



(51) Clasificación Internacional de Patentes:

A61K 38/19 (2006.01) C07K 14/52 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)  
C07K 14/495 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2011/000008

(22) Fecha de presentación internacional:

19 de enero de 2011 (19.01.2011)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201000060 19 de enero de 2010 (19.01.2010) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI-Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

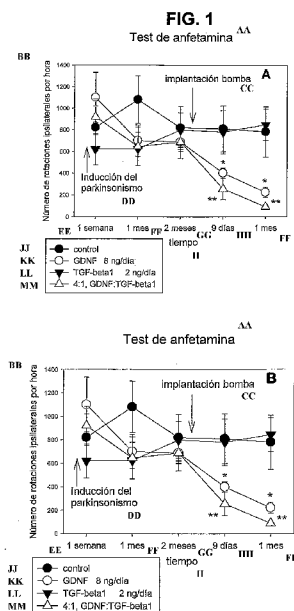
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): FERNÁNDEZ ESPEJO, Emilio [ES/ES]; Dpto. Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani, E-41009 Sevilla (ES). GONZÁLEZ APARICIO, Ramiro José [ES/ES]; Dpto. Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Avda. Dr. Fedriani, E-41009 Sevilla (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING GDNF AND TGF- $\beta$ 1 AND USE THEREOF FOR THE TREATMENT OF A NEUROLOGICAL DISEASE

(54) Título : COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE GDNF Y TGF- $\beta$ 1 Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD NEUROLÓGICA



(57) Abstract: Pharmaceutical composition comprising the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) and the transforming factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in a range of GDNF:TGF- $\beta$ 1 concentrations from 2:1 to 4:1. Moreover the present invention relates to the use of said pharmaceutical composition for the preparation of a medicament for the treatment of a neurological disease. Preferably the neurological disease is a neurodegenerative disease. Said disease may present with dyskinesias or other abnormal or involuntary movements. Preferably the disease is Parkinson's disease.

(57) Resumen: Composición farmacéutica que comprende el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) en un rango de concentraciones de GDNF:TGF- $\beta$ 1 de entre 2:1 a 4:1. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para la elaboración de un medicamento para el tratamiento una enfermedad neurológica. Preferiblemente la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa. Dicha enfermedad puede cursar con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios. Preferiblemente la enfermedad es Parkinson.

AA Amphetamine test  
BB Number of ipsilateral rotations per hour  
CC pump implantation  
DD Induction of parkinsonism  
EE week  
FF month  
GG months  
HH days  
II time  
JJ control  
KK GDNF 8 ng/day  
LL TGF-beta1 2 ng/day  
MM 4:1, GDNF:TGF-beta1

**(84) Estados designados** *(a menos que se indique otra cosa,**para toda clase de protección regional admisible):*

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

**Composición que comprende GDNF y TGF- $\beta_1$  y su uso para el tratamiento de una enfermedad neurológica**

La presente invención se enmarca dentro del campo de la neurobiología y de la biomedicina y se refiere a una composición farmacéutica que comprende el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor transformante beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) en un rango de concentraciones de GDNF:TGF- $\beta_1$  de entre 2:1 a 4:1. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para la elaboración de un medicamento para el tratamiento una enfermedad neurológica. Preferiblemente la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa. Dicha enfermedad puede cursar con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios. Preferiblemente la enfermedad es Parkinson.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, lo que produce disminución de la concentración de dopamina estriatal, condicionando aparición de rigidez muscular, lentitud de movimientos y temblor, síntomas que caracterizan a la EP.

Hasta ahora, debido a que la dopamina no puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE) el tratamiento más efectivo era la administración oral de levodopa, precursor de dopamina, que se absorbe por el intestino delgado y cruza la barrera hemato-encefálica penetrando en el cerebro.

Desde su introducción en la medicina a inicios de la década de 1960, la L-3,4-dihidroxifenilalanina o levodopa se ha convertido en uno de los fármacos más sorprendentes en neurología. Y, aunque después de 50 años, continúa siendo el principal fármaco para tratar la EP, en los últimos años, diversas investigaciones han aportado nuevos conocimientos sobre los mecanismos de acción y fisiopatología de las complicaciones inducidas por ella.

La levodopa absorbida es convertida a dopamina por la enzima dopadecarboxilasa (DDC). La conversión de levodopa en dopamina es

altamente eficiente y es la dopamina que circula en el plasma, la que produce múltiples y frecuentes efectos adversos.

Las altas dosis empleadas y el alto porcentaje de conversión de la levodopa en dopamina hacían que sólo el 5% de la levodopa administrada alcanzara el sistema nervioso central. Por ello, se ralentizó el uso clínico masivo de levodopa hasta la introducción de inhibidores de DDC que incrementaban en un 25% la cantidad de levodopa que iba al Sistema Nervioso Central. Esto marcó el inicio de una combinación terapéutica que se mantiene en la actualidad.

La levodopa cruza la BHE por medio de transportadores de la misma clase que permiten su ingreso desde el intestino. Una vez en la circulación encefálica, entra a la neurona directamente y es convertida mediante la DDC en dopamina.

El efecto de la levodopa es ejercido fundamentalmente a través de la dopamina producida en la neurona. La dopamina actúa estimulando directamente los receptores dopaminérgicos tipo 1 y tipo 2. La dopamina liberada al espacio sináptico es recaptada por la neurona dopaminérgica.

Probablemente, la levodopa además de convertirse en dopamina, sufre transformación a noradrenalina, así como a productos trazas de aminos, los cuales actúan en receptores no dopaminérgicos. Del mismo modo la dopamina sería capaz de estimular receptores GABA inhibitorios en la sustancia negra.

Por otro lado, recientes estudios demuestran que de los pacientes que llevan 5 años de tratamiento con levodopa, cerca de 40% desarrollan complicaciones motoras y aparición de movimientos involuntarios o discinesias. Además, estudios in vitro muestran muerte neuronal acelerada por la presencia de levodopa, por lo que se está planteando la posibilidad de que la levodopa sea tóxica.

Una alternativa a la levodopa la encontramos en el empleo de factores neurotróficos, moléculas requeridas por las neuronas para su desarrollo, migración y mantenimiento trófico que se expresan en distintas regiones del sistema nervioso.

Dentro de las potenciales familias de factores neurotróficos con capacidad terapéutica, numerosos estudios demuestran que el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es una potente molécula que protege a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración en modelos animales de EP, cuando se inyecta por ejemplo por vía intraventricular, o por medio de células trasplantadas o virus (Lin, L.F. et al., 1993. *Science* 260, 1130-1132; Tseng, J.L. et al., 1997. *J. Neurosci.* 17, 325-333; Gash, D.M., et al., 1998. *Ann. Neurol. (suppl.)* 44, G121-S125; Wider, C., et al., 2006. *Rev. Med. Suisse* 2, 1158-1162).

