



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 146**

51 Int. Cl.:
A61K 38/18 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94929728 .7**
86 Fecha de presentación : **19.08.1994**
87 Número de publicación de la solicitud: **0716610**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.06.1996**

54 Título: **Proteínas morfogenéticas óseas humanas para uso en regeneración nerviosa.**

30 Prioridad: **26.08.1993 US 112492**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2007

73 Titular/es: **Genetics Institute, L.L.C.**
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, Massachusetts 02140, US
The Board of Trustees of the University of Illinois

72 Inventor/es: **Wang, Elizabeth, A.;**
D'Alessandro, Josephine, S. y
Toriumi, Dean

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 265 146 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

Proteínas morfogenéticas óseas humanas para uso en regeneración nerviosa.

5 La presente invención se refiere a estos objetos:

(i) un método para inducir la formación de astrocitos “*in vitro*” que consiste en administrar a las células idóneas una proteína morfogenética ósea mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable;

10 (ii) el uso de una proteína morfogenética para la fabricación de una composición para la inducción del crecimiento o de la regeneración de células de astrocitos;

(iii) el método del apartado anterior (i) o el uso del apartado anterior (ii), en el que la proteína morfogenética ósea es la BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 o un heterodímero de la BMP-2/6 o de la BMP-2/7;

15 (iv) un dispositivo para inducir la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*” que consiste en un recipiente artificial, que contiene proteína morfogenética ósea, elegida entre la BMP-2, BMP-4 o un heterodímero de BMP-2/6 O BMP-2/7, adsorbida sobre una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglicanos;

20 (v) el dispositivo del anterior apartado (iv), en el que dicha matriz contiene colágeno en forma de una esponja;

(vi) el dispositivo del anterior apartado (iv) o (v), en el que el recipiente artificial contiene una tubería de Silastic con respiradero;

25 (vii) el uso de una proteína morfogenética ósea, elegida entre la BMP-2, BMP-4 y un heterodímero de BMP-2/6 O BMP-2/7 en un tubo de Silastic con respiradero para la fabricación de un dispositivo médico para la inducción de la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*”;

30 (viii) el uso del anterior apartado (vii), en el que dicha proteína morfogenética ósea se adsorbe en una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglicanos dentro de dicho tubo de Silastic con respiradero.

Antecedentes

35 Las proteínas morfogenéticas óseas de 2 a 10 son miembros de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes β (TGF- β). Las BMP se descubrieron inicialmente como proteínas osteogénicas capaces de inducir la formación de hueso “*in vivo*”. Los factores de crecimiento transformantes se identificaron inicialmente en base a su capacidad para inducir la transformación fenotípica de células de mamíferos cultivadas en un cultivo de tejido, un fenómeno que tradicionalmente se ha asociado con los cambios “*in vivo*” del crecimiento celular de normal a tumoral.

45 Los astrocitos son un tipo de células gliales que se ha encontrado en el sistema nervioso, cuya función es la guía de axones, la estimulación del crecimiento de neuritas, la morfogénesis y la migración de neuronas. Los astrocitos intervienen además en la inducción de la barrera hemato-encefálica endotelial vascular y en el transporte de sangre a las neuronas. Los astrocitos expresan una proteína de filamento intermedio del citoesqueleto, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), un marcador muy específico de los astrocitos.

50 Se han descrito clásicamente dos tipos de astrocitos en base a su ubicación y a su morfología. Los astrocitos protoplásmicos se han encontrado por ejemplo en la sustancia gris y tienen procesos de ramificación extensa densa, mientras que los astrocitos fibrosos se hallan en la sustancia blanca y tienen procesos lineales largos. Los astrocitos aislados de nervio óptico se han descrito en sentido antigénico como tipo 1 y tipo 2 en base a su tinción de las GFAP y el marcador superficial A2B5. Procedentes de dos linajes de desarrollo diferentes y de tiempos separados, los astrocitos de tipo 1 solamente tiñen las GFAP, mientras que los astrocitos de tipo 2 tiñen tanto el A2B5 como las GFAP. Los astrocitos proporcionan un entorno conducente para el crecimiento de los axones, que es un aspecto importante de la regeneración nerviosa. Por lo tanto, la supervivencia y la diferenciación de los astrocitos son factores importantes de la capacidad de las células y de los tejidos nerviosos para sobrevivir y regenerarse. Silver y col. en la patente de Estados Unidos nº 5 202 120 describen un método que utiliza astrocitos activados para promover la regeneración de axones. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que requiere una aportación de astrocitos, por ejemplo mediante un trasplante autólogo.

Resumen de la invención

65 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar composiciones capaces de inducir el crecimiento de células nerviosas. Otro aspecto de la presente invención consiste en proporcionar composiciones idóneas para la generación de células nerviosas y tejido nervioso y para la reparación de defectos nerviosos.

ES 2 265 146 T3

En sus varias formas de ejecución, la presente invención se refiere a los siguientes objetos:

(i) un método para inducir la formación de astrocitos “*in vitro*” que consiste en administrar a las células idóneas una proteína morfogenética ósea mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable;

(ii) el uso de una proteína morfogenética para la fabricación de una composición para la inducción del crecimiento o de la regeneración de células de astrocitos;

(iii) el método del apartado anterior (i) o el uso del apartado anterior (ii), en el que la proteína morfogenética ósea es la BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 o un heterodímero de la BMP-2/6 o de la BMP-2/7;

(iv) un dispositivo para inducir la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*” que consiste en un recipiente artificial, que contiene proteína morfogenética ósea, elegida entre la BMP-2, BMP-4 o un heterodímero de BMP-2/6 O BMP-2/7, adsorbida sobre una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglucanos;

(v) el dispositivo del anterior apartado (iv), en el que dicha matriz contiene colágeno en forma de una esponja;

(vi) el dispositivo del anterior apartado (iv) o (v), en el que el recipiente artificial contiene una tubería de Silastic con respiradero;

(vii) el uso de una proteína morfogenética ósea, elegida entre la BMP-2, BMP-4 y un heterodímero de BMP-2/6 O BMP-2/7 en un tubo de Silastic con respiradero para la fabricación de un dispositivo médico para la inducción de la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*”;

(viii) el uso del anterior apartado (vii), en el que dicha proteína morfogenética ósea se adsorbe en una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglucanos dentro de dicha tubería de Silastic con respiradero.

