



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 766**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**C12N 5/06** (2006.01)  
**C12N 5/08** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98948122 .1**  
86 Fecha de presentación : **09.09.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1011711**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

54 Título: **Efectos sinérgicos de morfogenes OP/BMP y factores neurotróficos GDNF/NGF.**

30 Prioridad: **09.09.1997 US 58258**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.01.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.01.2008**

73 Titular/es: **Curis, Inc.**  
**45 Moulton Street**  
**Cambridge, Massachusetts 02138, US**

72 Inventor/es: **Rueger, David, C.;**  
**Charette, Marc, F. y**  
**Ebendal, Ted**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 288 766 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Efectos sinérgicos de morfogenes OP/BMP y factores neurotróficos GDNF/NGF.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a preparaciones para el tratamiento de sujetos mamíferos afectados por, o con riesgo inminente de, daño o lesión a tejidos, particularmente tejidos neurales, que expresan receptores para morfogenes OP/BMP y factores neurotróficos GDNF/NGF.

10 **Antecedentes de la invención**

Durante el desarrollo del sistema nervioso mamífero, neuronas que se diferencian procedentes de los sistemas nerviosos central y periférico emiten axones que deben crecer y tomar contacto con células diana específicas. En algunos casos, las neuronas permanecen confinadas totalmente dentro del sistema nervioso central. Sin embargo, en otros casos, los axones en crecimiento deben cubrir enormes distancias, extendiéndose desde el SNC hacia la periferia del cuerpo. En mamíferos, esta fase de neurogénesis se completa durante la fase de vida embrionaria y se cree que las células neuronales no se multiplican una vez que se han diferenciado completamente.

El crecimiento dendrítico se produce en dos fases: extensión inicial seguida por elongación y ramificación. Purves y otros, *Nature* 336: 123-128 (1988). Se ha observado que algunas moléculas, incluyendo neurotransmisores y hormonas, regulan la expansión de un árbol dendrítico existente. Sin embargo, se sabe mucho menos acerca de los factores que influyen en los episodios iniciales y hacen que una neurona forme inicialmente dendritas. En ciertas clases de neuronas, el brote dendrítico inicial se produce como parte de un programa de desarrollo intrínseco que es relativamente independiente de interacciones tróficas. Dotti y otros, *J. Neurosci.* 8: 1454-1468 (1988). Sin embargo, en otras clases de neuronas, la regulación de las fases iniciales de crecimiento dendrítico parece ser bastante diferente. Por ejemplo, las neuronas simpáticas de rata no forman dendritas y extienden solo axones cuando se cultivan en ausencia de células no neuronales. En contraste, el cocultivo con células de Schwann o astrocitos hace que estas neuronas formen apéndices dendríticos y generen finalmente un árbol dendrítico que es comparable en tamaño al observado *in situ*. Tropea y otros, *Glia* 1: 380-392 (1988). Así, parece que se requerirían interacciones tróficas específicas para permitir que las neuronas simpáticas formen dendritas.

Las observaciones precedentes se han tomado para apoyar una teoría de que el ambiente *in situ* especifica la formación de un árbol dendrítico. Se cree que el ambiente en la vecindad de las células neurales o los apéndices neurales en desarrollo incluye campos o gradientes electromagnéticos, electroquímicos y/o bioquímicos que influyen positivamente y negativamente en la extensión y la especificidad de la emergencia dendrítica así como la formación de sinapsis entre dendritas y cuerpos y axones de células nerviosas. Sin embargo, esta teoría sufre de escasez de mediadores identificados que tengan la capacidad de hacer que las neuronas hagan brotar dendritas.

Se ha identificado una multitud de neuropatías, algunas de las cuales afectan solo a una subpoblación o un sistema de neuronas en los sistemas nerviosos periférico o central. Las neuropatías, que pueden afectar a las propias neuronas o las células gliales asociadas, pueden resultar de disfunción metabólica celular, infección, exposición a agentes tóxicos, disfunción por autoinmunidad; malnutrición o isquemia. En algunos casos, se cree que la disfunción celular induce a la muerte celular directamente mediante apoptosis. Oppenheim, *Ann Rev. Neurosci.* 14: 37-43 (1991). En otros casos, la neuropatía puede inducir necrosis tisular al estimular al sistema inmunitario del cuerpo, dando como resultado una respuesta inflamatoria local y lisis celular en la zona inicial de lesión neural.

La capacidad de las neuronas dentro del sistema nervioso periférico para regenerar una ruta neural dañada es limitada. Específicamente, nuevos axones y dendritas se extienden aleatoriamente y a menudo mal dirigidos, entrando en contacto con dianas inapropiadas, lo que puede provocar una función anormal. Además, cuando los apéndices nerviosos seccionados dan como resultado un hueco de más de unos pocos milímetros, por ejemplo más de 10 milímetros (mm), no se produce la regeneración nerviosa apropiada, bien debido a que los apéndices no crecen la distancia necesaria o bien debido a un crecimiento axonal mal dirigido. Los esfuerzos para reparar el daño nervioso periférico por medios quirúrgicos se han encontrado con resultados variados, particularmente cuando el daño se extiende a lo largo de una distancia significativa. En algunos casos, las etapas de sutura usadas para obtener un alineamiento apropiado de extremos nerviosos seccionados estimulan la formación de tejido cicatrizal que se cree que inhibe la regeneración de axones. Incluso cuando se ha reducido la formación de tejido cicatrizal, como con el uso de canales de guía del nervio u otras prótesis tubulares, la regeneración satisfactoria generalmente todavía está limitada a un daño nervioso de menos de 10 milímetros de distancia.

Está ahora bien establecido que diversos factores tróficos representan un papel crítico al regular la supervivencia y la diferenciación de neuronas en desarrollo. Snider y otros, *Ann. Neurol.* 26: 489-506 (1989). La mayoría de las acciones caracterizadas de los factores tróficos nerviosos se refiere a episodios de desarrollo y sugiere que la regulación temporal y local de la expresión de estas proteínas representa un papel durante la maduración del sistema nervioso. Los factores tróficos nerviosos también son importantes en la función del sistema nervioso del adulto para el mantenimiento de la integridad estructural y la regulación de la plasticidad. Tales procesos se alteran en enfermedades neurodegenerativas y episodios neurodegenerativos que siguen a una lesión aguda en el sistema nervioso. Esto ha

disparado la especulación de que los factores tróficos nerviosos están implicados en las alteraciones estructurales que se producen en respuesta a la lesión y la enfermedad.

Se ha observado que varios factores tróficos bien caracterizados potencian la supervivencia y la diferenciación de neuronas dopaminérgicas en cultivo tisular y/o después del trasplante a la cámara anterior del ojo. Estos factores tróficos incluyen factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), así como varias neurotrofinas relacionadas con factor de crecimiento nervioso (NGF).

Los factores tróficos nerviosos se encuentran entre varias superfamilias proteínicas de factores de crecimiento polipeptídicos basándose en su homología de secuencia de aminoácidos y/o su estructura tridimensional. MacDonald y otros, *Cell* 73: 421-424 (1993). Una familia de factores neurotróficos es la familia de las neurotrofinas. Esta familia consiste actualmente en factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4/5 (NT-4/5) y neurotrofina-6 (NT-6). Estos factores neurotróficos afectan a poblaciones neuronales específicas del sistema nervioso central. La pérdida de tales factores neurotróficos específicos puede ser responsable de deterioros relacionados con la edad en la supervivencia y/o la función de las células. Aunque la fuente celular sigue sin estar clara, existe una evidencia para sugerir que las neuronas y las células gliales son ambas capaces de secretar factores neurotróficos.

Las proteínas proteína osteogénica/proteína morfogénica ósea (OP/BMP) forman una familia, o subfamilia, dentro de la superfamilia TGF- $\beta$  mayor de proteínas. Esto es, estas proteínas forman un subgrupo diferente, denominado en la presente memoria "familia OP/BMP de morfogenes" o "morfogenes OP/BMP", dentro del agrupamiento evolutivo libre de proteínas relacionadas con la secuencia conocidas como la superfamilia TGF- $\beta$ . Miembros de esta familia de proteínas comprenden polipéptidos secretados que comparten características estructurales comunes y que se procesan de forma similar a partir de una proproteína para dar una proteína madura carboxiterminal. Los morfogenes OP/BMP se han identificado en el tejido del cerebro y la médula espinal de ratas en desarrollo y adultas, según se determina tanto mediante hibridación por transferencia Northern de sondas específicas para el morfogén a extractos de mRNA procedentes de tejido nervioso en desarrollo y adulto como mediante estudios de inmunolocalización. Por ejemplo, el análisis por transferencia Northern de tejido de rata en desarrollo ha identificado expresión significativa del transcrito de mRNA de OP-1 en el SNC. El mRNA de otro miembro de la familia OP/BMP, GDF-1, parece expresarse principalmente en tejido nervioso en desarrollo y adulto, específicamente en el cerebro, incluyendo el cerebelo y el tallo encefálico, la médula espinal y los nervios periféricos. También se ha presentado que los transcritos de BMP4 (también denominada BMP2B) y Vgr-1 se expresan en tejido nervioso.