El GDNF induce arborización o “sprouting” de neuronas de dopamina, de tal modo que la inhibición de GDNF con “antisenses” reduce el “sprouting” tras daño estriatal (Batchelor, P.E., et al., 2000. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3462–3468), actúa reduciendo la degeneración de las fibras dopaminérgicas, proceso regulado por el sistema ubiquitina-proteosoma pues la inhibición de este sistema aumenta la degeneración neuronal (McNaught, K.S., et al., 2002. *J. Neurochem.* 81, 301-306), protege al proteosoma suprimiendo el estrés del retículo y la activación de caspasas-3 (Li, X., et al., 2007. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 62, 943-950.) y, finalmente, también incrementa la actividad y expresión de la enzima tirosina-hidroxilasa o TH, que sintetiza dopamina.

Aunque el uso de GDNF como terapia neurotrófica ya se ha realizado, ha encontrado dificultades, pues por una parte el GDNF debido a su tamaño tiene grandes dificultades en atravesar la barrera hematoencefálica, y por otra, su empleo en animales es difícil de extrapolar a humanos por la diferencia en el tamaño cerebral.

El GDNF ha fracasado en ensayos clínicos, y su administración intracerebroventricular (ICV) mediante bolos (25 a 4000 µg. por dosis) o por infusión crónica con bombas osmóticas (3 a 50 µg. por día) no ha mostrado gran eficacia terapéutica. Además los efectos adversos han sido frecuentes, como náuseas (70% de los pacientes), parestesias (50% de los pacientes), y pérdida de peso. El empleo de trasplantes celulares con células que segregan GDNF también se ha acompañado de dificultades serias, como la aparición de discinesias, o la difícil difusión de GDNF por el parénquima cerebral.

Recientemente se ha visto que el GDNF necesita del cofactor TGF- $\beta_1$  (factor de crecimiento transformante  $\beta_1$ ) para tener actividad trófica. El TGF- $\beta_1$  además de actuar como agente protector de las neuronas de dopamina in vitro (Unsicker, K., et al., 1996. *Ciba Found Symp.* 196, 70-80.) potenciaría las acciones del GDNF in vitro e in vivo (Krieglstein, K., et al., 1998. *J. Neurosci.* 18, 9822-9834.; Schober, A., et al., 2007. *Neurobiol. Dis.* 25, 378-391.), cooperando ambos factores funcionalmente, de forma que el GDNF favorece la regeneración trófica del tejido dañado y el cese de la degeneración, y el TGF- $\beta_1$  disminuye el desarrollo de la hipersensibilidad dopaminérgica que aparece en el caudado/putamen de los pacientes que han desarrollado la enfermedad.

Hasta la fecha no ha sido ensayada una composición de la combinación de ambos factores tróficos en modelos animales, y por tanto, no se ha podido establecer el rango GDNF:TGF- $\beta_1$  más adecuado. Para estudiar el efecto sinérgico de ambos factores hasta ahora sólo se ha realizado in vitro, divulgándose un rango de GDNF:TGF- $\beta_1$  5:1, de forma que se utilizaba una concentración de GDNF de 10 ng/ml y una concentración de TGF- $\beta_1$  de 2 ng/ml (H. Peterziel, et al., 2002, *The Journal of Cell Biology*, 159 (1), 157-167). Por otra parte, el ensayo de este tipo de composición presenta una gran dificultad a la hora de atravesar la barrera hematoencefálica.

Por tanto, persiste el problema del tratamiento de algunas patologías con carácter neuronal, principalmente el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor transformante beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) en un rango de GDNF:TGF- $\beta_1$  de entre 2:1 a 4:1. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicha composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurológica. Preferiblemente la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa. Dicha enfermedad puede cursar con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios, como por ejemplo, pero sin limitarse, la

enfermedad de Parkinson, trastorno de Gilles de la Tourette, síndrome de Lesch-Nyhan o un desorden neurológico causado por abstinencia a drogas o por tratamiento con al menos un neuroléptico. Preferiblemente la enfermedad es Parkinson. Además, dicha composición se administra vía intracerebroputaminal presentándose de forma adaptada a esta vía de administración para su aplicación sobre el caudado dañado y/o el putamen dañado.

Es de destacar que en la presente invención se determina el rango GDNF:TGF- $\beta_1$  más adecuado para favorecer la acción farmacológica de ambos compuestos en su administración in vivo. Con el fin de aumentar la capacidad terapéutica del factor GDNF, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de enfermedades o desórdenes neurológicos que cursen con neurodegeneración y, más específicamente con discinesias u otros movimientos anormales e involuntarios mediante el uso de una composición farmacéutica que comprende los factores combinados GDNF y TGF- $\beta_1$  en un rango de GDNF:TGF- $\beta_1$  diferente del que se divulga en el estado de la técnica y por tanto, que un experto en la materia no consideraría obvio.

Por tanto, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea el tratamiento eficaz de algunas patologías con carácter neuronal, principalmente el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en combinación con la administración de dicha composición farmacéutica de forma precisa en el caudado putamen dañado vía intracerebroputaminal, preferiblemente mediante bombas de infusión, conectadas a catéteres intracerebrales.

Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los siguientes compuestos, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor transformante beta1 (TGF- $\beta_1$ ), en un rango de concentraciones de GDNF:TGF- $\beta_1$  de entre 2:1 a 4:1. Es decir, para una misma concentración de TGF- $\beta_1$  se puede emplear un rango de concentraciones de entre 2 y 4 veces superior del factor GDNF.

El empleo de factores neurotróficos, como ya se ha comentado, es una alternativa a la levodopa. Estos factores son moléculas requeridas por las neuronas para su desarrollo, migración, y mantenimiento trófico. Se expresan

en diferentes regiones del sistema nervioso durante el desarrollo, y son específicos para distintas poblaciones neuronales, lo que les hace buenos candidatos para enfermedades neurodegenerativas.

El GDNF o factor neurotrófico derivado de la glía se aisló de líneas celulares de glía de rata y es muy específico de neuronas dopaminérgicas. Tras el procesamiento intracelular, el GDNF se segrega en forma glicosilada como proteína de 134 aminoácidos, en forma de dímero de unos 32 Kda.

Se acepta que es el factor dopaminotrófico más potente, pues como ya se ha comentado protege a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración en modelos animales de EP, cuando se inyecta, por ejemplo, por vía intraventricular, o por medio de células trasplantadas o virus. Entre las propiedades que hacen al GDNF uno de los más potentes factores neurotróficos, destacan:

- inducción de arborización o “sprouting” de las fibras nerviosas de las neuronas de dopamina.
- reducir la degeneración de las fibras dopaminérgicas, de forma que se inhibe el proceso regulado por el sistema ubiquitina-proteosoma aumentando así la degeneración neuronal.
- proteger al proteosoma suprimiendo el estrés del retículo y la activación de caspasas-3.
- incrementar la actividad y expresión de la enzima tirosina-hidroxilasa o TH, enzima encargada de la síntesis de dopamina.

Por otro lado, el TGF- $\beta_1$  o factor transformante beta-1 pertenece a la misma familia que el GDNF (factores TGF- $\beta$ ), y también ejerce efectos sobre las neuronas dopaminérgicas. TGF- $\beta_1$  se identificó en plaquetas, y tiene una masa molecular de 25 KDa. Se sintetiza como un precursor de 390 aminoácidos que se procesa en un péptido maduro de 112 aminoácidos.