En lo tocante a la matriz del dispositivo para inducir la regeneración de nervios periféricos, dicha matriz consta de un material idóneo, elegido entre el grupo formado por el colágeno, los adhesivos de tejido de fibrina y los componentes de las vainas endoneuriales normales, la laminina, el ácido hialurónico y los condroitina-sulfato-proteoglucanos, incluido el versicano, véase Tona y col., J. Histochemistry and Cytochemistry 41, 593-599, 1993. En la forma más preferida de ejecución, la matriz consta de colágeno reticulado. El colágeno puede estar presente en cualquier forma apropiada, pero tiene con preferencia forma de esponja. El colágeno puede presentarse en cualquier forma idónea para la regeneración del tejido nervioso. La matriz adsorbida en BMP puede aplicarse a un recipiente de reemplazo nervioso artificial, que contenga la matriz y la BMP. El recipiente de reemplazo nervioso artificial se presenta con preferencia en forma de un tubo o un “stent” (dispositivo para mantener abierto un orificio), por ejemplo un tubo de Silastic con respiradero.

Descripción detallada de la invención

Los inventores presentes han encontrado de modo sorprendente que las BMP, en particular la BMP-2, la BMP-4 y los heterodímeros de BMP-2/6 y BMP-2/7 pueden utilizarse para favorecer la regeneración nerviosa. Las células nerviosas normalmente no proliferan después de una lesión y la reparación fisiológica empleando técnicas microquirúrgicas a menudo da lugar a resultados funcionales imperfectos, a pesar de darse un cuidado óptimo. Los tejidos nerviosos tienen que neovascularizarse antes de repararse. Sin embargo, la neovascularización tiene lugar posteriormente en los nervios que en los demás sistemas biológicos, retardando la reparación inicial de los axones y a menudo facilitando la atrofia irreparable y dependiente del tiempo de la placa terminal motora. Además, la formación más rápida de tejido fibrótico de la cicatriz puede impedir el éxito de la regeneración nerviosa de tipo natural. Por consiguiente, el uso de las BMP para favorecer o acelerar la reparación nerviosa proporciona un método de mejora la reparación nerviosa cuando no existe otra posibilidad de realizarla.

Las secuencias de DNA de las BMP son conocidas y se han descrito en los lugares siguientes: la BMP-2 (algunas veces denominada BMP-2A) y la BMP-4 (algunas veces denominada BMP-2B) en la patente US-5 013 649; la BMP-3, en la patente US-5 116 738; la BMP-5, en la US-5 106 748; la BMP-6, en la patente US-5 187 076; la BMP-7, en la patente US-5 141 905; la BMP-8, en la publicación PCT nº WO 93/00432; la BMP-9, en la WO 95/33830.

También son conocidos en la técnica los heterodímeros y la BMP-10.

La BMP recombinante humana, por ejemplo la rhBMP-2, puede obtenerse para utilizarse en el método de la invención por expresión de las secuencias de DNA que codifican a una BMP en una célula hospedante transformada idónea. Por ejemplo, empleando métodos conocidos puede unirse el DNA que codifica a la BMP-2 a un vector de expresión, por ejemplo el pED (Kaufman y col., Nucleic Acids Res. 19, 4484-4490, 1991), transformarse en una célula hospedante y puede inducirse y maximizarse la expresión de la proteína. Obviamente, las secuencias degeneradas de DNA que codifican a una BMP humana pueden emplearse también para producir una rhBMP, por ejemplo las secuencias de DNA que codifican a variantes alélicas de las BMP.

Puede emplearse cualquier vector de expresión idóneo para producir las rhBMP, por ejemplo la rhBMP-2, que pueden utilizarse en la presente invención. La expresión en mamíferos se conocen numerosos vectores de expresión además del vector pED, ya mencionado antes, por ejemplo el pEF-BOS (Mizushima y col., Nucleic Acids Res. 18, 5322, 1990); el pXM, el pJL3 y el pJL4 (Gough y col., EMBO J. 4, 645-653, 1985) y el pMT2 (derivado del pMT2-VWF, A.T.C.C. n° 67122; véase TCT/US-87/00033). Ya se conocen vectores de expresión idóneos para el uso en levaduras, insectos y células bacterianas. La construcción y el uso de estos vectores de expresión son bien conocidos de los expertos en la materia. Las BMP recombinantes, por ejemplo la rhBMP-2, pueden producirse empleando una secuencia de DNA quimérico que codifique a una BMP madura, unida operativamente a un péptido de una BMP diferente. Véase por ejemplo la US-5 168 050, cuya publicación se incorpora a la presente como referencia.

Las células hospedantes idóneas para la producción de BMP útiles para la presente invención incluyen, por ejemplo, las células de mamíferos, tales como las células de ovarios de hámster chino (CHO), las células COS de monos, las células 3T3 de ratón, las células L de ratón, las células de mieloma, por ejemplo las NSO (Galfre y Milstein, Methods in Enzymology 73, 3-46, 1981) y similares. Las rhBMP pueden producirse también por transformación de células de levadura, de insectos y de bacterias con secuencias de DNA que codifiquen a las BMP, por inducción y amplificación de la expresión de proteínas, empleando método ya conocidos. Cuando se produce en células bacterianas, puede ser necesario solubilizar la proteína morfogenética ósea.

