



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 315 842**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/48 (2006.01)

A61K 9/22 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05707792 .7**

(96) Fecha de presentación : **18.01.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1709161**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

(54)

Título: **Células terapéuticas humanas que secretan factor de crecimiento nervioso.**

(30)

Prioridad: **19.01.2004 DK 2004 00064**
20.01.2004 US 537033 P
30.04.2004 DK 2004 00673
28.05.2004 US 575087 P

(73)

Titular/es: **NsGene A/S**
154 Baltorpvej
2750 Ballerup, DK

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

(72)

Inventor/es: **Tornøe, Jens;**
Kusk, Philip y
Wahlberg, Lars

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

(74)

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 315 842 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

Células terapéuticas humanas que secretan factor de crecimiento nervioso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a líneas celulares humanas genéticamente modificadas para sobreexpresar NGF bioactivo. En otro aspecto, la presente invención se refiere a líneas celulares humanas encapsuladas genéticamente modificadas para sobreexpresar NGF bioactivo, que pueden usarse en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, neuropatía periférica y otros trastornos neurológicos susceptibles de tratamiento con NGF local y prolongado.

Antecedentes de la invención

Debido a que el NGF no cruza fácilmente la barrera hematoencefálica, su administración al SNC requiere el uso de procedimientos invasivos, que pueden comprometer la integridad de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, en los estudios preclínicos con roedores que demostraron la posible eficacia del NGF exógeno, se administró el NGF con minibombas osmóticas o a través de cánulas intraventriculares crónicas. Esas técnicas requieren infusiones repetidas en el cerebro, o bien a través de inyecciones mediante las cánulas, o bien a partir de bombas, que deben rellenarse cada vez que se vacía el depósito. Cada ocasión en la que debe sustituirse el depósito de la bomba o volverse a insertar la jeringuilla de inyección a través de la cánula representa otra oportunidad de que puedan introducirse contaminantes en el cerebro, que es especialmente susceptible de infección.

Incluso con el uso cuidadoso de procedimientos estériles hay riesgo de infección. Se ha notificado que incluso en unidades de cuidados intensivos, se infectaron con bacterias catéteres intracerebroventriculares usados para monitorizar la presión intracraneal tras aproximadamente tres días (Saffran, *Perspectives in Biology and Medicine*, 35, págs. 471-86 (1992)). Además del riesgo de infección, parece que hay algún riesgo asociado con el procedimiento de infusión. Se ha notificado que las infusiones en los ventrículos producen hidrocefalia (Saffran *et al.*, *Brain Research*, 492, págs. 245-254 (1989)) e infusiones continuas de disoluciones en el parénquima están asociadas con necrosis celular en el cerebro.

El uso de tejido fetal para sustituir neuronas degeneradas está enturbiado por preocupaciones éticas y las células no fetales no encapsuladas pueden rechazarse o producir tumores. Además, el tejido tomado de fuentes fetales puede ser sumamente variable. Por último, la infección directa de células huésped mediante vectores virales para producir NGF mediante terapia génica *in vivo* está asociada con riesgos de mutagénesis insercional y tumorigénesis así como la incapacidad de detener la secreción de NGF si se producen efectos adversos. Encapsulando células que producen NGF, puede suministrarse NGF exógeno con un riesgo mínimo de infección, sin el uso de tejido fetal o vectores virales, y sin el riesgo de rechazo de tejido o desarrollo de tumores.

Finalmente, también se han expresado preocupaciones sobre si el NGF exógeno a las dosis usadas anteriormente pudiera ser por sí mismo tóxico o dañino, quizá incluso acelerando los procesos neurodegenerativos asociados con la enfermedad de Alzheimer (Saffran, *Perspectives in Biology and Medicine*, 35, págs. 471-86 (1992)). Se ha sugerido que el NGF exógeno podría acelerar la formación de la maraña, iniciar el brote axonal de axones simpáticos perivasculares conduciendo potencialmente a cambios en el flujo sanguíneo cerebral, o remodelar las proyecciones de neuronas del prosencéfalo basal en respuesta al NGF exógeno de manera que neuronas del prosencéfalo basal todavía no afectadas se convierten en disfuncionales y acelerando así el proceso de demencia (Saffran, *Perspectives in Biology and Medicine*, 35, págs. 471-86 (1992)).

La administración de las dosis de NGF notificadas anteriormente puede tener efectos secundarios no deseables incluyendo pérdida de peso grave, dolor, apatía, hipofagia y reaparición de infección por herpes.

Las dosis requeridas de NGF administrado han sido relativamente altas, en gran parte debido a que la semivida de NGF es extremadamente corta. Los informes establecen una semivida de 45 minutos cuando se administra al intersticio del cerebro (Krewson & Salzman, 1996, *Brain Res* 727:169-181). Se ha medido que la semivida en suero de NGF en ratas es de 7,2 minutos (Poduslo & Curran, 1996, *Brain Res Mol Brain Res*, 36:280-286). La corta semivida también significa que los depósitos asociados con minibombas necesitan reponerse muy a menudo y/o las disoluciones de NGF necesitarán contener diversos conservantes, que por sí mismos pueden provocar efectos secundarios. Los efectos secundarios notificados a partir de estudios de infusión con NGF también pueden provocarse por productos de descomposición no caracterizados de NGF.

El estado de la técnica anterior da a conocer métodos y dispositivos para el suministro de NGF a partir de células BHK encapsuladas (Winn *et al* 1994, *PNAS*, 91:2324-2328). Aunque estas células secretaban grandes cantidades de NGF (275-325 pg de NGF por 10^3 células por hora) y se proporcionó una prueba de concepto en ratas, estas células no se han usado en estudios clínicos a pesar del largo periodo en el que las células han estado disponibles.

La razón principal de esto es que las cápsulas que contienen células BHK no son útiles para el tratamiento de seres humanos, debido al posible riesgo de desencadenar una respuesta inmunitaria o zoonosis a partir del uso de células xenogénicas y de la escasa viabilidad a largo plazo que muestran las células BHK tras su encapsulación debido a

la carencia de inhibición por contacto y proliferación continuada. Aunque se modificaron genéticamente las células BHK para que secretasen NGF humano, también secretan inherentemente varias proteínas de hámster, que pueden ser inmunógenas para seres humanos. En cualquier caso, las células BHK no tienen la viabilidad requerida cuando se hacen crecer en condiciones extremas en medios de crecimiento artificiales (documento US 6.361.771).

Por consiguiente, hay una necesidad de proporcionar células humanas adecuadas para encapsulación, células que secretan cantidades terapéuticamente relevantes de factor de crecimiento nervioso. Tales células no se encuentran en el estado de la técnica anterior.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una línea celular humana que comprende una construcción de expresión integrado de manera estable que comprende la siguiente secuencia:

un promotor de mamífero,

una secuencia codificante operativamente unida a dicho promotor, en la que dicha secuencia codificante codifica para NGF o una variante bioactiva de NGF, y

un intrón ubicado en el transcrito.

Los presentes inventores han determinado que sólo se secreta pre-pro-NGF a muy bajos niveles en una línea celular humana inhibida por contacto en ausencia de un intrón en el transcrito. En cambio, la secreción a partir de líneas celulares productoras tradicionales tales como células CHO y HEK293T es alta incluso en ausencia de un intrón. Las células CHO y HEK293T no son adecuadas para encapsulación, principalmente debido a que no se inhiben por contacto. Las células CHO no son tampoco adecuadas para tratamiento de seres humanos ya que no son humanas.

Insertando un intrón en el transcrito, el nivel de secreción aumenta inesperadamente varias veces en particular en células humanas inhibidas por contacto.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un dispositivo de cultivo celular implantable, comprendiendo el dispositivo:

una membrana semipermeable que permite la difusión de NGF a través de la misma; y

una población de células de la línea celular según la invención dispuesta dentro de la membrana semipermeable.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la línea celular de la invención, para la preparación de un medicamento.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del dispositivo de la invención, para la preparación de un medicamento.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno neurológico que comprende trasplantar las células de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno neurológico, que comprende la inserción en un sujeto que necesita el mismo de al menos un dispositivo de la invención.

Según esta invención, puede lograrse el suministro celular o capsular seguro de NGF, sintetizado *in vivo*, al cuerpo humano usando las células y cápsulas según la presente invención.

Según un aspecto de esta invención, los efectos beneficiosos de NGF exógeno para el tratamiento de defectos cognitivos relacionados con la edad, incluyendo enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, Alzheimer y ELA, pueden obtenerse con mayor seguridad ya que el tratamiento puede realizarse con líneas celulares humanas (preferiblemente inhibidas por contacto) en contraposición a líneas celulares de roedores y otras no humanas.

La invención puede usarse en un método de tratamiento que comprende el trasplante de una línea celular de la invención en un soporte sólido o semisólido tal como, pero sin limitarse a, perlas de gelatina u otros sustratos que permiten la inhibición por contacto y supervivencia.

Todavía en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la línea celular de la invención unida a una matriz.

La invención puede usarse además en un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un individuo que necesita el mismo una composición de células ARPE-19 transfectadas con un vector

seleccionado del grupo que consiste en pCIn.hNGF, pCInKhNGF y pNS1n.rINSintrA-hNGF tal como se define en la presente solicitud, pudiendo secretar dicha composición una cantidad terapéuticamente eficaz de NGF humano maduro.

La invención puede usarse además en un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un individuo que necesita el mismo un dispositivo, comprendiendo dicho dispositivo una membrana semipermeable que permite la difusión de NGF maduro humano a través de la misma, comprendiendo además el dispositivo una composición de células ARPE-19 transfectadas con un vector seleccionado del grupo que consiste en pCIn.hNGF, pCInKhNGF y pNS1n.rINSintrA-hNGF, pudiendo liberar dicho dispositivo una cantidad terapéuticamente eficaz de NGF humano maduro.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una línea celular ARPE-19 transfectada con un vector seleccionado del grupo que consiste en pCIn.hNGF, pCInKhNGF y pNS1n.rINSintrA-hNGF.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de células ARPE-19 que pueden secretar más de 10 ng de NGF maduro humano/ml/24 horas, cuando se hacen crecer en cultivos confluentes en medio libre de suero.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un dispositivo de células implantable, comprendiendo el dispositivo:

- (a) una membrana semipermeable que permite la difusión de NGF maduro humano a través de la misma; y
- (b) una población de células ARPE-19 dispuestas dentro de la membrana semipermeable, pudiendo liberar dicho dispositivo más de 0,1 ng de NGF maduro humano por 24 horas cuando se hacen crecer en medio libre de suero.

Preferiblemente, este dispositivo tiene el diseño y las dimensiones tal como se especifica en la presente solicitud.

Dibujos

Figura 1. Expresión diferencial de NGF en líneas celulares transfectadas de manera transitoria.

Figura 2: Efecto de intrón sobre la liberación de NGF *in vitro* (clones aislados +/- CI).

Figura 3: Mapa de vector del vector de expresión pNN con el promotor de CMV y una secuencia codificante de hNGF. El vector de expresión pNN se basa en el vector de expresión pNS1n (figura 5).

Figura 4: Mapa de vector del vector de expresión pNS1n vacío. pNS1n es un vector adaptado derivado de pcDNA3 (Invitrogen) con expresión bajo el control del promotor de citomegalovirus. El vector porta el marcador de resistencia neo en lugar de zeo (Jensen *et al* 2002, J Biol Chem, 277: 41438-41447).

Figura 5: Mapa de vector del vector de expresión pUBI1z vacío (Johansen *et al* 2003, J Gene Medicine, 5:1080-1089).

Figura 6: Cantidad de hNGF secretado a partir de 10⁵ células ARPE-19 transfectadas de manera transitoria en medio de crecimiento celular durante 48 horas. Cada barra es el promedio de tres transfecciones, medida cada transfección por duplicado en el ELISA de hNGF.

Figura 7: Comparación de los niveles de expresión de hNGF a partir de clones estables de cada una de las cuatro construcciones de expresión. Se muestra el promedio de 5 a 10 clones estables que expresan más de 2 veces con respecto al fondo para cada construcción (barras grises) así como el clon que secreta más NGF (barras negras).

Figura 8: Liberación de NGF medida mediante Elisa para NGF a partir de clones estables. Para la explicación véanse los ejemplos.

Figura 9: La secuencia de nucleótidos codificante de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 1) y la secuencia de aminoácidos traducida de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 2).

Figura 10: La secuencia de nucleótidos (SEQ ID No 14) de parte del vector de expresión pCIn.hNGF que abarca desde la primera base del promotor de CMV hasta la secuencia codificante de NGF. Se muestra el transcrito en negrita. Se muestra el intrón quimérico del vector pCI en letras minúsculas. Se muestra una parte del extremo N-terminal de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 15).

Figura 11. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID No 16) de parte del vector de expresión pCIn.KhNGF que abarca desde la primera base del promotor de CMV hasta la secuencia codificante de NGF. Se muestra el transcrito en negrita. Se muestra el intrón quimérico del vector pCI en letras minúsculas. Está subrayada una secuencia consenso de Kozak. Se muestra una parte del extremo N-terminal de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 17).

Figura 12. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID No 18) de parte del promotor de EF-1 α que abarca desde la primera base del promotor hasta la secuencia codificante de hNGF. Se muestra el transcrito en negrita. Se muestra el intrón de EF-1 α en letras minúsculas. Está subrayada una secuencia consenso de Kozak. Se muestra una parte del extremo N-terminal de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 19).

Figura 13. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID No 20) de parte del vector de expresión pUN que abarca desde la primera base del promotor de UbC humano hasta la secuencia codificante de NGF. Se muestra la caja TATA en negrita y subrayada. Se muestra el intrón de ubiquitina en letras minúsculas. Se muestra una parte del extremo N-terminal de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 21).

Figura 14. La secuencia de nucleótidos (SEQ ID No 22) de parte del vector de expresión pNRN que abarca desde la primera base del promotor de CMV hasta la secuencia codificante de NGF. Se muestra la caja TATA en negrita y subrayada. Se muestra el intrón A de insulina de rata en letras minúsculas. Se muestra una parte del extremo N-terminal de pre-pro-NGF humano (SEQ ID No 22).

La figura 15 muestra la parte madura de neurotrofinas pantrópicas humanas preferidas, mostrándose en negrita mutaciones en relación a NGF de tipo salvaje. La figura 15A muestra NGF pantrópico con mutaciones D16A-V18E-V20L-G23T-Y79Q-T81K-H84Q-F86Y-K88R-hNGF (SEQ ID No 7). La figura 15B muestra NGF pantrópico con mutaciones D16A-T81K-H84Q-F86Y-K88R-hNGF (SEQ ID No 8).

La figura 16 muestra la parte madura de variantes preferidas de NGF humano de unión a trkC, mostrándose en negrita mutaciones en relación a NGF de tipo salvaje. La figura 16A muestra NGF130 (parte superior; SEQ ID No 9) y NGF131 (parte inferior; SEQ ID No 10). NGF130 contiene los cuatro cambios: V20L, G23T, H84Q y F86Y. NGF131 contiene los cinco cambios V20L, G23T, T29I, H84Q y F86Y. La figura 16B muestra NGFR2 (parte superior; SEQ ID No. 11) y NGFR3 (parte inferior; SEQ ID No. 12). NGFR2 contiene los cuatro cambios V20L, G23T, T81K y H84Q. NGFR3 contiene los cuatro cambios V18E, G23T, T81K y H84Q.

La figura 17 muestra la parte madura (SEQ ID No. 13) de un NGF maduro humano preferido con capacidad reducida para unirse a p75^{NGFR} NGF. Las mutaciones relativas a NGF de tipo salvaje se muestran en negrita.

La figura 18 muestra un dispositivo de encapsulación montado sobre el cilindro mediante el tubo de carga antes de la carga de células. Las células en suspensión se inyectan desde una jeringuilla a través del tubo de carga mediante la unión del cilindro a la jeringuilla. Tras la carga de células, el tubo de carga se retrae de la cápsula y la abertura resultante se cierra con pegamento.

La figura 19 muestra células ARPE-19 que producen NGF biológicamente activo encapsuladas. La membrana de la cápsula, el armazón de espuma de PVA y las células encapsuladas están marcados en la figura. Tal como se muestra en la figura, el dispositivo de encapsulación ayuda a la viabilidad celular, permitiendo una producción y secreción de NGF sostenidas a partir del dispositivo.

La figura 20 muestra niveles de NGF liberado de cápsulas cargadas con una serie de clones de ARPE-19 que producen NGF. Aunque los niveles de liberación de NGF divergen entre clones y cápsulas debido a variaciones naturales, puede detectarse NGF liberado de todos los clones en todos los momentos.

La figura 21 muestra la liberación de NGF en HE-SFM a partir de cultivos confluentes de doce clones que producen NGF seleccionados transfectados con las construcciones pCIn.hNGF, pCIn.KhNGF y pNS1n.rINSintra-hNGF (véase la figura 8). Se recogieron medios condicionados cada semana para la determinación de la liberación de NGF mediante análisis de ELISA para NGF.

La figura 22 muestra la liberación de NGF para los doce clones 6 semanas tras la siembra en placas en HE-SFM, tal como se determinó mediante ELISA para NGF.

La figura 23 muestra la inmunotransferencia de tipo Western de NGF que muestra la liberación de NGF maduro (13 kDa) en medio condicionado de cuatro clones de ARPE-19 que producen NGF seleccionados. Las muestras de hNGF- β (R&D systems n° 256-GF-100) muestran una banda del mismo peso molecular.

La figura 24 muestra secciones longitudinales de células ARPE-19 encapsuladas que secretan NGF biológicamente activo explantado tras 8 semanas en el cerebro de una rata normal. La membrana de la cápsula (A), el armazón de espuma de PVA (C) y las células encapsuladas (B) están marcados en las figuras. Tal como se muestra en la figura, el dispositivo de encapsulación ayuda a la viabilidad celular, permitiendo una producción y secreción de NGF sostenidas a partir del dispositivo incluso tras 8 semanas *in vivo*. El diámetro interno de los dispositivos es de 700 μ m +/- 50 μ m. Figura 24a: clon n° 33. Figura 24b: clon n° 95.

La figura 25 muestra la secreción de NGF tal como se midió mediante Elisa para NGF a partir de cápsulas antes de (día 7 y 13) y tras 8 semanas *in vivo* en cerebros de rata (explante). Se muestra la secreción de NGF a partir de cápsulas mantenidas simultáneamente *in vitro* (días 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 y 70). Los resultados mostrados son de dos líneas celulares preferidas (n° 33 y n° 95) así como un control no transfectado (células ARPE-19 originales). El eje vertical muestra pg/NGF por cápsula. Tal como se muestra, la secreción de NGF en cápsulas que se han im-

plantado en cerebros de rata es comparable a cápsulas mantenidas *in vitro* y permanece alta tras el periodo de 10 semanas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Intrones” se refiere en este trabajo a las regiones de la secuencia de ADN que se transcriben junto con las secuencias codificantes (exones) pero que se eliminan entonces en la formación del ARNm maduro.

Los intrones pueden producirse en cualquier lugar dentro de una secuencia transcrita, entre las secuencias codificantes de un gen, dentro de la secuencia codificante de un gen y dentro de la región no traducida en 5' (UTR en 5') (incluyendo la región promotora). Los intrones en el transcrito primario se cortan y las secuencias de exón se ligan de manera simultánea y precisa para formar el ARNm maduro. Las uniones de intrones y exones forman los sitios de corte y empalme. La secuencia de bases de un intrón comienza de manera conservativa con GT y termina con AG en muchos eucariotas superiores.

Tal como se usa en el presente documento, “una cápsula biocompatible” significa que la cápsula, tras su implante en un mamífero huésped, no provoca una respuesta perjudicial para el huésped suficiente para que dé como resultado el rechazo de la cápsula o que la hagan inoperable, por ejemplo a través de degradación.

Tal como se usa en el presente documento, “una cápsula inmunoaislante” significa que la cápsula, tras su implante en un huésped mamífero, minimiza los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del huésped sobre las células dentro de su núcleo.

Actividad biológica se refiere a los efectos biológicamente útiles de una molécula sobre una célula específica. Tal como se usa en el presente documento, “un NGF biológicamente activo” es uno que se libera o se secreta a partir de la célula en la que se produce y ejerce su efecto sobre una célula diana separada. La actividad biológica del NGF secretado puede verificarse en el ensayo de PC-12 descrito en los ejemplos.

Por un “promotor de mamífero” quiere decirse un promotor que puede funcionar en una célula de mamífero.

Regulación por disminución de un promotor significa la reducción en la expresión del producto del transgén hasta un nivel, que puede conducir a una carencia de actividad biológica significativa del producto del transgén tras su implante *in vivo*. Tal como se usa en el presente documento, “un promotor no sometido a regulación por disminución” significa un promotor que, tras su implante *in vivo* en un huésped mamífero, dirige o continúa dirigiendo la expresión del transgén a un nivel que es biológicamente activo.

Tal como se usa en el presente documento, “expresión estable, a largo plazo de un NGF biológicamente activo” significa la producción continuada de un NGF biológicamente activo a un nivel suficiente para mantener su actividad biológica útil durante periodos mayores de un mes, preferiblemente mayores de tres meses y lo más preferiblemente mayores de seis meses.

“Identidad de secuencia”:

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTP de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410.

Con el fin de caracterizar la identidad, se alinean secuencias sujeto de modo que se obtiene el mayor orden de homología (apareamiento). Basándose en estos principios generales, puede determinarse el “porcentaje de identidad” de dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLASTP [Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences; FEMS Microbiol. Lett. 1999 174 247-250], que está disponible del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y usando los parámetros por defecto sugeridos en el presente documento (es decir, matriz = Blosum62; apertura de hueco = 11; extensión de hueco = 1; penalizaciones por hueco x_dropoff = 50; esperado = 10; tamaño de palabra = 3; con filtro). El algoritmo BLAST realiza una operación en dos etapas alineando en primer lugar dos secuencias basadas en los parámetros y luego determinando el % de identidad de secuencia en un intervalo de superposición entre dos secuencias alineadas. Además del % de identidad de secuencia, BLASTP también determina el % de similitud de secuencia basándose en los parámetros.

Con el fin de caracterizar la identidad, se alinean secuencias sujeto de modo que se obtiene el mayor orden de homología (apareamiento). Basándose en estos principios generales, puede determinarse el “porcentaje de identidad” de dos secuencias de ácido nucleico usando el algoritmo BLASTP [Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden: Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences; FEMS Microbiol. Lett. 1999 174 247-250], que está disponible del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Centro Nacional

para la Información Biotecnológica) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y usando los parámetros por defecto sugeridos en el presente documento (es decir, recompensa para un apareamiento = 1; penalización para un apareamiento = -2; opción de cadena = ambas cadenas; apertura de hueco = 5; extensión de hueco = 2; penalizaciones por hueco x_dropoff = 50; esperado = 10; tamaño de palabra = 11; con filtro). El algoritmo BLASTN determina el % de identidad de secuencia en un intervalo de superposición entre dos secuencias de nucleótidos alineadas. Para los fines de los intrones de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se calcula preferiblemente en un intervalo de superposición de al menos 10 nucleótidos, determinándose el intervalo mediante BLASTN con parámetros por defecto. Más preferiblemente el intervalo de superposición es al menos de 20 nucleótidos, más preferiblemente al menos de 30, más preferiblemente al menos de 40, más preferiblemente al menos de 50, tal como al menos de 75 nucleótidos, por ejemplo al menos de 100 nucleótidos, tal como al menos de 200 nucleótidos, por ejemplo al menos de 300 nucleótidos, tal como al menos de 400 nucleótidos, por ejemplo al menos de 500 nucleótidos, tal como al menos de 600 nucleótidos, por ejemplo al menos de 750 nucleótidos, tal como al menos de 1000 nucleótidos.

La homología entre dos secuencias de proteína puede determinarse adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG [Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., Journal of Molecular Biology, 1970 48 443-453]. Usar GAP con los siguientes parámetros para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación GAP de 8 y penalización de extensión GAP de 2. Puede determinarse la homología de la secuencia de ADN de longitud completa adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG [Needleman, S.B. y Wunsch C.D., Journal of Molecular Biology 1970 48 443-453]. Usar GAP con los siguientes parámetros para la comparación de secuencias de ADN: penalización de creación GAP de 50 y penalización de extensión GAP de 3.

Un ejemplo preferido, no limitativo, de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Un algoritmo de este tipo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias FASTA (Pearson WR, Methods Mol Biol, 2000, 132:185-219). Align calcula identidades de secuencia basándose en el alineamiento global. Align0 no penaliza los huecos en el extremo de las secuencias. Cuando se usa el programa ALIGN o Align0 para comparar secuencias de aminoácidos, se usa preferiblemente una matriz de sustitución BLOSUM50 con las penalizaciones de apertura/extensión de hueco de -12/-2.

Líneas celulares humanas

La presente invención se refiere en general a líneas celulares humanas genéticamente modificadas para sobreexpresar NGF o una variante biológicamente activa del mismo, en las que está ubicado un intrón en el transcrito que comprende la secuencia codificante de NGF. En el aspecto más amplio, la invención se refiere a cualquier línea celular o cultivo celular humano, ya sea policlonal o monoclonal. Son más preferibles líneas celulares monoclonales, ya que pueden caracterizarse mejor.

La invención se refiere a líneas celulares humanas, que se han immortalizado mediante la inserción de un gen de immortalización heterólogo y a líneas celulares que son inmortales de manera espontánea. En una realización preferida de la invención, la línea celular humana no se ha immortalizado con la inserción de un gen de immortalización heterólogo. Ya que la invención se refiere a células que son particularmente adecuadas para el trasplante de células, ya sean como células desnudas o, preferiblemente, como células encapsuladas, tales líneas celulares immortalizadas se prefieren menos ya que hay un riesgo inherente de que comiencen a proliferar de una manera no controlada dentro del cuerpo humano y formen potencialmente tumores si portan oncogenes conocidos.

Preferiblemente, la línea celular es una línea celular inhibida por contacto. Por una línea celular inhibida por contacto quiere decirse una línea celular que cuando se hace crecer en cultivos de dos dimensiones, crece hasta confluencia y luego deja de dividirse sustancialmente. Esto no excluye la posibilidad de que un número limitado de células escapen de la capa de dos dimensiones. Las células inhibidas por contacto también pueden hacerse crecer en tres dimensiones, por ejemplo dentro de una cápsula. También dentro de las cápsulas, las células crecen hasta confluencia y luego ralentizan significativamente su tasa de proliferación o dejan de dividirse completamente.

Un tipo particularmente preferido de células incluye células epiteliales que por su naturaleza se inhiben por contacto y que forman monocapas estables en cultivo.

Se prefieren incluso más, células epiteliales pigmentarias de la retina (células EPR). La fuente de células EPR es mediante aislamiento de células primarias a partir de la retina de mamíferos.

Los protocolos para recoger células EPR están bien definidos (U y Turner, 1988, Exp. Eye Res. 47:911-917; Lopez *et al.*, 1989, Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 30:586-588) y se consideran una metodología de rutina. En la mayoría de los informes publicados del cotrasplante de células EPR, las células se derivan de rata (Li y Turner, 1988; Lopez *et al.*, 1989). Según la presente invención, las células EPR se derivan de seres humanos. Además de células EPR primarias aisladas, pueden usarse líneas de células EPR humanas cultivadas en la práctica de la invención.

Todas las células de vertebrados diploides normales tienen una capacidad limitada de proliferar, un fenómeno que se ha conocido como la senescencia replicativa o límite de Hayflick. En fibroblastos humanos, este límite se produce

tras 50-80 duplicaciones de la población, tras lo cual las células permanecen en un estado senescente viable pero que no se divide durante muchos meses. Esto contrasta con el comportamiento de la mayoría de las células cancerosas, que han escapado de los controles que limitan su capacidad proliferativa y son inmortales de manera eficaz.