El TGF- $\beta_1$ , también protege las neuronas de dopamina in vitro, y potencia las acciones del GDNF in vitro e in vivo. Se sabe que la acción combinada de ambos factores es necesaria para una acción trófica mayor de GDNF, lo que hace la combinación de ambos muy atractiva desde el punto de vista

terapéutico.

TGF- $\beta_1$  y GDNF cooperan en la señalización intracelular, aumentando la expresión del receptor GFR $\alpha_1$  en la membrana celular, hecho de gran importancia para aumentar el efecto de GDNF.

Además, datos experimentales con modelos animales de parkinsonismo indican que el rango 2:1 a 4:1 de GDNF:TGF- $\beta_1$  es apropiado, y ratios de concentraciones por encima o debajo del mismo no son igualmente efectivas. En ratas parkinsonianas se han empleado dosis de GDNF de 6, 8 y 10 ng/día durante 8 días, combinadas con TGF- $\beta_1$  a dosis de 1, 2 y 3 ng/día durante 8 días en bombas osmóticas, en distintas combinaciones o ratios. Cuando se combinaron entre sí todas las posibles dosis se obtuvo que las dosis más efectivas eran las que pertenecían al rango de 2:1 a 4:1 de GDNF:TGF- $\beta_1$  (datos mostrados en los ejemplos).

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica que adicionalmente comprende, al menos, un excipiente farmacológicamente aceptable además de GDNF y TGF- $\beta_1$ , en un rango de concentraciones de GDNF:TGF- $\beta_1$  de entre 2:1 a 4:1.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de las secuencias de la presente invención, estabiliza dicha secuencia o ayuda a la preparación de dicha composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

Otra realización preferida se refiere a la composición farmacéutica, según se describe en párrafos anteriores, que adicionalmente comprende, al menos, un

vehículo farmacológicamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los compuestos de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de los compuestos de la invención GDNF y TGF- $\beta_1$  así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia permita la actividad del rango de concentraciones de GDNF: TGF- $\beta_1$  de entre 2:1 y 4:1.

De aquí en adelante, para hacer referencia a cualquier composición descrita en párrafos anteriores se puede emplear el término “composición de la presente invención” o “composición de la invención”.

En la presente invención se demuestra que ambos factores neurotróficos cooperan funcionalmente. Así, la acción de GDNF está mediada por un efecto trófico sobre las neuronas de dopamina nigroestriatales, mientras que el TGF- $\beta_1$  actúa aumentando la actividad de GDNF y disminuyendo la hipersensibilidad dopaminérgica, que es un hecho que aparece en la EP avanzada, y que se ha asociado a la aparición de discinesias tras levodopa.

A lo largo de la presente invención, se demuestra que la composición de la invención origina dos hechos novedosos e inesperados:

- el efecto trófico de GDNF es mayor, debido a un bloqueo de la desensibilización de su receptor GFR $\alpha_1$  en el que participa el TGF- $\beta_1$  y,

- no se desarrolla hipersensibilidad dopaminérgica.

Ello puede tener repercusiones muy favorables para el tratamiento de enfermedades o desórdenes neuronales, preferentemente neurodegenerativos, que cursen con discinesias u otros movimientos anormales e involuntarios, como se puede ver en los ejemplos, donde el tratamiento de estos factores combinados en ratas parkinsonianas producía una reducción de la sintomatología motora en las ratas. Además, con el tratamiento prolongado tampoco se observaba el desarrollo de discinesias invalidantes y secundarias a la hipersensibilidad dopaminérgica como ocurre con el uso de levodopa.

Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica. El término "enfermedad neurológica" hace referencia a aquellas enfermedades en las que se produce una lesión o una disfunción del sistema nervioso, ya sea central o periférico. Son trastornos del cerebro, la médula espinal y los nervios de todo el cuerpo. En conjunto, esos órganos controlan todas las funciones del cuerpo y cuando algo funciona mal en alguna parte del sistema nervioso, es posible que tenga dificultad para moverse, hablar, tragar, respirar o aprender. También pueden aparecer problemas relacionados con la memoria, los sentidos o el estado de ánimo.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad neurológica, donde dicha enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa. El término "enfermedad neurodegenerativa" hace referencia a aquellas enfermedades causadas por un aumento en los procesos de muerte celular, reduciendo el número de neuronas, genera cambios en la conducta causando el empeoramiento de muchas de las actividades corporales, incluyendo el equilibrio, el movimiento, el habla, la respiración y la función cardíaca. Muchas de estas enfermedades son genéticas, lo que significa que son hereditarias o que existe una mutación genética. Algunos cuadros clínicos, como lo es el alcoholismo, un tumor o un derrame, pueden causar otros tipos. Existen todavía otros tipos que pueden ser causados por toxinas, sustancias químicas o virus.

Según una realización más preferida, la enfermedad neurológica cursa con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios. Según otra realización más preferida de la presente invención, la enfermedad neurológica es Parkinson, trastorno de Gilles de la Tourette, síndrome de Lesch-Nyhan o un desorden neurológico causado por abstinencia a drogas o por tratamiento con al menos un neuroléptico.

Todas estas enfermedades o desórdenes neurológicos han sido seleccionados debido a que en todas ellas se desarrollan discinesias e hipersensibilidad dopaminérgica

En una realización aún más preferida, la enfermedad neurológica es Parkinson.

Tal como se ha comentado anteriormente, el GDNF es una macromolécula que no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que con el fin de facilitar a estas macromoléculas el transporte a través de la barrera hematoencefálica, una realización más preferida del uso de la composición farmacéutica de la presente invención se refiere al uso donde el medicamento de la presente invención se presenta en una forma adaptada a la administración intracerebroputaminal. El término "forma adaptada" hace referencia al modo de adecuar el medicamento de la presente invención para que pueda ser administrado vía intracerebroputaminal.

La administración por vía intracerebroputaminal de la composición de la invención, puede efectuarse a través de varios métodos como, por ejemplo, pero sin limitarse a microcápsulas de liberación lenta implantadas en el caudado/putamen, virus infundidos que liberen ambos factores o infusiones intraputaminales continuas con bombas de infusión conectadas a catéteres intracerebrales. La infusión continua permite el transporte de la composición de la invención de forma controlada y directamente al caudado dañado y/o putamen dañado, consiguiendo así un mayor efecto trófico en esta zona, junto a una reducción del desarrollo de hipersensibilidad dopaminérgica en el caudado/putamen. El primer efecto estaría mediado por GDNF y el segundo por TGF- $\beta_1$ .

