isquemia focal por obstrucción del flujo sanguíneo a través de la MCA, dando como resultado infarto del locus cerebral suministrado por esta arteria. El modelo MCA es razonablemente predictivo de la capacidad y eficacia de fármacos, tales como morfogenes, para alterar la recuperación funcional en humanos en los cuales se ha deteriorado o se ha perdido tejido del sistema nervioso central debido a un accidente cerebrovascular agudo. Por ejemplo, se considera que el modelo MCA es razonablemente predictivo de la eficacia de un fármaco para restablecer o mejorar de manera detectable la coordinación motora, la percepción sensorial, el habla o cualquier otra función del sistema nervioso central que es aportada naturalmente por el tejido comprendido dentro del territorio de la MCA.

ES 2 201 287 T5

Los animales que se trataron con OP-1, comenzando 24 horas después de la oclusión de la MCA, se comportaban notablemente mejor que los animales tratados con vehículo en una diversidad de ensayos funcionales/conductuales que se describen a continuación.

5 I. Procedimiento de Oclusión Quirúrgico

Los animales utilizados en este estudio eran ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 250-300 gramos (Charles River). Para los procedimientos quirúrgicos, los animales se anestesiaron con halotano al 2% en una mezcla 70% NO₂/30% O₂. Se canuló la arteria del rabo a fin de observar los gases en sangre y la glucosa en sangre. La temperatura corporal se observó utilizando una sonda rectal y se mantuvo a 37 ± 0,5°C con una almohadilla calefactora. La arteria cerebral media (MCA) proximal del lado derecho se ocluyó permanentemente utilizando una modificación del método de Tamura, *et al.* (1981, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1: 123-60). Resumidamente, la MCA proximal se dejó al descubierto transcranealmente sin separar el arco zigomático o transeccionar el nervio facial. Se electrocoaguló después la arteria utilizando un microcoagulador bipolar desde un punto inmediatamente próximo al tracto olfativo hasta la vena cerebral inferior, y se transeccionó luego (Bederson, *et al.*, (1986) *Stroke* 17: 472-476). Se observaron las ratas hasta que recuperaron la conciencia y se devolvieron luego a sus jaulas-habitáculo. Se administró a todos los animales cefazolina sódica (40 mg/kg, intraperitoneal), un antibiótico, el día antes e inmediatamente después de la cirugía del accidente cerebrovascular agudo a fin de prevenir infección. Durante la cirugía del accidente cerebrovascular agudo, no había diferencia alguna en los niveles de gases o glucosa en sangre entre los animales que recibieron 20 subsecuentemente tratamiento con OP-1 o con vehículo.

II. Administración del Morfogén

Los animales comprendidos en el grupo de tratamiento recibieron OP-1 intracisternalmente a una dosis de 1 ó 25 10 µg/inyección. Los animales de control recibieron soluciones de vehículo que carecían de OP-1 pero con todos los restantes componentes a concentraciones finales equivalentes.

Para administrar la inyección, los animales se anestesiaron con halotano en 70% NO₂/30% O₂ y se pusieron en una marco estereotáxico. El procedimiento para la inyección intracisternal de soluciones que contenían OP-1 o soluciones 30 de vehículo exclusivamente fue idéntico. Utilizando técnica aséptica, se introdujeron OP-1 (1 ó 10 µg/inyección) o un volumen equivalente de vehículo por inyección percutánea (10 µl/inyección) en la cisterna magna utilizando una jeringuilla de Hamilton provista con una aguja de calibre 26 (Yamada, *et al.*, (1991) *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 472-478). Antes de cada inyección, se extrajeron 1-2 µl de fluido cerebroespinal (CSF) mediante la jeringuilla de Hamilton para comprobar la colocación de la aguja en el espacio subaracnoideo. Estudios preliminares demostraron 35 que un tinte (azul de Evans) al 1%, suministrado de este modo se difundía libremente a través de las cisternas basales y a lo largo del córtex cerebral en el transcurso de una hora después de la inyección. Los animales se asignaron aleatoriamente a cualquiera de los grupos de tratamiento con OP-1 o al grupo de tratamiento con vehículo.

En un primer estudio, se practicaron inyecciones intracisternales (10 µg/inyección de OP-1 o vehículo) bisemanalmente durante 4 semanas, comenzando 24 horas después del accidente cerebrovascular agudo (es decir, en los días posteriores al accidente cerebrovascular 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, y 25). En un segundo estudio, los animales recibieron dos inyecciones intracisternales (2 x 1 µg/inyección de OP-1, 2 x 10 µg/inyección de OP-1, o 2 x vehículo); la primera inyección se administró 24 horas después del accidente cerebrovascular y la segunda inyección se administró 4 días después del accidente cerebrovascular. En un tercer estudio, se administró una sola inyección (10 µg/inyección de OP-45 1 o vehículo) 24 horas después del accidente cerebrovascular.

III. Ensayos Conductuales

Para habituar los animales a la manipulación, que sería necesaria para los ensayos conductuales/funcionales, se 50 manipularon los mismos durante 3 días antes de la cirugía; durante 10 minutos cada día. Después de la cirugía, los animales se alojaron en jaulas individuales. Se utilizaron cuatro ensayos estándar funcionales/conductuales para evaluar la función sensorimotora y refleja después del infarto. Los ensayos han sido descritos detalladamente en la bibliografía, con inclusión de Bederson *et al.* (1986) *Stroke* 17: 472-476; DeRyck, *et al.*, (1992) *Brain Res.* 573: 44-60; Markgraf *et al.*, (1992) *Brain Res.* 575: 238-246; y Alexis, *et al.*, (1995) *Stroke* 26: 2338-2346.

55 A. El Ensayo de Colocación de los Miembros Anteriores

Resumidamente, el ensayo de colocación de los miembros anteriores se compone de tres subensayos. Se obtienen 60 registros separados para cada miembro anterior. Para el subensayo de colocación visual, el animal se mantiene erguido por el investigador y se lleva cerca de un tablero de mesa. La colocación normal del miembro sobre la mesa se registra como "0", la colocación retardada (< 2 s) se registra como "1", y la ausencia de colocación o la colocación muy retardada (> 2 s) se registra como "2". Se obtienen registros separados primeramente cuando el animal se lleva hacia delante y luego nuevamente cuando el animal se lleva lateralmente respecto a la mesa (registro máximo por miembro = 4; en cada caso los números más altos denotan déficits mayores). Para el subensayo de colocación táctil, el animal se mantiene de tal manera que no pueda ver o tocar el tablero de la mesa con sus bigotes. La zarpa dorsal se pone ligeramente en contacto con el tablero de la mesa cuando el animal se lleva por primera vez hacia delante y luego se lleva lateralmente con respecto a la mesa. Se registra la colocación cada vez como anteriormente (registro máximo por miembro = 4). Para el ensayo de colocación propioceptiva, el animal se lleva hacia delante úni-

ES 2 201 287 T5

camente y se aplica mayor presión a la zarpa dorsal; se registra la colocación como anteriormente (registro máximo por miembro = 2). Estos subregistros se suman para dar el registro total de colocación de los miembros anteriores para cada miembro (campo = 0-10). En algunos animales, se realizó el subensayo de colocación de los bigotes, en el cual se ensayó la capacidad del animal para colocar el miembro anterior en respuesta a la estimulación de los bigotes por el tablero (registro máximo por miembro = 2). Se sumaron luego los subregistros para dar el registro total de colocación de los miembros anteriores para cada miembro (campo = 0-10, 0-12 con el subensayo de los bigotes).

B. El Ensayo de Colocación de los Miembros Posteriores

El ensayo de colocación de los miembros posteriores se conduce de la misma manera que el ensayo de colocación de los miembros anteriores, pero implica únicamente los subensayos táctil y propioceptivo de los miembros posteriores (registros máximos 4 y 2, respectivamente; campo de registro total = 0-6).

C. El Ensayo del Balancín de Equilibrio Modificado

El ensayo del balancín de equilibrio modificado examina la actividad del reflejo vestíbulo-motor cuando el animal se mantiene en equilibrio sobre un balancín estrecho (30 x 1,3 cm) durante 60 segundos. La capacidad de mantenerse en equilibrio sobre el balancín se registra como sigue: 1 - el animal se mantiene en equilibrio con las cuatro patas encima del balancín; 2 - el animal pone las patas en un lado del balancín o tiembla sobre el balancín; 3 - una o dos patas se escurren del balancín; 4 - tres miembros se escurren del balancín; 5 - el animal intenta mantener el equilibrio con las patas sobre el balancín pero cae; 6 - el animal se tumba sobre el balancín y luego cae; 7 - el animal cae del balancín sin intentar mantener el equilibrio. Los animales se sometieron a tres pruebas de entrenamiento antes de la cirugía: el registro de la última de éstas se tomó como registro de la línea base.

D. El Ensayo del Reflejo Postural

El ensayo del reflejo postural mide tanto la función refleja como la sensorimotora. Los animales se mantienen primeramente suspendidos sobre el suelo por el rabo. Los animales que tocan simétricamente el suelo con ambos miembros anteriores se registran como "0". Los animales que exhiben posturas anormales (flexión de un miembro, rotación del cuerpo) se ponen luego sobre una hoja de papel con refuerzo de plástico. Aquellos animales capaces de resistir el movimiento de un lado a otro con una presión lateral suave se registran como "1", mientras que aquéllos que son incapaces de resistir dicho movimiento se registran como "2". Todos los ensayos funcionales/conductuales se administraron inmediatamente antes de la cirugía causante del accidente cerebrovascular y luego en días alternos desde el día 1 después del accidente cerebrovascular al día 31. En cada sesión, se dejó que los animales se adaptaran a la sala de ensayo durante 30 minutos antes de iniciarse el ensayo.