Las BMP producidas por métodos recombinantes, por ejemplo la rhBMP-2, tienen que purificarse de su medio de cultivo o extractos celulares para poder utilizarse en la presente invención. El medio de cultivo o los extractos celulares que contienen las rhBMP pueden concentrarse empleando un filtro de concentración de proteínas comercialmente asequible, por ejemplo una unidad de ultrafiltración de Amicon o de Millipore Pellicon. Después del paso de concentración puede aplicarse el concentrado a una matriz de purificación, por ejemplo un medio de filtración de tipo gel. Como alternativa puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo una matriz o un sustrato que tenga grupos dietilaminoetil (DEAE) libres. Las matrices pueden ser de acrilamida, de agarosa, de dextrano, de celulosa o de otros tipos, que se emplean habitualmente en las purificaciones de proteínas. Como alternativa puede emplearse un paso de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos idóneos incluyen varias matrices insolubles que contienen grupos sulfopropilo o carboximetilo. La purificación de las BMP a partir del líquido sobrenadante del cultivo puede incluir también uno o varios pasos en columna a través por ejemplo de resinas de afinidad, como son la lectina-agarosa, la heparina-Toyopearl® o la Cibacom Blue 3GA Sepharose®; o por cromatografía de interacción hidrófoba, empleando resinas del tipo fenil-éter, butil-éter o propil-éter; o por cromatografía de inmovinoafinidad. Finalmente, pueden emplearse uno o varios pasos de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) en fase inversa empleando medios RP-HPLC hidrófobos, p. ej. gel de sílice, que tengan grupos metilo u otros grupos alifáticos libres, para seguir purificando las BMP que se van a utilizar en los métodos presentes. Algunos o todos los métodos de purificación anteriores, en varias combinaciones, pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente homogénea.

Las BMP, por ejemplo la rhBMP-2, pueden utilizarse para la preparación de composiciones de la presente invención para el tratamiento "in vivo" de mamíferos por parte de los médicos, cuando aquellos sufren una gran variedad de estados patológicos. Estos estados patológicos incluyen las enfermedades del sistema nervioso periférico, por ejemplo las lesiones de nervios periféricos, la neuropatía periférica y las neuropatías localizadas, y las enfermedades del sistema nervioso central, por ejemplo la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson, la de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y el síndrome de Shy-Drager. Otros estados patológicos que pueden tratarse con arreglo a la presente invención son los trastornos mecánicos y traumáticos, por ejemplo los trastornos de la médula espinal, el traumatismo craneal y las enfermedades cerebrovasculares, por ejemplo la apoplejía. Las BMP pueden utilizarse para aumentar la regeneración de las células nerviosas y el tejido nervioso con el fin de mejorar o acelerar la curación de tales trastornos.

Según la invención, una BMP, por ejemplo la rhBMP-2, pueden administrarse solas, en combinación con otras BMP o en combinación con otras terapias. Por ejemplo, la rhBMP-2 puede combinarse eficazmente con una citocina, una linfocina, un factor de crecimiento o un factor que estimule las colonias, para el tratamiento de enfermedades neurológicas. Los ejemplos de citocinas, linfocinas, factores de crecimiento y factores que estimulan la formación de colonias que pueden utilizarse en combinación con las BMP con arreglo al método de esta invención incluyen, pero no se limitan a: el EGF, FGF, interleucinas de 1 a 12, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, factor de células germinales, la eritropoyetina y similares. Además, las BMP pueden combinarse con factores neurotróficos, tales como el CNTF, LIF, IL-6 y los factores de crecimiento similares a la insulina [IFG]. Además, con arreglo a la presente invención pueden añadirse proteínas que se encuentran normalmente en el entorno nervioso a las BMP. Estas pueden incluir la laminina, el ácido hialurónico y los condroitina-sulfato-proteoglicanos, incluido el versicano.

Las BMP de la presente invención pueden administrarse empleando una matriz capaz de mantener las BMP en una ubicación y orientación deseadas para permitir la regeneración del tejido nervioso. Las BMP pueden con preferencia adsorberse sobre dicha matriz. La matriz está hecha de colágeno, adhesivos de tejido de fibrina y componentes de las vainas normales de endoneuro, incluidos la laminina, el ácido hialurónico y los condroitina-sulfato-proteoglicanos, incluido el versicano. La matriz puede ser con preferencia porosa, para permitir el influjo, la migración, la diferenciación y la proliferación de las células que se requieren para la regeneración del tejido nervioso. En una forma preferida de ejecución, la matriz consta de colágeno reticulado. El colágeno puede adoptar cualquier forma idónea, pero está con preferencia en forma de esponja. El colágeno puede moldearse en cualquier forma geométrica idónea para la regeneración del tejido nervioso. La matriz puede contener materiales que faciliten la formación de tejido nervioso, por ejemplo fibrina, o injerto de vena.

ES 2 265 146 T3

La matriz, sobre la que está adsorbida la BMP, puede aplicarse a un recipiente artificial de reemplazo nervioso, con preferencia en forma de tubería o de “stent”, por ejemplo una tubería de Silastic con respiradero. El recipiente artificial de reemplazo nervioso puede estar formado por cualquier material que mantendrá en su sitio la matriz sobre la que está adsorbida la BMP y permitirá la regeneración del tejido nervioso. En una forma de ejecución puede utilizarse como recipiente de reemplazo nervioso un injerto de vena autóloga. El recipiente artificial de reemplazo nervioso puede contener material resorbible, por ejemplo polímeros. En algunas formas preferidas de ejecución, la matriz puede servir además como recipiente artificial de reemplazo nervioso.

Las composiciones farmacéuticas idóneas para el uso en el método de la presente invención pueden contener, además de las BMP, vehículos, diluyentes, cargas de relleno, sales, tampones, estabilizadores y/u otros materiales bien conocidos de la técnica que sean farmacéuticamente aceptables. El término “farmacéuticamente aceptable” indica un material no tóxico que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del o de los principios activos. Las características del vehículo o de otros materiales dependerán de las vías de administración.