Otra realización preferida de la invención se refiere a la composición

farmacéutica de la invención, donde el medicamento tiene una cantidad de GDNF capaz de alcanzar una concentración diaria en tejido cerebral de entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Es conocido que el rango de concentraciones de GDNF de entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{día}$  es el más adecuado en humanos (Nutt JG. et al. 2003 *Neurology*. Jan 14; 60(1):69-73). Además también pueden emplearse los rangos de 8 a 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 15 a 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 17 a 45  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 21 a 40  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 25 a 37  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 27 a 31  $\mu\text{g}/\text{día}$  o el rango de GDNF que va desde 8 a 12  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Por otro lado, debido a que tal y como se demuestra en la invención, la dosis de TGF- $\beta_1$  debe ser de 2 a 4 veces inferior a la de GDNF de forma que ambas concentraciones se mantengan en el rango de 2:1 a 4:1 de GDNF:TGF- $\beta_1$ , el medicamento tiene una cantidad de TGF- $\beta_1$  capaz de alcanzar una concentración diaria en tejido cerebral de entre 1 a 25  $\mu\text{g}/\text{día}$ , además también pueden emplearse los rangos que van de 1 a 20  $\mu\text{g}/\text{día}$ , de 1 a 15  $\mu\text{g}/\text{día}$ , 1 a 10  $\mu\text{g}/\text{día}$  o el rango de TGF- $\beta_1$  que va desde 1 a 3  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

Otro aspecto de la invención se refiere al kit que comprende la composición de la invención.

En una realización preferida del aspecto anterior, además el kit comprende bombas de infusión y catéteres intracerebrales.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1. Rotaciones inducidas por anfetamina/apomorfina.**

Las Figuras 1A y B, muestran el número de rotaciones por hora que realiza el animal cuando se le inyecta anfetamina y no reciben ningún tratamiento, y posteriormente, al segundo mes, cuando se les implantan las minibombas con vehículo control, GDNF solo, GDNF + TGF- $\beta_1$  combinados, o con TGF- $\beta_1$  solo. La figura 1A incluye los datos con la ratio 4:1 de GDNF: TGF- $\beta_1$ , con dosis de 8 ng/día de GDNF (x 8 días) y de 2 ng/día de TGF- $\beta_1$  (x 8 días). La figura 1B incluye los datos con la ratio 2:1 de GDNF: TGF- $\beta_1$ , con dosis de 6 ng/día de GDNF (x 8 días) y de 3 ng/día de TGF- $\beta_1$  (x 8 días) (Medias  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. 2 meses después de inducir parkinsonismo en la rata, test de Newman-Keuls).

La Figuras 1C y D, muestran el número de rotaciones por hora que realiza el animal cuando se le inyecta apomorfina y no reciben ningún tratamiento, y posteriormente, al segundo mes, cuando se les implantan las minibombas con vehículo control, GDNF solo, GDNF + TGF- $\beta_1$  combinados, o con TGF- $\beta_1$  solo. La figura 1C incluye los datos con la ratio 4:1 de GDNF: TGF- $\beta_1$ , con dosis de 8 ng/día de GDNF (x 8 días) y de 2 ng/día de TGF- $\beta_1$  (x 8 días). La figura 1D incluye los datos con la ratio 2:1 de GDNF: TGF- $\beta_1$ , con dosis de 6 ng/día de GDNF (x 8 días) y de 3 ng/día de TGF- $\beta_1$  (x 8 días) (Medias  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. 2 meses después de inducir parkinsonismo en la rata, test de Newman-Keuls).

## **FIG. 2. Inmunotinción de la señal estriatal de tirosina-hidroxilasa (TH).**

La Figura 2 muestra inmunotinción de la señal estriatal de tirosina-hidroxilasa (TH) después de un mes tras el cese de la infusión constante (mediante bomba osmótica implantada) de vehículo salino, GDNF+TGF- $\beta_1$  o GDNF sólo, durante 8 días en ratas con estriado lesionado.

En la Figura 2A se observa el estriado lesionado (a la derecha de la imagen) tras infusión de salino.

En la Figura 2B se observa el estriado lesionado (a la derecha de la imagen) tras infusión de GDNF + TGF- $\beta_1$  a una ratio de 4:1 (dosis de 8 ng/día de GDNF y de 2 ng/día de TGF- $\beta_1$ ).

La Figura 2C es una ampliación de la Figura 2B, la zona más teñida es la zona de infusión.

En la figura 2D se observa el estriado lesionado (a la derecha de la imagen) tras infusión de GDNF+ TGF- $\beta_1$  a una ratio de 2:1 (dosis de 6 ng/día de GDNF y de 3 ng/día de TGF- $\beta_1$ ).

En la Figura 2E se observa el estriado lesionado (a la derecha de la imagen), tras infusión de GDNF sólo en esa zona (8 ng/día por 8 días).

Barra: 1 mm.

### **FIG. 3. Inmunoblotting del receptor GRFalfa1 (receptor de GDNF).**

En la Figura 3 se muestran los resultados de un inmunoblotting del receptor GRFalfa1 (receptor de GDNF) en los estriados contralateral y lesionado de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, después de un mes tras el cese de la infusión constante (mediante bomba osmótica implantada) de vehículo salino, GDNF+TGF- $\beta_1$  (ratio 4:1) o GDNF sólo, durante 8 días.

Se marca con un asterisco el estriado lesionado con infusión de GDNF y con almohadilla el estriado lesionado con infusión combinada de GDNF+TGF- $\beta_1$ .

### **EJEMPLOS**

La invención se basa en el tratamiento con infusiones intraputaminales de dosis farmacológicamente efectivas de GDNF y TGF- $\beta_1$  combinados a ratas parkinsonianas. Las infusiones se realizaron con bombas de infusión conectadas a catéteres intracerebrales, con el fin de mantener una inyección con flujo constante de estos factores tróficos. En humanos, la dosis recomendada de GDNF es 5-50  $\mu$ g/día y la de TGF- $\beta_1$  es de 1-10  $\mu$ g/día, manteniendo siempre una mayor concentración de GDNF en el rango de ratios de 2:1 a 4:1. Datos experimentales con modelos animales de parkinsonismo indicaron que este rango de ratios es apropiado, y ratios de concentraciones por encima o debajo del mismo no son

igualmente efectivas. Esta ratio de combinaciones es también novedosa, pues hasta la fecha sólo combinaciones 5:1 en cultivo celular se habían ensayado.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen cómo el tratamiento con infusiones intraputaminales de dosis farmacológicamente efectivas de GDNF y TGF- $\beta_1$  combinados y su correspondiente vehículo en solución dio lugar a una mejor recuperación de la sintomatología motora de ratas a las que se les había inducido la enfermedad de Parkinson que si las ratas se trataban mediante los factores GDNF o TGF- $\beta_1$  por separado, demostrando los efectos aumentados por la cooperación entre ambos factores. Por otro lado, también se comprobó que el efecto trófico mediado por GDNF se ve incrementado por TGF- $\beta_1$  porque éste bloquea la desensibilización o regulación a la baja de los receptores GFR $\alpha_1$  de GDNF e induce el freno de la degeneración, incremento de la regeneración y aumento de los niveles de dopamina (aumentó la expresión de la enzima tirosina-hidroxilasa de dopamina). El TGF- $\beta_1$  indujo per se una disminución del desarrollo de la hipersensibilidad de receptores de dopamina, que surgió como consecuencia del proceso degenerativo de la enfermedad y originó discinesias a la levodopa.

#### **EJEMPLO 1. Parkinsonismo inducido por 6-hidroxidopamina.**

Se crearon modelos animales de ratas parkinsonianas inyectando 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la neurotoxina más ampliamente utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores. Cuando es administrada por vía sistémica destruye las neuronas adrenérgicas de los ganglios simpáticos pero carece de acción tóxica a nivel del sistema nervioso central. Sin embargo, la inyección intracerebral de 6-OHDA produce una destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas. Esta especificidad es debida a su alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas.