IV. Análisis Histológico

El día 31 después de la oclusión de la MCA, se anestesiaron profundamente los animales con pentobarbital y se sometieron a perfusión transcardial con solución salina heparinizada seguida por formamida tamponada al 10%. Se extirparon los cerebros, se cortaron en tres partes, y se guardaron en formamida tamponada al 10% antes de deshidratación e incrustación en parafina. Se cortaron secciones en forma de corona (5 µm) en un microtomo deslizante, se montaron sobre portaobjetos de vidrio, y se tñieron con hematoxilina y eosina. El área de los infartos cerebrales en cada una de siete rodajas (+4,7, +2,7, +0,7, -1,2, -3,3, -5,3 y -7,3 comparadas con el bregma) se determinó utilizando un sistema de imágenes con interfaz de ordenador (Rioquant, R&M Biometrix, Inc., Nashville, TN). Se determinó el área total de infarto por rodaja por el "método indirecto" como [el área del hemisferio contralateral intacto]-[el área del hemisferio ipsilateral intacto] para corregir por la contracción del cerebro durante el procesamiento (Swanson, *et al.*, (1990) *J. Cereb. Blood flow Metab.* 10: 290-293). Se expresó luego el volumen del infarto como porcentaje del volumen hemisférico contralateral intacto. Los volúmenes de infarto en el córtex y el cuerpo estriado se determinaron también por separado utilizando estos métodos.

El técnico que realizaba las inyecciones intracisternales, los ensayos conductuales y el análisis histológico descubrió por completo los tratamientos asignados hasta que se hubieron recogido todos los datos. Los datos se expresaron como valores medios ± SD o valores medios ± SEM y se analizaron por análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA) seguido por ensayos apropiados de dos colas sin aparear, con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

V. Resultados

Diferencia en el volumen total de infarto y el peso corporal entre los animales tratados con OP-1 o tratados con vehículo

El córtex cerebral del lado derecho y el cuerpo estriado subyacente tanto de los animales tratados con OP-1 como de los animales tratados con vehículo presentaba grandes infartos en el territorio de la MCA. Las regiones cerebrales dañadas gravemente por los infartos incluían el córtex parietal, áreas 1 y 2 (Par1, Par2) y el córtex insular granular (GI). Las regiones dañadas parcialmente por los infartos incluían el córtex frontal, áreas 1, 2, y 3 (FR1, FR2, FR3); un córtex insular granular (A1); el córtex temporal (áreas 1 y 3) (Tel1, Tel3); el córtex lateral occipital (área 2) (Oc2L);

ES 2 201 287 T5

el área cortical del miembro anterior (FL), y el caudoputamen (cPu; Paxinos y Watson, 1986). El área cortical de los miembros posteriores (HL) estaba generalmente libre de infartos.

No había diferencia alguna en el volumen total de infarto entre los animales tratados con una serie de adminis-

- 5 traciones intracisternales de OP-1 ($8 \times 10 \mu\text{g}$ /inyección) y los animales tratados con vehículo ($26,3 \pm 2,5\%$ frente a $28,0 \pm 2,0\%$ de volumen hemisférico contralateral intacto, respectivamente, $t = 0,538$, p-n.s.). Además, no había diferencia alguna en el volumen de infarto cortical o estriado entre los animales tratados con OP-1 y los animales tratados con vehículo, cuando estos volúmenes se calcularon por separado (cortex: $30,9 \pm 3,1\%$ frente a $31,9 \pm 2,9\%$ de volumen de córtex contralateral intacto, respectivamente, $t = 0,254$, p-n.s.; cuerpo estriado: $66,0 \pm 3,0\%$ frente a $66,5 \pm 2,9\%$ de volumen estriado contralateral intacto, respectivamente, $t = 0,121$, p-n.s.). Adicionalmente, la inspección de las secciones teñidas con hematoxilina y eosina no mostró evidencia alguna de proliferación anormal de células en los cerebros de los animales tratados con OP-1. Análogamente, el volumen total de infarto de los animales que recibieron una sola inyección de OP-1 o dos inyecciones de OP-1 no difería significativamente de los animales correspondientes tratados con vehículo (datos no presentados).

- 10
15 La evolución temporal del peso corporal durante el mes posterior al infarto de los animales tratados con vehículo no difería significativamente de: (a) los animales tratados con una serie ($8 \times 10 \mu\text{g}/\text{animal}$) de administraciones de OP-1 (FIG. 4, $F = 0,56$, p-n.s.); (b) los animales tratados con dos inyecciones (dosis alta = $2 \times 10 \mu\text{g}/\text{animal}$; dosis baja = $2 \times 1 \mu\text{g}/\text{animal}$) de OP-1 (FIG. 7; $F = 0,417$, p-n.s.); y (c) los animales tratados con una sola inyección ($10 \mu\text{g}/\text{animal}$) de OP-1 (FIG. 10; $F = 0,693$, p-n.s.).

Eficiencia Funcional de los Animales Tratados con OP-1 y los Animales Tratados con Vehículo

Después del infarto, todos los animales acusaban alteraciones severas de la función sensorimotora y refleja en

- 20 los cuatro ensayos conductuales. Para los ensayos de colocación de los miembros, los déficits se confinaban en los miembros contralaterales (izquierdos). Los animales que recibieron el vehículo exhibían una recuperación parcial en la totalidad de los cuatro ensayos conductuales durante el primer mes después del accidente cerebrovascular (véanse Fig. 2A-2B, 3A-3B, 5A-5B, 6, 8A-8B y 9).

30 (i) *Animales que Recibieron Administraciones Bisemanales de OP-1*

Los animales que recibieron administraciones bisemanales de OP-1 ($8 \times 10 \mu\text{g}$ /inyección) se recuperaron más rápidamente y en mayor grado que las ratas tratadas con vehículo. La recuperación incrementada de los animales tratados con OP-1 frente a los tratados con vehículo era muy acusada para las tareas de colocación de los miembros anteriores (Fig. 2A; $F = 109,0$, $p = 0,0001$) y de colocación de los miembros posteriores (Fig. 2B; $F = 34,8$, $p = 0,0001$), y menos acusada, aunque todavía significativa, para el equilibrio en el balancín (Fig. 3A; $F = 11,7$, $p = 0,0051$). En cambio, no había diferencia significativa alguna entre los dos grupos en los ensayos del reflejo postural (Fig. 3B; $F = 3,7$, $p = \text{n.s.}$). Se observó una recuperación incrementada en todos los subensayos de los ensayos de colocación de los miembros (visual, táctil, y propioceptivo) después del tratamiento con OP-1 (datos no presentados).

- 40 El incremento de la recuperación por OP-1 fue muy pronunciado en los ensayos de la función sensorimotora de los miembros afectados, y menos pronunciado en los ensayos de la función refleja y postural. Los infartos de la MCA no dañaban por completo las áreas corticales de los miembros anteriores y de los miembros posteriores, lo cual es compatible con la recuperación en los ensayos de colocación de los miembros después del infarto focal en el territorio de la MCA.

45 (ii) *Animales que Recibieron Dos Administraciones de OP-1*

Los animales que recibieron dos administraciones de OP-1 (en los días 1 y 4 posteriores al accidente cerebrovas-

- 50 cular) se recuperaban más rápidamente y en mayor grado que las ratas tratadas con vehículo durante el mes de ensayo conductual. OP-1 (2×1 ó $10 \mu\text{g}$ /inyección) inducía una mejora significativa de la recuperación de: (a) la colocación de los miembros anteriores sin bigotes (Fig. 5A; $F = 31,835$, $p = 0,0001$; dosis alta frente a vehículo, $p < 0,0001$; dosis baja frente a vehículo, $p < 0,0001$), (b) la colocación de los miembros anteriores con bigotes (FIG: 5B; $F = 27,462$, $p = 0,0001$; dosis alta frente a vehículo, $p < 0,0001$; dosis baja frente a vehículo, $p < 0,0001$); y (c) la colocación de los miembros posteriores (Fig. 6; $F = 14,867$, $p = 0,0001$; dosis alta frente a vehículo, $p < 0,0001$; dosis baja frente a vehículo; $p = 0,0036$). Aunque la dosis alta producía una tendencia hacia mejor recuperación que la dosis baja en los tres ensayos conductuales, las diferencias entre los dos grupos tratados con OP-1 no eran significativas.

60 (iii) *Animales que Recibieron una Sola Administración de OP-1*

- Se observaron también mejoras de recuperación funcional a largo plazo con una sola administración de OP-1. Los animales que recibieron $10 \mu\text{g}$ de OP-1 intracisternalmente 24 horas después de la oclusión de la MCA se recuperaban más rápidamente y en mayor grado durante el mes de ensayos conductuales que las ratas tratadas con vehículo. OP-1 inducía una mejora significativa de la recuperación de: (a) la colocación de los miembros anteriores sin bigotes (Fig. 8A; $F = 10,853$, $p = 0,0064$); (b) la colocación de los miembros anteriores con bigotes (Fig. 8B; $F = 10,629$, $p = 0,0068$); y (c) la colocación de los miembros posteriores (Fig. 9, $F = 15,343$, $p = 0,002$).