La administración de las BMP, por ejemplo la rhBMP-2, puede efectuarse por un gran número de vías convencionales. Para la regeneración de tejidos nerviosos, para el tratamiento de defectos nerviosos o de lesiones nerviosas es preferida la aplicación tópica de las BMP. En el modo de administración más preferido, la BMP se adsorbe sobre una matriz biocompatible y se aplica a un recipiente artificial de reemplazo nervioso. La matriz biocompatible está hecha con preferencia de colágeno y puede adoptar la forma de esponja, de láminas o de alfombras, o de partículas estrechamente empaquetadas. El recipiente artificial de reemplazo nervioso puede adoptar la forma de un tubo o de un “stent”. Los expertos en la materia comprenderán que hay otros materiales idóneos que pueden utilizarse para el recipiente artificial de reemplazo nervioso. En una forma preferida de ejecución, el recipiente artificial de reemplazo nervioso, contiene una tubería de Silastic con respiradero, que contiene la matriz en la que está adsorbida la BMP. En otra forma preferida de ejecución, el recipiente artificial de reemplazo nervioso está formado por un injerto de vena autóloga. En algunas formas preferidas de ejecución, el mismo material puede servir a la vez de matriz y de recipiente artificial de reemplazo nervioso.

La cantidad de BMP útil para la presente invención dependerá de la naturaleza y de la gravedad del estado patológico a tratar y de la naturaleza de los tratamientos anteriores, a los que se ha sometido el paciente. Finalmente, el facultativo que atiende al paciente decidirá la cantidad de BMP con la que se va a tratar cada paciente individual. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas de la presente invención contengan de 0,1 μg a 100 mg, con preferencia de 0,1 μg a 100 μg de BMP por kg de peso corporal. El facultativo que atiende al paciente determinará el régimen actual de dosificación tomando en consideración varios factores que modifican la acción de los fármacos, p. ej. la enfermedad, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tiempo y el método de administración y otros factores clínicos.

Para llevar la invención a la práctica se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de BMP a un mamífero que sufra un estado patológico. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” indica la cantidad total de cada componente activo del método que es suficiente para desplegar un beneficio significativo para el paciente, es decir, la curación de estados patológicos crónicos o el aumento de velocidad de curación. Por ejemplo, una cantidad regeneradora nerviosa de una proteína morfogenética ósea es una cantidad de proteína que, cuando está adsorbida sobre un vehículo matriz idóneo y se implanta en un sitio donde hay una lesión, defecto o depleción nerviosos, permite la regeneración del tejido nervioso y/o la mejora de la lesión, defecto o depleción nerviosos. Cuando se aplican a un ingrediente activo individual, que se administra solo, el término se refiere a este ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que producen el efecto terapéutico, tanto si se administran en combinación, en serie o simultáneamente. Una dosis terapéuticamente eficaz de BMP para la puesta en práctica del método de esta invención está contemplada dentro del intervalo de 0,1 μg a 100 mg por kg de peso corporal por aplicación. En general, la administración se iniciará desde el punto más bajo del intervalo de dosificación y se incrementará la dosis a lo largo de un período de tiempo predeterminado hasta que se observe un efecto positivo. A continuación se realizarán aumentos incrementales de la dosificación limitando dichos aumentos incrementales a niveles tales que produzcan el correspondiente incremento del efecto, al tiempo que se toman en consideración los posibles efectos adversos que puedan surgir.

Cuando se utiliza el método de la presente invención, la duración de la terapia intravenosa variará en función de la gravedad del estado patológico a tratar y de la potencial respuesta idiosincrática de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la BMP se situará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración continua. En último término será el facultativo que atiende al enfermo quien decida la duración apropiada de la terapia empleando el método de la presente invención.

Con arreglo a esta invención, la regeneración nerviosa puede lograrse en mamíferos con la administración de una cantidad neuroregeneradora de BMP, por ejemplo de la rhBMP-2, mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para los fines de esta invención, una cantidad neuroregeneradora de BMP, por ejemplo de la rhBMP-2, con arreglo a la presente invención es la cantidad de proteína necesaria para producir la regeneración del nervio. La regeneración del nervio puede medirse por el peso o por el volumen del tejido nervioso presente. Se contempla que las células hospedantes idóneas, transformadas para expresar las BMP, pueden administrarse también al paciente con el fin de mejorar el crecimiento o la supervivencia de las células o del tejido nerviosos.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención.

ES 2 265 146 T3

Las formulaciones parenterales de BMP pueden presentarse en forma de soluciones acuosas libres de pirógenos y parenteralmente aceptables. La fabricación de tales soluciones de proteína parenteralmente aceptables, habida cuenta del pH, isotonía, estabilidad y similares, está dentro de la habilidad de los técnicos. Una formulación parenteral preferida debería contener, además de la BMP, un vehículo isotónico, por ejemplo una solución inyectable de cloruro sódico, una solución inyectable de Ringer, una solución inyectable de dextrosa, una solución inyectable de dextrosa y cloruro sódico, una solución inyectable de Ringer lactada u otro vehículo ya conocido en la técnica. Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden contener también estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos, que los expertos en la materia ya conocen.

Cuando se administran tópicamente, las BMP de la presente invención pueden adoptar la forma de una formulación líquida o semisólida libre de pirógenos y tópicamente aceptable, por ejemplo un ungüento, una crema, una loción, una espuma o un gel. La fabricación de tales formulaciones aplicables tópicamente ya es conocida de los expertos en la materia.