Se encontró que el morfogén OP-1 estaba localizado predominantemente en la matriz extracelular de la materia gris (cuerpos de células neuronales), presente claramente en todas las áreas excepto los propios cuerpos celulares. En la materia blanca, formada principalmente por fibras nerviosas mielinizadas, la tinción parece estar confinada a los astrocitos (células gliales). Un patrón de tinción similar también se observó en secciones cerebrales de rata recién nacida (10 días de edad).

Además, OP-1 se ha localizado específicamente en la sustancia negra, que está comprendida principalmente por ganglios basales estriados, un sistema de neuronas motrices accesorias cuya función está asociada con la corteza cerebral y el sistema corticoespinal. Las disfunciones en esta subpoblación o sistema de neuronas están asociadas con un número de neuropatías, incluyendo corea de Huntington y enfermedad de Parkinson. El efecto combinado de OP-1 y NGF sobre la diferenciación morfológica de ciertas células neuronales se describe en *Neuron*, 15, 597-605 (1998) y *Int. J. of Developmental Neuroscience*, 14, 203-215 (1996).

### Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los morfogenes OP/BMP en combinación con factores neurotróficos GDNF/NGF muestran un efecto sinérgico al promover la supervivencia o el crecimiento, o inhibir la muerte o degeneración, de células mamíferas, particularmente células neurales, que expresan protectores de treonina quinasa activados por OP/BMP y receptores de tirosina quinasa activados por GDNF/NGF. Basándose en este descubrimiento, la presente invención proporciona nuevas preparaciones farmacéuticas para el tratamiento *in vivo* e *in vitro* de tales células, incluyendo tratamientos *in vivo* para mamíferos afectados por, o con un riesgo inminente de, daño o lesión a tales células.

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona el uso de (a) un morfogén que comprende una proteína dímera que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con el esqueleto de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana y (b) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6, para la fabricación de un medicamento para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas en un sujeto mamífero afectado por, o con riesgo inminente de, una neuropatía o una enfermedad neurodegenerativa.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de (a) un morfogén que comprende una proteína dímera que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con el esqueleto de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana y (b) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF,

## ES 2 288 766 T3

NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero afectado por daño o lesión a células neurales.

5 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona el uso de (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero con riesgo inminente de daño o lesión a células neurales.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona preparaciones para promover la supervivencia o el crecimiento de células mamíferas, particularmente células neurales, que comprende un factor neurotrófico GDNF/NGF y un morfogén OP/BMP. De forma similar, la presente invención proporciona preparaciones para inhibir la muerte o la degeneración de células mamíferas, particularmente células neurales, que comprende un factor neurotrófico GDNF/NGF y un morfogén OP/BMP. Tales preparaciones pueden emplearse *in vitro* (por ejemplo, para cultivos celulares mejorados) o *in vivo* (por ejemplo, para tratar estados que afectan a tales células en un sujeto mamífero).

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona específicamente preparaciones para tratar a un sujeto mamífero afectado por, o con riesgo inminente de, daño a lesión a células, particularmente células neurales, que comprende un factor neurotrófico GDNF/NGF y un morfogén OP/BMP. Estas preparaciones pueden aplicarse bien a neuronas o bien a células neurogliales, y a células del sistema nervioso bien central o bien periférico.

20 Las preparaciones de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de células que se han dañado o lesionado, o tienen riesgo inminente de daño o lesión, debido a traumas mecánicos tales como lesión cerebral traumática por fuerza roma, lesión traumática de la médula espinal por fuerza roma, concusión, presión intracraneal debida a edema cerebral o hematoma subdural, vértebras rotas o aplastadas y nervios rasgados o seccionados; traumas químicos tales como los que surgen de exposición a neurotoxinas o los efectos secundarios de quimioterapias; lesiones isquémicas tales como las que surgen de apoplejía, ataque o fallo cardíaco; y daño o lesión neuropático o neurodegenerativo tales como los que surgen de enfermedades neuropáticas incluyendo enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, parálisis, demencia, enfermedad de Shy-Drager, síndrome de Wernicke-Korsakoff y enfermedad de Hallervorden-Spatz.

30 En realizaciones preferidas, los morfogenes OP/BMP de la presente invención comprenden polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos con al menos 70% de homología, más preferiblemente 80% de homología, con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana. En realizaciones particularmente preferidas, los morfogenes OP/BMP comprenden polipéptidos que tienen al menos 60% de identidad de aminoácidos, más preferiblemente al menos 70% de identidad, con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana. En las realizaciones más preferidas, el morfogén OP/BMP comprende al menos el dominio de seis o siete cisteínas C-terminal de una proteína OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 o BMP9 mamífera, preferiblemente humana. Preferiblemente, los morfogenes OP/BMP de la presente invención son capaces de inducir osteogénesis en el ensayo del hueso ectópico de Reddi-Sampath.

40 En realizaciones preferidas, los factores neurotróficos GDNF/NGF de la presente invención comprenden al menos la forma funcional madura de una proteína GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6 mamífera, preferiblemente humana.

45 En realizaciones preferidas, la concentración eficaz de la preparación comprende entre 0,1 ng/ml y 10 µg/ml de un morfogén OP/BMP y entre 0,1 ng/ml y 10 µg/ml de un factor neurotrófico GDNF/NGF, más preferiblemente entre 1 ng/ml y 100 ng/ml bien de un morfogén OP/BMP o bien de un factor neurotrófico GDNF/NGF y, lo más preferiblemente, entre 1 ng/ml y 100 ng/ml tanto de un morfogén OP/BMP como de un factor neurotrófico GDNF/NGF.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones para promover la supervivencia o el crecimiento, o inhibir la muerte o la degeneración, de células mamíferas, incluyendo células no neurales, que expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por GDNF/NGF. De forma similar, la presente invención proporciona preparaciones para tratar a un sujeto mamífero afectado por daño o lesión a células, o con riesgo inminente de daño o lesión a células, incluyendo células no neurales, que expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por GDNF/NGF. Estas preparaciones también comprenden un factor neurotrófico GDNF/NGF y un morfogén OP/BMP, según se describe anteriormente.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas para promover la supervivencia o el crecimiento de células mamíferas, o inhibir la muerte o la degeneración de células mamíferas, particularmente células neurales, que comprenden un factor neurotrófico GDNF/NGF en combinación con un morfogén OP/BMP.

### Breve descripción de los dibujos

65 La Fig. 1 es un gráfico de barras que muestra la supervivencia de neuronas simpáticas disociadas que crecen en geles de colágeno después de 2 ó 6 días de tratamiento con NT-3 (2 ng/ml) o GDNF (50 ng/ml), en presencia o ausencia de OP-1.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevas preparaciones para el tratamiento de sujetos mamíferos afectados por, o con riesgo inminente de, daño o lesión a tejidos, particularmente tejidos neurales, que comprenden un morfógen OP/BMP y un factor neurotrófico GDNF/NGF. Sorprendentemente, se ha demostrado que la administración de estos agentes en combinación tiene un efecto sinérgico al promover la supervivencia y/o el crecimiento de tejidos neurales y al inhibir la muerte o la degeneración de tejidos neurales.

Sin querer limitarse a ninguna teoría particular de la invención, se cree que los morfógenos OP/BMP y los factores neurotróficos GDNF/NGF ejercen un efecto sinérgico al promover la supervivencia y/o el crecimiento de tejidos neurales y al inhibir la muerte o la degeneración de tejidos neurales, al actuar a través de rutas de señalización basadas en receptores separadas. En particular, se cree que las proteínas OP/BMP actúan a través de receptores de serina/treonina quinasa y que los factores neurotróficos GDNF/NGF de la invención actúan a través de receptores de tirosina quinasa, tal que, cuando un morfógen OP/BMP y un factor neurotrófico GDNF/NGF se administran en combinación, las rutas de transducción de señal tanto de serina/treonina quinasa como de tirosina quinasa se activan y se produce un efecto sinérgico.

Así, se ha mostrado que los morfógenos OP/BMP actúan a través de receptores de serina/treonina quinasa, y se ha observado que estos receptores se expresan en tejidos de los sistemas nerviosos tanto periférico como central. Por ejemplo, se ha mostrado mediante hibridación *in situ* que varias clases de neuronas periféricas expresan receptores de serina/treonina quinasa de BMP tipo II que se sabe que se unen a la familia de morfógenos OP/BMP (Liu y otros, *Mol. Cell. Biol.* 15: 3479-3486 (1995); Rosenzweig y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 7632-7636 (1995)) y que ambos receptores de serina/treonina de OP/BMP tipo I y tipo II se expresan en el SNC. Söderström y otros, *Cell Tiss. Res.* 286: 269-279 (1996a); Nosrat y otros, *Cell Tiss. Res.* 286: 191-207 (1996).