En los últimos años, la inyección estriatal de 6-OHDA está siendo utilizada como modelo de degeneración neuronal debido a que produce atrofia y degeneración lenta y progresiva de las neuronas de la sustancia negra. Este modelo resulta muy interesante por varias razones. En primer lugar representa un modelo de

parkinsonismo en un estadio inicial de la enfermedad ya que la pérdida neuronal que se obtiene oscila entre un 60-70%. Por otro lado permite, de acuerdo a la dosis de 6-OHDA inyectada en el estriado, obtener una lesión parcial nigroestriada y por tanto puede ser el modelo ideal a utilizar para el estudio del efecto neuroprotector de determinadas sustancias.

Los animales con lesión unilateral de la vía nigroestriada, presentaron una rotación ipsilateral a la lesión cuando se les administraron sustancias que aumentan la liberación de dopamina como anfetamina (Figura 1A, B), y mostraron una rotación contralateral al lado de la lesión cuando recibieron agonistas dopaminérgicos como apomorfina (Figura 1C, D). La rotación contralateral inducida por apomorfina u otros agonistas dopaminérgicos, fue debida al incremento del número de receptores dopaminérgicos que aparecieron en el estriado homolateral a la lesión como consecuencia de la denervación. Por el contrario la anfetamina, al incrementar la liberación de dopamina en las terminales presinápticas incrementó la concentración de dopamina únicamente en estriado contralateral a la lesión, produciéndose un desequilibrio funcional a favor del estriado contralateral.

La lesión unilateral de la sustancia negra indujo cambios en el sistema nigroestriado que intentaron compensar el déficit de dopamina inducido por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Así, se ha descrito una inducción y activación de tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de catecolaminas) en las neuronas dopaminérgicas todavía funcionantes (Figura 2), un aumento de la cantidad de dopamina liberada en el estriado por las terminales dopaminérgicas existentes y un incremento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos (Figura 3). Este incremento apareció únicamente cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas fue superior al 90% y tuvo lugar después de 4 semanas de haberse producido la denervación dopaminérgica.

### 1.1 Medida de las rotaciones inducidas a ratas parkinsonianas.

#### 1.1.1 Rotaciones inducidas por anfetamina.

Todas las ratas parkinsonianas sin tratamiento giraron durante los dos meses tras la lesión con 6-OHDA. Tras implantar las minibombas con GDNF solo, GDNF +

TGF- $\beta_1$  combinados, TGF- $\beta_1$  solo o vehículo salino, se redujo el giro progresivamente, en todos los casos excepto en las control o con TGF- $\beta_1$  solo, indicativo de recuperación funcional. La combinación GDNF: TGF- $\beta_1$  (4:1 o 2:1) tuvo más efecto que el GDNF sólo (Figuras 1A, B).

La anfetamina se inyectó en 5 momentos determinados: una semana después de la inducción del parkinsonismo, 1 mes después de la inducción del parkinsonismo, 2 meses después de la inducción del parkinsonismo, 9 días después de la implantación de la bomba y 1 mes después de la implantación de la bomba.

(Medias  $\pm$  EEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs 2 meses después de inducir parkinsonismo en la rata).

#### 1.1.2 Rotaciones inducidas por apomorfina.

Las rotaciones aumentaron en todas las ratas parkinsonianas sin tratamiento durante dos meses tras la lesión con 6-OHDA, indicativo de desarrollo de hipersensibilidad dopaminérgica. La implantación de bombas con GDNF, TGF- $\beta_1$  o ambos factores combinados redujo la hipersensibilidad dopaminérgica, siendo el efecto mayor cuando se combinaron ambos factores o cuando se añadió TGF- $\beta_1$  sólo. Todos los efectos mencionados se mantuvieron durante un mes tras el cese de las bombas, indicando que la recuperación funcional y la hipersensibilidad disminuida eran efectos mantenidos (Figuras 1C, D).

La apomorfina se inyectó en 5 momentos determinados: una semana después de la inducción del parkinsonismo, 1 mes después de la inducción del parkinsonismo, 2 meses después de la inducción del parkinsonismo, 9 días después de la implantación de la bomba y 1 mes después de la implantación de la bomba.

(Medias  $\pm$  EEM, \*\*  $p < 0.01$  vs 2 meses tras la inducción del parkinsonismo).

#### 1.2 Inmunotinción de la señal estriatal de tirosina-hidroxilasa (TH).

Se puede observar en la Figura 2 que la inmunotinción de la señal estriatal de tirosina-hidroxilasa (TH), enzima de síntesis de la dopamina, después de un mes tras el cese de la infusión constante (mediante bomba osmótica implantada) de

vehículo salino, GDNF+TGF- $\beta_1$  o GDNF sólo durante 8 días en ratas con estriado lesionado, mostró que:

- el estriado lesionado presentaba ausencia de señal oscura de inmunotinción de TH, indicativa de degeneración dopaminérgica (compárese con el estriado contralateral no lesionado) cuando se infundió vehículo salino (Figura 2A),
- se observó una clara recuperación de la señal TH en el estriado cuando se infundió GDNF + TGF- $\beta_1$  durante 8 días a ratios 4:1 (Figura 2B y C) o 2:1 (Figura 2D), con una mayor señal de TH en la zona de infusión (Figura 2C, imagen ampliada de la zona de infusión). Dicha señal fue indicativa de que se había regenerado el tejido dopaminérgico tras la infusión de ambos factores neurotróficos (compárese la señal con el estriado contralateral, normal, no lesionado),
- la infusión de GDNF indujo un aumento de la señal de TH en el estriado inyectado, indicativo de su efecto trófico, pero dicha señal fue menor en densidad y tamaño al de la combinación GDNF+ TGF- $\beta_1$  a ambas ratios (4:1 o 2:1) (Figura 2E).

Barra: 1 mm

### 1.3 Inmunoblotting del receptor GRFalfa1 (receptor de GDNF) en los estriados contralateral y lesionado.

El inmunoblotting del receptor GRFalfa1 (receptor de GDNF) en los estriados contralateral y lesionado de ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA, después de un mes tras infusión constante (mediante bomba osmótica implantada) de vehículo control, GDNF, TGF- $\beta_1$  o ambos combinados en el estriado lesionado mostró cómo la señal del receptor (bandas a 55KDa) disminuyó tras la infusión de GDNF indicativo de “regulación a la baja” por desensibilización del receptor (asterisco), pero ello no ocurrió tras combinar GDNF con TGF- $\beta_1$  (almohadilla), lo que explica a nivel molecular por qué se facilita in vivo la acción trófica del GDNF a través de su receptor.

Los datos experimentales permiten afirmar por tanto que ambos factores neurotróficos cooperan funcionalmente: el GDNF favorece la regeneración trófica del tejido dañado y el cese de la degeneración, y el TGF- $\beta_1$  disminuye el desarrollo de la hipersensibilidad dopaminérgica que aparece en el caudado/putamen en la EP. Este último efecto es novedoso e inesperado, y con importantes repercusiones funcionales pues la hipersensibilidad dopaminérgica anómala se considera causa de discinesias y fracasos en la acción de levodopa en los enfermos de Parkinson.