Es preferible que las células puedan experimentar un cierto número de divisiones celulares de modo que puedan expandirse y modificarse genéticamente para producir suficientes células para tratamiento de trasplante o tratamiento con células encapsuladas. Por consiguiente, una línea celular preferida puede experimentar al menos 50 duplicaciones, más preferiblemente al menos 60 duplicaciones, más preferiblemente al menos 70 duplicaciones, más preferiblemente al menos 80 duplicaciones, más preferiblemente al menos 90 duplicaciones, tal como aproximadamente 100 duplicaciones.

Para la encapsulación, se necesita que las células puedan sobrevivir y mantener una secreción de NGF funcional a los bajos niveles de tensión de oxígeno del SNC. Preferiblemente, la línea celular de la invención puede sobrevivir a una tensión de oxígeno inferior al 5%, más preferiblemente inferior al 2%, más preferiblemente inferior al 1%. Una tensión de oxígeno del 1% corresponde al nivel de oxígeno en el cerebro.

Para ser una línea celular plataforma para un sistema de suministro a base de células encapsuladas, la línea celular debe tener tantas de las siguientes características como sea posible: (1) las células deben ser resistentes en condiciones rigurosas (las células encapsuladas deben ser funcionales en las cavidades tisulares vasculares y avasculares tales como en el sistema nervioso central de manera intraparenquimal o dentro de los espacios de líquidos ventriculares o intratecales del ojo, especialmente en el entorno intraocular). (2) Las células deben poderse modificar genéticamente para expresar NGF. (3) Las células deben tener una vida relativamente larga (las células deben producir suficientes progenies para depositarse, caracterizarse, modificarse mediante ingeniería genética, someterse a prueba para determinar su seguridad y fabricar un lote clínico). (4) Las células deben ser de origen humano (lo que aumenta la compatibilidad entre las células encapsuladas y el huésped). (5) Las células deben mostrar más del 80% de viabilidad durante un periodo de más de un mes *in vivo* en el dispositivo (lo que garantiza un suministro a largo plazo). (6) Las células encapsuladas deben suministrar una cantidad eficaz de NGF (lo que garantiza la eficacia del tratamiento). (7) Cuando se encapsulan, las células no deben provocar una reacción inmunitaria significativa en el huésped (lo que garantiza la longevidad del injerto). (8) Las células deben ser no tumorigénicas (para proporcionar seguridad añadida al huésped, en caso de escape del dispositivo).

En una selección y caracterización de varias líneas celulares, se ha encontrado que la línea celular ARPE-19 (Dunn *et al.*, 62 Exp. Eye Res. 155-69 (1996), Dunn *et al.*, 39 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2744-9 (1998), Finnemann *et al.*, 94 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12932-7 (1997), Handa *et al.*, 66 Exp. Eye. 411-9 (1998), Holtkamp *et al.*, 112 Clin. Exp. Immunol. 34-43 (1998), Maidji *et al.*, 70 J. Virol. 8402-10 (1996)) tiene todas las características de una célula plataforma satisfactoria para un sistema de suministro a base de células encapsuladas (documento US 6.361.771, Tao *et al.*). La línea celular ARPE-19 era superior a las otras líneas celulares sometidas a prueba.

La línea celular ARPE-19 está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (número de ATCC CRL-2302). La línea celular ARPE-19 se deriva de cultivos de células epiteliales pigmentadas de la retina (EPR) y expresan los marcadores específicos de células epiteliales pigmentarias de la retina CRALBP y RPE-65. Las células ARPE-19 forman monocapas estables, que muestran polaridad morfológica y funcional.

Las células ARPE-19 pueden cultivarse en medio de crecimiento completo, el medio que contiene suero recomendado por el depositario de las células. El medio de crecimiento completo es o bien una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham con L-glutamina 3 mM, 90%; suero bovino fetal, 10% o una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham con tampón HEPES que contiene un 10% de suero bovino fetal, bicarbonato de sodio a una concentración final de 56 mM y L-glutamina 2 mM. Las células se incuban preferiblemente a 37°C en un 5% de CO₂. Las células se siembran en placas y se hacen crecer normalmente en placas de 6 ó 12 pocillos o en frascos T25 o T75 o tratados para cultivo de tejidos y de tipo Falcon.

Para realizar subcultivos, se elimina el medio y se lavan preferiblemente las células ARPE-19 con tripsina al 0,05%, disolución de EDTA al 0,02% y se elimina la tripsina. Se añaden de uno a dos ml de disolución de tripsina adicional. El cultivo se incuba a temperatura ambiente (o a 37°C) hasta que se desprenden las células ARPE-19. Se recomienda una razón de subcultivo de 1:3 a 1:5.

Puede someterse a prueba la resistencia de las líneas celulares candidatas para el tratamiento con células encapsuladas usando la siguiente investigación en tres etapas. (a) Investigación de la viabilidad celular (las células pueden evaluarse en condiciones extremas usando medio de humor acuoso artificial (aAH) o medio de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF)). (b) Investigación de MEC *in vitro* (las células pueden evaluarse en una investigación de la matriz extracelular (MEC) *in vitro*). (c) Investigación de la viabilidad del dispositivo *in vivo* (las células encapsuladas pueden evaluarse en una investigación de membrana *in vivo*). Se encuentra una descripción detallada de las investigaciones y los resultados con varias líneas celulares humanas y no humanas en el documento US 6.361.771.

En los tres tipos de investigaciones descritos anteriormente, se ha probado que las células ARPE-19 son superiores con respecto a varias otras líneas celulares sometidas a prueba (véase el documento 6.361.771). En particular, debe indicarse que las células BHK que se han usado en el estado de la técnica anterior para secretar NGF no pasaron la investigación de la viabilidad celular.

En otra realización, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en: líneas celulares de fibroblastos inmortalizados humanos, líneas de células madre mesenquimatosas inmortalizadas humanas, líneas celulares de astrocitos inmortalizados humanos, líneas celulares mesencefálicas inmortalizadas humanas y líneas celulares endoteliales inmortalizadas humanas, preferiblemente inmortalizadas con SV40T, vmyc o la subunidad catalítica de la telomerasa (TERT).

Otro tipo de células humanas preferidas según la invención son líneas celulares de astrocitos humanos inmortalizados. Estas líneas celulares también pueden tener las propiedades requeridas para los usos según la presente invención.

El método para generar líneas celulares de astrocitos humanos inmortalizados se ha descrito anteriormente (Price TN, Burke JF, Mayne LV. A novel human astrocyte cell line (A735) with astrocyte-specific neurotransmitter function. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* mayo de 1999; 35(5):279-88.). Este protocolo puede usarse para generar líneas celulares de astrocitos.

Las siguientes tres modificaciones de ese protocolo se realizan preferiblemente para generar líneas celulares de astrocitos humanos adicionales.

Puede usarse tejido cerebral de fetos humanos diseccionados de 5-12 semanas de edad en lugar de tejido de 12-16 semanas de edad.

Puede usarse el gen de immortalización *v-myc* en lugar del antígeno T de SV40.

Puede usarse transferencia génica retroviral en lugar de transfección con plásmidos mediante técnicas de transfección de plásmidos convencionales (incluyendo precipitación con fosfato de calcio).

Estabilidad a largo plazo

Preferiblemente, las líneas celulares de la presente invención pueden sobrevivir durante periodos prolongados (varios meses y hasta un año o más) cuando se trasplantan como células encapsuladas *in vivo*. Las líneas celulares también pueden mantener preferiblemente una secreción de NGF bioactivo a un nivel suficiente para garantizar la eficacia terapéutica durante un periodo mayor de un mes, preferiblemente mayor de tres meses, más preferiblemente mayor de seis meses. También es preferible que las células puedan mantener una secreción relevante de NGF bioactivo tras su encapsulación durante al menos un mes, más preferiblemente al menos tres meses, más preferiblemente al menos seis meses. Tal como se muestra en el ejemplo 14, la viabilidad y secreción de NGF se mantuvieron altas tras un implante de dos meses en el cerebro de ratas normales.

El nivel de secreción es preferiblemente de al menos de 0,5 ng de NGF biológicamente activo por 10^5 células por 24 horas es al menos de 0,5 ng, más preferiblemente al menos de 0,75 ng, más preferiblemente al menos de 1 ng, más preferiblemente al menos de 2 ng, más preferiblemente al menos de 2,5 ng, más preferiblemente al menos de 5 ng, más preferiblemente al menos de 7,5 ng, más preferiblemente al menos de 10 ng, más preferiblemente al menos de 15 ng, más preferiblemente al menos de 20 ng, más preferiblemente al menos de 25 ng, más preferiblemente al menos de 50 ng. Tal como se evidencia mediante los ejemplos adjuntos, se han establecido varios clones humanos inhibidos por contacto que secretan más de 5 e incluso 10 ng/ 10^5 células/24 horas con construcciones de expresión de diferente expresión con diferentes tipos de intrones.

Cuando se mide a nivel de dispositivo, el dispositivo (que comprende células encapsuladas) puede secretar preferiblemente más de 0,1 ng de NGF biológicamente activo por 24 horas. Más preferiblemente, la cantidad de NGF biológicamente activo por 24 horas por dispositivo es al menos de 0,5 ng, más preferiblemente al menos de 0,75 ng, más preferiblemente al menos de 1 ng, más preferiblemente al menos de 2 ng, más preferiblemente al menos de 2,5 ng, más preferiblemente al menos de 5 ng, más preferiblemente al menos de 7,5 ng, más preferiblemente al menos de 10 ng, más preferiblemente al menos de 15 ng, más preferiblemente al menos de 20 ng, más preferiblemente al menos de 25 ng.

Intrones

A partir de un análisis del genoma humano en GenBank, puede derivarse que el intrón más pequeño conocido es de 4 pb y el intrón más largo conocido es de 1.022.077 pb. Basándose en este conocimiento, se contempla que la longitud del intrón usado en el contexto de la presente invención puede variar considerablemente. Excepto el límite superior conocido facilitado por Genbank, es difícil facilitar cualquier límite superior para la longitud de un intrón, que sea funcional en el contexto de la presente invención. El límite superior se determina más mediante el vector usado tal como se conoce bien en la técnica. En el contexto más amplio posible no hay límite superior para la longitud del intrón, siempre que pueda clonarse satisfactoriamente en el vector de expresión. Por razones prácticas, un experto en el estado de la técnica seleccionaría un intrón, que tiene menos de 100.000 pb de longitud, más preferiblemente menos de 10.000 pb de longitud.

ES 2 315 842 T3

Las únicas partes de un intrón que están en realidad sumamente conservadas son las secuencias inmediatamente dentro del intrón. Esto identifica la fórmula de un intrón genérico como:

GT.....AG

Los extremos se denominan avanzando desde la izquierda hasta la derecha a lo largo del intrón, es decir, como los sitios de corte y empalme izquierdo (o 5') y derecho (o 3'). Algunas veces se denominan los sitios donador y aceptor. Las bases inmediatamente adyacentes a los sitios donador y aceptor están menos conservadas. La frecuencia de diferentes bases en posiciones específicas en relación con los sitios de corte y empalme siguen los siguientes porcentajes (Lewin B, Genes V, Oxford University Press, Oxford, 1994, página 914):

Exón	Intrón								Exón	
A	G	G	T	A	A	G	T---C	A	G	N
64%	73%	100%	100%	62%	68%	84%	63%	65%	100%	100%

La secuencia dentro de estos sitios de corte y empalme para cada intrón individual puede variarse considerablemente mediante adición, delección o sustitución de bases. En una realización preferida de la invención, el intrón comprende una secuencia de nucleótidos que se deriva de un intrón que se produce de manera natural, y que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con respecto a dicho intrón que se produce de manera natural. Más preferiblemente, el intrón tiene al menos un 60% de identidad de secuencia con respecto a dicho intrón que se produce de manera natural, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98%. Se prefieren las identidades de secuencia en % superiores ya que se requiere menos trabajo para ensamblar el construcción de expresión, y ya que la posibilidad de cambiar la función del intrón aumenta con el número de diferencias entre un intrón que se produce de manera natural y una variante del mismo.

En una realización preferida, el intrón es más corto tal como inferior a 10.000 pb, lo que facilitará considerablemente la clonación. Por consiguiente, el intrón puede tener menos de 9.000 pb de longitud, preferiblemente menos de 8.000, más preferiblemente menos de 7.000, más preferiblemente menos de 6.000, más preferiblemente menos de 5.000, más preferiblemente menos de 4.500, más preferiblemente menos de 4.000, más preferiblemente menos de 3.500, más preferiblemente menos de 3.000, más preferiblemente menos de 2.500, más preferiblemente menos de 2.000, más preferiblemente menos de 1.500, más preferiblemente menos de 1.000, tal como menos de 750, por ejemplo menos de 500, tal como menos de 250, por ejemplo menos de 200.

De manera similar, se espera que el intrón deba tener una cierta longitud para cortarse y empalmarse apropiadamente a partir del transcrito antes de la traducción. Por tanto, el intrón tiene preferiblemente más de 4 pb de longitud, tal como más de 10 pb de longitud, por ejemplo más de 20 pb de longitud, preferiblemente más de 50 pb de longitud, más preferiblemente más de 75 pb de longitud.

Un intrón puede tener desde 4 pb hasta 1 millón de pb de longitud, más preferiblemente desde 10-10.000 pb, más preferiblemente desde 20-2000 pb, por ejemplo desde 50-1500 pb, tal como preferiblemente desde 75-200 pb, por ejemplo preferiblemente desde 500-1500 pb. Los intrones mostrados como ejemplo en los ejemplos se encuentran en el intervalo de desde 100 hasta 1000 pb.

El origen del intrón puede ser cualquiera. Puede ser incluso un intrón sintético siempre que funcione como un intrón. Ya que la presente invención se refiere a líneas celulares humanas, es preferible usar un intrón de una especie que esté tan estrechamente relacionada con los seres humanos como sea posible. Por tanto, el intrón es preferiblemente de origen eucariota. Más preferiblemente, el intrón es de origen de mamífero. Por ejemplo, el intrón puede ser de origen de roedor o de origen de primate. Todavía más preferiblemente, el intrón es de origen humano.

Se prefiere tener al intrón ubicado en la UTR en 5' o en la parte de la secuencia codificante más cercana al codón de iniciación, es decir, la primera parte de la secuencia codificante. La clonación es más fácil cuando el intrón se coloca en la UTR en 5' del transcrito. Se contempla por los presentes inventores que puede obtenerse un efecto de potenciación de la secreción similar clonando un intrón en la secuencia que codifica para NGF. En el caso de clonar dentro de la secuencia codificante, el intrón se coloca preferiblemente en la parte de la secuencia codificante más cercana al codón de iniciación, es decir, la primera parte de la secuencia codificante.

En una realización preferida, el intrón se deriva de un primer intrón. Un primer intrón es el intrón ubicado más cercano al sitio de iniciación de la transcripción en el gen del que se deriva. Aunque se prefieren los primeros intrones, debe entenderse que también puede usarse cualquier intrón tal como un segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto intrón. Un primer intrón de un gen particular se denomina a veces intrón A.

Se espera que sea suficiente incluir un intrón en las construcciones de expresión en las líneas celulares humanas de la presente invención. Por supuesto, es posible incluir intrones adicionales, y también se contempla por los presentes

inventores. En principio, no hay límite superior para el número de intrones insertados en el transcrito, pero por razones prácticas, el experto elegiría mantener el número tan bajo como sea posible para mantener la longitud de la construcción de expresión dentro de límites prácticos. El número de intrones puede ser dos, tres, cuatro, cinco o incluso superior.

Un intrón particularmente preferido se deriva de la insulina. Preferiblemente, insulina II de roedor, más preferiblemente intrón A de preproinsulina II de rata (nº de registro de GenBank J00748). La secuencia de nucleótidos de este intrón se expone en SEQ ID No 22 (bases nº 747 a 865, mostradas en minúsculas en la figura 14). El intrón A de insulina II de rata tiene 119 pb. La clonación de este intrón se describe en los ejemplos.

La secuencia que se encuentra entre los sitios de corte y empalme del intrón A de insulina II de rata puede variarse. Preferiblemente, el intrón comprende una secuencia, que se deriva del intrón A de insulina II de rata y por tanto tiene al menos un 50% de identidad de secuencia respecto a la secuencia expuesta anteriormente. Más preferiblemente, el intrón comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia respecto a dicha secuencia, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98%.

Otro intrón preferido es el intrón quimérico incluido en el vector de expresión pCI disponible de Promega Corp, Madison Wisconsin, EE.UU. (nº de catálogo: E1731). Este intrón está compuesto por el sitio donador en 5' del primer intrón del gen de b-globina humana y la ramificación y el sitio aceptor en 3' del intrón que está entre el líder y el cuerpo de una región variable de cadena pesada de un gen de inmunoglobulina (Bothwell *et al*, 1981, Cell 24:625). Las secuencias de los sitios donador y aceptor junto con el sitio de punto de ramificación se han cambiado para que se apareen con las secuencias consenso para el corte y empalme (Senapathy *et al*, 1990, Meth. Enzymol. 183:252). El vector de expresión pCI está disponible de Promega Corp. La longitud del intrón es de 113 pb y la secuencia del intrón se expone en SEQ ID No 14 (bases nº 890-1022, mostradas en minúsculas en la figura 10) y en SEQ ID No 16 (bases nº 890-1022, mostradas en minúsculas en la figura 11).

La secuencia que se encuentra entre los sitios de corte y empalme del "intrón pCI" pueden variarse. Preferiblemente, el intrón comprende una secuencia, que se deriva del "intrón pCI", secuencia derivada que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia respecto a la secuencia expuesta anteriormente. Más preferiblemente, el intrón comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia respecto a dicho "intrón pCI", más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98%.

Un intrón preferido adicional es el intrón del promotor de ubiquitina, preferiblemente el intrón del promotor C de ubiquitina humana (Johansen *et al*. 1990, FEBS Lett. 267, 289-294). El intrón UbiC tiene 811 pb de longitud (nº de registro de GenBank D63791). La secuencia de nucleótidos del intrón se expone en SEQ ID No 20 (bases nº 736 a 1547, mostradas en minúsculas en la figura 13). El intrón del promotor C de ubiquitina está disponible a partir del vector de expresión pUbi1z descrito en Johansen *et al* 2003, J Gene Medicine, 5:1080-1089.

La secuencia que se encuentra entre los sitios de corte y empalme de dicho intrón de ubiquitina puede variarse. Preferiblemente, el intrón comprende una secuencia, que se deriva del intrón de ubiquitina de rata, y que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia respecto a la secuencia expuesta anteriormente. Más preferiblemente, el intrón comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de dicho intrón de ubiquitina, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98%.

Otro intrón preferido es el intrón A de EF-1alfa (bases nº 609..1551 de número de registro de Genbank: J04617 J04616 gen del factor de elongación humano EF-1alfa, cds completa). Este intrón es parte de la secuencia promotora y tiene 943 pb de longitud. Una secuencia de nucleótidos del promotor de EF-1alfa que incluye el intrón se expone en SEQ ID No 18 (figura 12). El intrón se muestra en minúsculas (bases nº 232-1171).

La secuencia que se encuentra entre los sitios de corte y empalme de dicho intrón A de EF-1alfa puede variarse. Preferiblemente, el intrón comprende una secuencia que se deriva del intrón A de EF-1alfa, y que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia respecto a la secuencia expuesta anteriormente. Más preferiblemente, el intrón comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia respecto a dicho intrón A de EF-1alfa, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98%.

Preferiblemente, el intrón se selecciona del grupo que consiste en el intrón pCI, el ratINS-intrA y el intrón de ubiquitina; y una variante de secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de cualquiera de dichos intrones.

Más preferiblemente, el intrón se selecciona del grupo que consiste en el intrón pCI y el ratINS-intrA; y una variante de secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia respecto a la secuencia de cualquiera de dichos intrones.

5 Depósito

Se han depositado dos líneas celulares de *Homo sapiens* preferidas por NsGene A/S, Baltorpvej 154, DK-2750 Ballerup, Dinamarca, según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania el 15 de diciembre de 2004 con el número de registro: DSM ACC2706 y DSM ACC2707. Ambas líneas
10 celulares depositadas son clones de ARPE-19 transfectados con pCln.hNGF tal como se define en el presente documento. Las líneas celulares depositadas se identifican en los ejemplos como n° 33 (NGC-0233) y n° 95 (NGC-0295), respectivamente.

Vectores de expresión

15 Puede lograrse la construcción de vectores para la expresión recombinante de NGF para su uso en la invención usando técnicas convencionales que no requieren una explicación detallada para un experto habitual en la técnica. Sin embargo, para una revisión, los expertos habituales pueden desear consultar Maniatis *et al.*, in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982).

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores pueden
25 replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento
30 “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, virus adenoasociados, adenovirus y retrovirus con replicación defectuosa), que sirven para funciones equivalentes.

35 Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que van a usarse para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Dentro
40 de un vector de expresión recombinante, “operativamente unido” pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

45 La expresión “secuencia reguladora” pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquéllas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquéllas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos
50 sólo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de ese modo NGF y variantes y mutantes de NGF codificados por ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento.

55 En una realización preferida, el vector de expresión es un vector de expresión de plásmido de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de plásmido de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840), pCI (Promega Inc), pSI (Promega), pNS (figura 4), pUbi1z (figura 5) y pMT2PC (Kaufman, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usaron en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión se proporcionan a
60 menudo mediante elementos reguladores virales. Para otros sistemas de expresión adecuados para células eucariotas véanse, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

65 En resumen, la construcción de vectores de expresión recombinantes emplea técnicas de ligación convencionales. Para un análisis para confirmar las secuencias correctas en vectores contruidos, se secuencian los genes usando, por ejemplo, el método de Messing, *et al.*, (Nucleic Acids Res., 9: 309-, 1981), el método de Maxam, *et al.*, (Methods in Enzymology, 65: 499, 1980) u otros métodos adecuados que conocerán los expertos en la técnica.

La separación por tamaño de fragmentos escindidos se realiza usando electroforesis en gel convencional tal como se describe, por ejemplo, por Maniatis, *et al.*, (Molecular Cloning, págs. 133-134, 1982).

La expresión de un gen se controla a los niveles de transcripción, traducción o postraducción. La iniciación de la transcripción es un acontecimiento temprano y crítico en la expresión génica. Esto depende de las secuencias promotoras y potenciadoras y está influida por factores celulares específicos que interaccionan con estas secuencias. La unidad transcripcional de muchos genes consiste en el promotor y en algunos casos de elementos potenciadores o reguladores (Banerji *et al.*, Cell 27: 299 (1981); Corden *et al.*, Science 209: 1406 (1980); y Breathnach y Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50: 349 (1981)). Para retrovirus, los elementos de control implicados en la replicación del genoma retroviral residen en la repetición terminal larga (LTR) (Weiss *et al.*, eds., The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)). Las LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (VLM) y del virus del sarcoma de Rous (VSR) contienen secuencias promotoras y potenciadoras (Jolly *et al.*, Nucleic Acids Res. 11: 1855 (1983); Capecchi *et al.*, en: Enhancer and eukaryotic gene expression, Gulzman y Shenk, eds., págs. 101-102, Cold Spring Harbor Laboratories (NY 1991). Otros promotores potentes incluyen los derivados de citomegalovirus (CMV) y otros promotores virales de tipo salvaje y el promotor de UbiC derivado de la ubiquitina C humana (documento WO 98/32869).

También se han descrito regiones promotoras y potenciadoras de varios promotores no virales (Schmidt *et al.*, Nature 314: 285 (1985); Rossi y deCrombrughe, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5590-5594 (1987)). Los métodos para mantener y aumentar la expresión de transgenes en células quiescentes incluyen el uso de promotores incluyendo promotores de colágeno tipo I (1 y 2) (Prockop y Kivirikko, N. Eng. J. Med. 311: 376 (1984); Smith y Niles, Biochem. 19: 1820 (1980); de Wet *et al.*, J. Biol. Chem., 258: 14385 (1983)), SV40 y LTR.

Según una realización de la invención, el promotor es un promotor constitutivo seleccionado del grupo que consiste en: promotor de ubiquitina, promotor de CMV, promotor de JeT (documento US 6.555.674), promotor de SV40, promotor de Mt1 y promotor del factor de elongación 1 alfa (EF-1 alfa). Un promotor particularmente preferido es uno que no está sometido a regulación por disminución *in vivo*.

Los ejemplos de promotores inducibles/represibles incluyen: Tet-On, Tet-Off, promotor inducible por rapamicina, Mx1.

Además de usar promotores virales y no virales para dirigir la expresión transgénica, puede usarse una secuencia potenciadora para aumentar el nivel de expresión transgénica. Los potenciadores pueden aumentar la actividad transcripcional no sólo de su gen nativo sino también de algunos genes foráneos (Armstrong, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2702 (1973)). Por ejemplo, en la presente invención pueden usarse secuencias potenciadoras de colágeno con el promotor 2 de colágeno (I) para aumentar la expresión transgénica. Además, puede usarse el elemento potenciador encontrado en virus SV40 para aumentar la expresión transgénica. Esta secuencia potenciadora consiste en una repetición de 72 pares de bases tal como se describe por Gruss *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 943 (1981); Benoist y Chambon, Nature 290: 304 (1981), y Fromm y Berg, J. Mol. Appl. Genetics, 1: 457 (1982). Esta secuencia de repetición puede aumentar la transcripción de muchos genes virales y celulares diferentes cuando está presente en serie con diversos promotores (Moreau *et al.*, Nucleic Acids Res. 9: 6047 (1981)).

Otras secuencias que potencian la expresión incluyen pero no se limitan a la secuencia consenso de Kozak, el elemento de regulación postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck, WPRE, potenciador SP163, potenciador de CMV, regiones 5' o 3' no traducidas de los genes tau, TH o APP, y aislador de [beta]-globina de pollo u otros aisladores. Los elementos potenciadores preferibles incluyen la secuencia consenso de Kozak, WPRE y aislador de beta-globina.

Los virus útiles como vectores de transferencia génica incluyen papovavirus, adenovirus, virus vaccinia, virus adenoasociado, herpesvirus y retrovirus. Los retrovirus adecuados incluyen el grupo que consiste en VIH, VIS, VIF, EIAV, MoVLM.

Un tipo especial y preferido de retrovirus incluye los lentivirus que pueden transducir una célula e integrarse en su genoma sin división celular. Puede producirse una partícula de lentivirus a partir de un vector lentiviral que comprende una LTR lentiviral en 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un promotor operativamente unido a una señal polinucleotídica que codifica para NGF, un origen de síntesis de ADN de la segunda hebra y una LTR lentiviral en 3'.

Los vectores retrovirales son los vectores más comúnmente usados en ensayos clínicos con seres humanos, dado que portan 7-8 kb y dado que tienen la capacidad de infectar células y tienen su material genético integrado de manera estable en la célula huésped con alta eficacia. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/30761; WO 95/24929. Los Oncovirinae requieren al menos una ronda de proliferación de células diana para la transferencia e integración de secuencias de ácido nucleico exógeno en el paciente. Los vectores retrovirales se integran aleatoriamente en el genoma de la célula.

Se han descrito tres clases de partículas retrovirales; ecotrópicas, que pueden infectar células murinas eficazmente, y anfotrópicas, que pueden infectar células de muchas especies. La tercera clase incluye retrovirus xenotrópicos, que pueden infectar células de otras especies diferentes de las especies que produjeron el virus. Su capacidad para

integrarse sólo en el genoma de células en división ha hecho a los retrovirus atractivos para marcar linajes celulares en estudios de desarrollo y para suministrar genes terapéuticos o suicidas a cánceres o tumores.