ES 2 201 287 T5

En la presente invención, el tratamiento de una lesión isquémica del sistema nervioso central con OP-1 mejoraba tanto la velocidad como el grado de recuperación funcional durante el primer mes después del infarto. Una sola administración de una dosis eficaz de OP-1 era suficiente para inducir la mejora a largo plazo de la recuperación funcional.

5 La recuperación conductual mejorada se observó sin un cambio (v.g., sin una disminución) en el volumen de infarto en los animales tratados con OP-1 comparados con los animales tratados con vehículo. En todos estos grupos, la administración de OP-1 comenzó un día después de la isquemia, más allá de la “ventana terapéutica” aparente durante la cual OP-1, de acuerdo con la doctrina de los documentos WO 93/04692 y/o WO 94/03299, puede reducir el
10 tamaño del infarto. Los presentes descubrimientos se encuentran entre las primeras demostraciones de que un factor biológicamente activo administrado por vía exógena puede mejorar la recuperación conductual sin una reducción en el tamaño del infarto en un modelo de accidente cerebrovascular en animales.

15 Pueden hacerse modificaciones rutinarias análogas en otros modelos aceptados de accidente cerebrovascular, para confirmar la eficacia del tratamiento con morfogenes a fin de restablecer la función de coordinación motora del CNS deteriorada o perdida.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un morfogén para la fabricación de un medicamento para mejorar la recuperación de la función del sistema nervioso central en un mamífero afectado con un episodio isquémico del sistema nervioso central, donde dicha recuperación funcional comprende una mejora en la función de coordinación motora; donde opcionalmente dicha función de coordinación motora se selecciona entre postura, equilibrio, agarre y andadura; y en el cual
- dicho morfogén comprende una proteína dímera que tiene la propiedad de inducir morfogénesis específica de tejido en dicho mamífero y que comprende un par de polipéptidos plegados, cada uno de los cuales tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia que tiene más de 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con el dominio C-terminal de siete cisteínas de OP-1 humana, residuos 330-431 de SEQ ID NO:5; y
- (b) la secuencia de OPX definida por SEQ ID NO:3.
2. Uso de un morfogén para la fabricación de un medicamento para mejorar la recuperación de la función del sistema nervioso central en un mamífero afectado con un episodio isquémico del sistema nervioso central, donde: dicha recuperación funcional comprende una mejora en la función de coordinación motora; donde opcionalmente dicha función de coordinación motora se selecciona entre postura, equilibrio, agarre y andadura; y en el cual dicho morfogén se selecciona entre OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, DPP, Vgl, Vgr, proteína 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP-10, BMP-11, BMP-13, BMP-15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP y NEURAL.
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho morfogén está complejado con: al menos un péptido de dominio pro que comprende un péptido N-terminal de 18 aminoácidos seleccionado del grupo constituido por los términos N de los dominios pro de OP-1, OP-2, 60A, GDF-1, BMP-2A, BMP-2B, DPP, Vgl, Vgr-1, BMP-3, BMP-5, y BMP-6; o de modo no covalente con al menos un fragmento aumentador de la solubilidad de un polipéptido de dominio pro seleccionado de los dominios pro de morfogenes existentes naturalmente.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho morfogén se obtiene del sobrenadante de cultivo de una célula huésped que secreta morfogenes.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual dicho morfogén se administra por vía intracisternal, intraventricular, intratecal o intravenosa.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el morfogén:
- a) se proporciona en una sola administración; o
- b) se proporciona en una pluralidad de administraciones; o
- c) se proporciona en dos administraciones; y/o
- d) el morfogén se administra al menos 24 ó 48 horas después de la aparición de dicha lesión.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el morfogén se administra diariamente, bisemanalmente o semanalmente.

60

65

% Semejanza de Secuencia de Aminoácidos, Identidad con el Dominio de 7 Cisteinas de OP-1 Humana >=70%		
Secuencia	% Semejanza	% Identidad
hOP-1 (hBMP-7)	100	100
mOP-1 (mBMP-7)	100	99
hOP-2 (hBMP-8)	97	72
mOP-2 (mBMP-8)	97	75
hBMP-5	97	88
hBMP-6 (Vgr-1)	96	87
Vgr-1 (PT)	94	85
OP-3	91	66
d60A	90	69
BMP-4 (BMP-2b)	90	58
BMP-2 (BMP-2a)	89	60
dpp	87	57
sUNIVIN	87	63
xVg-1	86	58
hCDMP-1 (mGDF-5)	85	50
bCDMP-3 (mGDF-7, hBMP-12)	83	54
mGDF-3 (hVgr-2)	83	50
hCDMP-2 (mGDF-6, hBMP-13)	82	53
cDORSALIN	79	50
hGDF-1	78	49
mGDF-10	78	40
rBMP-3b	78	41
hBMP-10	78	47
hBMP-3	78	43
dSCREW	77	49
ADMP	77	
mGDF-1	73	50
hBMP-9	73	52
mNODAL	71	41
hBMP-15	71	41

Marcadores de Especie:

H=Humana, m=ratón, x= Xenopus, c= Pollo, s= Erizo de mar, d= Drosophila, r= rata

FIG. 1

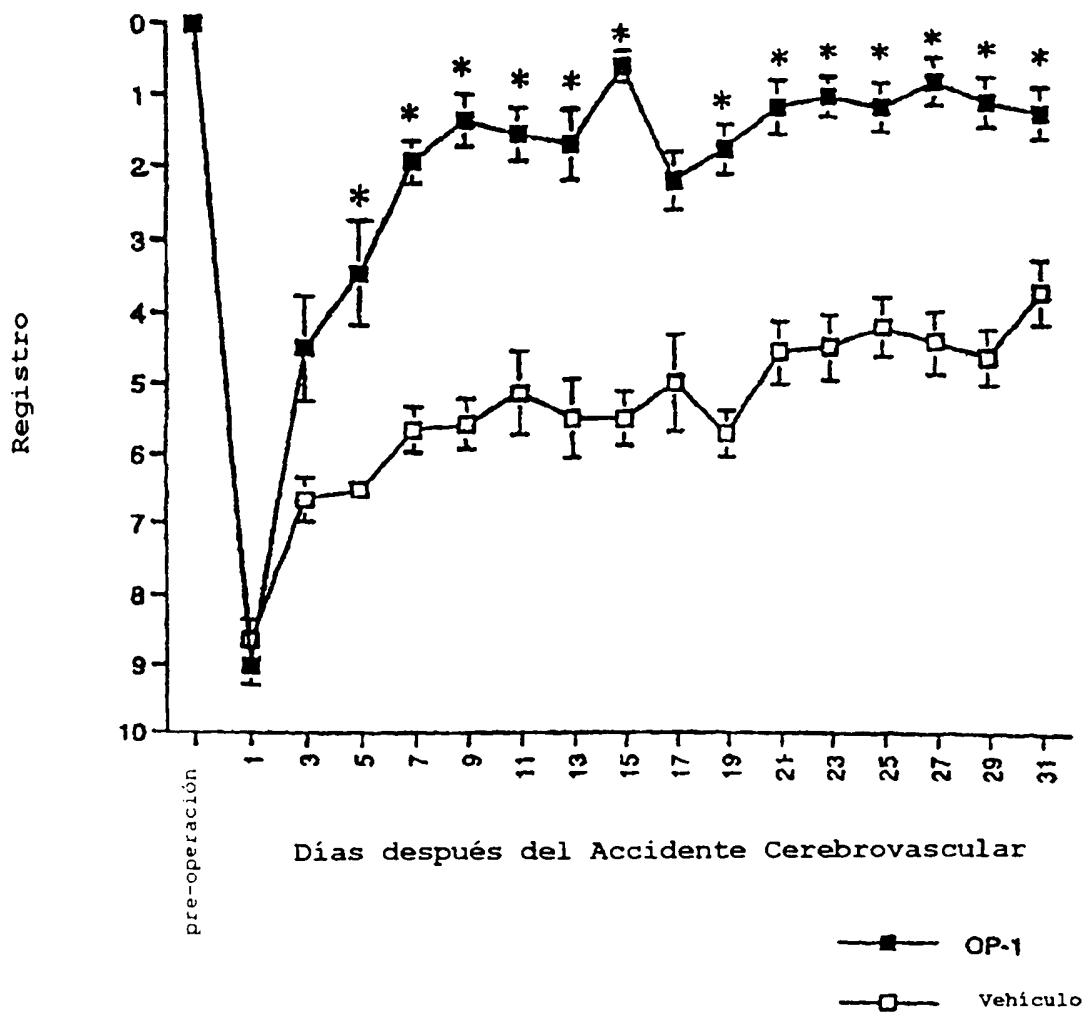


FIG. 2A

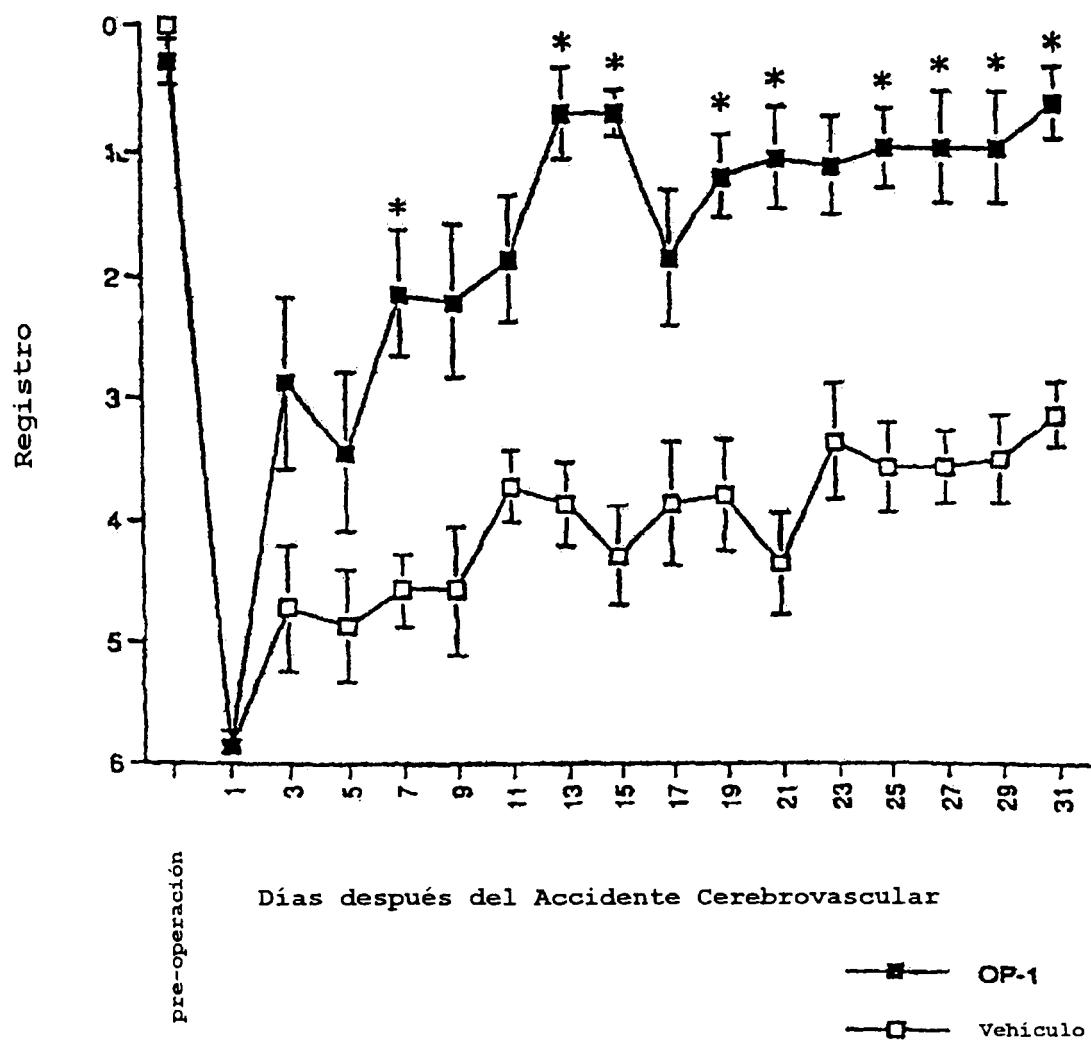


FIG. 2B

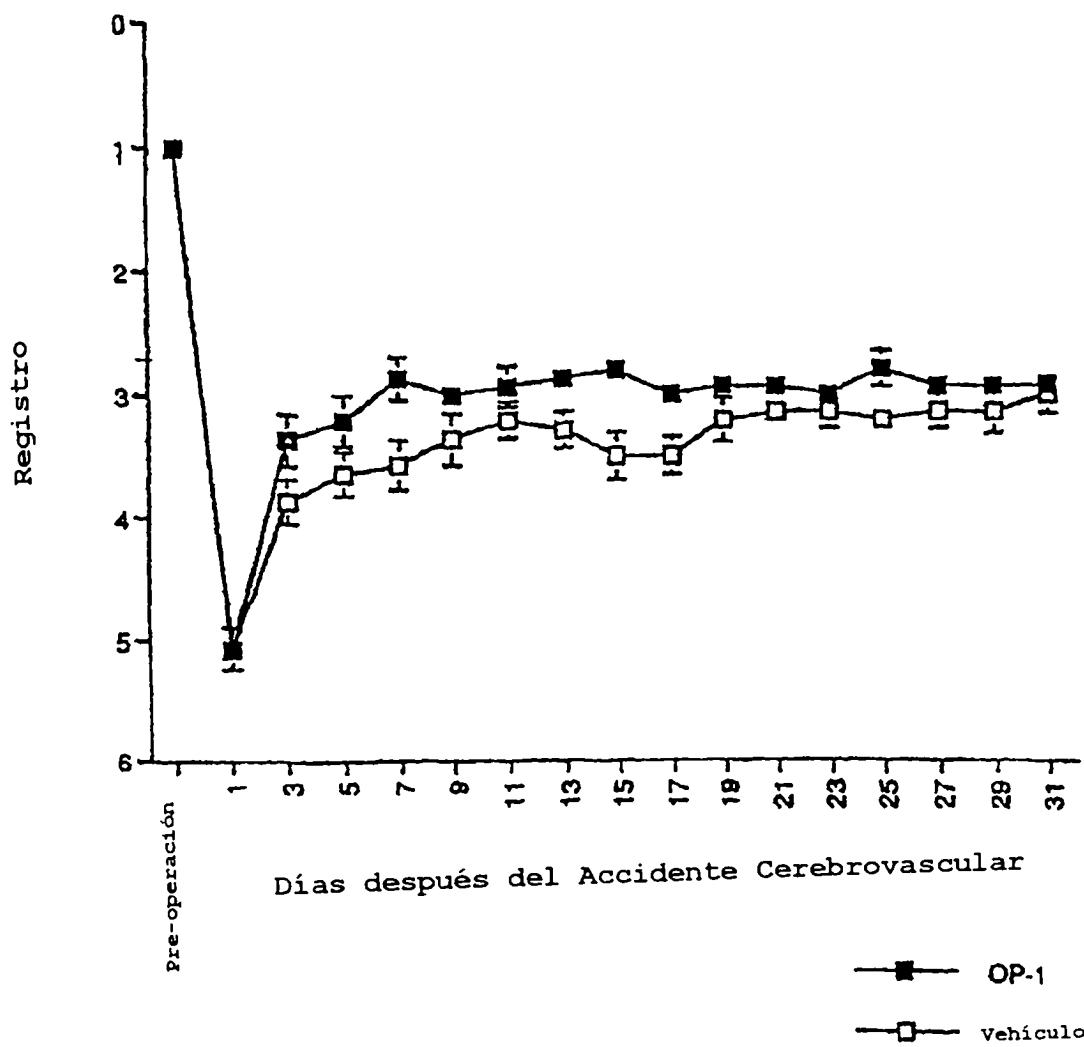


FIG. 3A

ES 2 201 287 T5

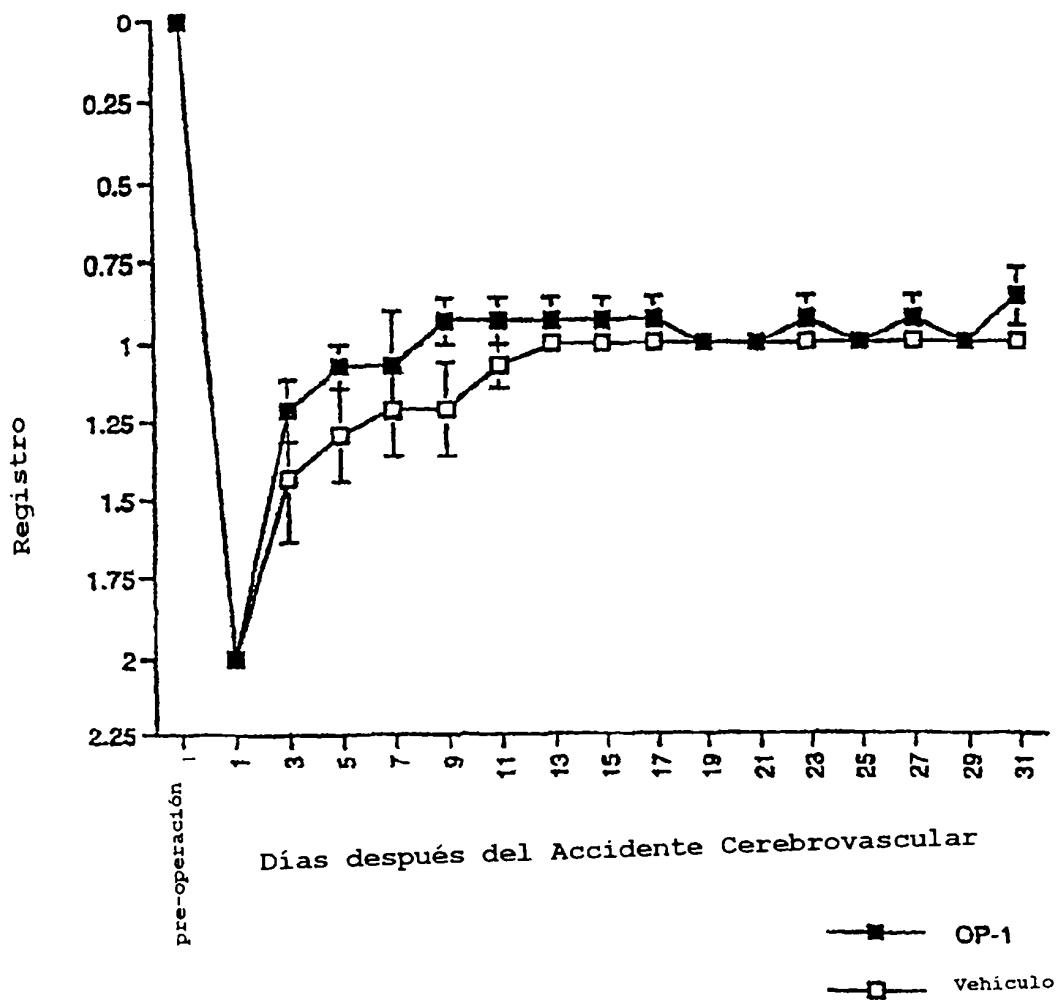


FIG. 3B

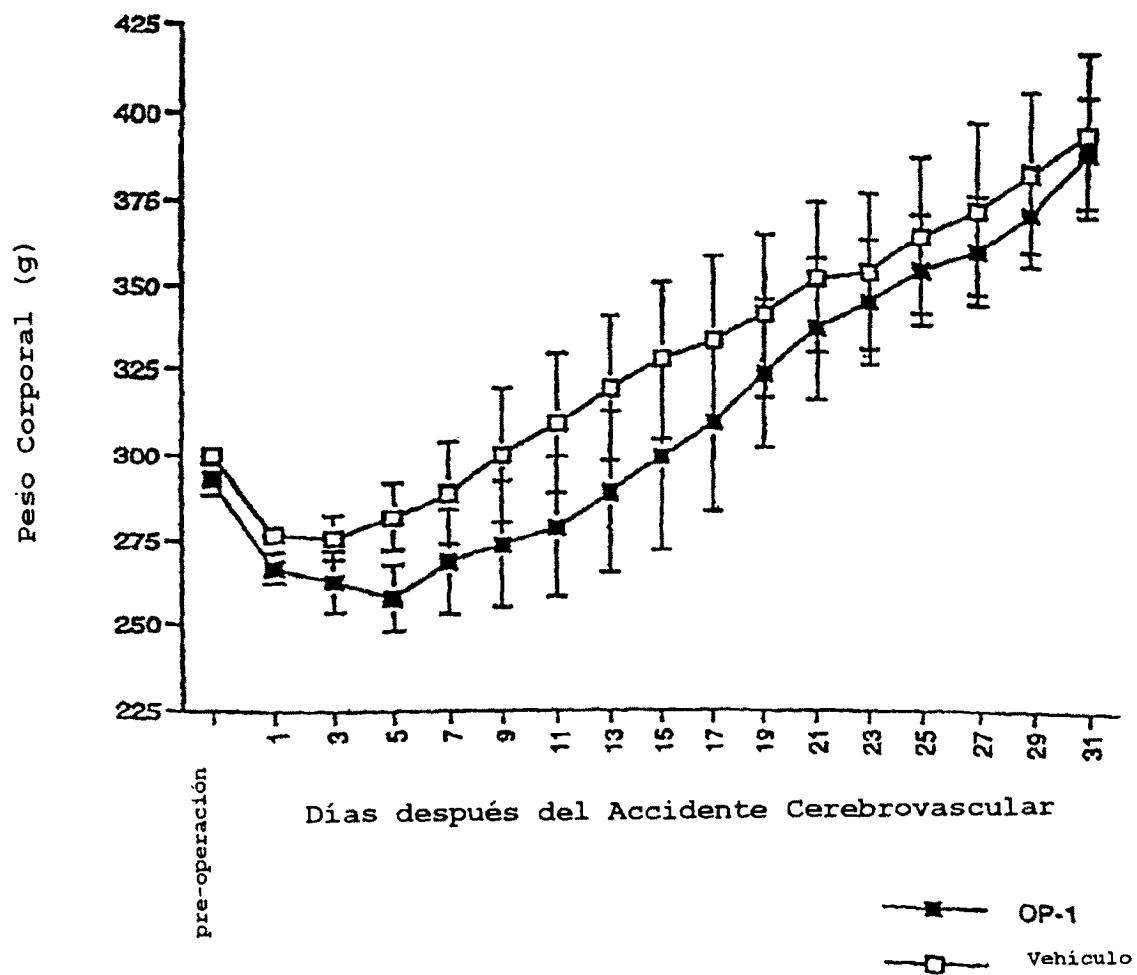


FIG. 4

ES 2 201 287 T5

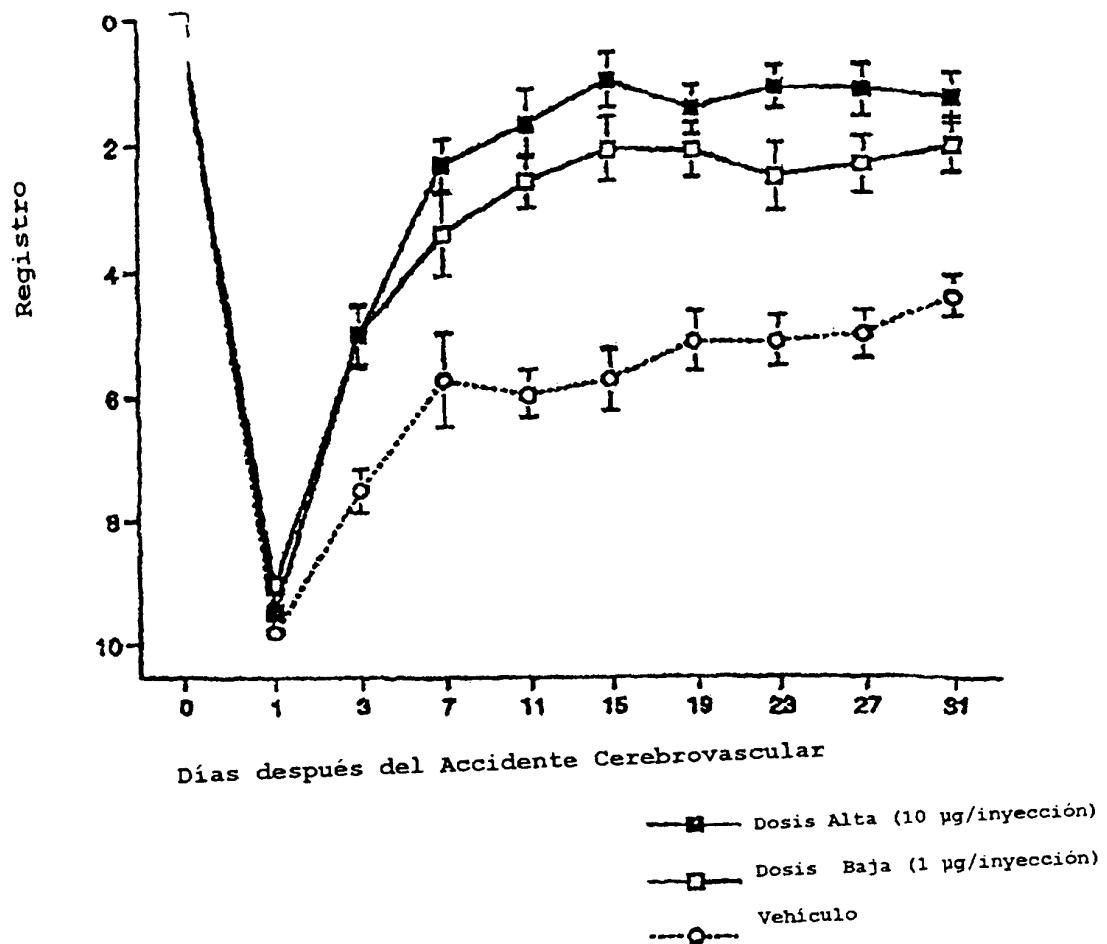


FIG. 5A

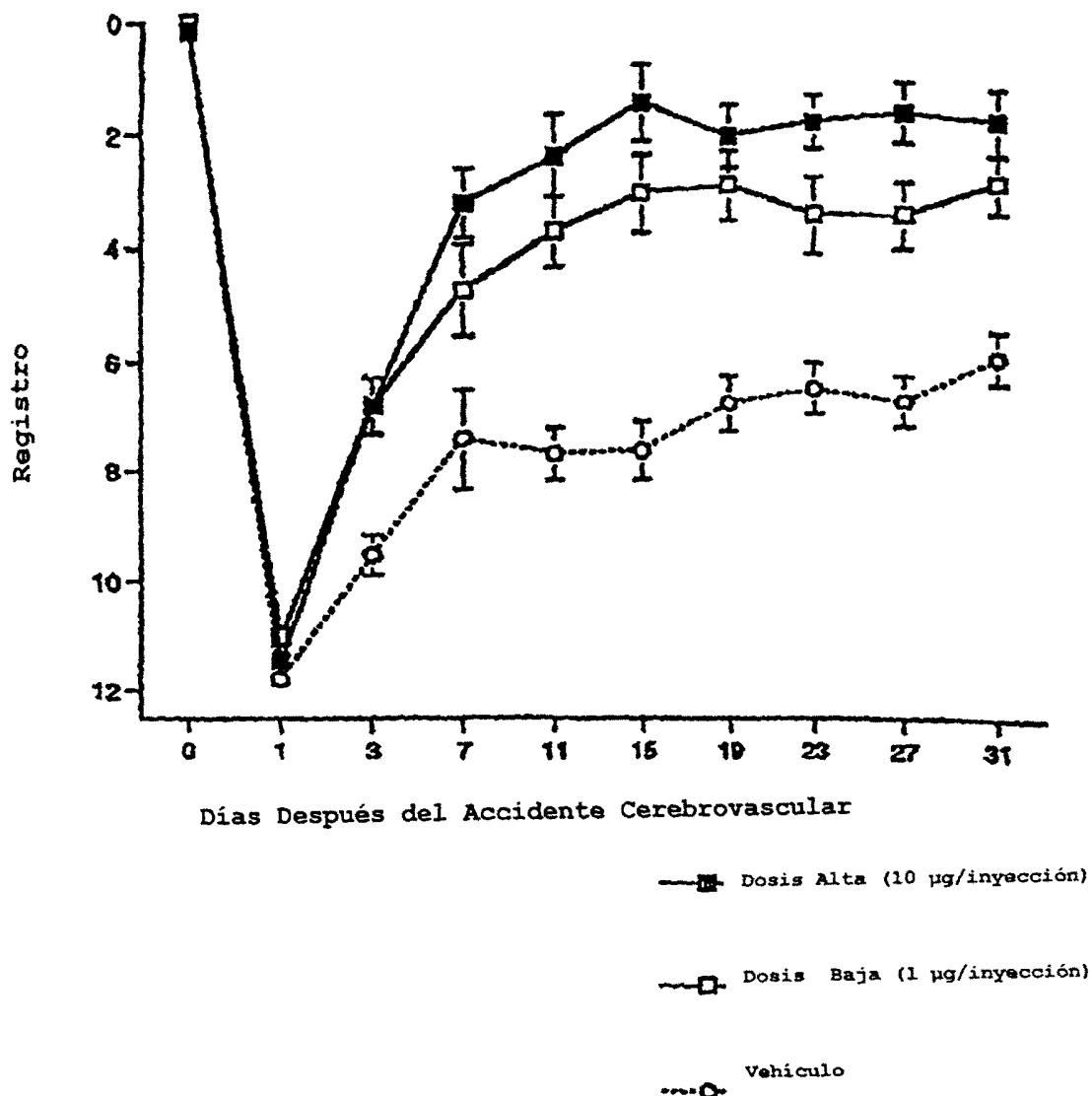


FIG. 5B

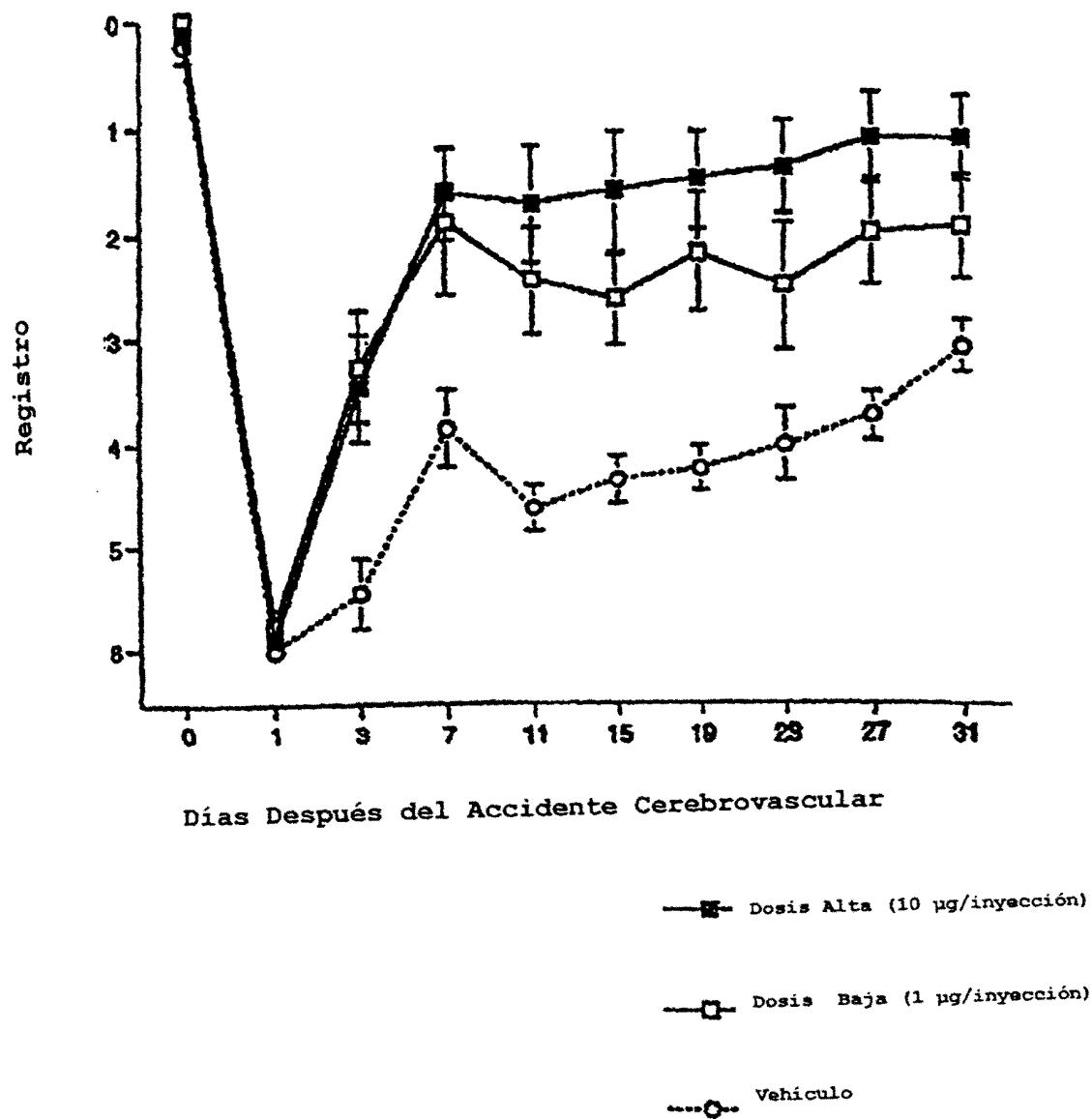


FIG. 6

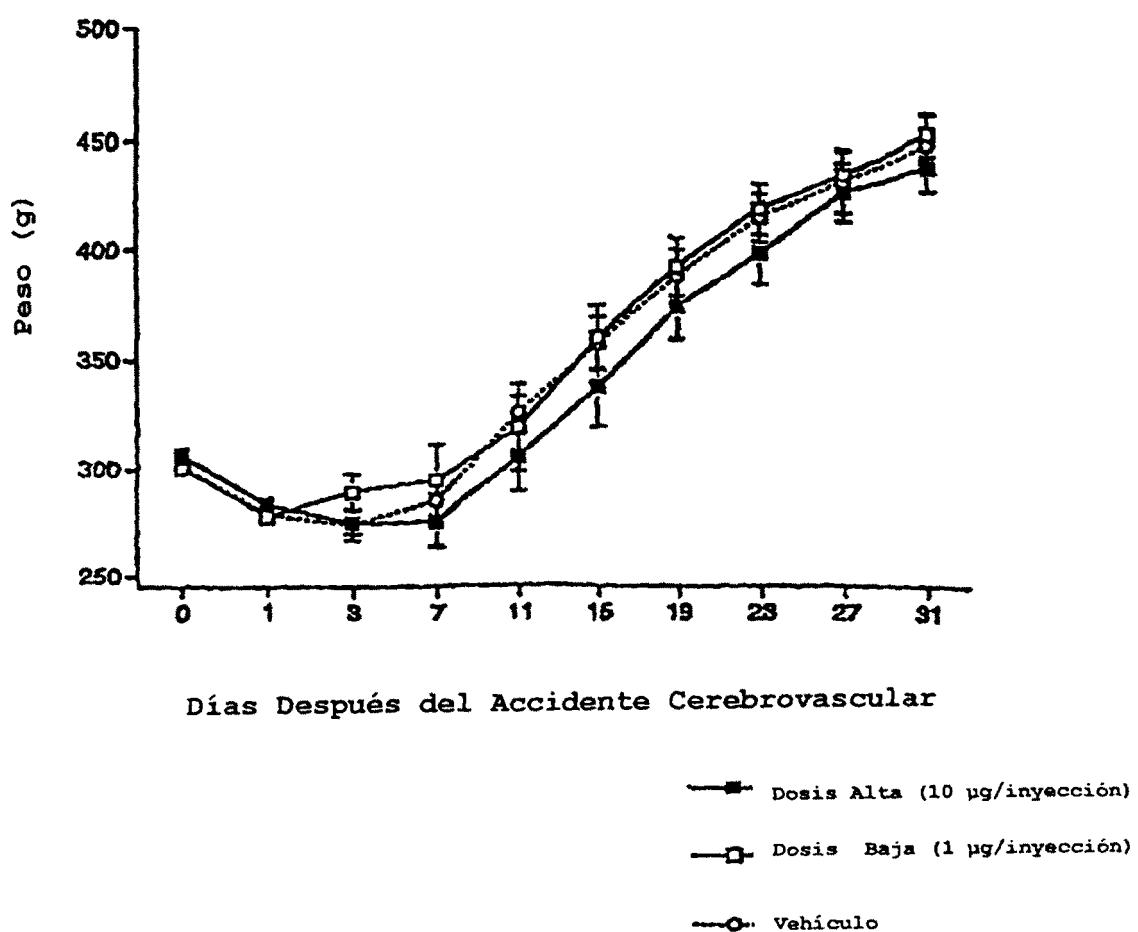


FIG. 7

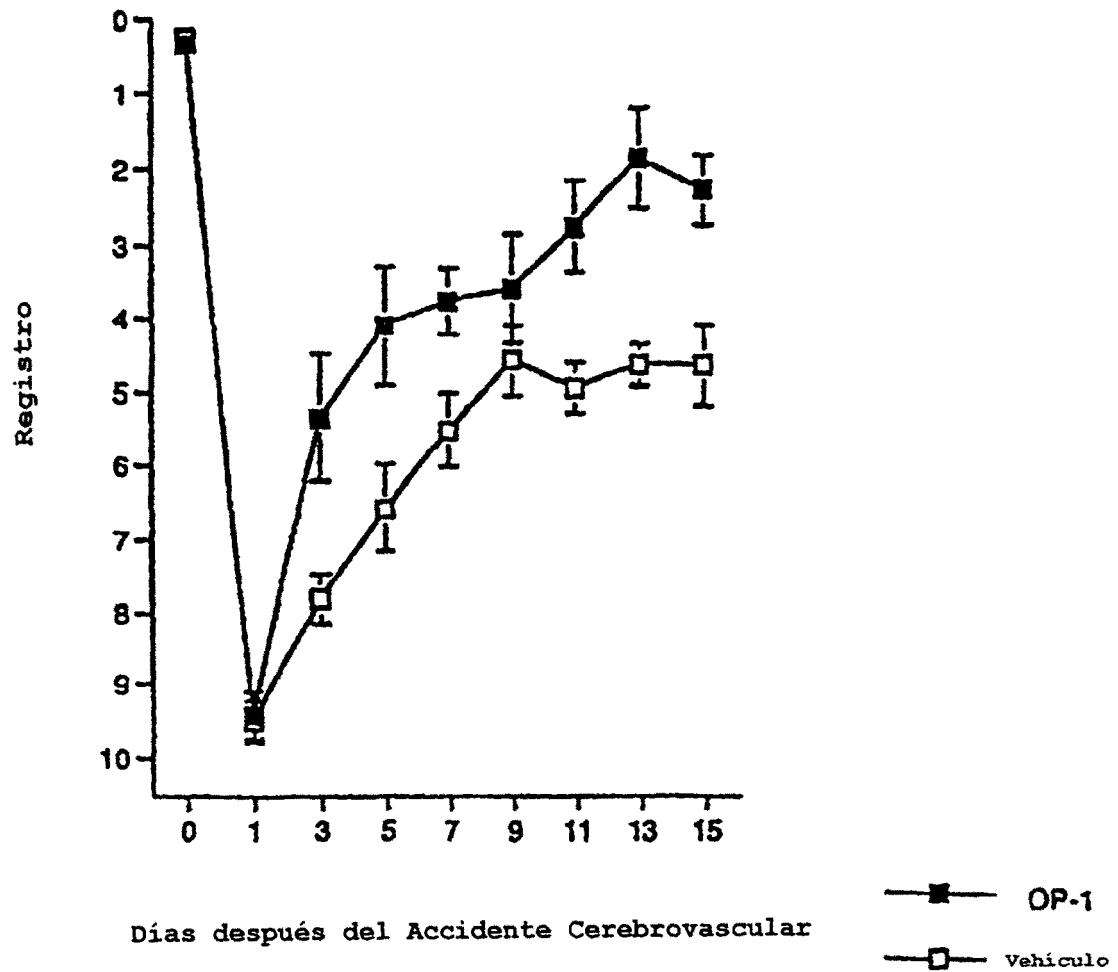


FIG. 8A

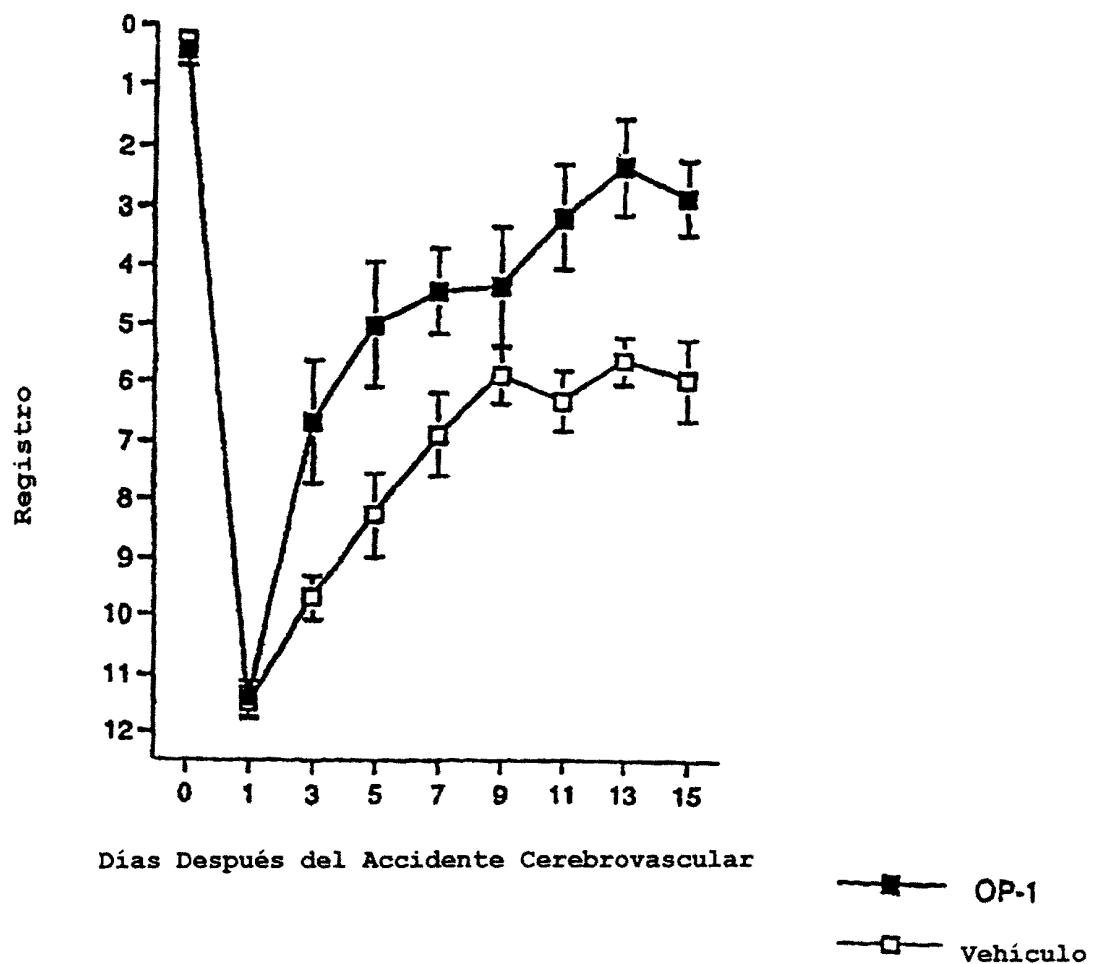


FIG. 8B

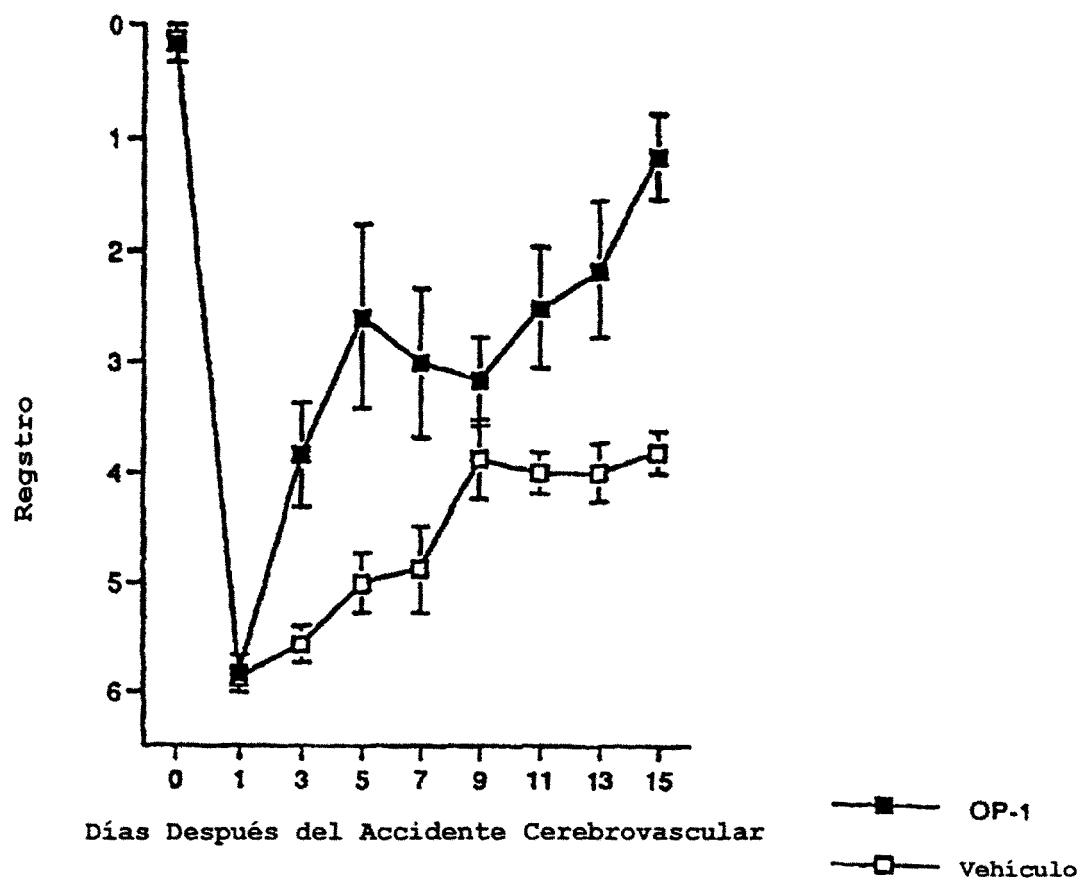


FIG. 9

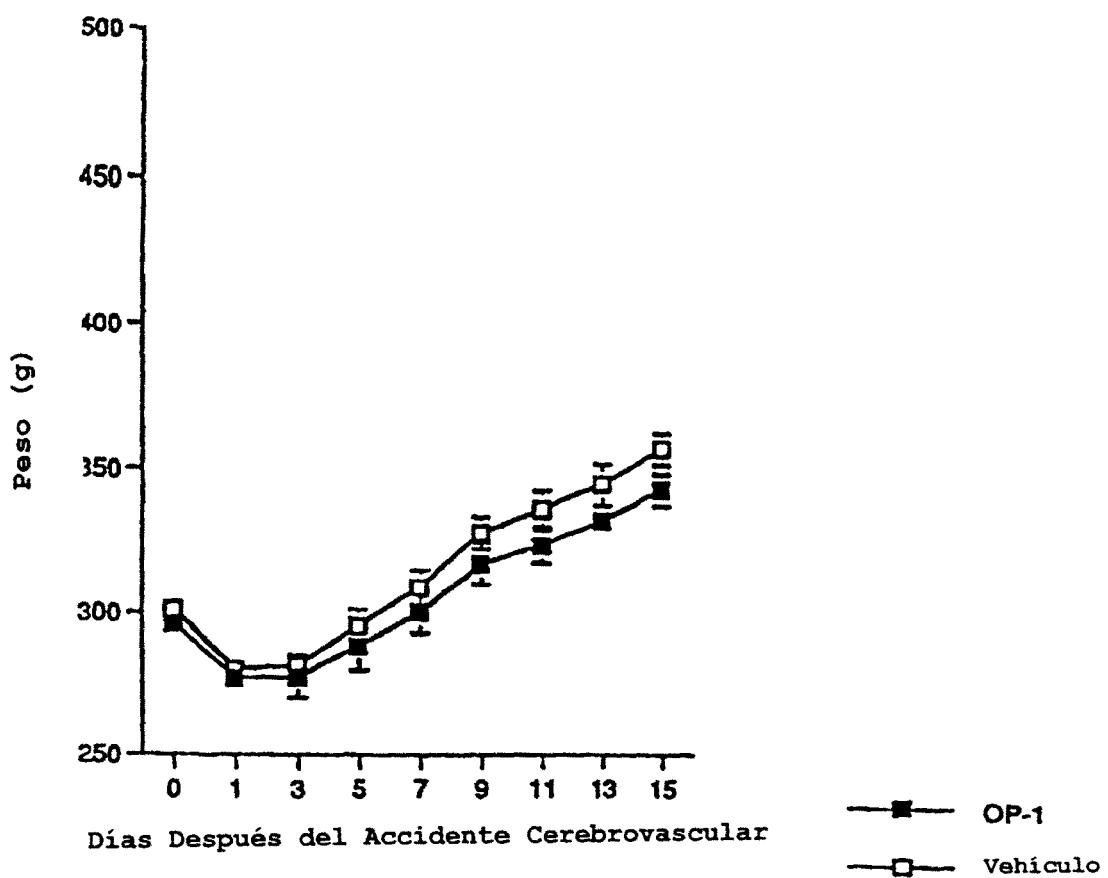


FIG. 10

ES 2 201 287 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (i) SOLICITANTE: CHARETTE, Marc F.
FINKLESTEIN, Seth P.

10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: MÉTODOS PARA MEJORAR LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL
DESPUÉS DE ISQUEMIA O TRAUMATISMO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- 15 (A) DESTINATARIO: CREATIVE BIOMOLECULES, INC.
(B) CALLE: 45 SOUTH STREET
(C) CIUDAD: HOPKINTON
20 (D) ESTADO: MA
(E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
(F) CÓDIGO POSTAL: 01748

25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.30

(vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DE PROCURADOR/AGENTE:

- 40 (A) NOMBRE: FENTON, GILLIAN M
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.508
(C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: CRP-069CP

45 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELÉFONO: (617)248-7000
(B) TELEFAX: (617)248-7100

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 97 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) CLASE DE CADENA:
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
65 (B) LOCALIZACIÓN: 1..97
(D) OTRA INFORMACIÓN: /marcador: Generic-Seq-7

ES 2 201 287 T5

/nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

5 Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 I 5 10 15
 Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Pro
 10 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Cys Cys Xaa Pro
 50 55 60
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa Xaa Cys Xaa Cys
 85 90 95
 20 Xaa

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 102 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CLASE DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

35 (ix) CARACTÉRISTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..102
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /marcador: Generic-Seq-8

/nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

45 Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa
 1 5 10 15
 50 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly
 20 25 30
 Xaa Cys Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala
 35 40 45
 Xaa
 50 55 60
 55 Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 65 70 75 80
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
 85 90 95
 60 Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

(2) INFORMACIÓN PARA SEO ID NO: 3:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 102 aminoácidos

ES 2 201 287 T5

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

10 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Proteína

(B) LOCALIZACIÓN: 1..102

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marcador = OPX

15 /nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa
1 5 10 15

Asp Trp Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly
20 25 30

Glu Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala
35 40 45

Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys
50 55 60

Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa
65 70 75 80

Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Xaa Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val Val
85 90 95

Xaa Ala Cys Gly Cys His

30

35

100

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1822 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

55 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: HOMO SAPIENS

(F) TIPO DE TEJIDO: HIPOCAMPO

60 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 49..1341

(C) MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN: experimental

(D) OTRA INFORMACIÓN:/función = PROTEÍNA OSTEOGÉNICA

/producto: “OP-1”

/evidencia: EXPERIMENTAL

/nombre_estándar = “OP1”

ES 2 201 287 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

	GGTGCAGGCC CGGAGCCCGG AGCCCCGGTA CGCGCTAGAG CCGGGCGG ATG CAC GTG Met His Val	57
5		1
	CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala	105
10	5 10 15	
	CCC CTG RTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn	153
15	20 25 30 35	
	GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg	201
20	40 45 50	
	CGG GAG ATG CAG CCC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg	249
25	55 60 65	
	CCG CGC CCG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met	297
30	70 75 80	
	CTG GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG CAG GAG GGC GGC GGG CCC GGC Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly	345
35	85 90 95	
	GCG CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly	393
40	100 105 110 115	
	CCC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp	441
45	120 125 130	
	ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe	489
50	135 140 145	
	CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile	537
55	150 155 160	
	CCA GAA GGG GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp	585
60	165 170 175	
	TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr	633
65	180 185 190 195	
	CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu	681
70	200 205 210	
	GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC	729

50

55

60

65

ES 2 201 287 T5

	Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp 215 220 225	
5	ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu 230 235 240	77
	Gly CTC CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro 245 250 255	825
10	AAG TTG GCG GGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro 260 265 270 275	873
15	TTC ATG GTG CCT TTC TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile 280 285 290	921
	CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro 295 300 305	969
20	AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC CTG GCA GAG AAC AGC AGC Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser 310 315 320	1017