De forma similar, se ha mostrado que los factores neurotróficos GDNF/NGF actúan a través de receptores de tirosina quinasa específicos que se expresan en tejidos neurales. Así, por ejemplo, se ha mostrado que la ruta de señalización de GDNF implica la activación del receptor de tirosina quinasa Ret (Trupp y otros, *Nature* 381: 785-789 (1996)), que se expresa en tejidos neurales incluyendo ganglios simpáticos, nodosos y ciliares. De forma similar, NT-3 actúa a través del receptor TrkC y, en alguna extensión, a través del receptor TrkA. Véase, por ejemplo, Ebendal, *J. Neurosci. Res.* 32: 461-470 (1992). Estos receptores se expresan en el cerebro y la médula espinal así como en neuronas periféricas. Véase, por ejemplo, Vázquez y Ebendal, *Neuro Report* 2: 593-596 (1991); Pei y Ebendal, *Exp. Neurol.* 132: 105-115 (1995); Söderström y otros, *Dev. Brain Res.* 85: 96-108 (1995); Hallböök y otros, *Int. J. Dev. Biol.* 39: 855-868 (1995); Williams y Ebendal, *Neuro Report* 6: 2277-2282 (1995); Williams y otros, *Eur. J. Neurosci.* 7: 116-128 (1995).

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona preparaciones para promover la supervivencia y/o el crecimiento de tejidos neurales, o para inhibir la muerte o la degeneración de tejidos neurales, que comprenden un morfógen OP/BMP y un factor neurotrófico GDNF/NGF en combinación, activando de ese modo tanto la ruta de serina/treonina quinasa activada por OP/BMP como la ruta de tirosina quinasa activada por GDNF/NT.

En otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de tejidos no neurales. En particular, existe una variedad de tejidos no neurales que expresan receptores de serina/treonina quinasa activados por OP/BMP y receptores de tirosina quinasa activados por GDNF, incluyendo tejido renal y muchos carcinomas papilares tiroideos (véase, por ejemplo, Schuchardt y otros, *Nature* 367: 380-383 (1994); Pachnis y otros, *Development* 119: 1005-1017 (1993)). Por lo tanto, la presente invención también proporciona preparaciones para promover la supervivencia y/o el crecimiento de tales tejidos no neurales, o para inhibir la muerte o la degeneración de tales tejidos no neurales, que comprende un morfógen OP/BMP y un factor neurotrófico GDNF/NGF en combinación, activando de ese modo tanto la ruta de serina/treonina quinasa activada por OP/BMP como la ruta de tirosina quinasa activada por GDNF/NT.

#### A. Morfógenos OP/BMP

Los morfógenos OP/BMP de la presente invención son proteínas presentes en la naturaleza, o variantes funcionales de proteínas presentes en la naturaleza, de la familia de proteína osteogénica/proteína morfogénica ósea (OP/BMP) dentro de la superfamilia TGF- $\beta$  de proteínas. Esto es, estas proteínas forman un subgrupo diferente, denominado en la presente memoria los "morfógenos OP/BMP", dentro del agrupamiento evolutivo libre de proteínas relacionadas con la secuencia conocidas como la superfamilia TGF- $\beta$ . Miembros de esta familia de proteínas comprenden polipéptidos secretados que comparten características estructurales comunes y que se procesan de forma similar a partir de una proteína para dar una proteína madura carboxiterminal. Dentro de la proteína madura, todos los miembros comparten un patrón conservado de seis o siete residuos de cisteína que definen un dominio de 97-106 aminoácidos, y la forma activa de estas proteínas es bien un homodímero unido por disulfuro de un solo miembro de la familia o bien un heterodímero de dos miembros diferentes. Véanse, por ejemplo, Massague, *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:597 (1990); Sampath y otros, *J. Biol. Chem.* 265:13198 (1990). Por ejemplo, en su forma nativa madura, la OP-1 humana de fuente natural es un dímero glicosilado que tiene típicamente un peso molecular aparente de aproximadamente 30-36 kDa, según se determina mediante SDS-PAGE. Cuando se reduce, la proteína de 30 kDa da lugar a dos subunidades peptídicas glicosiladas que tienen pesos moleculares aparentes de aproximadamente 16 kDa y 18 kDa. La proteína no glicosilada tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 27 kDa. Cuando se reduce, la proteína de 27 kDa da lugar a dos cadenas polipeptídicas no glicosiladas, que tienen pesos moleculares de aproximadamente 14 kDa a 16 kDa.

## ES 2 288 766 T3

Típicamente, las proteínas OP/BMP presentes en la naturaleza se traducen como un precursor, que tiene una secuencia de péptido de señal N-terminal, un dominio “pro” y un dominio de proteína “madura”. El péptido de señal es típicamente de menos de 30 residuos y se segmenta rápidamente durante la traducción en un sitio de segmentación que puede predecirse usando el método de Von Heijne, *Nucleic Acids Research* 14:4683-4691 (1986). El dominio “pro” es variable tanto en secuencia como en longitud, variando de aproximadamente 200 a más de 400 residuos. El dominio pro se segmenta para dar el dominio C-terminal “maduro” de aproximadamente 115-180 residuos, que incluye el dominio C-terminal de seis o siete cisteínas conservado de 97-106 residuos. Según se usa en la presente memoria, la “forma pro” de un miembro de la familia de OP/BMP incluye una proteína que comprende un par de polipéptidos plegado, comprendiendo cada uno un dominio pro en asociación bien covalente o bien no covalente con los dominios maduros del polipéptido de OP/BMP. Típicamente, la forma pro de una proteína es más soluble que la forma madura bajo condiciones fisiológicas. La forma pro parece ser la forma primaria secretada a partir de células mamíferas cultivadas. La “forma madura” de la proteína incluye un dominio C-terminal maduro que no está asociado, ni covalentemente ni no covalentemente, con el dominio pro. Se considera que cualquier preparación de OP-1 contiene forma madura cuando la cantidad de dominio pro en la preparación no es mayor que 5% de la cantidad de dominio C-terminal “maduro”.

Miembros de la familia OP/BMP útiles en la presente memoria incluyen cualquiera de las proteínas nativas presentes en la naturaleza conocidas, incluyendo el homólogo filogenético alélico y otras de sus variantes, ya sean de fuentes naturales o se produzcan biosintéticamente (por ejemplo, incluyendo “muteínas” o “proteínas mutantes”), así como nuevos miembros activos de la familia OP/BMP de proteínas.

Secuencias particularmente útiles incluyen las que comprenden los dominios de siete cisteínas C-terminales de OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP8 y BMP9 mamíferas, preferiblemente humanas. Otras proteínas útiles en la práctica de la invención incluyen formas activas de GDF-5, GDF-6, GDF-7, DPP, Vgl, Vgr-1, 60A, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP10, BMP11, BMP13, BMP15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP o NURAL y sus variantes en la secuencia de aminoácidos. En una realización actualmente preferida, los morfogenes OP/BMP de la invención se seleccionan de uno cualquiera de: OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 y BMP9.

Publicaciones que describen estas secuencias, así como sus propiedades químicas y físicas, incluyen: OP-1 y OP-2: Patente de EE.UU. N° 5.011.691, Patente de EE.UU. N° 5.66.683 y Ozkaynak y otros, *EMBO J.* 9:2085-2093 (1990); OP-3: WO94/10203; BMP2, BMP3 y BMP4: Patente de EE.UU. N° 5.013.649, WO91/18098, WO88/00205 y Wozney y otros, *Science* 242:1528-1534 (1988); BMP5 y BMP6: WO90/11366 y Celeste y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:9843-9847 (1991); Vgr-1: Lyons y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:4554-4558 (1989); DPP: Padgett y otros, *Nature* 325:81-84 (1987); Vgl: Weeks, *Cell* 51:861-867 (1987); BMP9: WO95/33830; BMP10: WO94/26893; BMP-11: WO94/26892; BMP12: WO95/16035; BMP-13: WO95/16035; GDF-1: WO92/00382 y Lee y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:4250-4254 (1991); GDF-8: WO94/21681; GDF-9: WO94/15966; GDF-10: WO95/10539; GDF-11: WO96/01845; BMP-15: WO96/36710; MP121: WO96/01316; GDF-5 (CDMP-1, MP52): WO94/15949, WO96/14335, WO93/16099 y Storm y otros, *Nature* 368:639-643 (1994); GDF-6 (CDMP-2, BMP13): WO95/01801, WO96/14335 y WO95/10635; GDF-7 (CDMP-3, BMP12): WO95/10802 y WO95/10635; BMP-3b: Takao y otros, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 219:656-662 (1996); GDF-3: WO94/15965; 60A: Basler y otros, *Cell* 73:687-702 (1993) y N° de Registro de GenBank L12032. En otra realización, proteínas útiles incluyen constructos biosintéticos biológicamente activos, incluyendo nuevas proteínas biosintéticas y proteínas quiméricas diseñadas usando secuencias procedentes de dos o más proteínas de la familia OP/BMP conocidas. Véanse también los constructos biosintéticos descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.011.691 (por ejemplo, COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 y COP-16).