Así, el tratamiento combinado dio lugar a una mejor recuperación de la sintomatología motora en la EP y al no desarrollo de discinesias invalidantes y secundarias a la hipersensibilidad dopaminérgica, de forma que puede ser aplicado a cualquier enfermedad o desorden neuronal, neurodegenerativo que curse con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que comprende el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), y el factor transformante beta1 ( $\text{TGF-}\beta_1$ ) en un rango de GDNF: $\text{TGF-}\beta_1$  de entre 2:1 a 4:1.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, que adicionalmente comprende, al menos, un excipiente farmacológicamente aceptable.
3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que adicionalmente comprende, al menos, un vehículo farmacológicamente aceptable.
4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de al menos una enfermedad neurológica.
5. Uso de la composición según la reivindicación 4, donde la enfermedad neurológica es una enfermedad neurodegenerativa.
6. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, donde la enfermedad neurológica es una enfermedad que cursa con discinesias u otros movimientos anormales o involuntarios.
7. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la enfermedad neurológica es Parkinson, trastorno de Gilles de la Tourette, síndrome de Lesch-Nyhan o un desorden neurológico causado por abstinencia a drogas o por tratamiento con al menos un neuroléptico.
8. Uso según la reivindicación 7, donde la enfermedad neurológica es Parkinson.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, donde dicho medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intracerebroputaminal.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, donde el medicamento

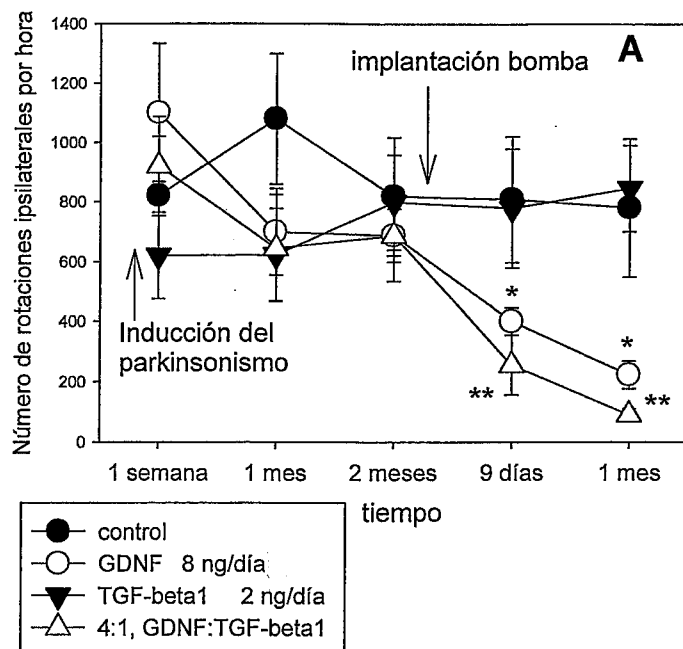
20

tiene una cantidad de GDNF capaz de alcanzar una concentración diaria en tejido cerebral de entre 5 y 50  $\mu\text{g}/\text{día}$ .

11. Kit que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
12. Kit según la reivindicación 11 que además comprende bombas de infusión y catéteres intracerebrales.

1/4

**FIG. 1**  
Test de anfetamina



Test de anfetamina

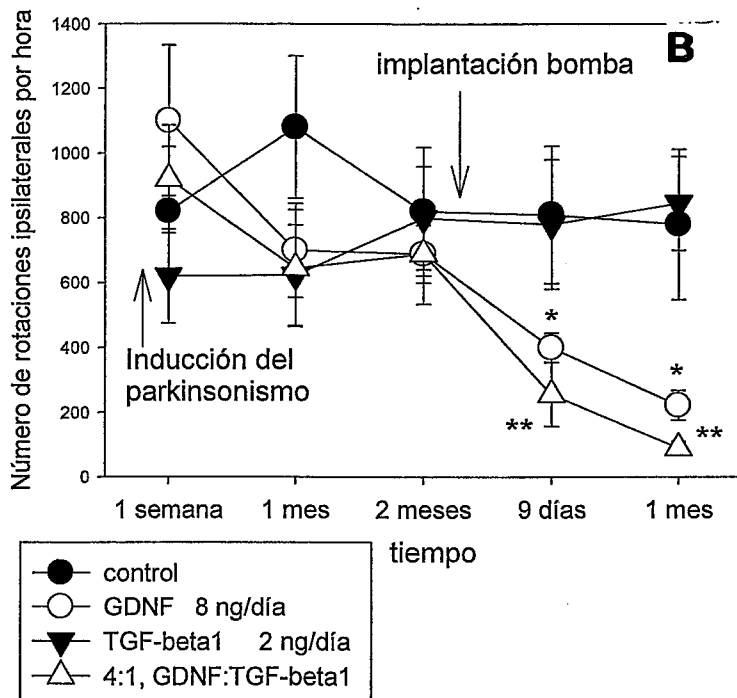


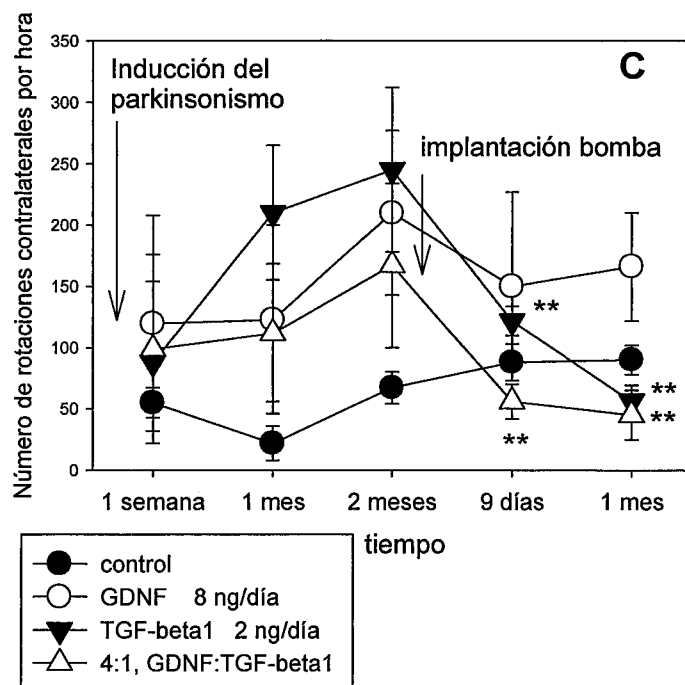
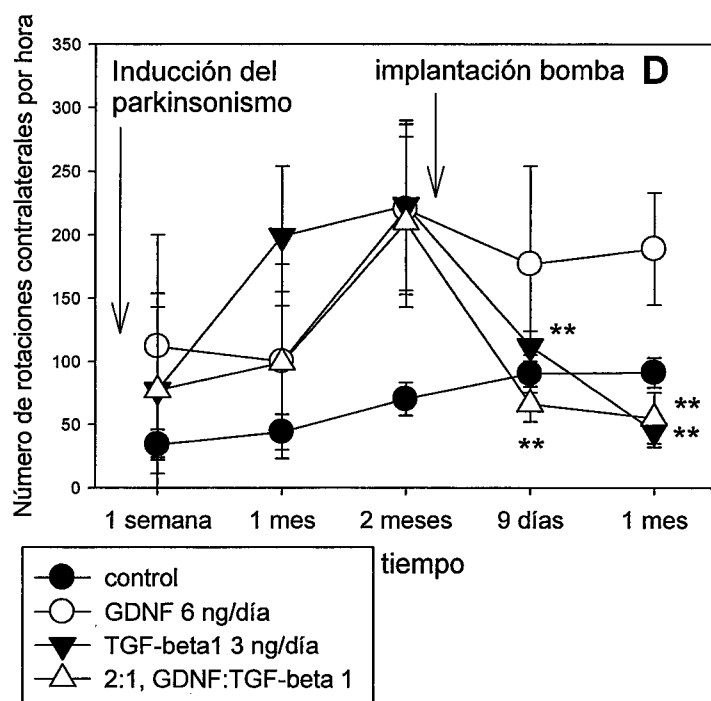
**FIG. 1****Test de apomorfin****Test de apomorfin**