25	AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC CAG CTG TAT GTC AGC TTC Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe 325 330 335	1065
	CGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCC Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala 340 345 350 355	1113
30	GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met 360 365 370	1161
	AAC GCC ACC AAC CAC GCC ATC GTG CAG ACG CTG GTC CAC TTC ATC AAC Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn 375 380 385	1209
35	CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala 390 395 400	1257
40	ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys 405 410 415	1305
	TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly cys His 420 425 430	1351
45	GAGARTTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG GAACCAGCG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTG ATCAGTTTT CAGTGGCAGC	1411 1471 1531
50	ATCCAATGAA CAAGATCTA CAAGCTGTGC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAAC GCATAAAGAA AAATGGCCGG GCCAGGTCAAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT CGTTTCCAGA GGTAAATTATG AGCCGCTTACCG AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG	1591 1651 1711
55	GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTCA TGTGCGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC CTGIAATAAA TGTCAACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAA A	1771 1922

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 431 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CLASE DE CADENA:
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 201 287 T5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

5 Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Ile Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 10 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 15 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly
 85 90 95
 20 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 25 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140
 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 30 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 35 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 40 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 45 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
 290 295 300
 50 Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
 325 330 335
 55 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
 340 345 350
 Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365
 60 Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 370 375 380
 Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
 385 390 395 400
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
 405 410 415
 65 Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

ES 2 201 287 T5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 97 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..97
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador = Generic-Seq-9

/nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Xaa
1 5 10 15
Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
20 25 30
Xaa
35 40 45
Xaa Cys Xaa Pro
50 55 60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65 70 75 80
Xaa Cys Xaa Cys
85 90 95
Xaa

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 102 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..102
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/marcador: Generic-Seq-10

/nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

ES 2 201 287 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Cys Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly
20 25 30
Xaa Cys Xaa
35 40 45
Xaa
50 55 60
Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
65 70 75 80
Xaa
85 90 95
Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
100

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..5
- (D) OTRA INFORMACIÓN:/nota

/nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: Proteína
- (B) LOCALIZACIÓN: 1..5
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “donde cada Xaa se selecciona independientemente de un grupo de uno o más aminoácidos especificados como se define en la memoria descriptiva”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

Gys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5