En otras realizaciones preferidas, los morfogenes OP/BMP útiles en la presente memoria incluyen proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 70% de “homología” de la secuencia de aminoácidos y, preferiblemente, 75% u 80% de homología con el dominio de siete cisteínas C-terminal presente en las formas activas de OP-1 humana (es decir, residuos 330-431, según se muestra en el N° ID SEC: 2 de la Patente de EE.UU. N° 5.266.683). En otras realizaciones preferidas, los morfogenes OP/BMP útiles en la presente memoria incluyen proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 60% de identidad de secuencia de aminoácidos y, preferiblemente, 65% o 70% de identidad con el dominio de siete cisteínas C-terminal presente en las formas activas de OP-1 humana. Así, una posible secuencia de aminoácidos puede alinearse con la secuencia de aminoácidos del dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana usando el método de Needleman y otros, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970), ejecutado convenientemente mediante programas informáticos tales como el programa Align (DNASTar, Inc.). Como se entenderá por los expertos en la técnica, secuencias homólogas o funcionalmente equivalentes incluyen disposiciones funcionalmente equivalentes de los residuos de cisteína dentro del esqueleto cisteínico conservado, incluyendo inserciones o deleciones de aminoácidos que alteran la disposición lineal de estas cisteínas, pero no deterioran materialmente su relación en la estructura plegada de la proteína dímera, incluyendo su capacidad para formar tales enlaces disulfuro intra- o inter-catenarios que pueden ser necesarios para la actividad biológica. Por lo tanto, los huecos internos y las inserciones de aminoácidos en la posible secuencia se ignoran con propósitos de calcular el nivel de homología o identidad de la secuencia de aminoácidos entre las secuencias posible y de referencia.

Se entiende en la presente memoria que “homología de la secuencia de aminoácidos” incluye tanto identidad como similitud de la secuencia de aminoácidos. Así, según se usa en la presente memoria, un porcentaje de “homología” entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de residuos de aminoácido que son idénticos o similares entre las secuencias. Residuos “similares” son “sustituciones conservativas” que cumplen los criterios definidos para una

“mutación puntual aceptada” en Dayhoff y otros, *Atlas of Protein Sequence and Structure* Vol. 5 (Supl. 3), pp. 354-352 (1978), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. Así, “sustituciones de aminoácidos conservativas” son residuos que son físicamente o funcionalmente similares a los correspondientes residuos de referencia, teniendo similares tamaño, conformación, carga eléctrica y/o propiedades químicas, tales como la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina. El término “sustitución conservativa” o “variación conservativa” también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original no sustituido en una cadena polipeptídica dada, con tal de que la cadena polipeptídica sustituida resultante tenga una actividad biológica útil en la presente invención.

Los morfogenes OP/BMP de la invención se caracterizan por actividades biológicas que pueden ser determinadas fácilmente por los expertos normales en la técnica. Específicamente, un morfogén OP/BMP de la presente invención es capaz de inducir osteogénesis en el ensayo del hueso ectópico de Reddi-Sampath (Sampath y Reddi, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78:7599-7603 (1981)) o un ensayo sustancialmente equivalente.

El ensayo del hueso ectópico de Reddi-Sampath es bien conocido en la técnica como un ensayo de actividad osteogénica. El ensayo, que puede realizarse fácilmente, se describe y analiza en, por ejemplo, Sampath y Reddi, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78:7599-7603 (1981); y Wozney, “Bone Morphogenetic Proteins”, *Progress in Growth Factor Research* 1:267-280 (1989). Muchos ensayos equivalentes, que usan otros animales y zonas de tejido, pueden emplearse o desarrollarse por los expertos en la técnica para evaluar la actividad biológica de los morfogenes OP/BMP de la presente invención. Véanse, por ejemplo, los bioensayos descritos en la Patente de EE.UU. N° 5.226.683.

Los morfogenes OP/BMP contemplados en la presente memoria pueden expresarse a partir de DNA genómico o cDNA intacto o truncado o a partir de DNAs sintéticos en células huésped procarióticas o eucarióticas. Las proteínas dímeras pueden aislarse del medio de cultivo y/o replegarse y dimerizarse *in vitro* para formar preparaciones biológicamente activas. Los heterodímeros pueden formarse *in vitro* al combinar cadenas polipeptídicas diferentes separadas. Alternativamente, los heterodímeros pueden formarse en una sola célula al coexpresar ácidos nucleicos que codifican cadenas polipeptídicas diferentes separadas. Véanse, por ejemplo, el documento WO93/09229 o la Patente de EE.UU. N° 5.411.941, para varios protocolos ejemplares de producción de proteínas heterodímeras recombinantes. Células huésped actualmente preferidas incluyen, sin limitación, procariotas, incluyendo *E. coli*, o eucariotas, incluyendo una levadura tal como *Saccharomyces*, células de insecto o células mamíferas, tales como células CHO, COS o BSC. Un experto normal en la técnica apreciará que pueden usarse ventajosamente otras células huésped. Descripciónes detalladas de las proteínas útiles en la práctica de esta invención, incluyendo cómo elaborarlas, usarlas y probarlas con respecto a la actividad osteogénica, se describen en numerosas publicaciones, incluyendo las Patentes de EE.UU. N° 5.266.683 y 5.011.691.

#### B. Factores Neurotróficos GDNF/NGF

Los factores neurotróficos GDNF/NGF útiles en las preparaciones de la presente invención incluyen polipéptidos, así como variantes funcionales de polipéptidos, que comprenden al menos la porción activa de una proteína mamífera madura seleccionada del grupo que consiste en GDNF, BDNF, NGF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6. Cada uno de estos factores neurotróficos GDNF/NGF preferidos se analizan separadamente a continuación.

1. GDNF. El factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) es un factor neurotrófico que pertenece la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), pero no a la familia OP/BMP dentro de la superfamilia TGF- $\beta$ . El GDNF presenta potentes efectos de supervivencia y promoción de la diferenciación para neuronas dopaminérgicas en modelos animales tanto *in vitro* (Lin y otros, *Science* 260:1130-1132 (1993)) como *in vivo* (Hudson y otros, *Brain Res. Bull.* 36:425-432 (1995); Hoffer y otros, *Neurosci. Lett.* 182:107-111 (1994). También se ha mostrado que el GDNF tiene efectos neurotróficos para neuronas motrices colinérgicas del tallo encefálico y la médula espinal. Oppenheim y otros, *Nature* 373:344-346 (1995); Yan y otros, *Nature* 373:341-344 (1995). Descripciónes de la porción activa de una proteína de GDNF mamífera madura pueden encontrarse en, por ejemplo, Lin y otros, *Science* 260:1130-1132 (1993); Lin y otros, *J. Neurochem.* 63:758-768 (1994) y en la publicación PCT WO97/11965. En resumen, el GDNF se sintetiza como un precursor y se secreta como una proteína madura que comprende 134 aminoácidos, incluyendo el dominio de siete cisteínas que caracteriza a la superfamilia TGF- $\beta$  de proteínas. Una variante de 133 aminoácidos de GDNF en la que el residuo de Met inicial se ha omitido ([Met<sup>-1</sup>]GDNF) tiene una actividad biológica sustancialmente equivalente. Véase, por ejemplo, el documento WO97/11965. Según se usa en la presente memoria, el término “GDNF” incluye un polipéptido que comprende al menos la forma madura de 134 aminoácidos, así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa o la variante de 133 aminoácidos.

2. NGF. El factor de crecimiento nervioso (NGF) es el miembro mejor caracterizado de la familia de proteínas “neurotrofinas”, otros miembros de la cual incluyen factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5) y neurotrofina-6 (NT-6), analizadas posteriormente. Se ha mostrado que el NGF representa un papel en la regulación de las fases iniciales del crecimiento dendrítico, y ayuda a promover la supervivencia, el crecimiento y/o la reparación de neuronas colinérgicas y a mantener el fenotipo diferenciado de neuronas colinérgicas. Por ejemplo, el NGF puede hacer que una subpoblación de neuronas nodosas forme

dendritas en cultivo (De Koninck y otros, *J. Neurosci.* 13:577-585 (1993)) y puede potenciar el crecimiento de dendritas simpáticas cuando se inyectan *in situ* (Snider, *J. Neurosci.* 8:2628-2634 (1988)). Sin embargo, el NGF solo no apoya el crecimiento dendrítico en cultivos de neuronas simpáticas. Bruckenstein y Higgins, *Dev. Biol.* 128:324-336 (1988). Además, se ha mostrado que el NGF es eficaz al prevenir o incluso invertir la atrofia de neuronas colinérgicas inducida en un modelo de axotomía de fimbria/fórnix estándar de la enfermedad de Alzheimer. Véanse, por ejemplo, Batchelor y otros, *J. Comp. Neurol.* 284:187-204 (1989); Hefti y otros, *J. Neurobiol.* 25:1418-1435 (1994); Olson y otros, *Neurochem. J.* 25:1-3 (1994). Según se usa en la presente memoria, el término “NGF” incluye un polipéptido que comprende al menos la forma madura, así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