15 Ejemplo I

Efectos de las BMP en las células nerviosas

Ejemplo IA

20 *Cultivo de células*

Se adquieren las células Balb c/SFME (de embrión de ratón libre de suero) a la American Type Culture Collection (CRL 9392) y se cultivan del modo descrito anteriormente (Sakai y col., PNAS:USA 87, 8378-8382, 1990) en medio DME/F12 (1:1) que contiene insulina bovina, 10 $\mu\text{g/ml}$ (Eli Lilly); transferrina humana, 25 $\mu\text{g/ml}$ (Collaborative Research); lipoproteína humana de alta densidad, 20 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma); factor de crecimiento epidérmico humano, 100 ng/ml (PeproTech); fibronectina de plasma bovino, 20 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO); selenito sódico, 10 nM (GIBCO); penicilina-estreptomina (10 U/ml); L-glutamina (4 mM); y ácido 4-(2-hidroxi-etil)-piperazina-etanosulfónico, pH 7,4 (15 mM).

Se pasan las células empleando un inhibidor de tripsina/EDTA y soja-tripsina (1 mg/ml) en una proporción volumétrica de 1:2, que se aplica entre los pasajes 19 y 50. Se cuentan las células, a menos que se indique lo contrario, con un contador de Coulter Diagnostics.

Ejemplo IB

35 *Factores de crecimiento y diferenciación*

Todas las proteínas recombinantes humanas tienen una pureza superior al 90%. El EGF se adquiere a PeproTech (NJ); la activina A recombinante humana es un gentil regalo de Helen New; el TGF- β 1 se adquiere a R&D Systems; las BMP se purifican en un medio acondicionado con CHO mediante varios pasos de purificación realizados en el Genetics Institute.

Ejemplo IC

45 *Estudios de diferenciación*

Para todos los análisis de inmunofluorescencia y FACS, a menos que se indique lo contrario, se introducen las células en placas a razón de $2,5 - 5 \times 10^4$ / cm^2 y se añade la BMP-2 al cabo de 16-20 h en las concentraciones y durante la duración temporal que se indican.

50 Ejemplo ID

Estudios de supervivencia

Se lavan las células dos veces en medio sin EGF y se introducen en placas a razón de $0,8 - 1 \times 10^5$ / cm^2 en el mismo medio suplementado con varios factores de crecimiento. Estos incluyen la BMP-2, la BMP-4, la BMP-5, la BMP-6, la BMP-7, el heterodímero de BMP-2/6, el heterodímero de BMP-2/7 y el TGF- β 1. Se determina la viabilidad porcentual y el número de células por duplicado por exclusión con colorante azul tripano en un hemocitómetro al cabo de 44-48 h, contando un mínimo de 400 células por muestra. Se calcula la viabilidad porcentual en forma de células vivas totales divididas por el número total de células en el punto final, ya que la proliferación celular se realiza en las mismas condiciones.

Ejemplo IE

65 *Tinción inmunofluorescente con anticuerpo*

Se quita el medio de las células de los recipientes de vidrio de cuatro hoyos o de las cámaras deslizantes de plástico (Lab Tek) y se lavan dos veces con PBS, exento de Ca^{+2} y de Mg^{+2} (CMF). Para la tinción superficial con el anticuerpo

ES 2 265 146 T3

A2B5 (Boehringer-Mannheim) se fijan inicialmente las células con paraformaldehído del 4% durante 10 minutos, se lavan con PBS y después se incuban con suero de conejo al 1% en PBS para bloquear la fijación no específica. Se diluye el anticuerpo en suero de conejo al 1% en PBS y se incuba durante 1 hora, después se lavan las células con suero de conejo al 1% en PBS y a continuación se realiza la detección con un anticuerpo de conejo anti-ratón biotinilado y después con un conjugado de estreptavidina-FITC (Zymed). Para los ensayos ulteriores de doble tinción o de tinción interna única del GFAP se fijan las células en acetona/metanol (50:50) a -20°C durante 10 minutos. Se efectúan la permeabilización y el bloqueo con Triton X-100 del 0,2% y con suero de cabra o de conejo al 1% en PBS, dependiendo del reactivo del segundo paso. Los anticuerpos primarios son policlonales de conejo (1:200) o monoclonales de ratón (5 µg/ml), según se indica, diluido en suero de cabra o de ratón al 1% en PBS, respectivamente, y se incuban durante una hora. La detección se realiza con un anticuerpo biotinilado secundario (Zymed) y estreptavidina-ficoeritrina (PE) (Zymed) o un conjugado de anticuerpo anti-IgG1-PE (Zymed). Se examinan las células con un aparato Axiophot de Zeiss o con un microscopio BH2-RFC de Olympus equipado con sistema óptico epifluorescente y se fotografían empleando una película Ektachrome 1600 ASA.

15 Ejemplo IF

Análisis FACS

Para estos ensayos se lavan las células una vez con PBS y una vez con EDTA/sales antes de la incubación con EDTA/sales a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después se separan las células por pipeteo suave de la superficie de las placas. Se lavan las placas con EDTA/sales y se combinan con las células que seguidamente se centrifugan, se lavan una vez con PBS y después se cuentan. Se utilizan 1×10^6 células para cada incubación de anticuerpos. Para la tinción superficial con A2B5 a 4°C se incuba en primer lugar el culote de las células con 50 µl de suero de conejo inactivado para bloquear la fijación no específica y después con el anticuerpo A2B5 (Boehringer-Mannheim) o IgM específico de grupo de control a razón de 5 µg/ml, diluido en suero de conejo al 1% en PBS durante una hora. La detección se realiza con un conjugado directo de anti-IgM-PE (Zymed). Para los ensayos posteriores de tinción doble o de tinción única interna del GFAP, se fijan las células en paraformaldehído del 0,25 a 4°C durante una hora, se centrifugan y después se suspenden de nuevo en 1 ml de Tween 20 al 0,2% en PBS/azida y se incuban a 37°C durante 15 minutos. Se añade 1 ml de suero de conejo inactivado por calor al 2% en PBS y se centrifugan las células. Se suspende de nuevo el culote en 50 µl de suero de conejo y entonces se diluyen los anticuerpos primarios y los controles específicos de grupo con 100 µl de suero de conejo al 1% en PBS a razón de 5 µg/ml. La detección final se realiza con anticuerpo anti-IgG1-FITC conjugado directamente (Zymed, Fisher Biotech). Se lavan las células con suero de conejo al 1%, Tween 20 al 0,2% en PBS/azida, después con PBS y finalmente se suspenden de nuevo en paraformaldehído del 1%. Se realiza el análisis FACS en un aparato FACScan (Becton Dickinson, San José, Ca) empleando un láser de argón de 15 mw, 488 nm, enfriado con aire, para la excitación del fluorocromo. La emisión de fluorescencia se mide en una configuración FACScan estándar: 530 nm (FITC), 585 nm (PE) y >650 nm (fluorescencia roja).