**FIG. 2**

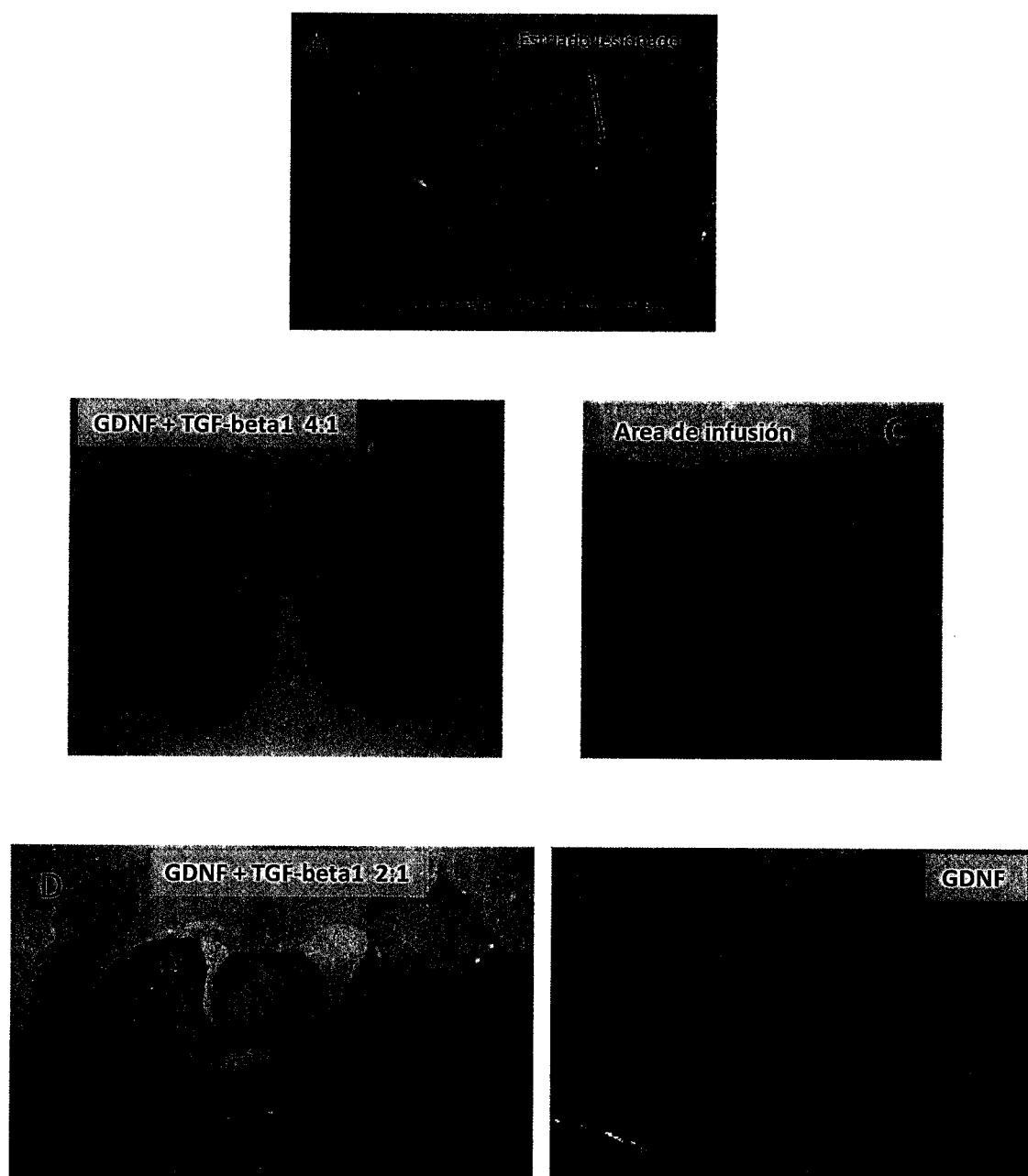
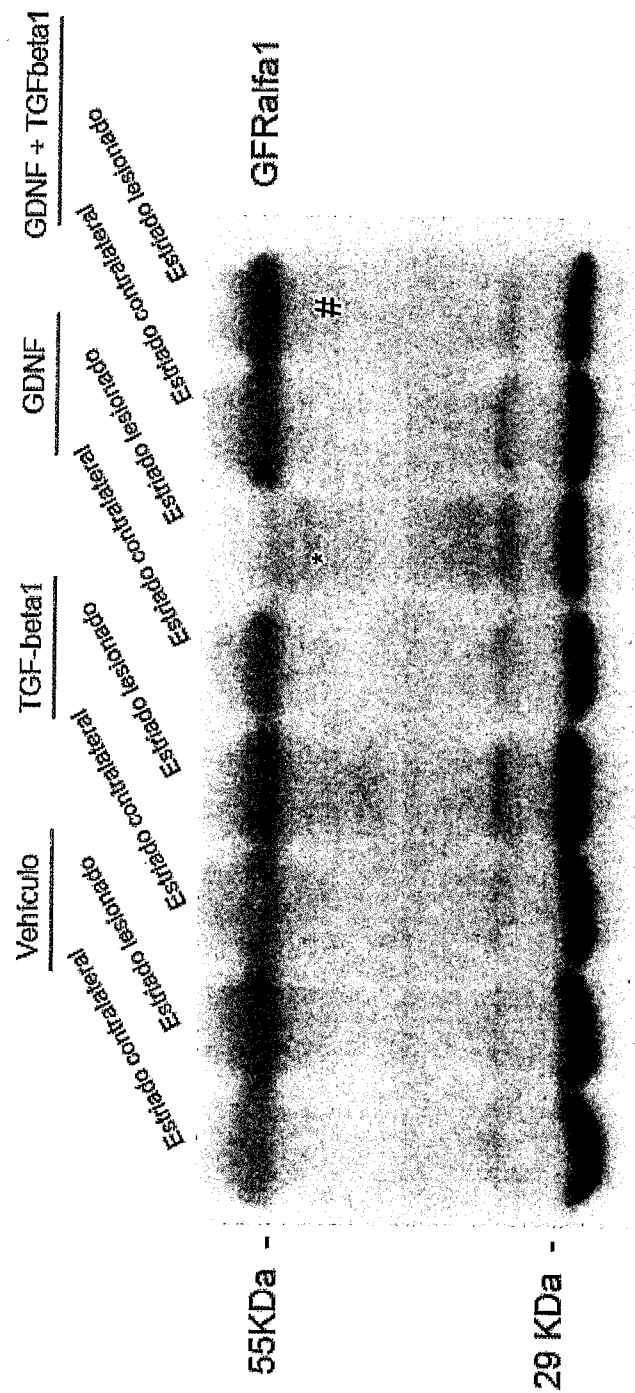