Para su uso en células en pacientes humanos, los vectores retrovirales deben ser de replicación defectuosa. Esto evita la generación adicional de partículas retrovirales infecciosas en el tejido diana (en su lugar, el vector con replicación defectuosa se convierte en un transgén "cautivo" incorporado de manera estable en el genoma de la célula diana). Normalmente, en vectores con replicación defectuosa, se han delecionado los genes gag, env y pol (junto con la mayoría del resto del genoma viral). Se inserta ADN heterólogo en lugar de los genes virales delecionados. Los genes heterólogos pueden estar bajo el control del promotor heterólogo endógeno, otro promotor heterólogo activo en la célula diana o la LTR en 5' retroviral (la LTR viral es activa en diversos tejidos). Normalmente, los vectores retrovirales tienen una capacidad transgénica de aproximadamente 7-8 kb.

Los vectores retrovirales con replicación defectuosa requieren la provisión de las proteínas virales necesarias para la replicación y el ensamblaje en trans de, por ejemplo, líneas celulares de empaquetamiento modificadas mediante ingeniería genética. Es importante que las células de empaquetamiento no liberen virus con replicación competente y/o virus auxiliares. Esto se ha logrado expresando proteínas virales a partir de ARN que carecen de la señal ψ , y que expresan los genes gag/pol y el gen env a partir de unidades transcripcionales separadas. Además, en algunos retrovirus de la 2 y 3 generación, se han sustituido las LTR en 5' por promotores no virales que controlan la expresión de estos genes, y se ha minimizado el promotor en 3' para que contenga sólo el promotor proximal. Estos diseños minimizan la posibilidad de recombinación que conduce a la producción de vectores con replicación competente, o virus auxiliares. Véase, por ejemplo, la patente US 4.861.719.

Activación génica

Puede usarse activación génica o reconocimiento génico para sustituir la región reguladora existente del gen de NGF de las células por una secuencia reguladora que comprende un promotor y un intrón ubicados en la región en 3' con respecto al promotor tal como se define en el presente documento. Tales secuencias reguladoras pueden estar compuestas por promotores, potenciadores, regiones de unión al armazón, elementos reguladores negativos, sitios de iniciación de la transcripción y sitios de unión a proteínas reguladoras o combinaciones de dichas secuencias.

El acontecimiento de reconocimiento génico puede ser una simple inserción de la secuencia reguladora, colocando el gen de NGF bajo el control de la nueva secuencia reguladora, por ejemplo, insertando un nuevo promotor e intrón ambos en sentido 5' del gen de NGF de la célula. Alternativamente, el acontecimiento de reconocimiento génico puede sustituir un elemento existente, por ejemplo, el promotor de NGF nativo de la célula puede sustituirse por un promotor constitutivo fuerte y un intrón en sentido 5' del gen de NGF. En este caso, se delecionan las secuencias que se producen de manera natural y se añaden nuevas secuencias. En todos los casos, la identificación del acontecimiento de reconocimiento génico puede facilitarse mediante el uso de uno o más genes marcadores seleccionables que son contiguos con el ADN de reconocimiento génico, permitiendo la selección de células en las que se ha integrado el ADN exógeno en el genoma de la célula huésped. La identificación del acontecimiento de reconocimiento génico también puede facilitarse mediante el uso de uno o más genes marcadores que presentan la propiedad de selección negativa, de manera que el marcador seleccionable de manera negativa está unido al ADN exógeno, pero configurado de manera que el marcador seleccionable de manera negativa flanquea la secuencia de reconocimiento génico, y de manera que un acontecimiento de recombinación homóloga correcto con secuencia en el genoma de la célula huésped no da como resultado la integración estable del marcador seleccionable de manera negativa. Los marcadores útiles para este fin incluyen el gen de la timidina quinasa (TK) del virus herpes simple o el gen de la xantina-guanina fosforribosil-transferasa (gpt) bacteriana.

Las técnicas de activación génica o reconocimiento génico que pueden usarse según este aspecto de la invención se describen más particularmente en la patente US 5.272.071 concedida a Chappel; la patente US 5.578.461 concedida a Sherwin *et al.*; el documento WO 93/09222 por Selden *et al.*; y el documento WO 91/06667 por Skoultchi *et al.*

Factores de crecimiento nervioso

TABLA 1

5 Alineación de secuencias múltiples de Clustal W (1,82) de preproNGF de ser humano (SEQ ID No 2), chimpancé (SwissProt Q9N2F1; SEQ ID No 5), cerdo (secuencia incompleta, SwissProt Q29074; SEQ ID No 6), ratón (SEQ ID No 3) y rata (SEQ ID No 4). La parte madura, bioactiva se muestra en **negrita** y puede ser de 120 ó 118 aminoácidos de longitud. Los dos aminoácidos del extremo C-terminal pueden eliminarse sin afectar a la actividad biológica

10	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	----- ----- ----- MLCLKPVKLGSLVVGHGQHGGLACGRAVOGAGWRIAGPKLTSVSGPNKGFAKDAAFYTGR -----
15	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	-----MSMLFYTLITAFLLIGIQAEPHSESNPAGHTIPQVHWTKLQHSIDTALRRARSA -----MSMLFYTLITAFLLIGIQAEPHSESNPAGHTIPQVHWTKLQHSIDTALRRARSA -----LIGIQAEPHSESNPAGHAIPOVHWTKLQHSIDTALRRARSA 20 SEVHSVMMSMLFYTLITAFLLIGVQAEPTDSNVPEGDSVPEAHWTKLQHSIDTALRRARSA -----MSMLFYTLITAFLLIGVQAEPTDSNVPEGDSVPEAHWTKLQHSIDTALRRARSA *** **:::*** *::::*****:***
25	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	PAAIAARVAGQTRNITVDPRLLFKRRLRSFVLFSTQPPREAADTQDLDFVGGAAFPN PAAIAARVAGQTRNITVDPRLLFKRRLRSFVLFSTQPPPEAADTQDLDFVGGAAFPN PAGANSARVAGQTRNITVDPRLLFKRRLRSFVLFSTQPPVAAADTQDPLEASGAASFN PTAPIAARVAGQTRNITVDPRLLFKRRLRSFVLFSTQPPPTSSDTLDLDFOAGTIFIN PAEPIAARVAGQTRNITVDPRLLFKRRLRSFVLFSTQPPPTSSDTLDLDFOAGTISFN * . :***;*****;*****;***** :;*** * * . * . :**
30	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	RTHRSKRSSSEPIFERGETSVCDSSVWVGOKTATDIDGKEVAVLGEVNIHSVFEQIT RTHRSKRSSSEPIFERGETSVCDSSVWVGOKTATDIDGKEVAVLGEVNIHSVFEQIT RTHRSKRSSSEPIFERGETSVCDSSVWVGOKTATDIDGKEVAVLGEVNIHSVFEQIT RTHRSKRSSSEPIFERGETSVCDSSVWVGOKTATDIDGKEVAVLGEVNIHSVFEQIT RTHRSKRSSSEPIFERGETSVCDSSVWVGOKTATDIDGKEVAVLGEVNIHSVFEQIT *****:***:*** *****:***:***
35	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	FETKCRPNFVDSGCRGIDSKHNSCTTTFVIALTDGKQAAARFIRIDTACVCVLS FETKCRPNFVDSGCRGIDSKHNSCTTTFVIALTDGKQAAARFIRIDTACVCVLS FETKCRPNFVDSGCRGIDSKHNSCTTTFVIALTDGKQAAARFIRIDTACVCVLS FETKCRPNFVDSGCRGIDSKHNSCTTTFVIALTDGKQAAARFIRIDTACVCVLS FETKCRPNFVDSGCRGIDSKHNSCTTTFVIALTDGKQAAARFIRIDTACVCVLS 40 ***** :***;*****:***** * *****
45	Ser humano Chimpancé Cerdo Ratón Rata	IKAVRA IKAVRA IKAGRA IKATRG IKAARG *** **.

50 “NGF” se refiere al factor de crecimiento nervioso de cualquier especie, incluyendo murina, bovina, ovina, porcina, equina, aviar y humana, en la secuencia nativa o en forma variante, y de cualquier fuente. Se conoce una secuencia de NGF de ratón, que tiene un extremo N-terminal que corresponde al extremo N-terminal de los otros NGF mostrados en la alineación. Este NGF de ratón tiene el número de registro P01139 en SwissProt.

55 Las secuencias preferidas para su uso comprenden una secuencia que da como resultado la secreción a partir de una célula de un NGF maduro, de secuencia nativa humana, más preferiblemente una forma de secuencia de 120 aminoácidos, e incluso más preferiblemente una forma de secuencia de 118 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos preferidas para pre-pro-NGF humano y NGF humano maduro se proporcionan por la patente US 5.288.622. La secuencia de ADN que codifica para pre-pro-NGF humano se expone en la SEQ ID No 1 (figura 9) junto con la secuencia de aminoácidos del péptido traducido (SEQ ID No 2, figura 9).

60 El NGF se sintetiza en células eucariotas como un pre-pro-péptido, que se procesa y se secreta. En células eucariotas, el NGF se secreta por medio del retículo endoplasmático, al que se dirige mediante el péptido señal (también denominado el pre-péptido). El NGF se pliega y se generan tres puentes de cisteína intramoleculares (Cys 58-108, Cys 68-110 y Cys 15-80) (McDonald *et al* 1991, Nature 354: 411-747). El NGF plegado y dimerizado puede secretarse o bien como NGF maduro (120 ó 118 aminoácidos) o con el prodominio todavía unido a la proteína bioactiva madura. El prodominio puede escindirse posteriormente.

En la bibliografía existen informes de que la pro-secuencia de NGF facilita la expresión y el posterior plegamiento de NGF (Rattenholl *et al* 2001, Eur J Biochem 268:3296-3303). También existen informes de que la ausencia del pro-péptido da como resultado una expresión reducida o ausente de NGF (Suter *et al*, 1991, The EMBO Journal, 10:2395-2400). En el pro-dominio, Asn-53 y Asn-8 están glicosiladas. Se ha mostrado que la mutación de éstas para dar Gln da como resultado una expresión reducida (Heymach *et al* 1996, J Biol Chem, 271:25430-25437). También se ha mostrado que la mutación del sitio de escisión de furina adyacente al péptido maduro (-1 a -4 en la SEQ ID No. 2) da como resultado la secreción en células de mamífero de pro-NGF (Heymach, citado anteriormente).

En la presente invención, se prefiere el uso de una secuencia que codifica para NGF que codifica para un pro-dominio funcional de NGF unido a NGF maduro para garantizar una biosíntesis eficaz y un plegamiento correcto del NGF maduro secretado. Un pro-dominio funcional significa un prodominio, con Asn en posiciones -8 y -53 en el pro-péptido, y con un sitio de furina funcional ubicado inmediatamente en sentido de 5' del NGF maduro. Preferiblemente, el propéptido funcional tiene al menos el 60% de identidad de secuencia con respecto al prodominio de la SEQ ID No 2 (AA₁₀₂-AA₁), más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%. En una realización preferida de la invención, el prodominio funcional comprende residuos marcados en la alineación de Clustal de la tabla 1 como completamente conservado (*), más preferiblemente el prodominio funcional comprende residuos marcados en la tabla 1 como conservados (*) y semiconservados (:), más preferiblemente el prodominio funcional comprende residuos marcados en la tabla 1 como conservados (*), semiconservados (:), y como menos conservados (.). Incluso más preferiblemente el prodominio es idéntico al prodominio de NGF humano.

La forma madura de 120 aminoácidos es una forma preferida en la forma de homodímero (es decir, 120/120), que se formará espontáneamente cuando se secreta la proteína madura a partir de una célula humana según la invención. Incluso se prefiere más la forma de 118 madura, que se formará también espontáneamente como un homodímero (es decir, 118/118). No existe ninguna diferencia en la bioactividad entre NGF de 118 y 120.

La estructura primaria de un NGF de mamífero (NGF de ratón) se dilucidó por primera vez por Angeletti y Bradshaw, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:2417 (1971). La estructura primaria de su precursor, pre-pro-NGF, se ha deducido a partir de la secuencia de nucleótidos del ADNc de NGF de ratón (Scott *et al.* Nature 302:538 (1983); Ullrich *et al.* Nature 303:821 (1983)). El gen de NGF humano (hNGF) homólogo también se ha identificado (Ullrich, Symp. on Quan. Biol., Cold Spring Harbor 48:435 (1983); patente US 5.288.622, presentada el 22 de febrero de 1994). Su homología con respecto al NGF de ratón es aproximadamente del 90% y del 87%, en los niveles de secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, respectivamente.

Preferiblemente la secuencia que codifica para NGF comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

secuencia (SEQ ID No 1) que codifica para NGF beta humano (preproNGF);

secuencia que codifica para NGF beta (preproNGF) de rata, ratón o cerdo;

secuencia que codifica para NGF beta (preproNGF) de chimpancé;

una secuencia que comprende una secuencia que codifica para NGF maduro de origen humano (SEQ ID No 2), de rata (SEQ ID No 4), de ratón (SEQ ID No 3), de cerdo (SEQ ID No 6) o chimpancé (SEQ ID No 5); y una secuencia que codifica para la variante de NGF bioactivo que comprende una secuencia madura que tiene al menos el 50% de identidad de secuencia con respecto a la parte madura de la SEQ ID No 2.

Por un NGF bioactivo se pretende decir una variante de NGF que es bioactiva en el ensayo de PC12 descrito en los ejemplos. Por sustancialmente la misma respuesta en el ensayo de PC12 se pretende decir que el número de células que portan neuritas es al menos el 50% del número obtenido con NGF de tipo salvaje, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%. El ensayo de PC12 puede devolver también la mejora del porcentaje en supervivencia a través de un tratamiento control. Sustancialmente la misma respuesta en este contexto significa una actividad que da como resultado al menos el 50% de la mejora de NGF de tipo salvaje, más preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%. La actividad biológica de un NGF variante puede, por supuesto, ser mayor que la del NGF de tipo salvaje.

Más preferiblemente, dicha variante de NGF bioactivo tiene al menos el 60% de identidad de secuencia con respecto a la parte madura de la SEQ ID No 2, más preferiblemente al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%.

En una realización particularmente preferida, la secuencia codificante de NGF comprende la secuencia que codifica para la secuencia que codifica para el NGF beta humano maduro.

En otra realización preferida, la secuencia codificante de NGF comprende una secuencia que codifica para NGF humano maduro (parte madura de la SEQ ID No 2).

Pueden realizarse otras modificaciones en la secuencia codificante sin apartarse del concepto inventivo de la presente invención. Por tanto, se contempla que el péptido señal puede sustituirse por otro péptido señal, preferiblemente de mamífero, más preferiblemente humano, para potenciar adicionalmente la secreción.

De manera similar, se contempla que el propéptido puede sustituirse por otro propéptido funcional, preferiblemente un propéptido de mamífero, más preferiblemente un propéptido humano.

En otras realizaciones, las líneas celulares de la presente invención expresan neurotrofinas pantrópicas y quiméricas de NGF, tales como las notificadas en la US 5.488.099, presentada el 30 de enero de 1996, en Urfer *et al.*, EMBO J. 13 (24):5896-909 (1994), y en el documento WO 95/33829, publicado el 14 de diciembre de 1995 en los que el NGF se ha modificado para unirse a más de un receptor o contiene una actividad de unión a receptor normalmente no presente en un grado significativo en el NGF nativo. De particular interés son quimeras que tienen una estructura principal de aminoácidos de NGF pero modificada para unirse a receptores distintos de trkA, tales como trkB o trkC. Estas formas de NGF tienen una secuencia de aminoácidos homóloga (habitualmente mayor del 80% de identidad de secuencia, preferiblemente mayor del 90%, y más preferiblemente mayor del 95%, y lo más preferiblemente mayor del 97%) con respecto a la secuencia de aminoácidos del NGF, con sustituciones que confieren otras especificidades de neurotrofina. En la realización preferida, los dominios se sustituyen por residuos de NGF; es decir, cierto número de aminoácidos se delecionan de la secuencia de NGF y se sustituye por un número idéntico o similar de aminoácidos, confiriendo una especificidad adicional. Por ejemplo, se prepara un NGF pantrópico con una sustitución D16A, que confiere una especificidad de BDNF (actividad de unión a trkB), mientras que se conserva la actividad de unión a trkA. Se prefieren aquéllos en los que las sustituciones de aminoácidos se han realizado en NGF por un aminoácido a partir de una posición correspondiente en NT-3 que es responsable de la unión al receptor trkC para NT-3. Tales mutantes de NGF tienen actividad de unión al receptor trkC similar a NT-3 mientras que conservan la conformación, la farmacocinética y el comportamiento de purificación de NGF (Urfer, *et al.*, Biochemistry 36(16):4775-4781 (1997)). Por ejemplo, se incluyen sustituciones en la región 1 pre-variable (V18E+V20L+G23T) y en la región 4 variable (Y79Q+T81K+H84Q+F86Y+K88R) que permiten la actividad de unión a trkC. La numeración de los aminoácidos comienza con el aminoácido número 1 del NGF maduro según la numeración en la lista de secuencias. Las sustituciones en la región 1 pre-variable pueden realizarse solamente con sustituciones de aminoácidos individuales en la región 4 variable; por ejemplo, pueden realizarse V18E+V20L+G23T y una o más de Y79Q, T81K, H84Q, F86Y, o K88R. Estos mutantes de NGF también pueden modificarse mediante ingeniería genética para carecer de actividad de unión a trkA, por ejemplo, eliminando o modificando los aminoácidos 1 a 9 N-terminales del NGF. La especie de 109 aminoácidos (10-118)hNGF, que resultan de la pérdida de los primeros 9 residuos del extremo N-terminal y los últimos dos residuos del extremo C-terminal del NGF humano recombinante purificado, es 300 veces menos eficaz para desplazar ¹²⁵I-NGF de ratón del receptor trkA humano en comparación con (1-118)hNGF (Shih *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (44):27679-86 (1994)).

En una realización preferida, un NGF pantrópico es una neurotrofina pantrópica, que tiene una secuencia de aminoácidos homóloga a la secuencia de aminoácidos de NGF, con dominios que confieren otras especificidades de neurotrofina. En una realización preferida, los dominios se sustituyen por residuos de NGF; es decir, cierto número de aminoácidos se delecionan de la secuencia de NGF, y se sustituye por un número idéntico o similar de aminoácidos, confiriendo una especificidad adicional. Por ejemplo, se prepara un NGF pantrópico con una sustitución D16A, que confiere especificidad de BDNF, más sustituciones en la región 1 pre-variable (V18+V20L+G23T) y en la región 4 variable (Y79Q+T81K+H84Q+F86Y+K88R). De manera alternativa, las sustituciones en la región 1 pre-variable pueden realizarse solamente con sustituciones de aminoácidos individuales en la región 4 variable; por ejemplo, pueden realizarse V18E+V20L+G23T y una de Y79Q, T81 K, H84Q, F86Y o K88R. El documento US 6.503.728 da a conocer cómo obtener neurotrofina pantrópica basándose en NGF.

Las neurotrofinas pantrópicas preferidas incluyen NGF seleccionado del grupo que consiste en D16A-V18E-V20L-G23TY79Q-T81K-H84Q-F86YK88R-hNGF (figura 15A) y D16A-T81K-H84Q-F86Y-K88R-hNGF (figura 15B).

Una variante de NGF de la invención puede derivarse del NGF sustituyendo en las posiciones de aminoácidos G23, H84, y V18 o V20 para conferir unión a trkC con el fin de obtener una variante de NGF que se une a trkC. En una realización preferida, se sustituye el V20. Opcionalmente, la variante de NGF puede contener adicionalmente una sustitución de F86, T81, o T29, que puede potenciar adicionalmente o ajustar de manera precisa la especificidad de NT-3. La actividad de inducción de señal o unión a trkC se adquiere o se confiere mediante cambios en el NGF que consisten esencialmente en los cambios tratados en el presente documento. Las variantes de NGF preferidas incluyen NGF130, NGF131, NGFR2 y NGFR3, tal como se muestra en la figura 16. Las sustituciones más preferidas en estas posiciones son G23T, H84Q, V18E, V20L, F86Y, T81K y T29I. Sin embargo, otras sustituciones son apropiadas, preferiblemente sustituciones en serie conservativas u homólogas. Por ejemplo, V18 puede sustituirse de manera conservativa por leucina o treonina para efectuar mínimamente la unión a trkC o un aminoácido conservativo de ácido glutámico u homólogo, tal como por ácido aspártico o glutamina, para potenciar la unión a trkC. V20 puede sustituirse por los aminoácidos hidrófobos más grandes, isoleucina, metionina o treonina para potenciar la unión a trkC, y quizás alanina para tener un efecto de unión a trkC mínimo. G23 puede sustituirse por serina. T29 puede sustituirse por isoleucina, valina, leucina o serina. Preferiblemente, T29I está presente cuando F86Y está presente. Y79 puede sustituirse por glutamina, fenilalanina, o asparagina, pero preferiblemente permanece Y79. T81 puede

sustituirse por arginina para efectuar la unión a trkC o por isoleucina, valina, leucina o serina con unión a trkC mínima. H84 puede sustituirse por asparagina. F86 puede sustituirse por metionina, triptófano, treonina o serina para efectuar la unión a trkC. El documento US 6.330.310 da a conocer las características de las variantes de NGF y los métodos para obtener las secuencias codificantes.

Variantes de NGF de unión a trkC preferidas se muestran en la figura 16A y B. La figura 16A muestra NGF130 (parte superior) y NGF131 (parte inferior). La figura 16B muestra NGFR2 (parte superior) y NGFR3 (parte inferior). NGF130 contiene los cuatro cambios: V20L, G23T, H84Q y F86Y. NGF131 contiene los cinco cambios V20L, G23T, T29I, H84Q y F86Y. NGFR2 contiene los cuatro cambios V20L, G23T, T81K y H84Q. NGFR3 contiene los cuatro cambios V18E, G23T, T81K y H84Q.

Según una realización de la invención, el NGF es un NGF modificado, que se ha modificado para reducir su afinidad por $p75^{NGFR}$. Los genes que codifican para tal NGF modificado se describen en la patente US 5.349.055. De manera específica, la cadena lateral con carga positiva de Lys32 puede sustituirse por, por ejemplo el grupo metilo de Ala. Tal reducción reduce la unión de la molécula a $p75^{NGFR}$ hasta el 5% de la unión observada con el NGF original. En otra realización, el cambio de Lys34 en Ala reduce la unión a células A875 hasta el 55% de los niveles originales. Todavía en otra realización, la sustitución simultánea de Lys32, Lys34 y Glu35 por alanina se usa para suprimir la unión de la molécula mutante a $p75^{NGFR}$. En el caso de cada uno de estos mutantes, a pesar de la unión reducida o ausente a $p75^{NGFR}$, las moléculas conservan actividad biológica de tipo salvaje en explantes de ganglios simpáticos.

Un pre-pro-NGF humano preferido con capacidad reducida para unirse a NGF de $p75^{NGFR}$ se expone en la figura 17. Las mutaciones relativas al NGF de tipo salvaje se muestran en negrita.

En una realización adicional, el NGF mutante puede diseñarse basándose en el descubrimiento de que los aminoácidos con carga positiva alrededor del aminoácido 95 en un segundo bucle de horquilla beta pueden interaccionar con Lys32 y Lys34 para formar una interfase con carga positiva implicada en la unión a $p75^{NGFR}$. La modificación simultánea de Lys32 con cualquiera de las otras dos lisinas (Lys 34 o Lys 95) da como resultado una pérdida de unión a $p75^{NGFR}$. A pesar de la falta de unión a $p75^{NGFR}$, estos mutantes se unen a $p140^{trk}$ y conservan su actividad biológica, tal como se mide mediante diferenciación neuronal de las células PC12 células y supervivencia de neuronas simpáticas cultivadas.

En el presente documento se realizan también modificaciones de NGF para potenciar la estabilidad. Tal como se describe en el presente documento, la modificación selectiva de uno o más de los residuos de aminoácido que aparecen entre el aminoácido 25 y 36 del factor de crecimiento nervioso, parece alterar la estabilidad del factor. Por consiguiente, la invención contempla la alteración de tales aminoácidos, seguido de la medición de la estabilidad y la actividad biológica de la molécula alterada para seleccionar aquellos factores que conservan su actividad biológica pero tienen una actividad potenciada en comparación con la molécula original.

Otro tipo de NGF modificado incluye NGF multifuncional tal como los dados a conocer en el documento US 5.512.661. Una proteína quimérica que tiene actividad neurotrófica y que consiste esencialmente en un NGF, en el que aproximadamente de 3 a aproximadamente 13 aminoácidos consecutivos de dicho NGF se sustituyen por una secuencia de aminoácidos de tamaño similar de un segundo factor neurotrófico de modo que la proteína quimérica resultante difiere en la secuencia en al menos 3 aminoácidos del NGF. Los factores neurotróficos quiméricos especialmente preferidos incluyen aquéllos en los que el segundo factor neurotrófico es BDNF, CNTF, NT-3 o NT-4. Se prefiere particularmente la quimera entre NGF y BDNF.

Tal NGF quimérico puede clonarse mediante corte y empalme de partes entre sí de genes de NGF y BDNF usando extensión por solapamiento de cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa. Pueden producirse moléculas quiméricas en las que regiones relativamente grandes (quimeras R1-R5) o pequeñas (R6-R10) se sustituyen por secuencias de NGF. Las secuencias de aminoácidos de R1-R10 se representan en las figuras 5A-D del documento US 5.512.661. Las quimeras R1 a R6 comprenden partes de BDNF humano y NGF humano y las quimeras R7 a R10 comprenden partes de BDNF humano y NGF de ratón. La tabla 2 representa un resumen de la extensión aproximada de las secuencias de BDNF y NGF en las quimeras R1 a R10.

TABLA 2

	Quimera	Secuencia de BDNF	Secuencia de NGF
5	R1	preprosecuencia	secuencia madura completa
10	R2	preprosecuencia residuos 1-17	residuos 18-120
15	R3	preprosecuencia residuos 1-58	residuos 59-120
20	R4	preprosecuencia residuos 1-72	residuos 73-120
25	R5	preprosecuencia residuos 1-81	residuos 82-120
30	R6	preprosecuencia residuos 1-110	residuos 111-120
35	R7	preprosecuencia residuos 1-33 residuos 42-118	residuos 34-41
40	R8	preprosecuencia residuos 1-43 residuos 51-118	residuos 44-50
45	R9	preprosecuencia residuos 1-58 residuos 67-118	residuos 59-66
50	R10	preprosecuencia residuos 1-72 residuos 80-118	residuos 73-79

Trastornos neurológicos

Según esta invención, se contempla la administración capsular de NGF, sintetizado por células humanas *in vivo*, a los ventrículos cerebrales, al parénquima cerebral, u otra ubicación de SNC adecuada, que oscila desde 1-1500 ng/día. La dosificación real de NGF, u otro factor adecuado, puede variarse implantando clones de producción alta o baja, más o menos células o un número menor o mayor de cápsulas. Se contempla la administración de 0,1-1500, preferiblemente de 1 a 1000, más preferiblemente de 10-600, lo más preferiblemente de 50-500, ng de NGF/ser humano/día, para la administración ventricular y de 0,1-1500, preferiblemente de 10-150 ng de NGF/ser humano/día para la administración parenquimal. Estos intervalos de dosificación son significativamente inferiores a las dosis notificadas anteriormente de NGF necesario para la conservación/proliferación de neuronas del prosencéfalo basal colinérgicas en estudios con roedores y en estudios con primates (17-350 μ g/día), especialmente si se normalizan las dosificaciones para explicar las diferencias de volumen cerebral entre roedores, primates y seres humanos. Tuzynski *et al.*, J. Neurosci., 10, págs. 3604-14 (1990); Koliatsos *et al.*, Ann. Neurol., 30, págs. 831-840 (1991), Koliatsos *et al.*, Experimental Neurol., 112, págs. 161-73 (1991); Dekker *et al.*, Neuroscience, 60, págs. 299-309 (1994). En el único paciente clínico evaluado, la dosis de NGF administrada fue de 75 μ g/día. (Olson *et al.*, J. Neural Trans., 4, págs. 79-95 (1992)). En una realización, las células humanas genéticamente modificadas que secretan NGF humano (hNGF) se encapsulan en membranas

semipermeables, y se implantan por vía intraventricular o por vía intraparenquimal en un huésped mamífero adecuado, preferiblemente un primate, lo más preferiblemente un ser humano.