3. BDNF. Se ha mostrado que el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), otro miembro de la familia de proteínas neurotrofinas, potencia la captación de dopamina por neuronas DA nigrales fetales en cultivo celular (Beck y otros, *Neurosci.* 52:855-866 (1993); Knusel y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:961-969 (1991)) y protege parcialmente a las neuronas DA de los efectos tóxicos de las neurotoxinas N-metil-4-fenilpiridinio y 6-hidroxidopamina (6-ODHA). Hyman y otros, *Nature* 350:230-232 (1991). También se ha mostrado que el BDNF tiene un fuerte efecto de apoyo sobre la supervivencia de neuronas DA nigrales cultivadas. Beck y otros, *Neurosci.* 52:855-866 (1993); Hyman y otros, *Nature* 350:230-232 (1991); Knusel y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 88:961-965 (1991). Estos hallazgos sugirieron que el BDNF podría tener un efecto promotor de la supervivencia sobre neuronas DA injertadas *in vivo*. El tratamiento con BDNF potencia el efecto de comportamiento de neuronas DA nigrales injertadas hacia el cuerpo estriado agotado en DA de ratas unilateralmente lesionadas con 6-ODHA según se manifiesta por una reducción relativa en la renovación inducida por anfetamina a las dos semanas después del injerto. Sauer y otros, *Brain Research* 626:37-44 (1993). Sin embargo, este estudio no establecía ninguna diferencia de corte clara entre animales tratados y de control en la extensión de la emergencia de neuritas desde las neuronas DA injertadas. Así, aunque la infusión con BDNF producía varios efectos de comportamiento y morfológicos en ratas injertadas con tejido nigral fetal, era incapaz de incrementar las tasas de supervivencia de las células dopaminérgicas trasplantadas. Según se usa en la presente memoria, el término “BDNF” incluye un polipéptido que comprende al menos la forma madura, así como una variante funcional del polipéptido, tal como un variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

4. NT-3. Según se usa en la presente memoria, “NT-3” significa una proteína humana, o sus homólogos mamíferos, que tiene una secuencia proteínica esencialmente como la publicada en Jones y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:8060-8064 (1990); Maisonpierre y otros, *Genomics* 10:558-568 (1991); Kaisho y otros, *FEBS Lett.* 266:187-191 (1990); WO 91/03569; y disponible a través del N° de Registro de GenBank M37763. El aislamiento y/o la caracterización de NT-3 humana se describe en, por ejemplo, Jones y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:8060-8064 (1990) y Maisonpierre y otros, *Science* 247:1446-1451 (1990). La secuencia de NT-3 de ratón se describe en Hohne y otros, *Nature* 344:339-341 (1990); WO 91/03569 y el N° de Registro de GenBank X53257. La secuencia del gen de NT-3 de rata se describe en Ernfors y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:5454-5458 (1990); WO 91/03569 y el N° de Registro de GenBank M34643. La comparación del precursor de NT-3 humana con los precursores de NT-3 de rata y ratón revela que las formas maduras son idénticas. El gen para NT-3 humana codifica un precursor de 257 aminoácidos putativo con un péptido de señal de 18 aminoácidos que se procesa hasta un péptido maduro de 119 aminoácidos. RNA de NT-3 se ha detectado en tejidos del SNC humano, incluyendo el cerebelo, el núcleo basal, los ganglios basales, el hipocampo y la corteza visual. Maisonpierre y otros, *Genomics* 10:558-568 (1991). La NT-3 humana comparte 56% de identidad de aminoácidos con NGF humano y BDNF humano, y comparte las 6 cisteínas conservadas con otros miembros de la familia de neurotrofinas, estando las regiones de mayor homología entre las tres proteínas aglomeradas alrededor de estos residuos de cisteína. El término “NT-3”, según se usa en la presente memoria, incluye un polipéptido que comprende al menos la forma de 119 aminoácidos madura según se describe en Jones y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:8060-8064 (1990), así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

5. NT-4. Según se usa en la presente memoria, “NT-4” significa una proteína humana, o sus homólogos mamíferos, que tiene una secuencia proteínica esencialmente como la publicada en Ip y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:3060-3064 (1992); Patente de EE.UU. N° 5.364.769; y disponible a través del N° de Registro del GenBank M86528. El aislamiento y/o la caracterización de NT-4 se describe en, por ejemplo, Ip y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:3060-3064 (1992); Hallböök y otros, *Neuron* 6:845-858 (1991); e Ibañez y otros, *Development* 117:1345-1353 (1993). La secuencia del gen de NT-4 completa codifica una proteína precursora de 27 kD de 236 aminoácidos que comprende una secuencia de péptido de señal putativa y la región pro de aproximadamente 60 aminoácidos, que se cree que es procesada hasta un polipéptido de NT-4 humano maduro de 130 aminoácidos. La forma madura de NT-4 comparte 46,5%, 55,4% y 52,2% de identidad de secuencia con NGF, BDNF y NT-3, respectivamente. NT-4 contiene las 6 cisteínas conservadas de la familia de neurotrofinas, pero contiene una inserción de 7 aminoácidos situada entre las cisteínas segunda y tercera. Se ha demostrado que NT-4 apoya la supervivencia de neuronas del ganglión trigeminal en el ratón (Ibañez y otros, *Development* 117:1345-1353 (1993)) y los ganglios radicales dorsales en el pollo (Ip y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:3060-3064 (1992)). En la rata, Se ha encontrado mRNA de NT-4 en la médula espinal y varias regiones cerebrales incluyen el cerebelo y la corteza. El término “NT-4”, según se usa en la presente memoria, incluye un polipéptido que comprende al menos la forma de 130 aminoácidos madura que se describe en Ip y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:3060-3064 (1992), así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

6. NT-5. Según se usa en la presente memoria, el término “NT-5” significa una proteína humana, o sus homólogos mamíferos, que tiene una secuencia proteínica esencialmente como la descrita en Berkemeier y otros, *Neuron* 7:857-866 (1991). El aislamiento y/o la caracterización de NT-5 se describe en, por ejemplo, Berkemeier y otros, *Neuron* 7:857-866 (1991) y Berkemeier y otros, *Som. Cell Mol. Genet.* 18:233-245 (1992). El gen humano para NT-5 codifica una proteína precursora de 22,4 kD de 210 aminoácidos putativa. El codón de iniciación asignado es seguido por un sitio de segmentación de la secuencia de señal putativa en Ser-24. La secuencia pre-pro putativa de NT-5 es aproximadamente 50 aminoácidos más corta que las de las otras neurotrofinas. La homología global del precursor de NT-5 con NT-4 de *Xenopus*, NT-3 humana, BDNF y NGF humano es 52%, 45%, 47% y 41%, respectivamente. La NT-5 madura tiene 123 aminoácidos de largo y comparte las 6 cisteínas conservadas en la familia de las neurotrofinas. NT-5 comparte 50% de homología con NGF, 56% de homología con BDNF, 55% de homología con NT-3 y 66% de homología con NT-4 de *Xenopus*. El gen de NT-5 de rata codifica una proteína de 209 aminoácidos que es 91% idéntica a su homólogo humano. Berkemeier y otros, *Neuron* 7:857-866 (1991). Proteína de NT-5 se ha identificado en cerero de rata adulta y actúa como un factor de supervivencia para células sensoras de gangliones radicales dorsales y promueve la supervivencia y la emergencia de neuritas a partir de neuronas de gangliones simpáticos. Berkemeier y otros, *Neuron* 7:857-866 (1991). El término “NT-5”, según se usa en la presente memoria, incluye un polipéptido que comprende la forma de 123 aminoácidos madura, así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

7. NT-6. Según se usa en la presente memoria, “NT-6” significa una proteína humana, o su homólogo mamífero, que tiene una secuencia proteínica esencialmente como la descrita en Gotz y otros, *Nature* 327: 266-269; WO 95/26363 (1994); y disponible a través del N° de Registro de GenBank L36325 y L36942. El aislamiento y la caracterización de NT-6 se describe en, por ejemplo, Gotz y otros, *Nature* 327:266-269 (1994). El precursor de NT-6 contiene 286 aminoácidos, que tienen un dominio hidrófobo en el extremo N (residuos 1-19) característico de un péptido de señal, y una región pro putativa en los residuos 20-142. La proteína madura putativa empieza en el residuo 143. NT-6 comparte las 6 cisteínas conservadas encontradas en todas las neurotrofinas, pero contiene una inserción de 22 residuos entre dominio que contiene la segunda y tercera cisteína conservada. El término “NT-6”, según se usa aquí, incluye un polipéptido que comprende la forma de 119 aminoácidos madura descrita en Gotz y otros, *Nature* 327:266-269 (1994), así como una variante funcional del polipéptido, tal como una variante de sustitución de aminoácidos conservativa.

### 30 C. Sujetos para el Tratamiento

Los sujetos para el tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen, sin limitación, (1) los que tienen tejidos neurales que se han dañado, o tienen riesgo inminente de daño, debido a traumas mecánicos tales como los que surgen de traumas por fuerzas romas en la cabeza, edema cerebral, hematoma subdural, vértebras rotas o aplastadas o nervios rasgados o seccionados (incluyendo las que surgen de procedimientos quirúrgicos); (2) los que han sufrido, o tienen riesgo inminente de sufrir, traumas químicos en tejido nervioso que pueden surgir, por ejemplo, de exposición a neurotoxinas (por ejemplo, plomo, etanol, amoníaco, formaldehído, mercurio) o la administración de agentes quimioterapéuticos con efectos secundarios neurotóxicos (por ejemplo, cisplatino); (3) los que han sufrido, o tienen riesgo inminente de, una lesión isquémica en tejidos neurales (por ejemplo, apoplejía cerebral) y (4) los afectados por, o con riesgo inminente de, una enfermedad neuropática o neurodegenerativa. Se contempla particularmente el tratamiento de sujetos humanos diagnosticados de, o con riesgo inminente de, una enfermedad neuropática o neurodegenerativa seleccionada del grupo que consiste en esclerosis lateral amiotrófica (ALS), atrofia muscular progresiva, neuropatía motriz y sensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth), enfermedad de Alzheimer, epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, parálisis, demencia, enfermedad de Shy-Drager, síndrome de Wernicke-Korsakoff y enfermedad de Hallervorden-Spatz.