Se registran y analizan los datos con un sistema computerizado Hewlett Packard 340C, empleando un programa informático LYSYS II (Becton Dickinson, San José, Ca). Se realizan controles de isotipos para cada muestra y se establecen límite para los ensayos de tinción única, por ejemplo que no incluyan más del 3% de células.

Ejemplo IG

Análisis "western"

Se introducen las células en placas de 6 hoyos, en hoyos duplicados, a razón de $2,5 \times 10^4$ /cm² y se añade la BMP o el TGF-β1 apropiado a razón de 1, 10 y 100 ng/ml a cabo de 16 horas. Pasadas 44 horas se recolectan las células. Se tripsiniza un hoyo y se cuenta y se lava el segundo con PBS, se raspan las células y se vierten sobre PBS enfriado con hielo que contiene Prefabloc 1 mM (inhibidor de proteasa soluble en agua, de Boehringer-Mannheim) y se centrifugan a 400 rpm. Se añaden al culote de las células y se mezclan 1-2 volúmenes de Triton X-100 al 0,1%, Prefabloc 1 mM, Tris-base 0,125 M, pH 6,8, DNAsa a 250 U/ml. Finalmente se añade a cada uno SDS del 0,5% y DTT 20 mM. Basándose en el recuento de las células de los hoyos duplicados se carga el volumen equivalente, que contiene 5×10^5 células de cada condición en cada carril de un mini-gel Laemlli del 12%, 1 mm (Novex). Se carga GFAP bovino a razón de 10 y 100 ng. Después de la operación se transfiere el gel a 300 mA x 1 hora en presencia de SDS del 0,05% a 0,45 µg de nitrocelulosa. Se seca la mancha con aire, se fija con KOH del 1%, se lava y se bloquea con Tween 20 al 0,5% en TBS (Tris 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8,5), después se incuba en una dilución 1:1000 de GFAP-antisuero (BTI) durante una noche. Se lava la mancha con Tween 20 al 0,5% en TBS, se incuba en una dilución 1:3000 de cabra anti-conejo conjugado con HRP durante 1 hora y después se revela con quimioluminiscencia ampliada (kit de Amersham). Resumiendo, se lava la mancha con TBS-Tw20 y después con TBS, se incuba en una mezcla 1:1 de los reactivos A y B durante 1 minuto y se expone a una película y se revela.

Resultados

El tratamiento de las células SFME con el TGF-β1 o suero se traduce en distintos cambios morfológicos acompañados de la expresión del marcador de diferenciación GFAP específico de astrocitos (Sakai y col., lugar citado). El tratamiento con TGF-β1 da lugar a un tipo de células bipolares elongadas con procesos citoplásmicos en ambos extremos, que se tiñen con el GFAP. A diferencia de ello, las células tratadas con el suero fetal bovino (FCS) son de tamaño mayor, con una redícula filamentosa muy ramificada, que se tiñe muy intensamente con el GFAP.

ES 2 265 146 T3

El tratamiento de las células SFME con la BMP-2, 4, 5, 6, 7 y el heterodímero BMP-2/6 y 2/7 a razón de 10 ng/ml da lugar a un cambio morfológico muy acusado en su aspecto, acompañado de la expresión del GFAP. Las células adquieren procesos citoplásmicos muy largos, típicos de los astrocitos primarios del cultivo. En conjunto, la intensidad de la tinción GFAP observada con las BMP y suero bovino es mucho mayor que la observada con el TGF- β . La BMP-2 y el heterodímero BMP-2/7 inducen un tipo de célula de morfología mayor, similar al observado con el suero bovino, mientras que la BMP-7 induce una morfología de naturaleza más fibrosa. Es posible que estas morfologías reflejen diferencias de fenotipo en el tipo de célula inducido (astrocitos de tipo 1 frente a los de tipo 2) o niveles variables de GFAP o de otras proteínas citoesqueléticas. Las células de control tienen un aspecto parecido a los fibroblastos y no se tiñen con el GFAP.

Con el fin de medir cuidadosamente el nivel de expresión del GFAP inducida por las BMP y de comparar la actividad con la del TGF- β se realiza un ensayo cuantitativo de clasificación de células activadas por fluorescencia. Se tratan las células con 10 ng/ml de cada uno de los siguientes: BMP, TGF- β 1 y activina y suero bovino del 10%. Se analizan los datos por el porcentaje de población que responde y por la intensidad media de la fluorescencia.

El porcentaje de la población que responde refleja el número de células que expresan el GFAP, con independencia del nivel de expresión. Las BMP-2, 4, 5, 6, 7, los heterodímeros 2/6 y 2/7, el TGF- β y el suero bovino inducen de modo significativo la expresión del GFAP si se compara con el control. La activina y otros miembros de la superfamilia TGF- β no tienen efecto. En este parámetro, los más eficaces son los heterodímeros BMP-2/6 y 2/7, resultando de ello aproximadamente del 75 al 72% de células que responden. Los tratamientos con la BMP-2, 4, el TGF- β 1 y suero fetal bovino dan lugar aproximadamente del 53 al 58% de células que responden; los tratamientos con BMP-5, 6 y 7 dan lugar aproximadamente del 30 al 40% de células que responden.