Por consiguiente, se cree que las líneas de celulares que expresan NGF de la invención son útiles para promover el desarrollo, el mantenimiento o la regeneración de neuronas *in vivo*, incluyendo centrales (cerebro y médula espinal), periféricas (neuronas simpáticas, parasimpáticas, sensitivas y entéricas) y neuronas motoras. Las líneas celulares que expresan NGF de la invención se utilizan en métodos para el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos neurológicos. En una realización preferida, las líneas celulares de la presente invención se administran a un paciente para tratar trastornos neurológicos. Por “trastornos neurológicos” se quiere decir en el presente documento trastornos del sistema nervioso central y/o periférico que se asocian con el daño o la degeneración de las neuronas. Los ejemplos específicos de trastornos neuronales incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular, traumatismo del SNC, ELA, neuropatías periféricas, dolor neuropático, y otros estados caracterizados por necrosis o pérdida de neuronas o sus procesos, ya sean centrales o periféricos, además de tratar los nervios dañados debido a traumatismo, quemaduras, lesión, insuficiencia renal, y los efectos tóxicos de los agentes quimioterápicos usados para tratar el cáncer o el SIDA. Por ejemplo, las neuropatías periféricas asociadas con ciertos estados, tales como neuropatías asociadas con la diabetes, el SIDA, o la quimioterapia pueden tratarse usando las formulaciones de la presente invención. Las líneas celulares pueden usarse también como un componente de los medios de cultivo para su uso en el cultivo de células nerviosas *in vitro* o *ex vivo*.

En diversas aplicaciones de la invención, se administran líneas celulares que expresan NGF a pacientes en los que se ha dañado el sistema nervioso mediante procesos idiopáticos, traumatismo, cirugía, accidente cerebrovascular e isquemia, infección, enfermedad metabólica, carencia nutricional, tumor maligno o agentes tóxicos, para promover la supervivencia o el crecimiento de neuronas, o en cualquiera de los estados que se ha descubierto que pueden tratarse con NGF. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan NGF de la invención pueden usarse para promover la supervivencia o el crecimiento de neuronas motoras que se han dañado por traumatismo o cirugía. Además, las líneas celulares que expresan NGF de la invención pueden usarse para tratar trastornos degenerativos de neuronas motoras, tales como esclerosis lateral amiotrófica (enfermedad de Lou Gehrig), parálisis de Bell, y diversos estados que implican atrofia muscular espinal, o parálisis. Las líneas celulares que expresan NGF de la invención pueden usarse para tratar trastornos neurodegenerativos humanos, tales como la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, deterioro cognitivo mínimo (DCM), enfermedad de Parkinson, epilepsia, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, síndrome de Down, sordera nerviosa y enfermedad de Meniere. Las líneas celulares que expresan NGF de la invención pueden usarse como potenciador cognitivo, para potenciar el aprendizaje particularmente en demencias o traumatismo.

La enfermedad de Alzheimer, que se ha identificado por el Instituto Nacional del Envejecimiento (National Institutes of Aging) que representa más del 50% de la demencia en los ancianos, es también la cuarta o quinta causa principal de muerte en los norteamericanos de más de 65 años de edad. Cuatro millones de norteamericanos, el 40% de los norteamericanos más de 85 años de edad (el segmento de mayor rapidez de crecimiento de la población estadounidense), tienen la enfermedad de Alzheimer. El veinticinco por ciento de todos los pacientes con la enfermedad de Parkinson padecen además demencia de tipo enfermedad de Alzheimer y en aproximadamente el 15% de los pacientes con demencia, coexisten la enfermedad de Alzheimer y la demencia por infarto múltiple. La tercera causa más común de demencia, tras la enfermedad de Alzheimer y demencia vascular, es el deterioro cognitivo debido a una enfermedad cerebral de causa orgánica relacionada directamente con el alcoholismo, que aparece en aproximadamente el 10% de los alcohólicos. Sin embargo, la anomalía más compatible para la enfermedad de Alzheimer, así como para la demencia vascular y el deterioro cognitivo debido a enfermedad cerebral de causa orgánica relacionada con el alcoholismo, es la degeneración del sistema colinérgico que surge desde el prosencéfalo basal (PB) hasta tanto la corteza como el hipocampo (Bigl *et al.* en Brain Cholinergic Systems, M. Steriade y D. Biesold, eds., Oxford University Press, Oxford, págs.364-386 (1990)). Además, existen varios sistemas de neurotransmisores distintos afectados por la enfermedad de Alzheimer (Davies Med. Res. Rev. 3:221 (1983)). Sin embargo, el deterioro cognitivo, relacionado por ejemplo con la degeneración del sistema de neurotransmisores colinérgicos, no se limita a individuos que padecen demencia. Se ha observado también en ratas y adultos mayores por lo demás sanos. Estudios que comparan el grado de deterioro de aprendizaje con el grado de flujo sanguíneo cerebral cortical reducido en ratas mayores muestran una buena correlación (Berman *et al.* Neurobiol. Aging 9:691 (1988)). En el alcoholismo crónico, la enfermedad cerebral de causa orgánica resultante, como la enfermedad de Alzheimer y envejecimiento normal, se caracteriza también por reducciones difusas en el flujo sanguíneo cerebral cortical en aquellas regiones cerebrales en las que aparecen neuronas colinérgicas (prosencefalo basal) y a las que se proyectan (corteza cerebral) (Lofti *et al.*, Cerebrovasc. y Brain Metab. Rev 1:2 (1989)). Tales demencias pueden tratarse mediante la administración de dispositivos o líneas celulares que secretan de NGF de la invención.

Además, los dispositivos o las líneas celulares que secretan de NGF de la invención implantados o bien en los tejidos periféricos o bien dentro del SNC, se usan preferiblemente para tratar neuropatía, y especialmente neuropatía periférica. “Neuropatía periférica” se refiere a un trastorno que afecta al sistema nervioso central, manifestándose la mayor frecuencia como uno o una combinación de neuronas motoras, sensitivas, sensitivo-motoras o autónomas. Cada una de la amplia variedad de morfologías mostradas por las neuropatías periféricas puede atribuirse únicamente a un número igualmente amplio de causas. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden adquirirse genéticamente, pueden resultar de una enfermedad sistémica, o pueden inducirse por un agente tóxico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, neuropatía periférica diabética, neuropatía sensitivo-motora distal, neuropatía asociada con el SIDA, o neuropatías autónomas tales como motilidad reducida del tubo digestivo o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías asociadas con enfermedad sistémica incluyen síndrome pospoliomielítico; los ejemplos de neuropatías

hereditarias incluyen enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Refsum, A-betalipoproteinemia, enfermedad de Tangier, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry, y síndrome de Dejerine-Sottas; y los ejemplos de neuropatías provocadas por un agente tóxico incluyen aquéllos provocados por el tratamiento con un agente quimioterápico tal como taxol, vincristina, cisplatino, metotrexato, o 3'-azido-3'-desoxitimidina.

Una dosis terapéuticamente eficaz de dispositivos o células que secretan NGF se administra a un paciente. Por “dosis terapéuticamente eficaz” se quiere decir en el presente documento una dosis que produce los efectos para los que se administra o aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico en un régimen de administración particular. La dosificación del NGF liberado de los dispositivos o las líneas celulares de la presente invención es la necesaria para conseguir una concentración eficaz de NGF *in vivo*, para el estado particular tratado, aunque la dosificación varía con el tipo de variante de NGF, la duración deseada de la liberación, la enfermedad objetivo, la especie animal sujeto y otros factores, tales como el estado del paciente. La dosis exacta dependerá del trastorno que va a tratarse y el sitio de implante, y podrá determinarse por un experto en el estado de la técnica usando técnicas conocidas. Actualmente, se ha administrado por vía subcutánea rhNGF a pacientes que tienen neuropatía periférica diabética o relacionada con el SIDA, con ensayos de fase III en curso. Las cantidades de dosificación semanal usadas en estos estudios clínicos proporcionan un buen punto de partida para que el médico determine las dosificaciones para la administración del NGF de la invención. Los datos indican que el NGF sintetizado en células *in situ* es 3-4 órdenes de magnitud más potente que proteína recombinante infundida o inyectada tal como se demuestra mediante estudios con primates y con roedores usando células BHK que secretan NGF encapsuladas. Debido a la mayor potencia documentada de NGF sintetizado *in situ* en comparación con formulaciones proteicas administradas y el perfil de dosificación mejorado que puede obtenerse mediante la liberación continua y local desde cápsulas, en general, los dispositivos o las líneas celulares que secretan NGF de la presente invención se administran para proporcionar de aproximadamente 0,01 ng de NGF/kg de peso corporal a aproximadamente 100 μ g/kg por día, preferiblemente desde 0,02 ng/kg hasta 10 μ g/kg, más preferiblemente de 0,03 a 500 ng/kg, y lo más preferiblemente de 0,5 ng/kg a 100 ng/kg. En algunas realizaciones, se proporcionan dosis de 0,03 a 1,0 ng/kg, más preferiblemente de 0,1 a 0,3 ng/kg. Además, tal como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la edad así como el peso corporal, la salud general, el género, la dieta, el momento de administración, la interacción con fármacos y la gravedad de la enfermedad, y podrá determinarse mediante experimentación rutinaria por los expertos en la técnica. Normalmente, el médico administrará dispositivos o líneas celulares que secretan NGF de la invención hasta que se alcanza una dosificación que mejora, repara, mantiene y/o, de manera óptima, restablece la función neuronal. La dosis también puede ser una dosis profiláctica que previene o reduce la degeneración de las neuronas. La evolución de este tratamiento puede monitorizarse fácilmente mediante ensayos convencionales.

Los resultados de ensayos clínicos de fase II indican que los pacientes con enfermedad de neuropatía periférica requieren tres dosis por semana de rhNGF a o bien 0,3 o bien 0,1 μ g/kg. Esto significa que sólo se necesitan 21 ó 7 μ g por dosis de rhNGF para un paciente medio con un peso corporal de 70 kg. La formación líquida de rhNGF actual es de 2 mg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 5,5, NaCl 142 mM. Esta información de dosificación proporciona un punto de partida para la dosificación con los dispositivos o las líneas celulares que secretan NGF teniendo en cuenta la mayor potencia y la administración local.

Trastornos oftálmicos

La mayoría de, si no todos, trastornos y enfermedades oftálmicos se asocian con una o más de tres tipos de indicaciones: (1) angiogénesis, (2) inflamación, y (3) degeneración. Para tratar estos trastornos, los dispositivos de la presente invención permiten el suministro de NGF y opcionalmente otros factores que actúan como factores antiangiogénicos; factores antiinflamatorios; factores que retardan la degeneración celular, promueven la conservación celular o promueven el crecimiento celular; y combinaciones de los anteriores. Basándose en las indicaciones de un trastorno particular, un experto habitual en la técnica puede administrar cualquier molécula o combinación de moléculas adecuada de los tres grupos a las dosificaciones especificadas más adelante.

La retinopatía diabética, por ejemplo, se caracteriza por angiogénesis y degeneración de la retina. Esta invención contempla tratar la retinopatía diabética implantando dispositivos que suministran NGF o bien por vía intraocular, preferiblemente en el humor vítreo, o bien por vía periocular, preferiblemente bajo la región de Tenon. Lo más preferido es administrarlo al humor vítreo para esta indicación. También es deseable administrar conjuntamente uno o más factores antiangiogénicos, o bien por vía intraocular o bien por vía periocular, preferiblemente por vía intraocular, y lo más preferiblemente por vía intravítrea.

La uveítis implica inflamación y degeneración secundaria. Esta invención contempla tratar la uveítis mediante el implante intraocular, preferiblemente en la cámara anterior o vítrea, de dispositivos que secretan NGF.

La retinitis pigmentosa, en comparación, se caracteriza por una degeneración de la retina primaria. Esta invención contempla tratar la retinitis pigmentosa mediante la colocación intraocular, preferiblemente vítrea, de dispositivos que secretan NGF.

La degeneración macular relacionada con la edad implica tanto angiogénesis como degeneración de la retina. Esta invención contempla tratar este trastorno usando los dispositivos de la invención para suministrar NGF por vía intraocular, preferiblemente al humor vítreo, y/o uno o más factores antiangiogénicos por vía intraocular o por vía periocular, preferiblemente por vía periocular, lo más preferiblemente bajo la región de Tenon.

El glaucoma se caracteriza por un aumento de la presión ocular y una pérdida de células ganglionares de la retina. Los tratamientos para el glaucoma contemplados en esta invención incluyen el suministro de NGF que protege las células de la retina del daño asociado con el glaucoma, suministrado por vía intraocular, preferiblemente por vía intravítrea.

Por vía intraocular, preferiblemente en el humor vítreo, se contempla el suministro de un factor neutrófico en un intervalo de dosificación de 50 pg a 500 ng, preferiblemente de 100 pg a 100 ng, y lo más preferiblemente de 1 ng a 50 ng por ojo por paciente por día. Para el suministro periocular, preferiblemente bajo la región o el espacio de Tenon, se contemplan intervalos de dosificación ligeramente superiores de hasta 1 µg por paciente por día.

Se contempla el uso de la presente invención para tratar una amplia variedad de trastornos y enfermedades oftálmicos caracterizados por, pero sin limitarse a, angiogénesis, inflamación, degeneración o alguna combinación de las mismas. Algunos ejemplos de trastornos oftálmicos que pueden tratarse mediante diversas realizaciones de la presente invención incluyen uveítis, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad y otros trastornos adquiridos, retinopatía, enfermedades vasculares de la retina y otras anomalías vasculares, endoftalmia, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias pero no infecciosas, síndrome de isquemia ocular, degeneraciones de la retina periférica, tumores y degeneraciones de la retina, tumores y trastornos de la coroides, trastorno del humor vítreo, desprendimiento de retina, traumatismo penetrante y no penetrante, complicaciones tras cirugía de cataratas y neuropatías ópticas inflamatorias.

La degeneración macular relacionada con la edad incluye, pero no se limita a, degeneración macular relacionada con la edad seca, degeneración macular relacionada con la edad exudativa y degeneración miópica.

La retinopatía incluye, pero no se limita a, retinopatía diabética, vitreoretinopatía proliferativa y retinopatía tóxica.

La presente invención puede ser útil para el tratamiento de neovascularización ocular, un estado asociado a muchos trastornos y enfermedades oculares y que explica la gran mayoría de la pérdida de vista grave. Por ejemplo, se contempla el tratamiento de la neovascularización ocular asociada a la isquemia de la retina, una causa principal de ceguera en la diabetes y muchas otras enfermedades; la neovascularización de la córnea, que predispone a los pacientes a sufrir fallo del injerto de córnea; y neovascularización asociada a retinopatía diabética, oclusión de la vena central de la retina y posiblemente degeneración macular relacionada con la edad.

La presente invención también puede usarse para tratar los síntomas oculares que resultan de enfermedades o estados que presentan síntomas tanto oculares como no oculares. Algunos ejemplos incluyen trastornos relacionados con el SIDA tales como retinitis por citomegalovirus y trastornos del humor vítreo; trastornos relacionados con el embarazo tales como cambios hipertensivos en la retina; y efectos oculares de diversas enfermedades infecciosas tales como tuberculosis, sífilis, enfermedad de Lyme, enfermedad parasítica, *Toxocara canis*, oftalmomiasis, cercosis quística e infecciones fúngicas.

En una aplicación de la presente invención, se encapsulan células vivas y se insertan quirúrgicamente (bajo anestesia retrobulbar) en el humor vítreo del ojo. Para la colocación vítrea, el dispositivo puede implantarse a través de la esclerótica, sobresaliendo una parte del dispositivo o anclaje a través de la esclerótica. Lo más preferiblemente, todo el cuerpo del dispositivo está implantado en el humor vítreo, sin que ninguna parte del dispositivo sobresalga hacia o a través de la esclerótica. Preferiblemente el dispositivo se ancla a la esclerótica (u otra estructura ocular adecuada). El anclaje puede comprender un ojal de sutura o cualquier otro medio de anclaje adecuado (véase por ejemplo el documento US 6.436.427). El dispositivo puede permanecer en el humor vítreo tanto tiempo como sea necesario para conseguir el tratamiento o la profilaxis deseados. Tales tratamientos incluyen por ejemplo promover la supervivencia o reparación de neuronas o fotorreceptores, o la inhibición y/o inversión de la neovascularización de la retina o la coroides, así como la inhibición de la inflamación de la úvea, de la retina y del nervio óptico. Esta realización es preferible para suministrar NGF a la retina.

Con la colocación vítrea, el NGF puede suministrarse a la retina o al EPR.

En otra realización, los dispositivos cargados con células se implantan por vía periocular, dentro o debajo del espacio conocido como cápsula de Tenon. Esta realización es menos invasiva que el implante en el humor vítreo y por tanto se prefiere generalmente. Esta vía de administración también permite el suministro de NGF al EPR o la retina. Esta realización se prefiere especialmente para tratar la neovascularización de la coroides y la inflamación del nervio óptico y el tracto uveal. En general, el suministro desde este sitio de implante permitirá la circulación de NGF a la vasculatura de la coroides, la vasculatura de la retina y el nervio óptico.

Según esta realización se prefiere el suministro periocular (implante bajo la cápsula de Tenon) de NGF a la vasculatura de la coroides para tratar la degeneración macular (neovascularización de la coroides).

El suministro de NGF directamente a la vasculatura de la coroides (por vía periocular) o al humor vítreo (por vía intraocular) usando los dispositivos y métodos de esta invención puede reducir los problemas mencionados anteriormente y puede permitir el tratamiento de neovascularización de la coroides poco definida u oculta. También puede proporcionar una manera de reducir o prevenir la neovascularización recurrente de la coroides por medio de tratamiento complementario o de mantenimiento.

Dos o más líneas celulares modificadas mediante ingeniería genética por separado pueden encapsularse conjuntamente, o la línea celular de suministro puede modificarse mediante ingeniería genética para que secrete un factor además de NGF, o puede implantarse más de un dispositivo en el sitio de interés. Pueden implantarse dispositivos en dos o más sitios diferentes en el ojo simultáneamente para suministrar NGF y otros factores. Por ejemplo, puede ser deseable suministrar NGF al humor vítreo para suministrar la retina neural (células ganglionares al EPR) y para suministrar un factor antiangiogénico a través de la zona bajo el espacio de Tenon para suministrar a la vasculatura de la coroides. Aunque se contempla el tratamiento usando más de un dispositivo y hasta cinco dispositivos por ojo, se prefiere el implante de tres dispositivos o menos por ojo.

La dosificación puede variarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Esto incluye cambiar (1) el número de células por dispositivo, (2) el número de dispositivos por ojo, o (3) el nivel de producción de NGF por célula. Se prefiere el uso de 10^3 a 10^8 células por dispositivo, más preferiblemente de $5 \cdot 10^4$ a $5 \cdot 10^6$ células por dispositivo.

Los presentes líneas celulares y dispositivos son útiles para tratar heridas crónicas en zonas que están poco vascularizadas y poco innervadas. Por tanto, las heridas crónicas que pueden tratarse mediante el presente método incluyen, pero no se limitan a, heridas provocadas por o asociadas a los siguientes estados: defectos epiteliales de la córnea que pueden resultar de diversas causas, por ejemplo de la interrupción o perturbación de la primera rama del nervio trigémino, o de quemaduras químicas tales como quemaduras por ácido o por álcali, o como una complicación de infecciones virales, por ejemplo zóster oftálmico o queratitis por herpes; descomposición del epitelio tras queratoplastia penetrante; curación retrasada tras queratectomía fotorrefractiva (QFT); úlceras del pie diabético; úlceras de decúbito; y úlceras por estasis venosas. Estas heridas están presentes en el ojo o en otras zonas del cuerpo, por ejemplo la parte inferior de la pierna y el pie, la región sacra, las nalgas.

La invención puede usarse en un método de curación de un defecto o una herida de la córnea administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de dispositivos o células que secretan NGF al sujeto que presenta la herida. En otro ejemplo, el presente método se aplica al tratamiento de heridas cutáneas.

Los presentes métodos de curación de heridas crónicas se pondrán en práctica normalmente en un paciente o ser humano pero pueden aplicarse a otros mamíferos incluyendo, pero sin limitarse a, caballos, perros, gatos y otros animales domésticos.

De acuerdo con el método de tratamiento, se administrará al sujeto o paciente que padece la herida una cantidad de dispositivos o células que secretan NGF terapéuticamente eficaz para curar la herida. Para el tratamiento de heridas del ojo o de la córnea, una cantidad terapéuticamente eficaz de dispositivos o células que secretan NGF es la cantidad que proporcionará un efecto de curación observable en el epitelio en el plazo de veinticuatro a setenta y dos horas. El efecto observable es una claridad mejorada del epitelio y/o una reducción en el tamaño del defecto del epitelio. El efecto de curación en el epitelio del ojo puede observarse usando el microscopio de lámpara de hendidura que es un instrumento convencional usado por los oftalmólogos. En zonas distintas del ojo, tales como una úlcera del pie diabético o una úlcera de decúbito, la cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad que producirá un efecto de curación beneficioso visible para un médico en el plazo de 3-7 días, generalmente en el plazo de aproximadamente 72 horas. El efecto de curación beneficioso puede determinarse mediante la medición diaria de la anchura, longitud y profundidad de la herida en milímetros, usando una regla. Preferiblemente, la cantidad de dispositivos o células que secretan NGF administrada es suficiente para reducir el tamaño de la herida en al menos el 50%, preferiblemente, en el 75% e incluso más preferiblemente, en el 90-100%.

La cantidad para producir un efecto terapéutico deseado variará en parte con el tipo y la extensión de la enfermedad o lesión en el sujeto particular en cuestión, la actividad biológica del NGF empleado, la manera y frecuencia de administración a los dispositivos o las células, la salud global del ser individual que está tratándose y similares. Se esperará que un sujeto que tiene una lesión de poca importancia pueda beneficiarse mediante una cantidad menor para la recuperación veloz del traumatismo del epitelio. Con una mayor perturbación del epitelio, se espera que una pueda ser deseable una mayor cantidad para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz de dispositivos o células que secretan NGF usada para tratar heridas cutáneas variará también dependiendo de factores tales como el estado y la edad de la piel. La cantidad precisa para su uso con cualquier paciente particular puede determinarse por los expertos en la técnica farmacéutica teniendo en cuenta estos factores y la presente descripción.

Encapsulación

El tratamiento con células encapsuladas se basa en el concepto de aislar células del sistema inmunitario del huésped receptor rodeando las células con un material biocompatible semipermeable antes del implante en el huésped. La invención incluye un dispositivo en el que se encapsulan las células en una cápsula inmunoaislante. Una "cápsula inmunoaislante" significa que la cápsula, tras el implante en un huésped receptor, minimiza los efectos nocivos del sistema inmunitario del huésped sobre las células en el núcleo del dispositivo. Las células se inmunoaislan del huésped encerrándolas en cápsulas poliméricas implantables formadas por una membrana microporosa. Este enfoque evita el contacto célula-célula entre los tejidos del huésped y los implantados, eliminando el reconocimiento antigénico a través de presentación directa. Las membranas usadas también pueden adaptarse para controlar la difusión de moléculas, tales como anticuerpo y complemento, basándose en su peso molecular (Lysaght *et al.*, 56 J. Cell Biochem. 196 (1996), Colton, 14 Trends Biotechnol. 158 (1996)). Usando técnicas de encapsulación, pueden trasplantarse células en un

huésped sin rechazo inmunitario, o bien con o bien sin uso de fármacos inmunosupresores. Las cápsulas poliméricas biocompatibles útiles contienen habitualmente un núcleo que contiene células, o bien suspendidas en un medio líquido o bien inmovilizadas dentro de una matriz de inmovilización, y una región circundante o periférica de membrana o matriz de permeabilidad selectiva (“envoltura”) que no contiene células aisladas, que es biocompatible y que es suficiente para proteger las células en el núcleo frente a un ataque inmunológico perjudicial. La encapsulación impide que los elementos del sistema inmunitario entren en el cápsula, protegiendo de ese modo las células encapsuladas frente a la destrucción inmunitaria. La naturaleza semipermeable de la membrana de la cápsula permite también que la molécula biológicamente activa de interés difunda fácilmente desde la cápsula hacia el interior del tejido del huésped circundante.

La cápsula puede fabricarse de un material biocompatible. Un “material biocompatible” es un material que, tras el implante en un huésped, no produce una respuesta perjudicial en el huésped suficiente como para dar como resultado el rechazo de la cápsula o convertirla en inoperable, por ejemplo por degradación. El material biocompatible es relativamente impermeable para moléculas grandes, tales como componentes del sistema inmunitario del huésped, pero es permeable para moléculas pequeñas, tales como insulina, factores de crecimiento y nutrientes, mientras que permite eliminar el residuo metabólico. Una variedad de materiales biocompatibles son adecuados para suministrar factores de crecimiento mediante la composición de la invención. Se conocen numerosos materiales biocompatibles, que tienen diversas morfologías de superficie externa y otras características mecánicas y estructurales. Preferiblemente la cápsula de esta invención será similar a las descritas por los documentos WO 92/19195 o WO 95/05452, o las patentes estadounidenses n° 5.639.275; 5.653.975; 4.892.538; 5.156.844; 5.283.187; o la patente US 5.550.050. Tales cápsulas permiten el paso de metabolitos, nutrientes y sustancias terapéuticas mientras que minimizan los efectos perjudiciales del sistema inmunitario del huésped. Los componentes del material biocompatible pueden incluir una membrana semipermeable circundante y el almacén de soporte de células interno. Preferiblemente, las células recombinantes se siembran sobre el almacén, que se encapsula mediante la membrana de permeabilidad selectiva. El almacén de soporte de células filamentosas puede estar fabricado de cualquier material biocompatible seleccionado del grupo que consiste en material acrílico, poliéster, polietileno, polipropileno poliacetonitrilo, tereftalato de polietileno, nailon, poliamidas, poliuretanos, polibutéster, seda, algodón, quitina, carbono o metales biocompatibles. Además, pueden usarse estructuras de fibra unida para el implante de células (patente US 5.512.600). Los polímeros biodegradables incluyen los compuestos por poli(ácido láctico) PLA, poli(ácido láctico-co-glicólico) PLGA, y poli(ácido glicólico) PGA y sus equivalentes. Se han usado armazones de espuma para proporcionar superficies sobre las que pueden adherirse las células trasplantadas (documento WO 98/05304). Se han usado tubos de malla tejida como injertos vasculares (documento WO 99/52573). Adicionalmente, el núcleo puede estar compuesto por una matriz inmovilizante formada por un hidrogel, que estabiliza la posición de las células. Un hidrogel es un red tridimensional de polímeros hidrófilos reticulados en forma de un gel compuestos sustancialmente por agua.