Enfermedades tales como ALS, atrofia muscular progresiva y neuropatía motriz y sensorial hereditaria (enfermedad de Charcot-Marie-Tooth) resultan todas, al menos en parte, de la degeneración de neuronas motrices que están situadas en el cuerno ventral de la médula espinal. Así, en una realización, la presente invención proporciona métodos y preparaciones que emplean un morfogén OP/BMP en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF para el tratamiento de estos y otros estados que implican la pérdida de o el daño a neuronas motrices.

El hipocampo, una estructura bien definida que es parte de la corteza cerebral del cerebro, es importante en la formación de la memoria a largo plazo. La degeneración de neuronas CA1 piramidales, que están situadas en la región CA1 del hipocampo, es una característica de la enfermedad de Alzheimer. Estas mismas neuronas son selectivamente vulnerables a daño isquémico y anóxico que se produce en estados tales como apoplejía y trauma de cabeza. Además, las neuronas hipocampales piramidales CA1 así como las neuronas piramidales situadas en la región CA3 del hipocampo son lesionadas selectivamente en la epilepsia. Así, en una realización, la presente invención proporciona métodos y preparaciones que emplean un morfogén OP/BMP en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF para el tratamiento de estos y otros estados que implican la pérdida o el daño a neuronas hipocampales.

La mayoría de las neuronas del cuerpo estriado utilizan GABA (ácido 4-aminobutírico) como su neurotransmisor, y pueden denominarse neuronas “GABAnérgicas”. El cuerpo estriado también es el objetivo principal de la neurodegeneración progresiva que se produce en la enfermedad de Huntington, en la que neuronas que utilizan GABA del cuerpo estriado (por ejemplo, neuronas de célula espinosa y neuronas encefalinérgicas) se atrofian y/o mueren. Así, en una realización, la presente invención proporciona métodos y preparaciones que emplean un morfogén OP/BMP en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF para el tratamiento de estos y otros estados que implican la pérdida de o el daño a neuronas del cuerpo estriado o GABAnérgicas.

Las neuronas productoras de dopamina (“dopaminérgicas” o “DA”) están situadas principalmente en la sustancia negra y, en una extensión menor, en el cuerpo estriado adyacente (que comprende el núcleo caudado, el putamen, el globo pálido y el locus cerúleo). Las neuronas del cuerpo estriado expresan receptores para dopamina y son responsables del control de la actividad motriz. Así, la degeneración de neuronas DA da como resultado una disminución de los niveles de dopamina y una pérdida de la actividad motriz. En particular, la degeneración progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra puede conducir a la ralentización de la iniciación y la ejecución del movimiento muscular voluntario (bradiquinesia), la rigidez muscular y el temblor que son característicos de la enfermedad de Parkinson. Así, en una realización, la presente invención proporciona métodos y preparaciones que emplean un morfogén OP/BMP en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF para el tratamiento de estos y otros estados que implican la pérdida de o el daño a neuronas dopaminérgicas, incluyendo las de la sustancia negra.

Otros estados neuropáticos en los que poblaciones de células neurales se pierden o dañan incluyen parálisis, demencia, enfermedad de Shy-Drager, síndrome de Wernicke-Korsakoff y enfermedad de Hallervorden-Spatz. Así, en otras realizaciones, la presente invención proporciona métodos y preparaciones que emplean un morfogén OP/BMP en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF para el tratamiento de estos y otros estados que implican pérdida de o daño a tejidos neurales.

#### D. Preparaciones Farmacéuticas

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen al menos un morfogén OP/BMP en combinación con al menos un factor neurotrófico GDNF/NGF. Preferiblemente, tales preparaciones incluyen una cantidad de cada gen que es eficaz cuando se administra por sí misma. Sin embargo, debido al efecto sinérgico de los agentes en combinación, las preparaciones farmacéuticas pueden contener una cantidad de cada agente que, cuando se administrara en ausencia del otro, no sería eficaz sola. Las determinaciones de relaciones apropiadas de los agentes está dentro de la capacidad y la competencia de un experto normal en la técnica para el tratamiento de un estado dado, para una combinación dada de morfogén OP/BMP y factor neurotrófico GDNF/NGF, y una ruta de administración dada.

Como una cuestión general, las preparaciones farmacéuticas de la presente invención, que incluyen al menos un morfogén OP/BMP y al menos un factor neurotrófico GDNF/NGF, pueden probarse usando ensayos *in vitro*, modelos animales y estudios clínicos. Concentraciones eficaces de las preparaciones son aquellas suficientes para (1) provocar una emergencia de neuritas potenciada en un ensayo *in vitro* de crecimiento neuronal; (2) provocar mejora en la aptitud motriz en un modelo animal estándar de la enfermedad de Parkinson; o (3) provocar una mejora clínicamente significativa en la función neurológica cuando se administran a un sujeto mamífero (por ejemplo, un paciente humano).

#### E. Métodos y Formulaciones para Administración

Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención, que incluyen al menos un morfogén OP/BMP y al menos un factor neurotrófico GDNF/NGF, pueden administrarse a un individuo mediante cualquier medio adecuado, preferiblemente directamente (por ejemplo, localmente, tal como mediante inyección a un emplazamiento tisular) o sistémicamente (por ejemplo, parenteralmente u oralmente). Cuando la preparación ha de administrarse parenteralmente, tal como mediante administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracraneal, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal o bucal, la preparación comprende preferiblemente parte de una solución acuosa. La solución se elige para que sea fisiológicamente aceptable, tal que, además del aporte del morfogén OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF deseados al paciente, la solución no afecte adversamente de otro modo al equilibrio electrolítico y volumétrico del paciente.

Soluciones útiles para administración parenteral pueden prepararse mediante una variedad de métodos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Gennaro, A., ed., Mack Pub., (1990). Las formulaciones pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las formulaciones para administración directa, en particular, pueden incluir glicerol y otras preparaciones de alta viscosidad. Polímeros biocompatibles, preferiblemente biorreabsorbibles, incluyendo, por ejemplo, ácido hialurónico, colágeno, polibutirato, fosfato tricálcico, láctico y copolímeros de láctido/glicólido, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de la preparación *in vivo*. Otros sistemas de aporte parenteral potencialmente útiles para estas preparaciones incluyen partículas de copolímero de etilenoacetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas.

Como se apreciará por los expertos en la técnica, las cantidades y/o las concentraciones de los agentes presentes en una preparación farmacéutica variarán dependiendo de un número de factores, incluyendo la dosificación del fármaco que ha de administrarse, las características químicas (por ejemplo, hidrofobia) de los agentes empleados y la ruta de administración. La dosificación preferida también puede depender de variables tales como el tipo y la extensión del daño o la lesión que ha de tratarse, el estado de salud global del sujeto, la eficacia biológica relativa de los agentes empleados, la presencia de excipientes o diluyentes, y similares.

Como una cuestión general, las preparaciones farmacéuticas de la presente invención se administran en cantidades suficientes para alcanzar concentraciones eficaces del morfogén OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF en una zona de daño o lesión tisular neural, o en una zona de riesgo inminente de tal lesión. Preferiblemente, las preparaciones contienen una cantidad de un morfogén OP/BMP tal que, cuando se administra mediante la ruta de administración elegida, da como resultado una concentración del morfogén OP/BMP de 0,1 ng/ml a 10 µg/ml, más preferiblemente

1 ng/ml a 100 ng/ml. De forma similar, las preparaciones contienen preferiblemente una cantidad de un factor neurotrófico GDNF/NGF tal que, cuando se administra mediante la ruta de administración elegida, da como resultado una concentración del factor neurotrófico GDNF/NGF de 0,1 ng/ml a 10  $\mu$ g/ml, más preferiblemente 1 ng/ml a 100 ng/ml. Debido a las interacciones sinérgicas de los morfógenos OP/BMP y los factores neurotróficos GDNF/NGF, las concentraciones y las relaciones óptimas variarán dependiendo de los agentes particulares empleados.

Cuando la lesión a neuronas de una ruta neural está inducida deliberadamente como parte de, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico, el morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF preferiblemente se proporcionan justo antes de o concomitantemente con la inducción del trauma. Preferiblemente, el morfógeno y el factor neurotrófico se administran profilácticamente en un entorno quirúrgico.

Cuando el morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico han de proporcionarse a una zona para estimular la regeneración de axones, la preparación farmacéutica se proporciona preferiblemente a la zona en asociación con un portador biocompatible, preferiblemente biorreabsorbible, adecuado para mantener las proteínas en la zona *in vivo*, y a través del cual puede regenerarse un apéndice neural. Un portador preferido actualmente también comprende una estructura suficiente para ayudar a la dirección del crecimiento axonal. Portadores actualmente preferidos incluyen moléculas estructurales tales como colágeno, ácido hialurónico o laminina, y/o polímeros o copolímeros sintéticos de, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(ácido butírico). Actualmente, los más preferidos son portadores que comprenden matriz extracelular tisular. Estos pueden obtenerse comercialmente. Además, una matriz extracelular derivada de tejido cerebral puede prepararse como se describe en la Publicación PCT WO92/15323 y/o mediante otros medios conocidos en la técnica.