La intensidad de fluorescencia media (MFI) es un indicativo del nivel de la expresión del GFAP; cuanto mayor es la fluorescencia media, tanto mayor es el nivel del GFAP expresado. Las células inducidas con los heterodímeros BMP-2/6 y 2/7 tienen una fluorescencia media aproximadamente 8 veces mayor que la de las células inducidas con el TGF- β 1. Las células inducidas con la BMP-2, 4, 5, 6 y 7 tienen una fluorescencia media aproximadamente de 2 a 4 mayor que la de las inducidas con suero bovino. Tanto el TGF- β como el suero bovino dan valores significativamente mayores que el control.

Con el fin de comparar la capacidad de las BMP y del TGF- β 1 de inducir el GFAP, se ensayan la BMP-2, la BMP-6, el heterodímero BMP-2/6 y el TGF- β 1 en un intervalo de concentraciones de 0 a 10 ng/ml y se aplica el ensayo FACS para cuantificar la expresión del GFAP. Se recurre a la concentración, en la que cada factor da un valor de fluorescencia media GFAP de 5 (10 veces mayor que el control, que es de 0,5), para comparar las actividades relativas. En términos de actividad relativa comparada con el TGF- β 1, el heterodímero BMP-2/6 es aproximadamente 18 veces más activo y la BMP-2 y la BMP-6 son aproximadamente 3-4 veces más activos. La BMP-2 y la BMP-2/6 inducen niveles detectables de GFAP en el intervalo de 0 a 0,08 ng/ml, mientras que el primer incremento de GFAP detectable con el TGF- β 1 se sitúa en el intervalo de 0,4 a 2 ng/ml.

El análisis "western" confirma también los niveles más elevados del GFAP producido por células SFME después de la exposición a las BMP. En los extractos celulares tratados con BMP o TGF- β 1, el anticuerpo policlonal GFAP empleado para la detección reconoce específicamente una proteína de 40-50 kD que se sitúa ligeramente por debajo de los 52 kD del GFAP bovino estándar. El amplio abanico de pesos moleculares observado probablemente es el resultado de la proteólisis. Hay un aumento dependiente de la dosis en los niveles de proteína con el tratamiento con la BMP-2 y la BMP-6 de 1 a 100 ng/ml. El GFAP inducido por el tratamiento con el TGF- β es máximo para una dosis de 10 ng/ml y es aproximadamente igual al observado con solo 1 ng/ml de la BMP-2. Este nivel no pudo aumentarse ni con una dosis de 100 ng/ml. Las BMP inducen niveles más altos de GFAP que el TGF- β 1.

El tratamiento de células SFME con las BMP se traduce en la conversión de las células de tipo "fibroblasto" en dos morfologías distintas, positivas de GFAP. Un tipo de células grandes y planas con pocos procesos es reminiscente de un tipo protoplásmico de astrocitos; otro de procesos citoplásmicos muy largos es característico de astrocitos fibrosos.

Estas células se caracterizan además por la tinción doble de anticuerpo inmunofluorescente con A2B5 y GFAP. En la población de BMP-2/6 están presentes tanto las células del linaje de astrocitos de tipos 1 como las del tipo 2. La mayoría de células, que se tiñen con el GFAP pero no con el A2B5, son del linaje de astrocitos de tipo 1, mientras que las células que se tiñen tanto con el A2B5 como con el GFAP son del linaje de astrocitos de tipo 2. Las células de control se tiñen con A2B5 en su superficie, pero no se tiñen con el GFAP.

Con el fin de cuantificar las poblaciones observadas en la tinción inmunofluorescente hemos utilizado análisis FACS de doble tinción. Los datos de la tabla 1 se expresan en forma de promedio de por lo menos tres ensayos \pm la desviación estándar. Las células de control son aproximadamente un 37% positivas con A2B5. Las células de control no se tiñen positivamente con los marcadores de linajes de astrocitos. Las células tratadas con la BMP-2, 6 y 2/6 no se tiñen únicamente con el A2B5, pero están formadas por poblaciones de los dos linajes de astrocitos. Más del 60% son positivas del GFAP solo, lo cual indica que son del linaje de tipo 1 y un 18% son positivas tanto del A2B5 como del GFAP, lo cual indica que son del linaje de tipo 2. El tratamiento con el TGF- β 1 produce también una población de tipo similar de células del linaje de tipo 2 (aproximadamente el 14%), pero solo aproximadamente el 40% de la población positiva de células de linaje del tipo 1. Queda además una pequeña población de células (aproximadamente el 7%),

ES 2 265 146 T3

que se tiñen solamente con el A2B5. En conjunto, el tratamiento de la células SFME con las BMP o con el TGF- β 1 da como resultado una pérdida de la expresión del A2B5 que no puede atribuirse totalmente a la población A2B5/GFAP.

5

TABLA 1

Astrocitos			
		Tipo 1	Tipo 2
	A2B5	GFAP	A2B5/GFAP
Control	$37,13 \pm 18,66$	$0,15 \pm 0,19$	$1,18 \pm 0,67$
BMP-2	$0,39 \pm 0,54$	$60,49 \pm 3,71$	$19,89 \pm 3,31$
BMP-6	$0,25 \pm 0,43$	$59,28 \pm 1,28$	$17,89 \pm 3,19$
BMP-2/6	$0,42 \pm 0,38$	$65,07 \pm 7,33$	$18,37 \pm 5,49$
TGF- β 1	$7,05 \pm 1,02$	$39,72 \pm 3,02$	$14,23 \pm 3,04$