La envoltura tiene preferiblemente un punto de corte de peso molecular inferior a 1000 kD, más preferiblemente entre 50-700 kD, lo más preferiblemente entre 70-300 kD. El punto de corte del peso molecular debe seleccionarse para garantizar que el NGF bioactivo pueda escapar de la cápsula mientras que protege las células encapsuladas del sistema inmunitario del paciente.

El espesor de la envoltura se encuentra normalmente en el intervalo de 2 a 200 micras, más preferiblemente desde 50 hasta 150 micras. La envoltura debe tener un espesor para proporcionar a la cápsula una resistencia suficiente para mantener las células encapsuladas y debe ser, teniendo esto en cuenta, tan delgada como sea posible para ocupar el menor espacio posible.

Pueden usarse diversos polímeros y combinaciones de polímeros para fabricar la membrana semipermeable circundante, incluyendo poliacrilatos (que incluyen copolímeros acrílicos), polivinilidenos, copolímeros de poli(cloruro de vinilo), poliuretanos, poliestirenos, poliamidas, acetatos de celulosa, nitratos de celulosa, polisulfonas (que incluyen polietersulfonas), polifosfazenos, poliacrilonitrilos, poli(acrilonitrilo-co-cloruro de vinilo), así como derivados, copolímeros y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la membrana semipermeable circundante es una membrana de fibra hueca semipermeable biocompatible. Tales membranas, y los métodos para prepararlas se dan a conocer en las patentes estadounidenses n° 5.284.761 y 5.158.881. La membrana semipermeable circundante puede formarse a partir de una fibra hueca de polietersulfona, tal como las descritas en la patente US 4.976.859 o la patente US 4.968.733. Un material de membrana semipermeable circundante alternativo es poli(acrilonitrilo-co-cloruro de vinilo).

La cápsula puede ser de cualquier configuración apropiada para mantener la actividad biológica y proporcionar acceso para suministrar el producto o la función, incluyendo por ejemplo, cilíndrica, rectangular, en forma de disco, en forma de parche, ovoide, estrellada o esférica. Además, la cápsula puede estar enrollada o enrollada en un estructura anidada o de tipo malla. Si la cápsula ha de recuperarse tras implantarse, no se prefieren las configuraciones que tienden a conducir a la migración de las cápsulas desde el sitio de implante, tales como las cápsulas esféricas lo suficientemente pequeñas como para desplazarse por los vasos sanguíneos del huésped receptor. Ciertas formas, tales como rectángulos, parches, discos, cilindros y láminas planas ofrecen una mayor integridad estructural y son preferibles cuando se desea su recuperación. Una forma particularmente preferida es la forma cilíndrica, ya que una forma de este tipo se produce fácilmente a partir de fibras huecas que pueden producirse industrialmente.

Cuando se usan macrocápsulas, se encapsulan preferiblemente al menos 10^3 células, tal como se encapsulan entre 10^3 y 10^8 células, lo más preferiblemente se encapsulan de 10^5 a 10^7 células en cada dispositivo. Naturalmente, el número de células en cada cápsula depende del tamaño de la cápsula. Por regla general, en una cápsula con espuma

ES 2 315 842 T3

(descrita más adelante) los presentes inventores han encontrado que cargar entre 10.000 y 100.000 células por μl de cápsula (volumen calculado como el volumen interno incluyendo la espuma), más preferiblemente desde 25.000 hasta 50.000 células por μl , más preferiblemente desde 30.000 hasta 40.000 células por μl . El número de células que ha de cargarse depende también del tamaño de las células.

La dosificación puede controlarse implantando un menor o mayor número de cápsulas, preferiblemente entre 1 y 10 cápsulas por paciente.

Una macrocápsula en el presente contexto es una cápsula que tiene un volumen de al menos 1 μl , tal como desde 1 hasta 10 μl .

El armazón puede recubrirse con moléculas de matriz extracelular (MEC). Ejemplos adecuados de moléculas de matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágeno, laminina y fibronectina. La superficie del armazón puede modificarse también tratándola con irradiación por plasma para conferir carga para potenciar la adhesión de las células.

Puede usarse cualquier método adecuado de sellado de las cápsulas, incluyendo el uso de adhesivos poliméricos o engarce, anudamiento y termosellado. Además, también puede usarse cualquier método de sellado "en seco" adecuado, tal como se describe, por ejemplo, en la patente US 5.653.687.

Los dispositivos de células encapsuladas se implantan según técnicas conocidas. Se contemplan muchos sitios de implante para los dispositivos y métodos de esta invención. Estos sitios de implante incluyen, pero no se limitan a, el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro, la médula espinal (véanse las patentes estadounidenses n° 5.106.627, 5.156.844 y 5.554.148), y los humores acuoso y vítreo del ojo (véase el documento WO 97/34586).

Armazones de espuma

El armazón de espuma puede formarse a partir de cualquier material adecuado que forme una espuma biocompatible con una estructura macroporosa o de células abiertas con una red de poros. Una espuma de células abiertas es una estructura reticulada de poros interconectados. El armazón de espuma proporciona un material de armazón estable no biodegradable que permite la unión de células adherentes. Entre los polímeros que son útiles en la formación de los armazones de espuma para los dispositivos de esta invención están los materiales termoplásticos y elastómeros termoplásticos.

Algunos ejemplos de materiales útiles en la formación de armazones de espuma adecuados se enumeran en la tabla 3.

TABLA 3

Materiales	Elastómeros
termoplásticos:	termoplásticos:
Material acrílico	Poliamida
Material modacrílico	Poliéster
Poliamida	Polietileno
Policarbonato	Polipropileno
Poliéster	Poliestireno
Polietileno	Poliuretano
Polipropileno	Poli(alcohol vinílico)
Poliestireno	Silicona
Polisulfona	
Polietersulfona	
Poli(fluoruro de vinilideno)	

Se prefieren los armazones de espuma de material termoplástico fabricados de polisulfona y polietersulfona, y armazones de espuma de elastómero termoplástico fabricados de poliuretano y poli(alcohol vinílico).

La espuma debe tener algunos poros (pero no necesariamente todos) de un tamaño que permita a las células unirse a las paredes o a las superficies dentro de los poros. El tamaño de poro, la densidad de poros y el volumen hueco del armazón de espuma pueden variar. La forma de poro puede ser circular, elíptica o irregular. Dado que la forma del poro puede variar considerablemente, sus dimensiones pueden variar según el eje que se está midiendo. Para los fines de esta invención, al menos algunos poros en la espuma deben tener un diámetro de poro de entre 20 y 500 μm , preferiblemente de entre 50 y 150 μm . Preferiblemente, las dimensiones anteriores representan el tamaño de poro medio de la espuma. Si no es circular, el poro puede tener dimensiones variables, siempre que su tamaño sea suficiente para permitir que las células adherentes se unan a las paredes o a las superficies dentro del poro. En una realización, se contemplan espumas que tienen algunos poros elípticos que tienen un diámetro de 20-500 μm a lo largo del eje menor y un diámetro de hasta 1500 μm a lo largo del eje mayor.

Además de los tamaños de poros permisivos de las células anteriores, preferiblemente al menos una fracción de los poros en la espuma debe ser inferior a 10 μm para que la célula sea no permisiva pero que todavía proporcione canales para transportar nutrientes y moléculas biológicamente activas a través de la espuma.

La densidad de poros de la espuma (es decir, el número de poros por volumen que pueden alojar las células, tal como se describió anteriormente) puede variar entre el 20 y el 90%, preferiblemente entre el 50 y el 70%.

De manera similar, el volumen vacío de la espuma puede variar entre el 20 y el 90%, preferiblemente entre el 30 y el 70%.

Las paredes o las superficies de los poros están recubiertas normalmente con una molécula o moléculas de la matriz extracelular, u otra molécula adecuada. Este recubrimiento puede usarse para facilitar la adherencia de las células a las paredes de los poros, para mantener las células en un fenotipo particular y/o para inducir la diferenciación celular.

Los ejemplos preferidos de moléculas de la matriz extracelular (MEC) que pueden adherirse a las superficies dentro de los poros de las espumas incluyen: colágeno, laminina, vitronectina, poliornitina y fibronectina. Otras moléculas de la MEC adecuadas incluyen glicosaminoglicanos y proteoglicanos; tales como condroitín sulfato, heparín sulfato, hialurona, dermatán sulfato, queratín sulfato, proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) y elastina.

La MEC puede obtenerse mediante el cultivo de células que se sabe que depositan MEC, incluyendo células de origen mesenquimatoso o astrocítico. Pueden inducirse células de Schwann para que sinteticen MEC cuando se tratan con ascorbato y AMPc. Véase, por ejemplo, Baron-Van Evercooren *et al.*, "Schwann Cell Differentiation *in vitro*: Extracellular Matrix Deposition and Interaction", Dev. Neurosci., 8, págs. 182-96 (1986).

Además, se ha encontrado que fragmentos peptídicos de adhesión, por ejemplo, secuencias que contienen RGD (ArgGlyAsp), secuencias que contienen YIGSR (TyrIleGlySerArg), así como secuencias que contienen IKVAV (IleLysValAlaVal), son útiles para promover la unión celular. Algunas moléculas que contienen RGD están comercialmente disponibles, por ejemplo, PepTite-2000.TM. (Telios).

Los armazones de espuma de esta invención también pueden tratarse con otros materiales que potencian la distribución celular dentro del dispositivo. Por ejemplo, los poros de la espuma pueden llenarse con un hidrogel no permisivo que inhibe la proliferación o la migración celular. Tal modificación puede mejorar la unión de las células adherentes al armazón de espuma. Los hidrogeles adecuados incluyen hidrogeles aniónicos (por ejemplo, alginato o carragenano) que pueden repeler a las células debido a la carga. Alternativamente, también pueden usarse hidrogeles "sólidos" (por ejemplo, agarosa u óxido de polietileno) para inhibir la proliferación celular poniendo freno a la unión de moléculas de la matriz extracelular secretadas por las células.

El tratamiento del armazón de espuma con regiones de un material no permisivo permite la encapsulación de dos o más poblaciones de células distintas dentro del dispositivo sin tener un crecimiento en exceso de una población sobre la otra. Por tanto, pueden usarse materiales no permisivos dentro del armazón de espuma para segregar poblaciones separadas de células encapsuladas. Las poblaciones de células distintas pueden ser tipos de células iguales o diferentes, y pueden producir moléculas biológicamente activas iguales o diferentes. En una realización, una población de células produce una sustancia que aumenta el crecimiento y/o la supervivencia de la otra población de células. En otra realización, se encapsulan múltiples tipos de células que producen múltiples moléculas biológicamente activas. Esto proporciona al receptor una mezcla o "cóctel" de sustancias terapéuticas.

Los dispositivos de esta invención pueden formarse según cualquier método adecuado. En una realización, el armazón de espuma puede preformarse e insertarse en una envoltura prefabricada, por ejemplo, una membrana de fibra hueca, tal como un componente diferenciado.

Puede preformarse cualquier material de armazón de espuma de material termoplástico o de elastómero termoplástico adecuado para su inserción en una envoltura prefabricada. En una realización se prefieren esponjas de poli(alcohol vinílico) (PVA) para su uso como armazón de espuma. Varias esponjas de PVA están comercialmente disponibles. Por ejemplo, son adecuadas esponjas de espuma de PVA n° D-3, de 60 μm de tamaño de poro (Rippey Corp, Kanebo). De manera similar, están comercialmente disponibles esponjas de PVA de Ivalon Inc. (San Diego, Calif.). Las esponjas de PVA son espumas insolubles en agua formadas mediante la reacción de una disolución de poli(alcohol vinílico) aireada con vapor de formaldehído como el agente de reticulación. Los grupos hidroxilo en el PVA se reticulan co-

valentemente con los grupos aldehído para formar la red polimérica. Las espumas son flexibles y elásticas cuando se humedecen y semirrígidas cuando se secan.

Como alternativa, puede usarse un soporte de maya o hilo tal como se describe en el documento US 6.627.422.

Para una fácil recuperación, la cápsula puede estar equipada con un anclaje.

Matriz de soporte para células que producen NGF

El método de la presente invención comprende además el cultivo de las células que producen NGF *in vitro* sobre una matriz de soporte antes del implante en el cerebro de mamífero. La adhesión previa de las células a microportadores antes del implante en el cerebro está diseñada para mejorar la viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas y para proporcionar un beneficio funcional a largo plazo. Los métodos para cultivar células sobre una matriz de soporte y los métodos para implantar dichas células en el cerebro se describen en el documento US 5.750.103 (Cherksey).

Para aumentar la viabilidad a largo plazo de las células trasplantadas, es decir, células que secretan NGF trasplantadas, las células que van a trasplantarse pueden unirse *in vitro* a una matriz de soporte antes del trasplante. Los materiales de los que puede estar compuesta la matriz de soporte incluyen aquellos materiales a los que se adhieren las células tras la incubación *in vitro*, y sobre los que pueden crecer las células, y que pueden implantarse en el cuerpo del mamífero sin producir una reacción tóxica o una reacción inflamatoria que destruiría las células implantadas o que por lo demás interferiría con su actividad biológica o terapéutica. Tales materiales pueden ser sustancias químicas naturales o sintéticas, o sustancias que tienen un origen biológico.

Los materiales de la matriz incluyen, pero no se limitan a, vidrio y otros óxidos de silicio, poliestireno, polipropileno, polietileno, poli(fluoruro de vinilideno), poliuretano, polialginato, polisulfona, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilonitrilo, poliacrilamida, policarbonato, polipenteno, nailon, amilasas, gelatina natural y modificada y colágeno natural y modificado, polisacáridos naturales y modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo, nitrocelulosa), agar y magnetita. Pueden usarse o bien materiales resorbibles o bien no resorbibles. También se desean materiales de la matriz extracelular, que se conocen bien en la técnica. Los materiales de la matriz extracelular pueden obtenerse comercialmente o prepararse haciendo crecer células que secretan tal matriz, eliminando las células secretoras y permitiendo que las células que van a trasplantarse interaccionen con y se adhieran a la matriz. El material de la matriz sobre el que crecen las células que van a implantarse, o con el que están mezcladas las células, puede ser un producto propio de las células del EPR. Así, por ejemplo, el material de la matriz puede ser matriz extracelular o material de la membrana basal, que se produce y se secreta por las células del EPR que van a implantarse.

Para mejorar la adhesión, la supervivencia y la función celulares, la matriz sólida puede recubrirse opcionalmente sobre su superficie externa con factores que se sabe en la técnica que promueven la adhesión, el crecimiento o la supervivencia celulares. Tales factores incluyen moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, tales como, por ejemplo, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, o proteoglicanos o factores de crecimiento.

Alternativamente, si la matriz sólida en la que se unen las células implantadas está construida de material poroso, puede(n) incorporarse el factor o factores que promueven el crecimiento o la supervivencia en el material de la matriz, del que se liberarían lentamente tras su implante *in vivo*.

Cuando se unen al soporte según la presente invención, las células usadas para el trasplante generalmente están en la "superficie exterior" del soporte. El soporte puede ser sólido o poroso. Sin embargo, incluso en un soporte poroso, las células están en contacto directo con el medio externo sin una membrana intermedia u otra barrera. Así, según la presente invención, se considera que las células están sobre la "superficie exterior" del soporte aun cuando la superficie a la que se adhieren pueda estar en forma de pliegues o circunvoluciones internos del material de soporte poroso que no están en el exterior de la propia partícula o perla.

La configuración del soporte es preferiblemente esférica, como en una perla, pero puede ser cilíndrica, elíptica, una tira o lámina plana, una forma de aguja o alfiler, y similares. Una forma preferida de matriz de soporte es una perla de vidrio. Otra perla preferida es una perla de poliestireno.

Los tamaños de perla pueden oscilar desde aproximadamente 10 μm hasta 1 mm de diámetro, preferiblemente desde aproximadamente 90 μm hasta aproximadamente 150 μm . Para una descripción de diversas perlas de microporador, véanse, por ejemplo, Fisher Biotech Source 87-88, Fisher Scientific Co., 1987, págs. 72-75; Catálogo de cultivo celular de Sigma (Sigma Cell Culture Catalog), Sigma Chemical Co., St. Louis, 1991, págs. 162-163; Catálogo de productos de Ventrex (Ventrex Product Catalog), Ventrex Laboratories, 1989. El límite superior del tamaño de perla puede venir dictado por la estimulación de la perla de reacciones no deseadas en el huésped, que pueden interferir con la función de las células trasplantadas o producir daño al tejido circundante. El límite superior del tamaño de perla también puede venir dictado por el método de administración. Un experto en el estado de la técnica puede determinar fácilmente tales limitaciones.

Sistemas de suicidio

Los dispositivos de la presente invención, que encapsulan células que secretan NGF, pueden retirarse del paciente cuando se requiera. Como precaución de seguridad adicional, las células pueden estar equipadas con un sistema de suicidio, que garantiza que las células pueden destruirse selectivamente tras la administración de un fármaco adecuado para el paciente en cuestión.

El sistema de suicidio se prefiere particularmente para el trasplante de células desnudas según la presente invención, ya que las posibilidades de eliminar las células desnudas tras el trasplante son muy limitadas.

Uno de tales sistemas de suicidio se basa en timidina quinasa. Al tener un sistema de suicidio incorporado en el que se expresa de manera constitutiva o inducible una timidina quinasa, las células pueden destruirse administrando al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo de nucleósido, tal como AZT. El análogo de nucleósido puede administrarse si las células encapsuladas comienzan a proliferar de una manera incontrolada. También puede desearse terminar el tratamiento simplemente porque ya no hay necesidad de que las células que secreten NGF, porque la terminación debe ser inmediata y no puede esperarse a la extracción quirúrgica de las células encapsuladas o porque el tratamiento adicional se realiza mediante alguna otra vía.

En los casos en los que las células trasplantadas o encapsuladas se han inmortalizado condicionalmente antes del trasplante, existe un riesgo teórico de que el oncogén inicie la transcripción tras el trasplante y de que las células trasplantadas lleguen a ser tumorigénicas en consecuencia. Siempre que las células se inmortalicen mediante transducción con un oncogén bajo el control de un promotor inducible (por ejemplo el sistema Tet on-off, el promotor Mx1 o similares), se inserta una secuencia que codifica para una enzima timidina quinasa (TK) en la construcción de vector bajo el control del mismo promotor (por ejemplo, mediante el uso de una construcción IRES) o se inserta la secuencia que codifica para TK en otro vector con un promotor idéntico. Esto garantiza que siempre que se transcribe el oncogén, también se transcribe la TK y pueden destruirse selectivamente las células transducidas y tumorigénicas mediante la administración de un profármaco.

Existen en el estado de la técnica varios ejemplos de genes de timidina quinasa (TK). Una TK preferida es la timidina quinasa del VHS. Otras quinasa preferidas incluyen la timidina quinasa de *Drosophila melanogaster* descrita en Munch-Petersen *et al* 2000, J. Biol. Chem. 275:6673-6679. Se prefieren incluso más los mutantes de esta quinasa particular ya que tienen una DL₅₀ disminuida con respecto a varios análogos de nucleósidos (documento WO 01/88106). Otro grupo de timidina quinasa preferidas incluye quinasa de plantas descritas en el documento WO 03/100045.

Proteínas inmunoestimuladoras de la superficie celular

En una realización, se proporcionan células humanas encapsuladas que pueden expresar un polipéptido inmunoestimulador de la superficie celular además de NGF o una variante de NGF. Estas células que expresan una superficie celular inmunoestimuladora son particularmente útiles cuando se encapsulan para su implante en un paciente humano, porque las células que escapan de una cápsula rota se destruyen mediante el sistema inmunitario del paciente. No se desencadenará una respuesta inmunitaria en el huésped mediante las células recombinantes que expresan un polipéptido inmunoestimulador de la superficie celular en un dispositivo intacto. En caso de un fallo del dispositivo, sin embargo, las células liberadas pueden eliminarse eficazmente mediante fagocitos sin activación del complemento ni la creación de una memoria inmunitaria.

En una realización específica, un polipéptido quimérico que contiene el dominio de membrana del receptor de transferrina humana ancla la región Fc de IgG₁ humana a la superficie de la membrana plasmática de la célula en una "orientación inversa", imitando así la configuración de IgG durante la opsonización. El polipéptido quimérico de IgG₁ humana se une al receptor de Fc para activar fagocitos, tales como macrófagos, pero evita las características indeseables de activar también la cascada del complemento ("fijación del complemento"). Un sistema de complemento activado de manera crónica puede destruir las células huésped y la evidencia en acumulación sugiere que este mecanismo puede producir muchas enfermedades degenerativas, incluyendo inflamación y enfermedades neurodegenerativas. En el documento US 6.197.294 (Neurotech) se describen detalles adicionales de esta realización de la invención.

Según esta realización, la línea celular comprende además una construcción que comprende un promotor operativamente unido a una secuencia polinucleotídica que codifica para una proteína de fusión que comprende una proteína inmunoestimuladora de la superficie celular unida en el extremo amino terminal a un segundo polipéptido de la superficie celular, en la que el segundo polipéptido de la superficie celular comprende una región transmembrana, en la que tras la expresión, la proteína de fusión se expresa en la superficie celular.

Preferiblemente, el polipéptido inmunoestimulador de la superficie celular activa fagocitos pero no se fija al complemento. En una realización, el polipéptido inmunoestimulador de la superficie celular es una región de IgG, preferiblemente Fc. El segundo polipéptido de la superficie celular puede ser una región bisagra del receptor de transferrina.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

5 Clonación y expresión de NGF

Clonación de NGF a partir de ADN genómico

Se purificó ADN genómico de células HEK-293 tal como se describió anteriormente (Current Protocols in Molecular Biology). Se amplificó todo el marco de lectura abierto de NGF a partir del ADN genómico mediante PCR utilizando los cebadores hNGFs+BamHI (5'-TATAGGATCCCTCTGAGGGACCCAGAACT-3'; SEQ ID No 24) y hNGFs+XhoI (5'-TATACTCGAGCAGGTCAGGCTCTTCTCAC-3'; SEQ ID No 25) en condiciones estándar. Se purificó y se clonó el producto resultante de la PCR en los sitios BamHI/XhoI en pNS1n para dar pNS1n.hNGF. pNS1n es un vector adaptado derivado de pcDNA3 (Invitrogen) con expresión bajo el control del promotor de citomegalovirus que porta el marcador de resistencia neo en lugar de zeo (Jensen *et al* 2002, J Biol Chem, 277: 41438-41447). En la figura 9 se muestra la secuencia codificante del NGF clonado.

Adición de Kozak

Se añadió una secuencia consenso de Kozak (Marylin Kozak, Nucleic Acids Res. 26 de octubre de 1987; 15(20): 8125-48.) a la secuencia de NGF mediante PCR utilizando los cebadores NGF+Kzks (5'-TACAGGATCCGCCGCCG CCATGTCCATGTTGTTCTACAC-3'; SEQ ID No 26) y NGF 457as (5'-TTGATGTCTGTGGCGGTGGT-3'; SEQ ID No 27) en condiciones estándar usando pNS1n.hNGF como molde. Se digirió el producto resultante con BamHI y EcoRI y se volvió a clonar en pNS1n.hNGF usando los mismos sitios de restricción. El vector resultante se denominó pNS1n.KhNGF.

Crecimiento y transfección de líneas celulares

Se hicieron crecer células ARPE-19 (número de registro de ATCC CRL-2302, Dunn KC *et al.* ARPE-19, una línea de células epiteliales pigmentarias de la retina humanas con propiedades diferenciadas. Exp. Eye Res. 62: 155-169, 1996.) en medio DMEM/F12 (REF invitrogen) complementado con 10% de FBS (REF Hyclone) en 5% de CO₂ a 37°C.

Análisis de células transfectadas de manera transitoria

Se hicieron crecer células ARPE-19, CHO, HEK293T y HiB5 tal como se describió anteriormente (Tornøe *et al*, Gene, 297: 21-33 (2002)) y se sembraron en placas de 6 pocillos seguido por transfección por triplicado con pNS1n.hNGF o pNS1n.KhNGF usando Fugene6 según las recomendaciones del fabricante. Se determinó que las eficacias de la transfección eran comparables entre líneas celulares mediante transfecciones paralelas con un plásmido que expresa EGFP seguido por análisis de citometría de flujo. 72 h tras la transfección, se recogieron los medios de crecimiento media y se sometieron a análisis de ELISA para NGF usando el kit de ELISA para NGF β humano DuoSet (DuoSet ELISA Development System, R&D systems) según las recomendaciones del fabricante. Se calcularon todos los valores como medias de los datos por triplicado y se normalizaron para la liberación de NGF obtenida de células CHO transfectadas con pNS1n.hNGF fijado al valor arbitrario de 100. En la figura 1 se muestran los resultados del experimento. Tal como se esperaba, ARPE-19 y HiB5 produjeron significativamente menos NGF en comparación con las líneas celulares de producción de proteínas bien establecidas HEK293T y CHO. Además, en todas las líneas celulares excepto en CHO, la adición de una secuencia consenso de Kozak pareció aumentar sustancialmente la secreción de NGF recombinante.

Ejemplo 2

Expresión de NGF usando transcritos que contienen intrones

Adición de intrón quimérico

Se liberaron fragmentos de BstZ17I/NheI de pNS1n.hNGF y pNS1n.KhNGF. Se digirió pCI-neo (Promega Inc) con BamHI, se formaron extremos romos y se digirió con NheI. Se clonaron los fragmentos que contenían NGF de pNS1n.hNGF y pNS1n.KhNGF en el fragmento de estructura principal de pCI-neo para dar pCIn.hNGF y pCIn.KhNGF, respectivamente. Una parte de la secuencia nucleotídica del pCIn.hNGF se expone en la figura 10 comenzando con la primera base del promotor de CMV. Para comparación, en la figura 11 se muestra una parte similar de pCIn.KhNGF. La secuencia consenso de Kozak (subrayada) está ubicada en las bases n° 1128 a 1133 (figura 11).

pNN

Se clonó el NGF humano mediante PCR a partir de ADN genómico humano utilizando los siguientes cebadores: cebador en 5': 5'-TATAGGATCCCTCTGAGGGACCCAGAACT-3' (SEQ ID No 24), cebador en 3': 5'-TATACTC GAGCAGGTCAGGCTCTTCTCAC-3' (SEQ ID No 25). Se cortó el fragmento de PCR de 839 pb con BamHI y XhoI y se insertó entre los sitios BamHI y XhoI de pNS1n. pNS1n es un vector adaptado derivado de pcDNA3 (Invitrogen)

ES 2 315 842 T3

con expresión bajo el control del promotor de citomegalovirus que porta el marcador de resistencia neo en lugar de zeo (Jensen *et al* 2002, J Biol Chem, 277: 41438-41447). En la figura 4 se muestra un mapa de vector de pNS1n. En la figura 3 se muestra un mapa de vector de pNN.

pNRN

Se amplificó mediante PCR el intrón A de la preproinsulina II de rata a partir de ADN genómico aislado de células HiB5, como un fragmento de 189 pb usando los siguientes cebadores: cebador en 5': 5'-TATAAAGCTTTAAGT GACCAGCTACAGTCG-3' (SEQ ID No 28) y cebador en 3': 5'-TAGGATCCGTTGGAACAATGACCTGGAAG-3' (SEQ ID No 29). Se cortó el fragmento de PCR con HindIII y BamHI y se insertó entre los sitios HindIII y BamHI de pNN dando como resultado el vector de expresión pNRN. En la figura 14 se muestra una parte de la secuencia de nucleótidos de pNRN que abarca desde la primera base del promotor hasta la secuencia codificante de NGF. El intrón se muestra en minúsculas.

pUN

Se escindió el NGF humano (hNGF) de pNN con BamHI y XhoI y se insertó entre los sitios BamHI y XhoI de pUbi1z (Johansen *et al* 2003, J Gene Medicine, 5:1080-1089.). En la figura 5 se muestra un mapa de vector del vector de expresión resultante. En la figura 13 se muestra la parte de la secuencia de nucleótidos que abarca desde la primera base del promotor y hasta la secuencia codificante de NGF mostrándose el intrón de ubiquitina en minúsculas.

pUNW

Se escindió el elemento posregulador de marmota (WPPE) de pHsCXW (número de acceso de GenBank AY468486) cortando en primer lugar con la enzima de restricción KpnI seguido por la formación de extremos romos con la polimerasa Klenow y cortando luego con BamHI. Este fragmento de WPPE de 831 pb de semi-extremos romos se insertó entre los sitios XbaI y PmeI de pUN.