Los medios actualmente preferidos para reparar roturas en rutas neurales, particularmente rutas del sistema nervioso periférico, incluyen proporcionar el morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF a la zona como parte de un dispositivo que induce una membrana o envuelta biocompatible de una dimensión suficiente para cubrir la rotura y que tiene aberturas adaptadas para recibir extremos nerviosos seccionados. El morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF se disponen dentro de la envuelta, preferiblemente dispersados a través de un portador adecuado, y son accesibles a los extremos del nervio seccionados. Alternativamente, el morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF pueden adsorberse sobre la superficie interior de la envuelta, o asociarse de otro modo con ella. La envuelta actúa como un canal de guía del nervio, ayudando a dirigir el crecimiento axonal. Materiales de canal o envuelta adecuados incluyen silicona o materiales biorreabsorbibles tales como colágeno, ácido hialurónico, laminina, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido butírico) y similares.

## Ejemplos

### *Sinergia del Morfógeno OP/BMP y el Factor Neurotrófico GDNF/NGF*

Las composiciones de morfógeno OP/BMP y factor neurotrófico GDNF/NGF descritas en la presente memoria potencian la formación de apéndices en células neurales. Se usó una variedad de ganglios periféricos derivados de pollos embrionarios como un modelo para la inducción de la emergencia de fibras nerviosas mediante OP-1 (Creative Biomolecules, Hopkinton, MA) en combinación con GDNF (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey), NT-3 (Austral Biologicals, San Ramon, CA), activina A (Austral Biologicals, San Ramon, CA) o  $\beta$ -NGF de ratón.

Se obtuvieron ganglios periféricos de pollos embrionarios de 9 días (E9) de acuerdo con el método de Ebendal y otros (Ebendal, en *IBRO Handbook series: Methods in the Neurosciences* Vol. 12, pp. 81-93 (1989), John Wiley, Chichester). Se obtuvieron ganglios simpáticos de la región lumbar. Se obtuvieron ganglios ciliares de la órbita. Se obtuvieron ganglios de Remak del mesorrecto dorsal. Se obtuvieron ganglios radicales dorsales de la región lumbosacra. Se obtuvieron ganglios nodosos del nervio vago craneal hacia el corazón. Para algunos experimentos, se obtuvieron ganglios trigeminales y los lóbulos maxilomandibular y oftálmico se separaron antes del explante. Los ganglios se extirparon intactos y se mantuvieron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% en una matriz de colágeno o se disociaron en neuronas simples y se extendieron en un gel de colágeno delgado (Ebendal (1989), anteriormente). En ambos casos, los geles se complementaron con volúmenes iguales de medio basal de Eagle con suero de ternero fetal al 1%. Los cultivos de control consistían en medio basal de Eagle con suero de ternero fetal al 1%, en algunos casos complementado con el tampón (arginina 25 mM, NaCl 150 mM, pH 9,0, Tween 80 al 0,1%) a concentraciones para ajustarse a las condiciones de cultivo experimentales. Los cultivos se trataron con medio de control, OP-1, NT-3, GDNF o NGF solos, o en diversas combinaciones y en una serie de concentraciones durante 2, 4 y 6 días.

Los cultivos de 6 días se alimentaron con medio reciente que contenía los factores de crecimiento el día 4 después de la incubación. Los ganglios enteros se examinaron bajo iluminación de campo oscuro mientras que las neuronas disociadas se examinaron usando óptica de contraste de fases. Las células supervivientes se contaron en una tira a través de la placa para calcular la supervivencia relativa a la supervivencia de células tratadas con NGF en 5 ng/ml durante 2 días.

Estudios previos han mostrado que NT-3 provoca emergencia de fibras en ganglios ciliares explantados y también provoca una respuesta débil en ganglios simpáticos del embrión de pollo. Ernfors y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87:5454-5458 (1990). OP-1 potencia mucho la emergencia de fibras inducida por tratamiento con NT-3 en ganglios simpáticos E9. Los efectos eran evidentes después de 2 días en cultivo y persistían después de 4 días de cultivo. Las concentraciones óptimas de NT-3 y OP-1 eran 10 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente. El tratamiento de cultivos

de ganglios con OP-1 en combinación con GDNF daba resultados similares. OP-1 no estimulaba la emergencia de fibras de ninguno de los ganglios E9 explantados totales a dosis de 0,1 ng/ml a 1000 ng/ml. Además, OP-1 tampoco estimulaba ganglios más jóvenes (por ejemplo, procedentes del día embrionario 4, 5). El tampón (pH 9) no ejercía ningún efecto potenciador sobre las respuestas de NT-3 en ganglios simpáticos, ciliares o nodosos.

El tratamiento de ganglios ciliares con 10 ng/ml de NT-3 y 50 ng/ml de OP-1 daba como resultado halos fibrosos robustos que consistían en manojos gruesos de neuritas que radiaban desde la célula. El tratamiento de ganglios ciliares con 50 ng/ml de GDNF y 50 ng/ml de OP-1 daba un halo fibroso de manojos de nervios ciliares después de 2 días de cultivo. Los ganglios ciliares extendían menos fibras nerviosas o fibras nerviosas menos robustas en respuesta a NT-3 (2 ng/ml y 10 ng/ml) y GDNF (50 ng/ml) pero no extendían neuritas en respuesta a 50 ng/ml de OP-1 sola.

Así, el tratamiento de neuronas con una combinación de OP-1 y NT-3, u OP-1 y GDNF, sugería un efecto sinérgico de OP-1 sobre la emergencia de neuritas inducida por NT-3 o GDNF. Un análisis estadístico también muestra que las diferencias en la supervivencia son significativas (Figura 1) en comparación con el control (BME o medio basal, Eagle). Tanto OP-1 como NT-3 se requieren desde el principio del período de tratamiento para provocar la respuesta de emergencia nerviosa potenciada en los ganglios ciliares.

Neuronas sensoras de los ganglios nodosos también se trataron con OP-1 (50 ng/ml) sola y en combinación con NT-3 (2 ng/ml y 10 ng/ml) u OP-1 (50 ng/ml) en combinación con GDNF (50 ng/ml). El tratamiento de las neuronas sensoras con OP-1 sola no provocaba emergencia de fibras. Sin embargo, OP-1 potenciaba la emergencia de neuritas inducida por NT-3 después de 2 y 4 días de tratamiento.

La activina A (20 ng/ml) no imitaba los efectos de OP-1 cuando se probaba sola o en combinación con NT-3 (10 ng/ml), GDNF (50 ng/ml) o NGF (5 ng/ml) en el tratamiento de los ganglios simpáticos.

Por lo tanto, OP-1 es capaz de promover la formación de apéndices nerviosos inducida por NT-3 y GDNF en varias clases de neuronas periféricas.

#### *Tratamientos para la Enfermedad de Alzheimer*

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa en la que existe pérdida neuronal significativa de las células piramidales grandes de las áreas de asociación parietal y frontal, el hipocampo y la amígdala. Las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal y las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo también se ven gravemente afectadas.

De acuerdo con la presente invención, un morfógeno OP/BMP, preferiblemente OP-1 humana, ha de administrarse a un paciente con enfermedad de Alzheimer en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF, preferiblemente GDNF o NT-3, para promover el crecimiento y la supervivencia de células en esta región, así como para inhibir la pérdida progresiva de células neuronales adicionales.

Una preparación farmacéutica acuosa que comprende un morfógeno OP/BMP y factor neurotrófico GDNF/NGF ha de administrarse al paciente parenteralmente. Preferiblemente, la preparación se administra intracerebralmente mediante, por ejemplo, inyección o infusión intracerebroventricular o intratecal. En una realización, el cráneo del sujeto se inmoviliza en un dispositivo estereotáxico, se realiza un pequeño agujero en el cráneo y la preparación se inyecta o infunde directamente en las regiones afectadas del cerebro. Las dosificaciones pueden calcularse para alcanzar concentraciones del morfógeno OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF de aproximadamente 0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ , preferiblemente aproximadamente 1-100 ng/ml, en la zona de inyección. Alternativamente, las dosificaciones pueden calcularse para aportar aproximadamente 10-100  $\mu\text{g/kg}$  del morfógeno y el factor neurotrófico, preferiblemente 1-25  $\mu\text{g/kg}$ . Las dosificaciones se repiten diariamente o menos frecuentemente durante un período de varias semanas a meses o, si es necesario, en base regular a lo largo de la vida del sujeto. Alternativamente, un dispositivo de liberación sostenida ha de implantarse dentro del cerebro del sujeto para provocar una liberación continua de la preparación a lo largo de un período prolongado.