25

Estudio de supervivencia de las células SFME

Se requiere el EGF para la supervivencia de las células SFME y otros factores, como el FGF y el TGF- β , no pueden sustituirlo. En ausencia del EGF, las células SFME se tratan con la BMP-2, 7, el heterodímero 2/7, el TGF- β 1 y la activina. Se ha observado que la activina es una molécula de supervivencia de células nerviosas P19 (Schubert y col., Nature 344, 868-870, 1990). Después de 48 horas de ausencia del EGF solamente queda un 30% de células supervivientes y una disminución general del número de células. La adición del EGF se traduce en aproximadamente un 95% de supervivencia celular, acompañado de un aumento de 5 veces del número de células. Las células tratadas con la BMP-2, la BMP-7 y el heterodímero BMP-2/7 mantienen el número de células aproximadamente en el 70-80% de la densidad de siembra. Sin embargo, las células no proliferan. Las células tratadas con la BMP-2 no solamente sobreviven, sino que parece que se han diferenciado. El índice de supervivencia se sitúa aproximadamente en el 80-85%. El tratamiento de las células con el TGF- β 1 o con la activina da lugar a índices de supervivencia de < 10% y una disminución por lo menos de 10 veces en el número de células. Las concentraciones más elevadas del TGF- β 1 no aumentan la supervivencia.

40

Ejemplo II

Regeneración nerviosa periférica en mamíferos empleando la BMP-2

45

A. Preparación de una esponja de colágeno

Se cortan las esponjas de colágeno (Collastat[®], Vitaphore Wound Healing, Inc.) en rebanadas de dimensiones aproximadas 2 x 2 x 18 mm, se lavan ampliamente en agua destilada en vidrio estéril, se liofilizan, se esterilizan con óxido de etileno y se desgasifican antes de la adición de la BMP-2.

50

Sobre la longitud de cada esponja preparada se reparten a lo ancho 0,5 μ g de la BMP-2 en acetonitrilo del 45%, con un 0,1% de ácido trifluoracético. Después se colocan las esponjas en un tubo, se congelan en nitrógeno líquido y se liofilizan. Se preparan los implantes de control del mismo modo, excepto que se emplea un tampón de acetonitrilo del 45% y ácido trifluoracético del 0,1% sin la BMP-2.

55

Después de la liofilización se carga la BMP-2 y se colocan las esponjas de control dentro de una tubería de Silastic con respiradero estéril de dimensiones aproximadas 1,6 x 20 mm. Todas las manipulaciones se realizan en condiciones estériles. Se corta el exceso de tubería en cada extremo del implante dentro de la sala de operaciones antes de la cirugía.

60

Se secciona el nervio ciático de 6 ratas Lewis. Se insertan "stents" de Silastic o biodegradables con respiradero, de 1,6 mm de diámetro interno x 20 mm de longitud. Los "stents" contienen un vehículo de matriz de colágeno con o sin la rhBMP-2. El vehículo de matriz de colágeno se compone de una esponja de colágeno (Collastat) (aproximadamente 1,5 mm x 15 mm). Los animales con el nervio ciático seccionado y recogido, para evitar que se pueda volver a unir, sirven como controles positivos. La extremidad trasera no operada sirve como control negativo de unión retardada.

65

Se aplican los "stents" microscópicamente y se anastomosan a los extremos nerviosos seccionados del nervio ciático. Se insertan los extremos nerviosos en el "stent" por 1 mm de cada extremo, quedando una brecha de 15 mm. Se ensaya el retorno eléctrico de la función de los animales al cabo de 6, 8 y 12 semanas de la implantación. Se

ES 2 265 146 T3

examinan los potenciales de acción muscular mixta (CMAP), que proporcionan un procedimiento transcutáneo fiable y reproducible, que es un procedimiento cuidadoso de determinación del grado de retorno funcional. La amplitud y la latencia son dependientes de la edad y directamente proporcionales al número de axones/placas terminales motoras reinervados.

5

Se sacrifican los animales para realizar el examen patológico al cabo de 12 semanas de la intervención. Las tinciones incluyen H&E, plata, azul sólido Luxol y S100. Se realiza la cuantificación insesgada de los elementos proximales, centrales y distales dentro del "stent". Como controles de las tinciones se emplean los "stents" colocado dentro de los tejidos subcutáneos de diversas ratas.

10

Los resultados indican buena regeneración nerviosa a lo largo de los 15 mm de nervio roto después de 12 semanas en 4 de los 6 animales tratados con 0,6 μ g de BMP-2 por dispositivo, depositados en una esponja de Collastat. Los controles sin la BMP-2 no presentan crecimiento a lo largo de los 15 mm de nervio roto.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para inducir la formación de astrocitos “*in vitro*”, que consiste en administrar a las células idóneas una proteína morfogenética ósea mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. Uso de una proteína morfogenética ósea para la fabricación de una composición para la inducción del crecimiento o regeneración de células de astrocito.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en los que la proteína morfogenética ósea es la BMP-2, la BMP-4, la BMP-5, la BMP-6, la BMP-7 o un heterodímero de BMP-2/6 o de BMP-2/6.
- 15 4. Un dispositivo para inducir la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*” que consta de un recipiente artificial que contiene una proteína morfogenética ósea elegida entre la BMP-2, la BMP-4 y un heterodímero de BMP-2/6 o de BMP-2/7, adsorbida sobre una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglucanos.
5. El dispositivo de la reivindicación 4, en el que la matriz contiene colágeno en forma de esponja.
- 20 6. El dispositivo de la reivindicación 4 ó 5, dicho recipiente artificial contiene una tubería de Silastic con respiradero.
- 25 7. Uso de una proteína morfogenética ósea elegida entre la BMP-2, la BMP-4 y un heterodímero de BMP-2/6 o BMP-2/7 en una tubería de Silastic con respiradero para la fabricación de un dispositivo médico destinado a inducir la regeneración de nervios periféricos “*in vivo*”.
- 30 8. El uso de la reivindicación 7, en el que dicha proteína morfogenética ósea está adsorbida sobre una matriz que contiene colágeno, adhesivos de tejido de fibrina, laminina, ácido hialurónico o condroitina-sulfato-proteoglucanos contenidos dentro de una tubería de Silastic con respiradero.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65