Transfecciones

Se utilizó la línea celular ARPE-19 inhibida por contacto en todas las transfecciones. Se hicieron crecer las células ARPE-19 en DMEM/F-12 w/glutamax-1 w/piridoxina (Life Technologies) y 10% de suero FCS. Se llevaron a cabo las transfecciones utilizando FuGene6 (Roche) según el manual del fabricante. Para cada transfección, se hicieron crecer 10^5 células en placas de 6 pocillos 24 horas antes de la transfección. Se usaron 3 μ g de plásmido total por transfección (plásmido de NGF de 1,5 μ g y plásmido de EGFP de 1,5 μ g, siendo este último para fines de normalización). El medio se cambió 24 horas tras la transfección.

Para los experimentos de transfección transitoria, se recogió 1 ml de medio 72 horas tras la transfección para realizar las pruebas de ELISA (véase más adelante), y se determinó el número de células en cada pocillo, es decir se midió la producción de NGF durante 48 horas. Además, las células se sometieron a análisis de FACS para determinar la eficacia de la transfección. Se llevaron a cabo transfecciones estables transfecando $2,4 \times 10^6$ células usando 10 μ g de plásmido. Setenta y dos horas tras la transfección se sometieron los transfectantes con pNRN a selección con G418 (800 μ g/ml), mientras que se hicieron crecer los transfectantes con pUN, pUNW o pUNWI en presencia de zeocina 150 μ g/m. Se recogieron las colonias tras 13-14 días y se transfirieron a placas de 48 pocillos y se hicieron crecer. Las colonias se hicieron crecer hasta la confluencia en las placas de 48 pocillos. Se midieron los niveles de secreción de hNGF mediante ELISA para NGF (véase más adelante) a partir de 400 μ l de sobrenadante de cultivo incubados 4 horas con las células. Se determinó el número de células en el momento de la recogida del sobrenadante.

Análisis de clones estables basado en el vector de expresión pCI

Para generar clones de células recombinantes, se transfectaron las células con plásmidos linealizados utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6 (REF Roche) según las recomendaciones del fabricante. Tras la transfección, se seleccionaron clones recombinantes en medios de crecimiento complementados con G418 (REF Sigma) y se aislaron usando técnicas de cultivo celular convencionales. Se sembró un número fijo de células en medio de crecimiento seguido por sustitución de los medios tras la unión celular. Tras 4 h de incubación, se extrajeron los medios y se sometieron a análisis de ELISA para NGF utilizando el kit de ELISA para NGF β humano DuoSet (REF R&D systems) según las recomendaciones del fabricante. Se calcularon los valores de ELISA como ng de NGF/ 10^5 células/24 h. En la figura 2 se muestran los niveles de NGF para clones representativos con y sin intrón transfectado con pCIn.hNGF y pNS1n.hNGF, respectivamente. La adición de un intrón aumentó significativamente la liberación de NGF en 10-20 veces de todos los clones transfectados con pCIn.hNGF en comparación con los clones transfectados con pNS1n.hNGF sin intrones. Aparentemente, la presencia de un intrón es esencial en la obtención de altos niveles de NGF recombinante a partir de una línea celular transfectada.

Secreción de NGF a partir de los vectores de expresión pNN, pNRN, pUN y pUNW

Se transfectaron las cuatro construcciones de plásmido diferentes descritos anteriormente en células ARPE-19. Se midieron los niveles transitorios de secreción de NGF humano mediante un ELISA para NGF en sobrenadantes en cultivo. También se aislaron clones estables de cada transfección y se sometieron a prueba para determinar la secreción

de NGF mediante el ELISA para NGF. Los resultados se muestran en las figuras 6 (transfecciones transitorias) y 7 (clones estables).

En los cultivos transitorios, la presencia del intrón A de la insulina II de rata conduce a un aumento de aproximadamente 10 veces en los niveles de NGF secretados (compárese pNN con pNRN, figura 6). En los clones estables, el intrón A de insulina II de rata produce un aumento incluso mayor en el NGF secretado (comparar pNN con pNRN en la figura 7). Los clones estables transfectados con construcciones con el promotor de ubiquitina (que también contienen un intrón) muestran niveles de NGF secretados comparables a la construcción con intrón de insulina de rata (pNRN y pUN, figura 7) y mucho mayores que los niveles de NGF de los clones estables transfectados con la construcción pNN. A partir de las barras de datos promedio en la figura 7, parece que el elemento WPRE no ejerce un efecto perceptible sobre los niveles de NGF secretado cuando hay un intrón en el transcrito.

Ejemplo 3

Comparación de clones transfectados estables

Se seleccionaron clones transfectados con pCIn.hNGF, pCIn.KhNGF y pNS1n-rINSintroA-hNGF (pNRN) tal como se describió anteriormente. Estos tres vectores de expresión dieron los mayores niveles de liberación de NGF en la transfección transitoria y estable. La liberación de NGF se midió tal como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 8. Todos los clones seleccionados secretaron más de 5 ng de NGF/10⁵ células/24 horas.

Los clones n° 33 (NGC-0233) y n° 95 (NGC-0295) se han depositado según el Tratado de Budapest en la DSMZ, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania, con los números de registro DSM ACC2706 y DSM ACC2707, respectivamente.

Ejemplo 4

Evaluación del procesamiento de NGF a partir de clones transfectados

El fin de este experimento fue analizar el NGF secretado a partir de clones de ARPE-19 transfectados en análisis de inmunotransferencia de tipo Western para confirmar el procesamiento correcto del NGF secretado.

Experimento 1

Brevemente, se recogió medio condicionado del clon 84, el clon 23 de ARPE-19/pCIKhNGF (figura 8) y las células ARPE-19 originales. Tras la recogida del medio, se contaron las células y se lisaron en tampón de muestra. Como control se usó hNGF β recombinante de R&D systems, número de catálogo 256-GF-100.

Se purificó parcialmente el NGF secretado a partir del medio condicionado. En resumen, se recubrió una placa de 96 pocillos con 25 μ g/ml de Fc de cabra anti-ser humano (Jackson, número de catálogo 209 005 098) y se bloqueó con BSA al 1%. Tras el lavado, se incubaron los pocillos con la proteína de fusión TrkA/Fc humana recombinante (R&D Systems n° 175-TK). Posteriormente se añadió a los pocillos el medio condicionado en el que el NGF se unía a TrkA inmovilizada. Se eliminó por lavado la proteína no unida y el NGF unido se eluyó con tampón de muestra (que incluía DTT).

Se cargaron muestras hervidas y desnaturalizadas en un gel de SDS en gradiente del 8-18%, se expusieron a SDS-PAGE y se realizó una transferencia a una membrana de PVDF. Se detectó el NGF usando un anticuerpo frente a NGF (anticuerpo de cabra anti-NGF β humano con número de catálogo AF-256-NA de R&D systems) y un anticuerpo anti-cabra unido a HRP. Detección con ECL+.

Experimento 2

Igual que en el experimento 1, pero las células se hicieron crecer en medio libre de suero durante 24 horas antes de recoger las células y el medio condicionado.

Resultados

Lisados: sólo los lisados de los clones transfectados con pCInKhNGF mostraron una banda correspondiente a pro-NGF.

Medio condicionado: el medio condicionado tanto del clon 23 y como del 84 mostraron bandas correspondientes al monómero de NGF β así como al dímero de NGF β . Las bandas del NGF β recombinante control mostraron una razón correspondiente entre dímero y monómero.

Conclusión

Sólo las células transfectados con pCInKhNGF mostraron secreción de cantidades detectables de NGF en contraste con las células ARPE-19 originales. El peso molecular de las bandas correspondientes al monómero y al dímero de NGF confirmó que el NGF se secretaba con el procesamiento correcto.

Experimento 3

El fin de este experimento fue analizar el NGF secretado de clones que producen NGF en análisis de inmunotransferencia de tipo Western para confirmar el correcto procesamiento del NGF secretado. Se escogieron cuatro clones de ARPE-19 (nº 70, 95, 33 y 48) y un clon de NTC200 (nº 68, transfectado con pCIn.hNGF). La célula NTC200 es una subpoblación de la línea celular ARPE-19 y se hizo crecer de manera similar (Tao *et al*, Invest Ophthalmol Vis Sci (43), 10:3292-3298 (2002)).

Para evaluar la expresión y el procesamiento de NGF en clones que producen NGF de manera estable, se sembró un número fijo de células en medio de crecimiento. Al día siguiente, se sustituyó el medio por medio libre de suero endotelial humano (HE-SFM) de Invitrogen (nº de catálogo 11111-044) o HyQ®CDM4-Retino™ de HyClone (nº de catálogo SH30520). Tras una incubación de 24 h, se recogió el medio condicionado de los clones que producen NGF y las células ARPE-19 originales y se añadió 5X tampón de muestra concentrado (con DTT). Se diluyó hNGF β recombinante (R&D systems nº 256-GF-100) en 1x tampón de muestra y se usó como control positivo.

Se cargaron muestras hervidas y desnaturalizadas en un gel de SDS en gradiente del 8-18%, se expusieron a SDS-PAGE y se realizó una transferencia a una membrana de PVDF. Se detectó el NGF usando un anticuerpo frente a NGF (anticuerpo de cabra anti-NGF β humano con número de catálogo AF-256-NA de R&D systems) y un anticuerpo anti-cabra unido a HRP. Detección con ECL⁺.

Resultados (figura 23)

El medio condicionado de los cuatro clones de ARPE-19 (nº 70, 95, 33 y 48) mostraron bandas correspondientes al monómero de NGF β (13 kDa), mientras que no hubo bandas inmunorreactivas en el medio condicionado de las células ARPE-19 originales. El NGF en medio condicionado del clon nº 68 de NTC200 fue indetectable mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Conclusión

Sólo las células transfectados con las construcciones pCIn.hNGF, pCIn.KhNGF y pNS1n.rINSintrA-hNGF mostraron secreción de NGF. El peso molecular de la banda correspondiente al monómero de NGF confirmó que se secretaba NGF en HE-SFM con el procesamiento correcto.

Ejemplo 5

Evaluación de la liberación de NGF de clones estables confluentes

Para evaluar la estabilidad de la liberación de NGF en cultivos confluentes de clones estables, se sembró un número fijo de células en medio de crecimiento. Al día siguiente, se sustituyó el medio por medio libre de suero endotelial humano (HE-SFM) de Invitrogen (nº de catálogo 11111-044). Tras una incubación de 4 h, se eliminaron los medios y se sometieron a análisis de ELISA para NGF usando el kit de ELISA para NGF β humano DuoSet (REF R&D systems) según las recomendaciones del fabricante. Los valores de ELISA se calcularon como ng de NGF/ml/24 h. Se permitió que las células crecieran hasta la confluencia y se mantuvieron en cultivo durante 6 semanas. Se determinó la liberación de NGF en los medios de 4 h cada semana. En la figura 21 se muestran los niveles de NGF en HE-SFM para clones representativos transfectados con las construcciones pCIn.hNGF, pCIn.KhNGF y pNS1n.rINSintrA-hNGF, respectivamente. Al final del experimento, las células se trataron con tripsina y se contaron. La figura 22 muestra la liberación de NGF durante 6 semanas calculada como ng de NGF/10⁵ células/24 h. Debe observarse que las células en el clon nº 68 son más grandes que las de otros clones, lo que conduce a un número de células inferior en los cultivos confluentes, lo que explica la diferencia relativa entre la liberación de NGF para este clon en la figura 21 y la figura 22. Los clones nº 68 y nº 16 son células NTC-200 (véase el ejemplo 4) transfectadas con pCIn.hNGF. Los clones restantes son clones de ARPE-19 transfectados con construcciones de expresión tal como se muestra en la figura 8.

Ejemplo 6

Bioactividad de NGF medida en ensayos de PC12

Las células PC12 son células de feocromocitoma que expresan TrkA y que se han usado ampliamente como un sistema modelo para la diferenciación inducida por el NGF. Responden a NGF mediante la detención del crecimiento y la extensión de neuritas largas y un fenotipo similar a las neuronas del sistema nervioso simpático. En este experimento, se utilizó un subclón de células PC12 células para someter a prueba la bioactividad de NGF producido por clones de ARPE-19 transfectados. Se usó hNGF β recombinante (R&D systems nº 256-GF-100) como control positivo.

Se sembraron células ARPE-19 originales y clones que producen NGF en frascos T25 (750.000 células/frasco). Al día siguiente, las células se cambiaron a medio de crecimiento fresco. Tras 24 h, se recogió el medio condicionado y se añadió a las células PC12.

ES 2 315 842 T3

Se cultivaron las células PC12 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con glucosa 4,5 g/l y glutamax (Life Technologies n° 32430-027) con el 7,5% de suero de caballo donante (Life Technologies n° 16050-098) y 7,5% de FBS (Life Technologies n° 10099-141) en presencia de 5% de CO₂ a 37°C. El medio se cambió cada 2-3 días y las células se subcultivaron 1:3 - 1:6 dos veces a la semana vaciando el frasco y dispensándolo a nuevos frascos.

Se sembraron las células PC12 para su diferenciación en placas de 24 pocillos recubiertas con colágeno a una densidad de 15.000 células/cm² (30.000/ml, 1 ml/pocillo) en medio de crecimiento con suero. Al día siguiente, se cambió el medio a 1) medio de crecimiento de ARPE-19 complementado con NGF β humano recombinante, para dar concentraciones finales de 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 2 nM, 2) medio condicionado de clones de ARPE-19 que producen NGF (en diluciones diferentes), 3) medio condicionado de células ARPE-19 originales (sin diluir), 4) medio de crecimiento de ARPE-19. Los cultivos se inspeccionaron diariamente para determinar la excrecencia de neuritas y se tomaron fotografías tras una incubación de 3-5 días.

Resultados: El medio condicionado de los clones de ARPE-19 transfectados para expresar en exceso el NGF indujo la excrecencia de neuritas tal como se esperaba.

Ejemplo 7

Preparación de cápsulas para su uso en el SNC

Los dispositivos están fabricados de polisulfona (PS), o polietersulfona (PES) o una membrana de fibra hueca de polímero equivalente con un diámetro exterior de 800-1000 μ m y un espesor de pared de aproximadamente 100 μ m. Un material de armazón poroso que consiste en poli(alcohol vinílico) (PVA) insertado en la cavidad de la fibra de membrana garantiza la distribución y la unión celular apropiadas de la línea celular. Finalmente, un anclaje fabricado de poliuretano (PU) o un material equivalente fijado al extremo del dispositivo proporciona un medio para retirar la cápsula tras el implante.

Las cápsulas utilizadas para las pruebas preclínicas (en ratas) tienen aproximadamente 5 mm de largo. Las cápsulas contempladas para su implante en cerebros humanos tienen aproximadamente 20 mm de largo.

La carga celular se produce a través de un segmento de cilindro y un acceso unido al dispositivo de fibra hueca en el extremo distal al anclaje (figura 18). Se infunden las células NGF preparadas como una suspensión celular única en el acceso, se retira el segmento de cilindro y se sella el orificio de infusión con pegamento. Por cada mm de longitud de los dispositivos, se cargan aproximadamente 10.000 células que expresan NGF. Los dispositivos se mantienen en medios hasta su uso.

Las cápsulas para su implante en cerebros de rata estaban fabricados con los materiales siguientes:

Membrana: Membrana de fibra hueca de polisulfona (PS90/700 de Minntech Corp, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.), con un punto de corte de peso molecular de 90 kDA. Dimensiones: 700 μ m +/- 50 μ m de diámetro interno, 100 μ m +/- 20 μ m de pared. Se cortó la fibra hueca a longitudes de aproximadamente 5 mm. Espuma: espuma de PVA, producto número 160 LD de Hydrofera Inc, Cleveland, Ohio, EE.UU. Se cortó la espuma de PVA para ajustarse al diámetro interno de la fibra hueca.

Tubo de carga: Copolímero de perfluoroalcoxilo, 0,0037" +/- 0,0005" de DI; 0,005" +/- 0,001" de pared. De Zeus Industrial Products, Orangeburg, Carolina del Sur, EE.UU. El tubo de carga se pega a la fibra hueca en un extremo y al cilindro en el otro extremo.

Cilindro: Producto n° P/N 02030200 Rev 1, de Abtec, Bristol, PA, EE.UU.

Pegamento para pegar el tubo de carga al cilindro: Dymax 201-CTH de Diatom, Hvidovre, Dinamarca.

Adhesivo para la fibra hueca: Dymax 1181-M de Diatom, Hvidovre, Dinamarca.

Las cápsulas se ensamblaron en un entorno controlado, se envasaron en tubos de ensayo Falcon de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson, número de catálogo 352096) y se esterilizaron mediante inyección de etanol al 70% y se secaron mediante aire estéril en una campana de flujo, antes de llenarlos con células.

Ejemplo 8

Pruebas in vitro de clones de células ARPE-19 que producen NGF encapsuladas

Se expandieron las células en medios de crecimiento tal como se describió anteriormente. El día antes de la encapsulación, se trataron las células con tripsina, se contaron y se volvieron a sembrar en los medios de crecimiento. Inmediatamente antes de la encapsulación, se trataron las células con tripsina, se contaron, se lavaron y se resuspendieron en medios libres de suero endoteliales humanos (HE-SFM, Invitrogen). La suspensión se mantuvo en hielo durante todo el experimento. Los dispositivos se fabricaron según las especificaciones del ejemplo 7. Se inyectaron cuidadosamente las células en el dispositivo utilizando una jeringuilla Hamilton. Para los dispositivos experimentales,

ES 2 315 842 T3

se inyectaron 50.000 células en 8 μ l en cada dispositivo. Tras la encapsulación celular y el sellado de los dispositivos, se transfirieron los dispositivos a HE-SFM. Se sembraron las células restantes en medios de crecimiento en placas de cultivo celular convencionales para confirmar la viabilidad celular. Durante todo el experimento, se mantuvieron los dispositivos en HE-SFM a 37°C/5% de CO₂. Se tomaron muestras en puntos de tiempo deseados para realizar un ELISA para NGF: Se lavaron los dispositivos en HE-SFM y posteriormente se incubaron en 1 ml de HE-SFM durante 4 h. Se midió el NGF liberado utilizando el kit de ELISA para NGF humano DuoSet (R&D systems). En la figura 20 se muestra la cantidad de NGF secretada por dispositivo.

Al final del experimento, se fijaron los dispositivos en paraformaldehído, se embebieron y se cortaron, y se tiñeron con eosina/hematoxilina usando técnicas de histología convencionales (véase la figura 19). Se determinó la supervivencia celular de cortes del dispositivo. Los cortes del dispositivo confirmaron que la supervivencia *in vitro* fue excelente.

Ejemplo 9

Implante intratecal de las cápsulas

Puede conseguirse el implante intratecal a lo largo del conducto vertebral, preferiblemente a nivel lumbar por debajo del cono medular. Se practica una pequeña incisión a nivel lumbar y se utiliza una aguja espinal para entrar en el espacio intratecal. Una vez estabilizado el flujo de LCR, se inserta un hilo guía en el espacio intratecal y se utiliza un sistema dilatador para entrar en el espacio. Se retira el hilo guía y se inserta el dispositivo encapsulado en el espacio, de modo que la parte activa esté completamente encerrada en el compartimento del LCF. Se sujeta el anclaje a la fascia lumbar mediante un hilo de sutura no resorbible y utilizando preferiblemente una grapa de seguridad. Se cierra la piel utilizando procedimientos quirúrgicos convencionales.

Ejemplo 10

Implante en el prosencéfalo colinérgico basal

Bajo anestesia general o anestesia local y sedación, se sujeta un marco estereotáctico nequirúrgico a la cabeza del paciente. Se aplica una marca fiducial y una obtención de imágenes por RMN posterior para determinar la zona anatómica y las coordenadas del implante. El implante también puede guiarse mediante obtención de imágenes con tensor de difusión y mapeo de la dosis, utilizando un equipo de navegación y software a medida suministrado por BrainLAB AG. A continuación se lleva al paciente al quirófano donde se prepara y se cubre con el paño quirúrgico. Basándose en los datos de la imagen estereotáctica, se practica una pequeña incisión en la piel de manera frontolateral y se practica un pequeño trepanado a través del cráneo. Se penetra la duramadre y las meninges subyacentes mediante la incisión y se inserta una cánula guía con un trocar en la zona objetivo basal del prosencéfalo. Se extrae el trocar y se desliza el dispositivo hacia su posición. Se extrae la guía y se sujeta el anclaje del dispositivo en el cráneo con una placa de titanio o grapa de retención a medida. Se cose la piel próxima con hilo de sutura de nailon de 3-0 interrumpido. Se repite el procedimiento en el lado opuesto.

Ejemplo 11

Preparación de cápsulas para su uso oftálmico

El procedimiento de encapsulación es tal como sigue: Las fibras huecas están fabricadas de polietersulfona (PES) con un diámetro externo aproximado de 720 μ m y un espesor de la pared de aproximadamente 100 μ m (AKZO-Nobel Wuppertal, Alemania). Estas fibras se describen en las patentes estadounidenses números 4.976.859 y 4.968.733. Los dispositivos comprenden:

- una membrana de fibra hueca semipermeable de polietersulfona fabricada por AKZO Nobel Faser AG;
- un segmento de membrana de cilindro;
- un extremo delantero de resina de metacrilato curado ligero (LCM); y
- un anclaje de silicona.

Los dispositivos tienen un elemento de sujeción de tabique en el extremo proximal para la entrada de la carga celular y están sellados en el extremo distal. Se preparan las células de NGF como una suspensión celular única y se infunden en el acceso septal a una densidad de 15 K células por μ l tras mezclar 1:1 con colágeno fisiológico (Vitrogen: PC-1). Tras la infusión de 1,5 μ l de la suspensión celular, se extrae el tabique y se sella el acceso de entrada con resina de LCM 23. Los componentes del dispositivo están comercialmente disponibles. El adhesivo de LCM está disponible de Ablestik Laboratories (Newark, Del.); Luxtrak Adhesives LCM23 y LCM24).

Ejemplo 12

Implante de células encapsuladas bajo el espacio de Tenon (bajo la cápsula de Tenon)

- 5 Se prepara al paciente y se le cubre con el paño quirúrgico de la forma habitual tras administrar una inyección retrobulbar de 3 cc de xilocaína al 2% en el ojo. Se inserta un espéculo por debajo de los párpados superior e inferior. Se coloca en posición el microscopio para el estudio de la córnea. Se practica una incisión perpendicular a través tanto de la conjuntiva como de la cápsula de Tenon en el cuadrante superotemporal aproximadamente 4 mm por detrás del limbo. La incisión se extiende aproximadamente 4-5 mm por detrás del limbo. En este punto, se insertan unas tijeras de punta roma a través de la incisión y se usan para volver a diseccionar 5 mm adicionales más o menos en la superficie de la esclerótica. En este punto, se coloca en su sitio un dispositivo de membrana tal como se describe en el ejemplo 7 a través de esta incisión para llegar a reposar sobre la superficie de la esclerótica. El extremo del dispositivo que está más próximo al limbo tiene un pequeño bucle que está unido al dispositivo cargado de células. En este punto, se hace pasar un hilo de sutura de nailon nº 10-0 a través de este bucle y se sutura en la esclerótica superficial para anclar la membrana a la esclerótica. En este punto, tanto la cápsula de Tenon como la conjuntiva se cierran con hilos de sutura de tripa plana nº 6-0. Se extrae el espéculo y se concluye el procedimiento.

Ejemplo 13

20 *Implante de células encapsuladas en la cavidad vítrea*

- Se prepara al paciente y se le cubre con el paño quirúrgico de la forma habitual tras administrar una inyección retrobulbar de xilocaína al 2% en el ojo. En este punto, se inserta un espéculo en los párpados superior e inferior y se coloca en posición el microscopio. Se practica una pequeña incisión a través tanto de la conjuntiva como de la cápsula de Tenon paralela y aproximadamente 4 mm desde el limbo en el cuadrante supranasal. Se cauteriza la zona expuesta con un aparato de cauterización de campo húmedo. Entonces se practica una incisión de 3 mm perpendicular al limbo aproximadamente 4 mm por detrás del limbo. La incisión se practica a través de la esclerótica y en la cavidad vítrea con una cuchilla del nº 65. Cualquiera de las cavidades vítreas que se presentan en la incisión se corta y se extrae. En este punto, se inserta un dispositivo de membrana tal como se describe en el ejemplo 7 a través de la incisión en la cavidad vítrea. En el extremo de la membrana, hay un pequeño bucle de 2 mm que está unido a la membrana. El bucle permanece fuera de la esclerótica. Se cierra la esclerótica con hilos de sutura de nailon nº 9-0 interrumpidos. Los hilos de sutura de nailon nº 9-0 también se usan para anclar este bucle del dispositivo a la esclerótica. La conjuntiva se cierra con hilos de sutura de tripa plana nº 60.

35 Ejemplo 14

Pruebas in vivo de clones de células ARPE-19 que producen NGF encapsuladas

- Catorce días antes del implante, se encapsularon las células tal como se describe en el ejemplo 8. Se encapsularon muestras del clon nº 33 y del clon nº 95, así como las células ARPE-19 originales. Hasta el implante, las células encapsuladas se mantuvieron en HE-SFM a 37°C/5% de CO₂. Un lote de cápsulas se mantuvo *in vitro* durante diez semanas. Se midió la liberación de NGF (durante 4 horas) dos veces a la semana tal como se describe en otra parte. Se cambió el medio en relación con las mediciones de liberación de NGF. Tras dos semanas *in vitro*, se implantó un lote de cápsulas en cerebros de rata.

- Se utilizaron ratas Sprague-Dawley hembras de 220 gramos alojadas en ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y con libre acceso a comida para ratas y agua para la cirugía de implante. Se implantaron los dispositivos intraauricularmente en animales anestesiados con isoflurano (1,5-2%) en el sitio descrito por las siguientes coordenadas con respecto al bregma: AP: 0,0, ML: -3,0, DV: -7,5, TB: 0,0. Tras la cirugía, se monitorizó la evaluación del comportamiento general y el peso, un peso sí y otro no. A las 8 semanas tras el implante, se decapitó a los animales. Se extrajeron las cápsulas del cerebro y se enjuagaron una vez en PBS. Se sustituyó el PBS con 1 ml de medio libre de suero y se incubó para la medición de la liberación de NGF tal como se describió anteriormente. Posteriormente se fijaron los dispositivos en paraformaldehído al 4% y se procesaron para el análisis histológico mediante tinción con hematoxilina y eosina. Se diseccionó el cerebro y se enjuagó con solución salina fría durante 1 minuto antes de la preparación en paraformaldehído al 4% y la fijación por inmersión durante la noche a 4°C. Entonces se transfirieron los cerebros a sacarosa al 25%/tampón fosfato 0,1 M y tras 48 horas, se practicaron cortes de 40 µm en un microtomo de congelación. Posteriormente se procesaron los cortes de cerebro para determinar la morfología general (hematoxilina y eosina, violeta de cresilo) (figura 24) y se realizó la inmunohistoquímica de NGF (datos no mostrados).