#### *Tratamiento para Fibras Nerviosas Seccionadas*

Debido a la capacidad limitada de las células nerviosas mamíferas para crecer o regenerarse, las fibras nerviosas seccionadas conducen frecuentemente a pérdida permanente de la función sensorial o motriz asociada con el nervio. Las fibras nerviosas pueden rasgarse o seccionarse en accidentes (por ejemplo, accidentes automovilísticos) o como un efecto secundario inevitable de la cirugía.

De acuerdo con la presente invención, un morfógeno OP/BMP, preferiblemente OP-1 humana, ha de administrarse en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF, preferiblemente GDNF o NT-3, a un sujeto que tiene fibras nerviosas seccionadas para promover el crecimiento reparador y la supervivencia de células dañadas.

Una preparación farmacéutica acuosa que comprende un morfógeno OP/BMP y factor neurotrófico GDNF/NGF ha de administrarse al paciente parenteralmente. En el caso de fibras nerviosas periféricas dañadas (por ejemplo, en el nervio ciático), la preparación se administra preferiblemente junto con el uso de canales de guía del nervio que encierran los extremos de las fibras seccionadas y guían su crecimiento conjuntamente. En el caso de fibras secciona-

das en la médula espinal, la preparación se inyecta o infunde preferiblemente en el fluido cerebroespinal en la región de la lesión. Las dosificaciones pueden calcularse para alcanzar concentraciones del morfogén OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF de aproximadamente 0,1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , preferiblemente aproximadamente 1-100  $\text{ng}/\text{ml}$ , en la zona de inyección o infusión. Alternativamente, las dosificaciones pueden calcularse para aportar aproximadamente 10-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del morfogén y el factor neurotrófico, preferiblemente 1-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En el caso de una lesión espinal, las dosificaciones se repiten diariamente o menos frecuentemente durante un período de varias semanas a meses. Alternativamente, en el caso de nervios periféricos seccionados encerrados en canales de guía del nervio, ha de emplearse una formulación de liberación sostenida en la que la preparación se mezcla con un material de matriz dentro del canal de guía del nervio.

#### *Tratamientos para la Apoplejía*

Los episodios isquémicos, o apoplejías, en el cerebro pueden provocar lesiones neurales que dan como resultado pérdida permanente de función cognitiva, sensorial o motriz. Inmediatamente después del comienzo de una apoplejía, la inhibición de la muerte o degeneración de las células en el área isquémica, así como la promoción del crecimiento y la supervivencia de estas células, es importante para minimizar el daño permanente.

De acuerdo con la presente invención, un morfogén OP/BMP, preferiblemente OP-1 humana, ha de administrarse en combinación con un factor neurotrófico GDNF/NGF, preferiblemente GDNF o NT-3, a un sujeto que sufre una apoplejía.

Una preparación farmacéutica acuosa que comprende un morfogén OP/BMP y factor neurotrófico GDNF/NGF ha de administrarse al paciente parenteralmente. Preferiblemente, la preparación se administra intracerebralmente mediante, por ejemplo, inyección o infusión intracerebroventricular o intratecal. Las dosificaciones pueden calcularse para alcanzar concentraciones del morfogén OP/BMP y el factor neurotrófico GDNF/NGF de aproximadamente 0,1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , preferiblemente aproximadamente 1-100  $\text{ng}/\text{ml}$ , en la zona de inyección. Alternativamente, las dosificaciones pueden calcularse para aportar aproximadamente 10-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del morfogén y el factor neurotrófico, preferiblemente 1-25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las dosificaciones pueden ser continuas o frecuentes durante un período de varios días a semanas. Las primeras dosificaciones se administran preferiblemente dentro de las primeras pocas horas desde el comienzo de la apoplejía.

## ES 2 288 766 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de (a) un morfogén que comprende una proteína dímera que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con el esqueleto de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana y (b) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6, para la fabricación de un medicamento para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas en un sujeto mamífero afectado por, o con riesgo inminente de, una enfermedad neuropática o neurodegenerativa.
- 10 2. Uso de (a) un morfogén que comprende una proteína dímera que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con el esqueleto de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana y (b) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero afectado de daño o lesión a células neurales.
- 15 3. Uso de (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero con riesgo inminente de daño o lesión a células neurales.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho daño o lesión comprende un trauma mecánico a un tejido que comprende dichas células.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho trauma mecánico se selecciona del grupo que consiste en lesión cerebral traumática por fuerza roma, lesión traumática de la médula espinal por fuerza roma, concusión, presión intracraneal debida a edema cerebral o hematoma subdural, vértebras rotas o aplastadas y nervios rasgados o seccionados.
- 30 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho daño o lesión comprende un trauma químico a un tejido que comprende dichas células.
- 35 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho daño o lesión comprende isquemia de un tejido que comprende dichas células.
- 40 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho daño o lesión resulta de una enfermedad neuropática.
- 45 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 u 8, en el que dicha enfermedad neuropática se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, parálisis, demencia, enfermedad de Shy-Drager, síndrome de Wernicke-Korsakoff y enfermedad de Hallervorden-Spatz.
- 50 10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células neurales comprenden neuronas o células neurogliales.
- 55 11. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células neurales comprenden células neurales del sistema nervioso central.
- 60 12. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células neurales comprenden células del sistema nervioso periférico.
- 65 13. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de homología con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.
15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de aminoácidos con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho morfogén comprende al menos el dominio de seis o siete cisteínas C-terminal de una proteína mamífera seleccionada del grupo que consiste en OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 o BMP9.

## ES 2 288 766 T3

18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 0,1 ng/ml a 10 µg/ml, y dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 0,1 ng/ml a 10 µg/ml.

5 19. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

20. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

10 21. El uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml y dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

22. Uso de (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP, para la fabricación de un medicamento para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas en un sujeto mamífero afectado por, o con riesgo inminente de, una neuropatía o una enfermedad neurodegenerativa, en el que dichas células expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por dicho factor neurotrófico.

20 23. Uso de (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero afectado por daño o lesión a células neurales mamíferas, en el que dichas células expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por dicho factor neurotrófico.

25 24. Uso de (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP, para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto mamífero con riesgo inminente de daño o lesión a células neurales mamíferas, en el que dichas células expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por dicho factor neurotrófico.

30 25. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho factor neurotrófico es GDNF.

26. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que dicho factor neurotrófico es NT-3.

35 27. Un método *in vitro* para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas, que comprende: poner en contacto las células neurales con una preparación sinérgica que comprende (a) un morfogén que comprende una proteína dímera que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con el esqueleto de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana y (b) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6.

40 28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dichas células neurales comprenden neuronas o células neurogliales.

45 29. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dichas células neurales comprenden células neurales del sistema nervioso central.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dichas células neurales comprenden células del sistema nervioso periférico.

50 31. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.

55 32. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de homología con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de aminoácidos con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.

60 34. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en el que dicho morfogén comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de aminoácidos con el dominio de siete cisteínas C-terminal de OP-1 humana.

65 35. El método de acuerdo con la reivindicación 31, en el que dicho morfogén comprende al menos el dominio de seis o siete cisteínas C-terminal de una proteína mamífera seleccionada del grupo que consiste en OP-1, OP-2, OP-3, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 o BMP9.

## ES 2 288 766 T3

36. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 0,1 ng/ml a 10 µg/ml y dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 0,1 ng/ml a 10 µg/ml.

5 37. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en el que dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

10 39. El método de acuerdo con la reivindicación 36, en el que dicho morfogén está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml y dicho factor neurotrófico está presente en una concentración de 1 ng/ml a 100 ng/ml.

15 40. Un método *in vitro* para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas, en el que dichas células expresan un receptor de serina/treonina quinasa activado por OP/BMP y un receptor de tirosina quinasa activado por GDNF o neurotrofina, comprendiendo dicho método poner en contacto dichas células con una concentración eficaz de una preparación sinérgica que comprende: (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP.

20 41. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 40, en el que dicho factor neurotrófico es GDNF.

42. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 40, en el que dicho factor neurotrófico es NT-3.

25 43. Una preparación farmacéutica para promover la supervivencia de, o inhibir la muerte o la degeneración de, células neurales mamíferas, que comprende: (a) un factor neurotrófico seleccionado del grupo que consiste en GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5 y NT-6 y (b) un morfogén OP/BMP.

30 44. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 43, en la que dicho factor neurotrófico es GDNF.

45. Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 43, en la que dicho factor neurotrófico es NT-3.

35 46. Una preparación farmacéutica de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, en donde dicha preparación comprende además un portador biocompatible.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

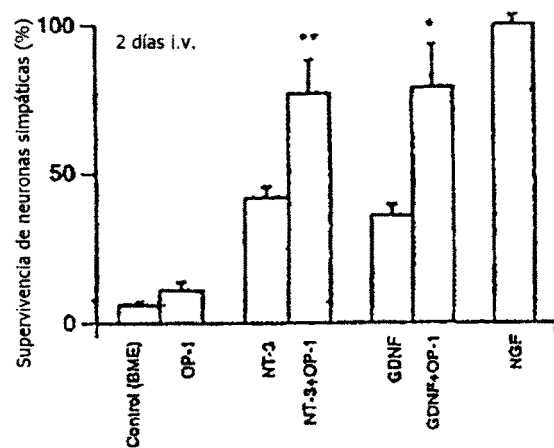


FIGURA 1B