FIG. 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/000008

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 99/15191 A2 (BIOPHARM GMBH) 01.04.1999. Abstract, page 1, lines 1-2, page 2, line 19- page 3, line 4, page 3, lines 11-16, page 4, lines 20-23, pages 10, line 5- page 11, line 9, figures 6-11 and claims 1-2, 5 and 16-17.                                                                       | 1-8, 11               |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 9-10, 12              |
| Y         | WO 2004/075720 A2 (NORTH BRISTOL N.H.S. TRUST AND UNIVERSITY OF KENTUCKY) 10.09.2004. Page 21, lines 15-16, page 23, lines 3-5, page 25, line 25 – page 26, line 11 and page 47, lines 17-31.                                                                                                         | 9-10, 12              |
| X         | KRIEGLSTEIN K., et al. "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor- $\beta$ for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." The Journal of Neuroscience (1998) Vol. 18, pages 9822-9834. Pages 9822, 9828-9832 and figures 1-2 y 4. | 1-8, 11               |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                          |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                              |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                              |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                 |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                |

Date of the actual completion of the international search  
29/04/2011

Date of mailing of the international search report  
(06/06/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. García Bueno

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3497000

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/000008

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                        |                       |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                            | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                    | Relevant to claim No. |
| A                                                     | FERNÁNDEZ-ESPEJO E. et al. "Trasplante de células naturales 'dopaminotróficas': nuevo concepto terapéutico antiparkinsoniano." Revista de Neurología (2003) Vol. 36, páginas 540-544. The whole document.                                              | 1-12                  |
| A                                                     | GALÁN-RODRIGUEZ B. et al. "Grafts of extra-adrenal chromaffin cells as aggregates show better survival rate and regenerative effects on parkinsonian rats than dispersed cell graft." Neurobiology of Disease (2008) Vol. 29, pages 529-542. Page 529. | 1-12                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/000008

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                                                                                                                          | Publication<br>date                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO9915191 A                                   | 01.04.1999          | CA2301693 A<br>AU1024899 A<br>EP1011712 AB<br>EP19980952613<br>JP2001517634 T<br>US6790824 B<br>ES2214743 T<br>DE69821629 T                         | 01.04.1999<br>12.04.1999<br>28.06.2000<br>21.09.1998<br>09.10.2001<br>14.09.2004<br>16.09.2004<br>13.01.2005                                 |
| -----<br>WO2004075720 A                       | -----<br>10.09.2004 | CA2516857 A<br>AU2004216251 A<br>US2004209810 A<br>US2005137134 A<br>EP1622636 A<br>EP20040714078<br>PL378360 A<br>MXPA05009011 A<br>JP2006518747 T | -----<br>10.09.2004<br>10.09.2004<br>21.10.2004<br>23.06.2005<br>08.02.2006<br>24.02.2004<br>20.03.2006<br>07.04.2006<br>17.08.2006<br>----- |
| -----                                         | -----               | -----                                                                                                                                               | -----                                                                                                                                        |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/000008

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K38/19** (2006.01)

**A61K38/18** (2006.01)

**C07K14/495** (2006.01)

**C07K14/52** (2006.01)

**A61P25/16** (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ES2011/000008

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
A61K, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE.

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                              | Relevante para las reivindicaciones n° |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | WO 99/15191 A2 (BIOPHARM GMBH) 01.04.1999. Resumen, página 1, líneas 1-2, página 2, línea 19- página 3, línea 4, página 3, líneas 11-16, página 4, líneas 20-23, página 10, línea 5- página 11, línea 9, figuras 6-11 y reivindicaciones 1-2, 5 y 16-17.                                              | 1-8, 11                                |
| Y          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 9-10, 12                               |
| Y          | WO 2004/075720 A2 (NORTH BRISTOL N.H.S. TRUST AND UNIVERSITY OF KENTUCKY) 10.09.2004. Página 21, líneas 15-16, página 23, líneas 3-5, página 25, línea 25 – página 26, línea 11 y página 47, líneas 17-31.                                                                                            | 9-10, 12                               |
| X          | KRIEGLSTEIN K., et al. "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor- $\beta$ for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." The Journal of Neuroscience (1998) Vol. 18, pages 9822-9834. Páginas 9822, 9828-9832 y figuras 1-2 y 4. | 1-8, 11                                |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
29/04/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**06 de junio de 2011 (06/06/2011)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Bueno  
N° de teléfono 91 3497000

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/000008

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                          |                                        |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                 | Relevante para las reivindicaciones n° |
| A                                                    | FERNÁNDEZ-ESPEJO E. et al. "Trasplante de células naturales 'dopaminotróficas': nuevo concepto terapéutico antiparkinsoniano." Revista de Neurología (2003) Vol. 36, páginas 540-544. Todo el documento.                                                 | 1-12                                   |
| A                                                    | GALÁN-RODRIGUEZ B. et al. "Grafts of extra-adrenal chromaffin cells as aggregates show better survival rate and regenerative effects on parkinsonian rats than dispersed cell graft." Neurobiology of Disease (2008) Vol. 29, pages 529-542. Página 529. | 1-12                                   |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/000008

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes                                                                                                                      | Fecha de<br>Publicación                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WO9915191 A                                              | 01.04.1999              | CA2301693 A<br>AU1024899 A<br>EP1011712 AB<br>EP19980952613<br>JP2001517634 T<br>US6790824 B<br>ES2214743 T<br>DE69821629 T                                  | 01.04.1999<br>12.04.1999<br>28.06.2000<br>21.09.1998<br>09.10.2001<br>14.09.2004<br>16.09.2004<br>13.01.2005                        |
| -----<br>WO2004075720 A                                  | -----<br>10.09.2004     | -----<br>CA2516857 A<br>AU2004216251 A<br>US2004209810 A<br>US2005137134 A<br>EP1622636 A<br>EP20040714078<br>PL378360 A<br>MXPA05009011 A<br>JP2006518747 T | -----<br>10.09.2004<br>10.09.2004<br>21.10.2004<br>23.06.2005<br>08.02.2006<br>24.02.2004<br>20.03.2006<br>07.04.2006<br>17.08.2006 |
| -----                                                    | -----                   | -----                                                                                                                                                        | -----                                                                                                                               |

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/000008

## CLASIFICACIONES DE INVENCION

*A61K38/19* (2006.01)  
*A61K38/18* (2006.01)  
*C07K14/495* (2006.01)  
*C07K14/52* (2006.01)  
*A61P25/16* (2006.01)