- 60 El peso y el comportamiento de las ratas fueron normales y no difirieron entre los tratamientos diferentes.

- Los resultados representados en la figura 24 muestran que la supervivencia de las células tras 8 semanas en ratas normales fue excelente para ambos clones que secretan NGF (figura 24a: clon nº 33; figura 24b: clon nº 95). Los resultados en la figura 25 muestran que para las cápsulas mantenidas *in vitro*, la secreción de NGF aumentó marcadamente durante las primeras cuatro semanas, probablemente debido al crecimiento de células dentro de las cápsulas. Desde aproximadamente la semana 4 en adelante, los niveles de NGF fueron estables, entre 0,5 y 1 ng/cápsula para el clon nº 33 y entre 1 y 2 ng/cápsula para el clon nº 95. Las cápsulas explantadas tras 8 semanas *in vivo* (explanje) mostraron niveles de NGF al menos tal altos como los niveles de las cápsulas mantenidas *in vitro*.

ES 2 315 842 T3

Secuencias

	SEQ	ID	Tipo	Anotación	SEQ	ID	No	en	DK	PA
5	No				2004	00064				
	1		N	hpreproNGF	1					
	2		P	hpreproNGF	2					
10	3		P	mpreproNGF	3					
	4		P	rpreproNGF	4					
	5		P	chimppreproNGF	5					
15	6		P	pigpreproNGF (parcial)	6					
	7		P	panNGF (figura 15a)						
20	8		P	panNGF (figura 15b)						
	9		P	NGF130 (figura 16a, parte superior)						
25	10		P	NGF131 (figura 16a, parte inferior)						
30	11		P	NGFR2 (figura 16b, parte superior)						
	12		P	NGFR3 (figura 16b, parte inferior)						
35	13		P	p75lessNGF (figura 17)						
	14		N	pCIn.hNGF parcial	7					
	15		P	N-term. de hNGF						
40	16		N	pCIn.KhNGF parcial	8					
	17		P	N-term. de hNGF						
	18		N	EF1 α .KhNGF parcial	9					
45	19		P	N-term. de hNGF						
	20		N	UbC.hNGF	10					
	21		P	N-term. de hNGF						
50	22		N	rINSintrA.hNGF	11					
	23		P	N-term. de hNGF						
	24		N	hNGFs+cebador BamHI						
55	25		N	hNGFas+cebador XhoI						
	26		N	NGF+cebador Kzk s						
	27		N	NGF cebador 457as						
60	28		N	Cebador rINSintrA en sentido 5'						
	29		N	Cebador rINSintrA en sentido 3'						
65										

REIVINDICACIONES

- 5 1. Línea celular humana que comprende una construcción de expresión integrada de manera estable que comprende las siguientes secuencias:
- un promotor de mamífero,
- 10 una secuencia codificante operativamente unida a dicho promotor, en la que dicha secuencia codificante codifica para NGF, y
- un intrón ubicado en el transcrito.
- 15 2. Línea celular según la reivindicación 1, que es una línea celular monoclonal.
3. Línea celular según la reivindicación 1, que es una línea celular policlonal.
4. Línea celular según la reivindicación 1, que se origina a partir de un cultivo primario.
- 20 5. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la línea celular no se ha immortalizado mediante inserción de un gen de immortalización heterólogo.
6. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la línea celular se inhibe por contacto.
- 25 7. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no es tumorigénica en mamíferos.
8. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que puede sobrevivir a una baja tensión de oxígeno.
- 30 9. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se origina a partir de un cultivo primario.
10. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que puede experimentar al menos 50 duplicaciones.
- 35 11. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que desencadena un bajo nivel de reacción inmunitaria en el huésped humano.
12. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una construcción suicida bajo el control de un promotor inducible y/o constitutivo.
- 40 13. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una construcción que comprende un promotor operativamente unido a una secuencia polinucleotídica que codifica para una proteína de fusión que comprende una proteína inmunoestimuladora de la superficie celular unida en el extremo amino terminal a un segundo polipéptido de la superficie celular, en la que el segundo polipéptido de la superficie celular
- 45 comprende una región transmembrana, en la que tras la expresión, la proteína de fusión se expresa en la superficie celular.
14. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el intrón tiene menos de 10.000 pb de longitud.
- 50 15. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el intrón tiene más de 50 pb de longitud.
16. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho intrón es de origen eucariota.
- 55 17. Línea celular según la reivindicación 16, en la que dicho intrón es de origen mamífero.
18. Línea celular según la reivindicación 17, en la que dicho intrón es de origen humano, de primate o de roedor.
- 60 19. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho intrón se coloca en la UTR en 5' del transcrito.
20. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 18, en la que dicho intrón se coloca dentro de la secuencia que codifica para NGF.
- 65 21. Línea celular según la reivindicación 20, en la que el intrón se coloca en la parte de la secuencia codificante más cercana al codón de iniciación.

ES 2 315 842 T3

22. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho intrón se deriva de un primer intrón.

23. Línea celular según la reivindicación 1, en la que dicho intrón es un intrón de insulina o comprende una secuencia que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con las bases nº 747-865 de SEQ ID No 22.

24. Línea celular según la reivindicación 1, en la que dicho intrón es el intrón del vector pCI (bases nº 890 a 1022 de SEQ ID No 14) o comprende una secuencia que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con las bases nº 890 a 1022 de SEQ ID No 14.

25. Línea celular según la reivindicación 1, en la que dicho intrón es un intrón de promotor de ubiquitina o comprende una secuencia que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con las bases nº 736-1547 de SEQ ID No 20.

26. Línea celular según la reivindicación 1, en la que dicho intrón es un intrón de EF1 alfa (bases nº 609-1551 de SEQ ID No 18) o comprende una secuencia que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con las bases nº 609-1551 de SEQ ID No 18.

27. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia que codifica para NGF comprende una secuencia que codifica para un propéptido de NGF funcional que tiene al menos un 60% de identidad de secuencia con el prodominio de SEQ ID No. 2.

28. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia que codifica para NGF comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) secuencia codificante de NGF beta humano (SEQ ID No 1);
- (b) secuencia codificante de NGF beta de rata, ratón o cerdo (preproNGF);
- (c) secuencia codificante de NGF beta de chimpancé (preproNGF);
- (d) una secuencia que codifica para NGF beta humano maduro (SEQ ID No 2), de rata (SEQ ID No 4), de ratón (SEQ ID No 3), de cerdo (SEQ ID No 6) o de chimpancé (SEQ ID No 5);
- (e) una secuencia que codifica para una variante de NGF bioactivo que comprende una secuencia madura que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la parte madura de SEQ ID No 2.

29. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia codificante de NGF comprende una secuencia que codifica para NGF humano maduro (parte madura de SEQ ID No 2).

30. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia codificante de NGF codifica para una molécula de NGF en la que la parte madura se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) una molécula de NGF maduro en la que la región 25-35 se sustituye por la región 25-35 de BDNF;
- (b) una molécula de NGF maduro en la que la región de aa 94-98 se sustituye por la región 94-98 de BDNF;
- (c) una molécula de NGF maduro en la que la región 23-33 se sustituye por la región 21-33 de BDNF;
- (d) una molécula de NGF maduro en la que la región 92-101 se sustituye por la región 92-101 de BDNF;
- (e) una molécula de NGF maduro en la que uno o más aminoácidos cargados positivamente en los aminoácidos 30-34 y/o 94-98 se sustituyen por aminoácidos no cargados o cargados negativamente;
- (f) una molécula de NGF maduro modificada con capacidad reducida de unirse a p75^{NGFR};
- (g) una molécula de NGF maduro modificada que tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones: G23, H84 y o bien V18 o bien V20;
- (h) una molécula de NGF maduro modificada que comprende al menos los 117 aminoácidos N-terminales de NGF maduro y que tiene sustituciones de aminoácidos en las posiciones G23, H84, V18 y V20 y o bien H84 o bien T81.

31. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia codificante de NGF codifica para NGF maduro con un péptido señal heterólogo.

32. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la secuencia codificante de NGF codifica para un NGF maduro con un propéptido heterólogo.

33. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción integrada de manera estable comprende además una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: secuencia consenso de Kozak, WPRE, aislador de β -globina, potenciador SP163, regiones de cebado en 5' ó 3' no traducidas de los genes tau, TH o APP.

34. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el promotor es un promotor constitutivo.

35. Línea celular según la reivindicación 34, en la que dicho promotor se selecciona del grupo que consiste en CMV, UbiC humano, JeT, RSV, EF-1alfa.

36. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 33, en la que el promotor es un promotor inducible.

37. Línea celular según la reivindicación 36, en la que el promotor inducible se selecciona del grupo que consiste en el promotor Tet-regulable, Mo-MLV-LTR, Mx1, progesterona, RU486.

38. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la construcción integrada de manera estable es un vector de expresión de plásmido de mamíferos.

39. Línea celular según la reivindicación 38, en la que dicho vector de expresión se selecciona del grupo que consiste en: pCI, pSI, pNS, pUbi1z.

40. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 34, en la que dicha construcción integrada de manera estable es un vector de virus.

41. Línea celular según la reivindicación 40, en la que dicho vector de virus se deriva de la familia *Retroviridae* incluyendo lentivirus, VIH, VIS, VIF, VIAE, VIC.

42. Línea celular según la reivindicación 40, que se selecciona del grupo que consiste en alfavirus, adenovirus, virus adenoasociado, baculovirus, VHS, coronavirus, virus del papiloma bovino, Mo-VLM.

43. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se deriva de una célula epitelial.

44. Línea celular según la reivindicación 43, que se deriva de una célula del epitelio pigmentario de la retina (EPR), incluyendo pero sin limitarse a células del EPR primarias.

45. Línea celular según la reivindicación 44, que es una línea celular derivada de ARPE-19.

46. Línea celular según la reivindicación 45, que tiene el número de registro DSM ACC2706.

47. Línea celular según la reivindicación 45, que tiene el número de registro DSM ACC2707.

48. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 42, que se selecciona del grupo que consiste en: líneas celulares de astrocitos, línea celular mesencefálica humana y línea celular endotelial humana.

49. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que puede mantener la producción de un NGF biológicamente activo a un nivel suficiente para mantener su actividad biológica útil durante un periodo mayor de un mes.

50. Línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que puede secretar más de 0,5 ng de NGF biológicamente activo por 10^5 células por 24 horas.

51. Dispositivo de cultivo celular implantable, comprendiendo el dispositivo:

(a) una membrana semipermeable que permite la difusión de NGF a través de la misma; y

(b) una población de células de la línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50 dispuesta dentro de la membrana semipermeable.

52. Dispositivo según la reivindicación 51, que puede secretar más de 0,1 ng de NGF biológicamente activo por 24 horas.

53. Dispositivo según la reivindicación 51, que comprende células que pueden obtenerse de la línea celular que tiene el número de registro DSM ACC2706.

54. Dispositivo según la reivindicación 51, que comprende células que pueden obtenerse de la línea celular que tiene el número de registro DSM ACC2707.

ES 2 315 842 T3

55. Dispositivo según la reivindicación 51, en el que la membrana semipermeable es inmunoaislante.

56. Dispositivo según la reivindicación 51, en el que la membrana semipermeable es microporosa.

5 57. Dispositivo según la reivindicación 56, en el que el punto de corte del peso molecular de la membrana es de 1000 kD o inferior.

58. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 57, que comprende al menos 10^3 células.

10 59. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 58, en el que el volumen del dispositivo es un volumen de 1-10 μ l.

15 60. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 59, en el que la longitud es de al menos 1 mm.

61. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 60, en el que el espesor es de al menos 1000 μ m de profundidad.

20 62. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 61, en el que el espesor de la envoltura es de 2-200 micras.

63. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 62, en el que el dispositivo comprende además un anclaje.

25 64. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 51 a 63, en el que el dispositivo comprende un núcleo que comprende un armazón de espuma reticulada que tiene poros interconectados, variando la densidad de poros de la espuma entre el 20% y el 90%, estando dispersas las células en los poros.

30 65. Dispositivo según la reivindicación 64, en el que el armazón de espuma es un material termoplástico o un elastómero termoplástico.

66. Uso del dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 51 a 65, para la preparación de un medicamento.

35 67. Uso según la reivindicación 66, para el tratamiento de un trastorno neurológico.

68. Uso según la reivindicación 67, en el que el trastorno neurológico es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, traumatismo del SNC, ELA, enfermedad de Parkinson, neuropatía periférica, dolor neuropático y otros estados caracterizados por necrosis o pérdida de neuronas o sus procesos, ya sean centrales o periféricas.

40 69. Uso según la reivindicación 66, en el que el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en: retinopatía diabética, uveítis, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, neovascularización ocular, retinitis y heridas de la córnea.

45 70. Composición farmacéutica que comprende una línea celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 50 unida a una matriz.

50 71. Composición según la reivindicación 70, en la que la matriz se selecciona del grupo que consiste en vidrio y otros óxidos de silicio, poliestireno, polipropileno, polietileno, poli(fluoruro de vinilideno), poliuretano, polialginato, polisulfona, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilonitrilo, poli(acrilamida), policarbonato, polipenteno, nailon, amiladas, gelatina natural y modificada y colágeno natural y modificado, polisacáridos naturales y modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo, nitrocelulosa), agar y magnetita.

55 72. Composición según la reivindicación 70, en la que la matriz sólida puede recubrirse en su superficie externa con factores que promueven la adhesión, el crecimiento o la supervivencia celulares, incluyendo pero sin limitarse a moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, o proteoglicanos o factores de crecimiento.

60 73. Composición según la reivindicación 70, en la que el factor o factores que promueven el crecimiento o la supervivencia se incorporan en el material de la matriz.

74. Composición según la reivindicación 70, en la que la configuración del soporte es esférica, cilíndrica, elíptica, una tira o lámina plana, una forma de aguja o alfiler y similares.

65 75. Composición según la reivindicación 74, en la que el tamaño de perla oscila aproximadamente desde 10 μ m hasta 1 mm de diámetro.

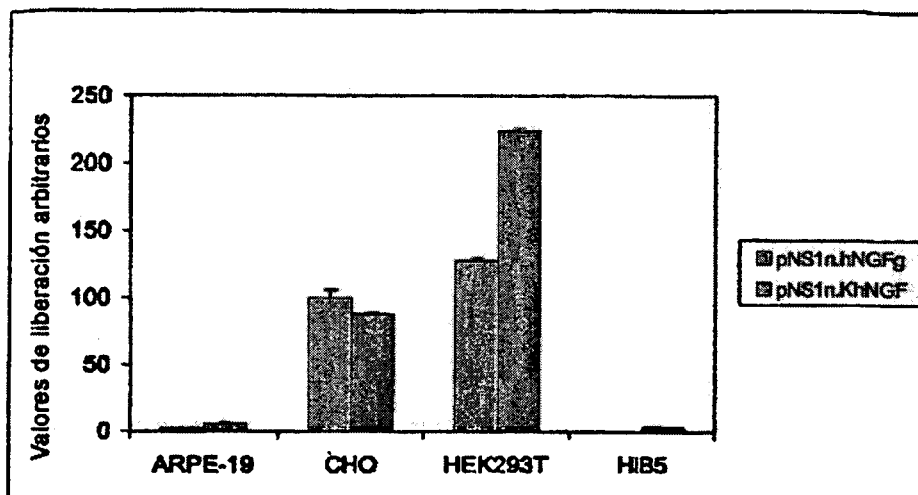


Fig. 1

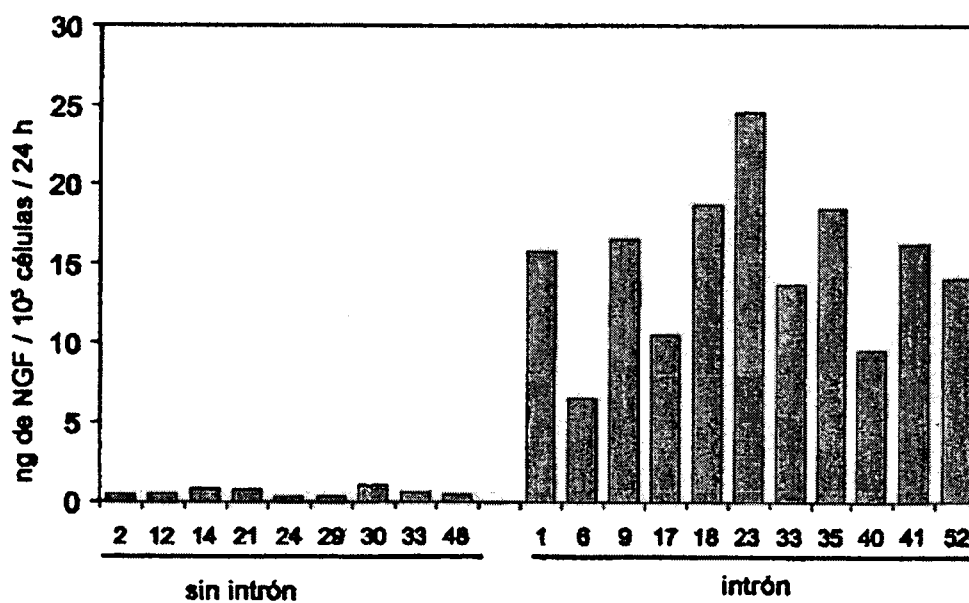


Fig. 2

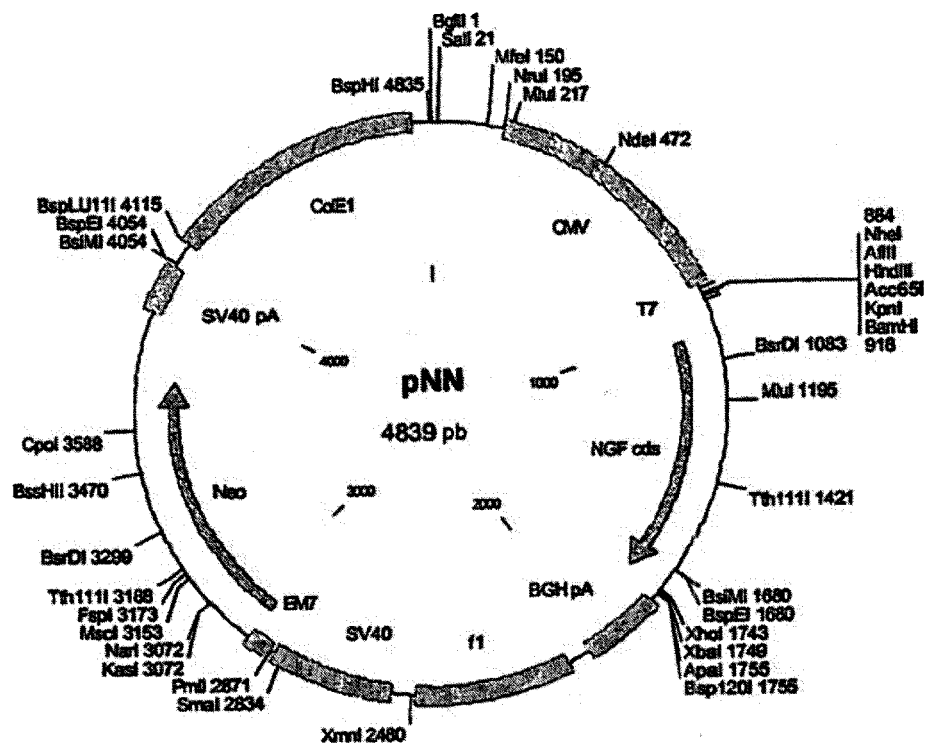


Fig. 3

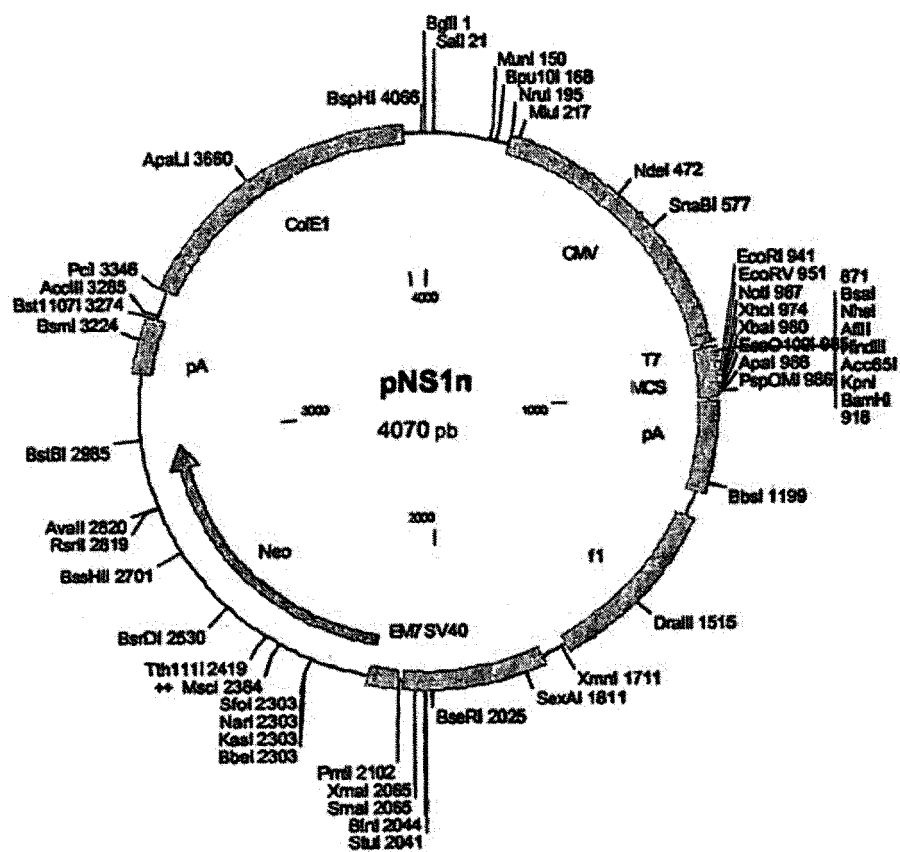


Fig. 4

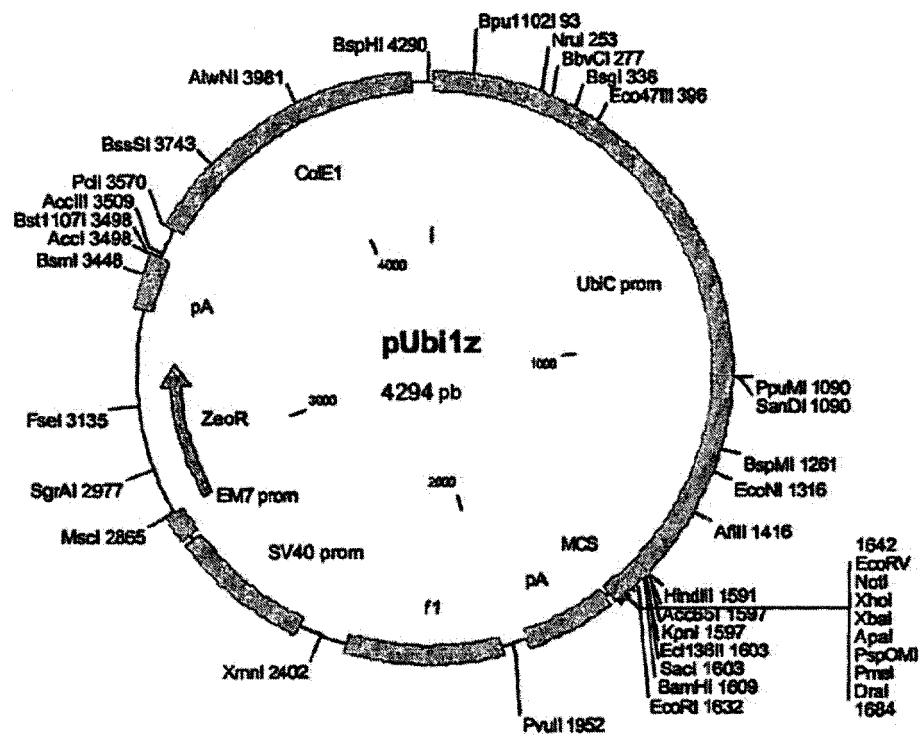


Fig. 5

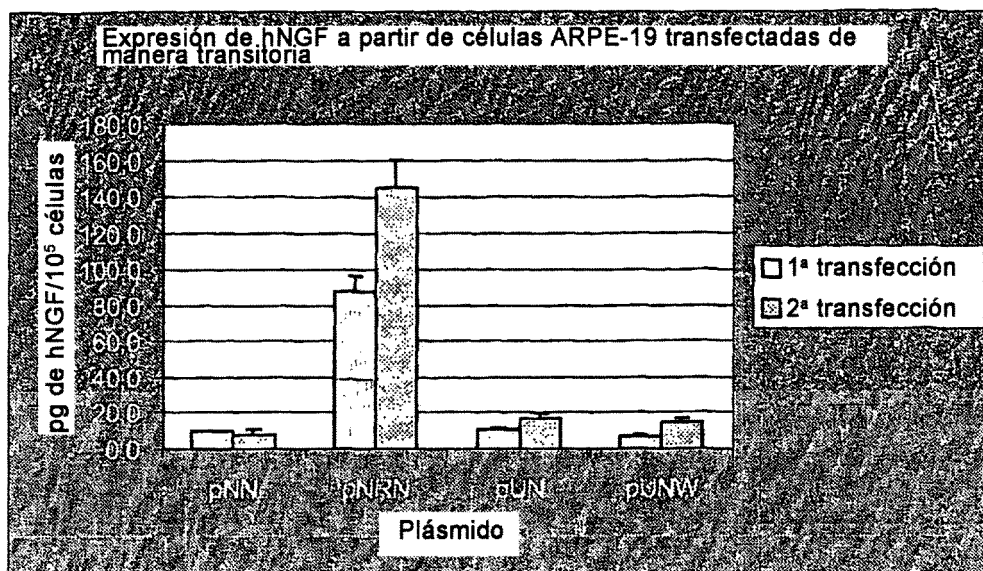


Fig. 6

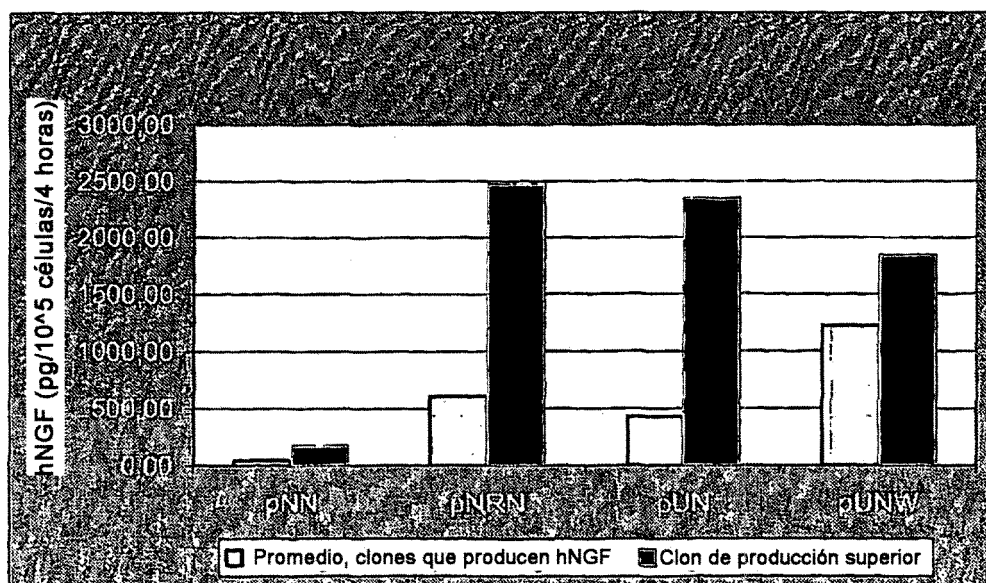


Fig. 7

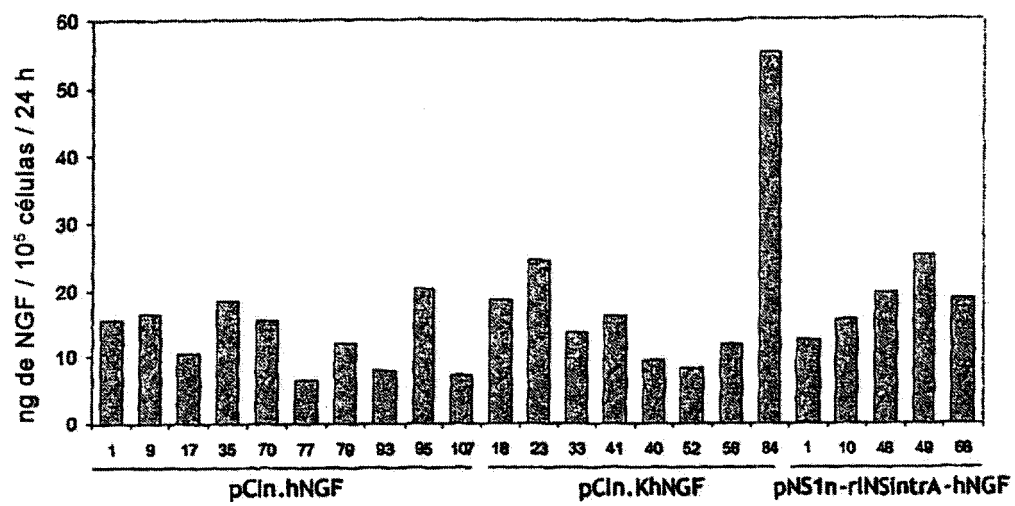


Fig. 8

Secuencia de hNGF:

```

ATGTCATGT TGTTCACAC TGTGATCACA GCTTTCTGA TGGCATACA GCGGMACCA CACTCAGAGA GCATGTCCC TGCAGGACAC ACCATCCCC
>>.....NGF cds.....>
m s m l f y t l i t a f l i g l q a e p h e s n v p a g h t i p
>.....>
AAGTCCACTG GACTAAACTT CAGCATTCOC TTGACACTCC CCTTCGACA GCGCGCAGG CCGCGGCAGC GCGATAGCT GCACGCTGG CGGGCGAGAC
>.....NGF cds.....>
q v b w t k l q h s l d t a l r r a r s a p a a a i a a r v a g q
>.....>
CCGCAACATT ACTGTGACC CCGGCTGTT TAAAGCGG CGACTCGTT CACCCGCTGT GCTGTTTACC ACCAGCCTC CCGGTGAGC TGCAGACACT
>.....NGF cds.....>
t r n i t v d p r l f k k r r l r s p r v l f s t q p p r e a a d t
>.....>
CAGGATCTGG ACTTCGAGGT CGGTGTGCT GCGCCCTTCA ACAGGACTCA CAGGAGCAAG CGGTATCAT CCATCCCAT CTCCACAGG GCGGATTCI
>.....NGF cds.....>
q d l d f e v g g a a p f n r t h r s k r s s s h p i f h r g e f
>.....>
CGGTGTGTA CAGTGTGAGC GTGTGGGTTG GGGATAGAC CACGCCACA GACATCAAG GCAGGAGGT GATGTGTTG GGAGAGTGA ACATTACAA
>.....NGF cds.....>
s v c d s v s v w v g d k t t a t d i k g k e v m v l g e v n i n
>.....>
CAGTGTATTC AATCAGTACT TTTTGAGAC CAAGTGCGG GACCCAAATC CGTTGACAG CCGGTGCCG GGCATGACT CAAGCACTG GATCATAT
>.....NGF cds.....>
n s v f k q y f f e t k c r d p n p v d s g c r g i d s k h w n s y
>.....>
TGTACACGA CTCACACCTT TGTCAAGGCG CTGACCATGG ATGGCAAGCA GGTGCTCTGG CGGTTATCC GGTATGATAC GGCCTGTGTG TGTGTCTCA
>.....NGF cds.....>
c t t t h t f v k a l t m d g k q a a w r f i r i d t a c v c v l
>.....>
GCAGGAGGC TGTGAGAGA GCTTGA
>.....NGF cds.....>
s r k a v r r a -

```

Fig. 9

pCIn.hNGF:

```

1   TCAATATATGG CCATTAGCCA TATTATTTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCTATATCA TAATATGTAC
101  ATTTATATTG GCTCATGTCC AATATGACCG CCAATGTGGC AATTGATTAT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCCAT
201  ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG ACCCCGCCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT
301  AGTAACGCCA ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC CCACCTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTCCG
401  CCCCCTATTG ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCGGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTACGGGACT TTCTACTTGT GCAGTACATC TACGTATTAG
501  TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTT GGCAGTACAC CAATGGGCGT GGATCTCAGG TTGACTCAGG GGTCTCCACC CCATTGACGT
601  CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAATCA ACGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAATG CCGGTTGAC GCAAAATGGC GGTAGGCGTG
701  TACGGTGGGA GGTCATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGA CCGTCAGATC ACTAGAGCTT TTATGCGGT AGTTATACAC AGTTAAATG CTAACGCGCT
801  CAGTCTTCT GACACACACG TCTCGAATTT AAGCTGCACT GACTCTCTTA AGGTAGCCTT GCAGAGTTG GTCTGAGGC ACTGGGCAGG taagtataa
901  ggtacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgttgc tgataggcac otattgggtct tactgacatc
1001 caetttgact ttctctccac aggtgtccac TCCCAGTTCA ATTACAGCTC TTAAGGCTAG AGTACTTAAT ACGACTCACT ATAGGCTAGC GTTTAAACTT
1101 AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCCTCTGA GGGACCCAGA AACTGCTCTT TGACTGCAT TAGTACTCCA TGMAGTCACC CTCATTCTTT TTTCAATCCA
1201 GGTGCATAGC GUAATGTCCA TGTGTGTTCTA CACTCTGATC ACGCTCTTTC TGATCGGCAT ACAGGCGGAA CCACACTCAG AGAGCAATGT CCCTGCAGGA
>>.....NGF cds.....>
      m s m l f y t l i . t a f l i g i q a e p h s e s n v p a g
1301 CACACCATCC CCCAAGTCCA CTGGACTAAA CTTGAGCAAT CCCTTGACAC TGCCTTCC AGAGCCCGCA GCGCCCCGC AGCGCGGATA GCTGCACGCG
>.....NGF cds.....>
      h t i p q v h w t k l q h s l d t a l r r a r s a p a a a i a a r

```

Fig. 10

PCIn.KhNGF:

```

1   TCAATATTGG CCATTAGCCA TATTATTCAI TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA TTGGCCATTG CATAAGTTGT ATCTATATCA TAATATGTAC
101  ATTATATTG GCTCATGTCC AATATGACCG CCATGTTGGC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCAATTAGTT CATAGCCCCAT
201  ATATGGAGTT CCGGTTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG ACCCCCGGCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTTCCCAT
301  AGTAACGCCA ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTAC GGTAATGTC CCACITGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTCCG
401  CCCCATTATG ACGTCAATGA CCGTAATGG CCGGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTACGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG
501  TCATCGCTAT TACCATGGTG ATCGGTTTTT GGCAGTACAC CAATGGGCGT GGATAGGGT TTGACTCAGG GGAATTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT
601  CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAATCA ACGGACTTT CCAAAATGTC GTAACTAGT CGATCGCCG CGATCGCCG GCAAAATGGC GGTAGGCGTG
701  TACGGTGGGA GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTAGTGAA CCGTCAGATC ACTAGAGCT TTATTGGGT GCAGAACTG GTCTGAGGC ACTGGGCAGG taagtataa
801  CAGTGTCTCT GACACACACG TCTCGAATTT AGCTGCACT GACTCTCTTA AGSTAGCCTT GCAGAACTG GTCTGAGGC ACTGGGCAGG taagtataa
901  ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcagagac agagaagact cttgcgttcc tgataggcac ctattgggtot tactgacatc
1001 cactttgcct ttctctccac agtGTCTCCAC TCCAGTTTCA ATTACAGCTC TTAAAGGTAG AGTACTTAAT ACGACTCACT ATAGGCTAGC GTTTAAACTT
1101 AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCGCCGCC GGCATGTCCA TGTGTCTCTA CACTCTGATC ACAGCTTTC TGATCGGCAT ACAGGCGGNA CCACACTCAG
>>
1201 AGAGCAATGT CCCTGCAGCA CACACCATCC CCCAAGTCCA CTGCACTAAA CTTCAAGCATT CCCTTGACAC TGCCCTTCGC AGAGCCCCGA GCGCCCCGGC
>.....NGF.....
e s n v p a g h t i p q v h w t k l q h s l d t a l x r a r s a p
1301 AGCGGCGATA GCTGCAGCG TGGCGGGGCA GACCCGGGCA ATTACTGTGG ACCCAGGCT GTTTAAAG CCGGAGCTCC GTTCACCCCG TGTGCTGTTT
>.....NGF.....
a a a i a a r v a g q t x n i t v d p r l f k k r r l r s p r v l f

```

Fig. 11

KhNGF del intrón de promotor de EF1- α :

```

1  GCGTCGGTG CCGTCAGTG GCGAGAGCGC ACAAGCCCA CAGTCCCGA GAAGTTGTGG GGAGGGTGG GCAATTGAAC CGGTGCCTAG AGAAGTGCG
101 GCGGGTAA CTGGGAAGT GATGTGTGT ACTGCTCGG CTTTTCCTC GAGGTGGGG GAGAACGTA TATANGTCCA GTAGTCCCG TGAACGTTCT
201 TTTCCCAAC GCGTTCCCG Cgtasgtgoc gtgtgtgtt ccgcgcgcgc tggactctt acgggttatg gacttgctt gacttgact
301 acttccact ggtgagta cgtgattott gatccgagc ttgggttgg agtgggtgg ggccttggc ttgggtggc ttgggtggc
401 gtcttgagt tggggttgg cgtgggtgg ggtgggtgg cgtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg
501 ttaaatctt tcatgactg cgtgagctt ttttttgg caagatagtc ttttaaatg ggcacagat ctgcacatg gtatttggt ttttggggc
601 ggggggggg acggggggc tgcgtccag cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt
701 gggggctgc totgtgact ggcctgggc cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt cgcactgtt
801 ggccttccc ggccttctg cagggtgctc aaatggagg acggggggt cgggtgggt ggcgtgggt ggcgtgggt ggcgtgggt
901 tctcgagcg tgccttcctg tgccttcctg ggccttcctg ggccttcctg ggccttcctg ggccttcctg ggccttcctg ggccttcctg
1001 ggggggggtt ttatggatg gacttccc acactggatg ggtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg ggtgggtgg
1101 ttttgagttt ggtatgtgt tcatctcaa gctcgagca gttgttcaa gttgttcaa gttgttcaa gttgttcaa gttgttcaa
1201 CTAGCCTTA AACTTAAGT TGTACCGAG CTGGATCCG CCGCCCGAT GTCGATGTC TCTTACTC TGTACCGAG TTTCTGATC GGCATACAG
>>.....NGF.....>
1301 CGTAACCA CAACAGAGC AATGCTCTG CAGGACAC CACGACAC CACGACAC CACGACAC CACGACAC CACGACAC CACGACAC
>.....NGF.....>
a e p h s e s n v p a g b t i p q v h w t k l q h s l d t a l r

```

Fig. 12

Secuencia de hNGF-intrón de UbC humana.

```

1  CTAGCTTCT CCGAGTCAT TGTCTTGT CCGGCCCC GGGAGCCCC CCGACCCGC CTGGAGGCT CAGGAGGTT GAAGGGGCT GAGCAAGGA
101 AGCCCCGTC TACCTCAAA TGTACCCAA AATAAAGAC CGTCCATCT CCAGGGGTG CCACGGGGG GTACGAGGG AGGGGGCGG GAOCCCGACT
201 CTGCAGNAG CACTCGCTC GTGCCCCAC TCCGCCNAC CCGGGGTTC CCACCCGAG GATTTCGG GCTGAGGG GCGGGCGCG AGCCCGCGC
301 TAGGNACGC GGGCGCCCA CCGCTCCG GTGAGCGGC CTCGGCCCG GATTTCGG GCTGAGGG GCTGAGGG GCGGGCGCG AGCCCGCGC
401 CGTCAGACGA AGGGCGCAG CAGCTCCG ATCCTCCG CCGGACGCT CCGGACGCT AGGACAGCG CCGCTGCT ATAGACTCG CCCTAGAAC CCAGTATCA
501 GCAGAGGAC ATTTAGAC GGGACTTGG TGACTTAG GCACTGTT TCTTCCAG GAGCGNAC TAGTCCGT GCAGCGGA AGTAGTCC TCTCGCGAT
601 TCTCGGAGG GATCTCGT GGGCGTGAA CGCCATGAT TATTAAGGA CCGCCGGCT GTGGCAGC GTGGCAGC TAGTCCGT GCAGCGGA TTTGGGTGC
701 GGTCTTGT TGTGGATCG TGTGATCG ACTTGTGAG TAGCGGCTG CTGGGCTTC CCGGCGCG GTGGCAGC GTGGCAGC TAGTCCGT GCAGCGGA TTTGGGTGC
801 GCGTGTGAG AGACCGCAA GGGCTGAG CTGGTCCG GAGCAAGTT GCGCTGAG GCGCTGAG GTGGCAGC GTGGCAGC TAGTCCGT GCAGCGGA TTTGGGTGC
901 AGCTTGAAT GGAAGAGCT GTGAGGCG GCTGAGGCT CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG
1001 TAATCGGGA AAGCTTAT TCAGGTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CACCATGCT GAGCCTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG
1101 GTTGGGCGG CAGCAGTAT GCGGCTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CACCATGCT GAGCCTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG
1201 TTATAATGA GGTGAGGCT ACCTGCGGT AGGTGAGG TGGGCGGCT GTGGCAGC CACCATGCT GAGCCTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG
1301 CAGGCGCGG ACCTGAGT GAGGAGGGA TAAGTGAAG GTCAGTTCT TCAGTGAAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CACCATGCT GAGCCTGAG TGGGCGGCT GTGGCAGC CAGTGAACA AGGTGAGG CAGTGAACA AGGTGAGG
1401 GAGCTATCG CTCGGGCTG GCGAGTGT TTTGGAAG TTTTGAAG CTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG TTTTGAAG
1501 TAGTAAATG TCGCTAAT TCGGCGGT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT
1601 TGACTGCAT TAGTACTCA TGAAGTCAC CTGATTTCT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT TTTGCTTT
>>.....NGF cds.....>
      m s m l f y t l i t a f

```

Fig. 13

Secuencia de hNGF-intrón A de insulina II de rata

```

1  CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTAATTG ACTAGTTATT ANTAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATATA TATGGAGTTC
101 CGCGTTACAT AACTTACGGT AATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA CCCCAGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATATA GTACGCCCAA
201 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTAG GTAACTGCC GAACTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAGTACGC CCCCTATTGA
301 CGTCATGAC GGTAAATGGC CCBCCTGGCA TTATGCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCTACTTGG CAGTACATCT AGCTATTAGT CATCGCTATT
401 ACCATGTGCA TCGCGTTTG GCAGTACATC AATGGCGTG TACAGCGGT TACTCAGCG GANTTCCAA GTCTCCACC CATTCACGTC ATGGGAGTT
501 TGTTTTGCA CCMAATCAA CGGACTTTC CMAATGTCG TAACTACTC GCGCATTGA CCGAATGGG AGGAGAGCGT GTACGGTGGG AGGCTATGAT
601 AAGCAGAGCT CTCGGCTAA CTAGAGAAC CACTGCTTAC TGGCTTATCG AATTATATC GACTCATTAT AGGAGAGCC AGCTGGCTA GCGTTTAAAC
701 TTAAGCTTAA AGTGACCAGC TACAGTCCAG ACCATCAGC AAGCAGTat gtactctcca ggttgggcct ggttcccca gtcaagactc cagggatttg
801 agggacgctg tgggctcttc tcttacatgt acctttgct agcctcaacc ctgactatct tccaggtcat tgttccanag gatccctctg agggacccag
901 AACTGCGCTT TTGACTGCAAT TTAGTACTCC ATGAAGTCAC CCTCATTTCT TTTTCATTC AGGTGCATAG CGTAATGTCC ATGTTGTTC ACACCTGTAT
>>.....NGF cds.....>
      m s m l f y t l

```

Fig. 14

Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys
1				5					10					15
Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Trp	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp
				20					25					30
Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn
				35					40					45
Asn	Ser	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Asp
				50					55					60
Pro	Asn	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His
				65					70					75
Trp	Asn	Ser	Gln	Cys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Arg	Ala	Leu
				80					85					90
Thr	Met	Asp	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp
				95					100					105
Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Val	Arg		
				110					115			118		

Fig. 15A

Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys
1				5					10					15
Ala	Ser	Val	Ser	Val	Trp	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp
				20					25					30
Ile	Lys	Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn
				35					40					45
Asn	Ser	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Asp
				50					55					60
Pro	Asn	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His
				65					70					75
Trp	Asn	Ser	Tyr	Cys	Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Tyr	Val	Arg	Ala	Leu
				80					85					90
Thr	Met	Asp	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp
				95					100					105
Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Val	Arg		
				110					115			118		

Fig. 15B

```

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
 1      5      10      15
Ser Val Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
 20      25      30
Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
 35      40      45
Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
 50      55      60
Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
 65      70      75      80
Thr Thr Thr Gln Thr Tyr Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
 85      90      95
Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
100      105      110
Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
115      120

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
 1      5      10      15
Ser Val Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Ile Asp Ile Lys
 20      25      30
Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
 35      40      45
Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
 50      55      60
Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
 65      70      75      80
Thr Thr Thr Gln Thr Tyr Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
 85      90      95
Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
100      105      110
Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
115      120

```

Fig. 16A

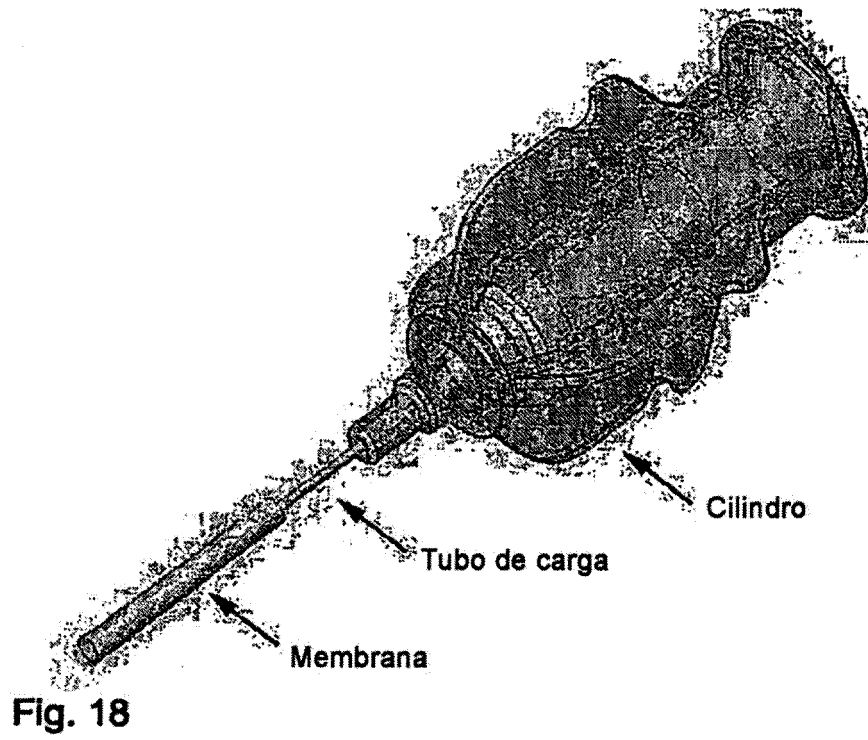
Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys	Asp
1				5					10					15	
Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Lys
		20						25					30		
Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Val
		35					40						45		
Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Asp	Pro	Asn	Pro	Val
	50					55					60				
Asp	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Tyr	Cys
65					70					75					80
Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Leu	Thr	Met	Asp	Gly	Lys	Gln
			85						90					95	
Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu
		100						105					110		
Ser	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Arg	Ala								
		115					120								

Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys	Asp
1				5					10					15	
Ser	Glu	Ser	Val	Trp	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Ile	Lys
		20						25					30		
Gly	Lys	Glu	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn	Asn	Ser	Val
		35					40						45		
Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Asp	Pro	Asn	Pro	Val
	50					55					60				
Asp	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Tyr	Cys
65					70					75					80
Lys	Thr	Thr	Gln	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Leu	Thr	Met	Asp	Gly	Lys	Gln
			85						90					95	
Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu
		100						105					110		
Ser	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Arg	Ala								
		115					120								

Fig. 16B

Ser	Ser	Ser	His	Pro	Ile	Phe	His	Arg	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Cys
1				5					10					15
Asp	Ser	Val	Ser	Val	Trp	Val	Gly	Asp	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp
				20					25					30
Ile	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Met	Val	Leu	Gly	Glu	Val	Asn	Ile	Asn
				35					40					45
Asn	Ser	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Phe	Phe	Glu	Thr	Lys	Cys	Arg	Asp
				50					55					60
Pro	Asn	Pro	Val	Asp	Ser	Gly	Cys	Arg	Gly	Ile	Asp	Ser	Lys	His
				65					70					75
Trp	Asn	Ser	Tyr	Cys	Thr	Thr	Thr	His	Thr	Phe	Val	Lys	Ala	Leu
				80					85					90
Thr	Met	Asp	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Trp	Arg	Phe	Ile	Arg	Ile	Asp
				95					100					105
Thr	Ala	Cys	Val	Cys	Val	Leu	Ser	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Arg	Ala
				110					115					120

Fig. 17



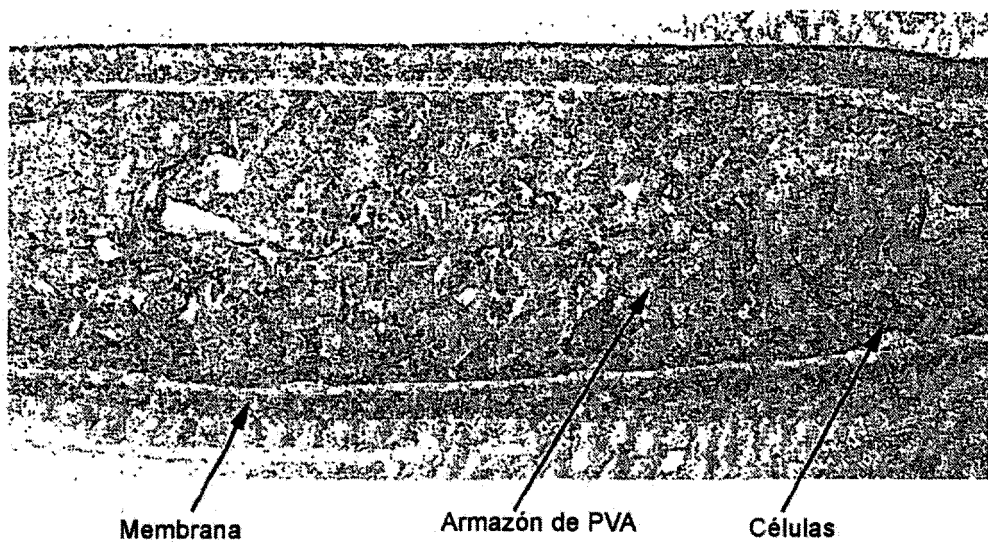


Fig 19

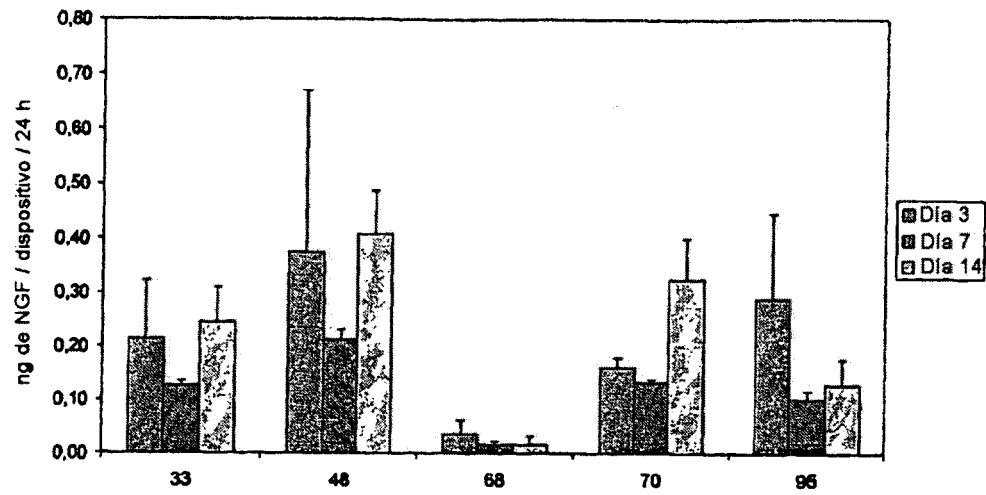


Fig 20

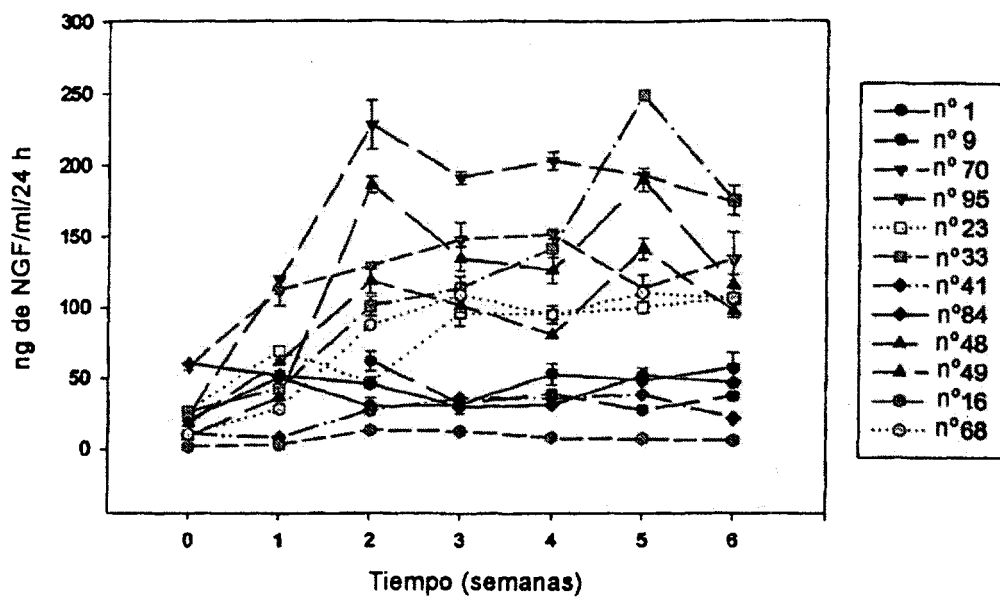


Fig. 21

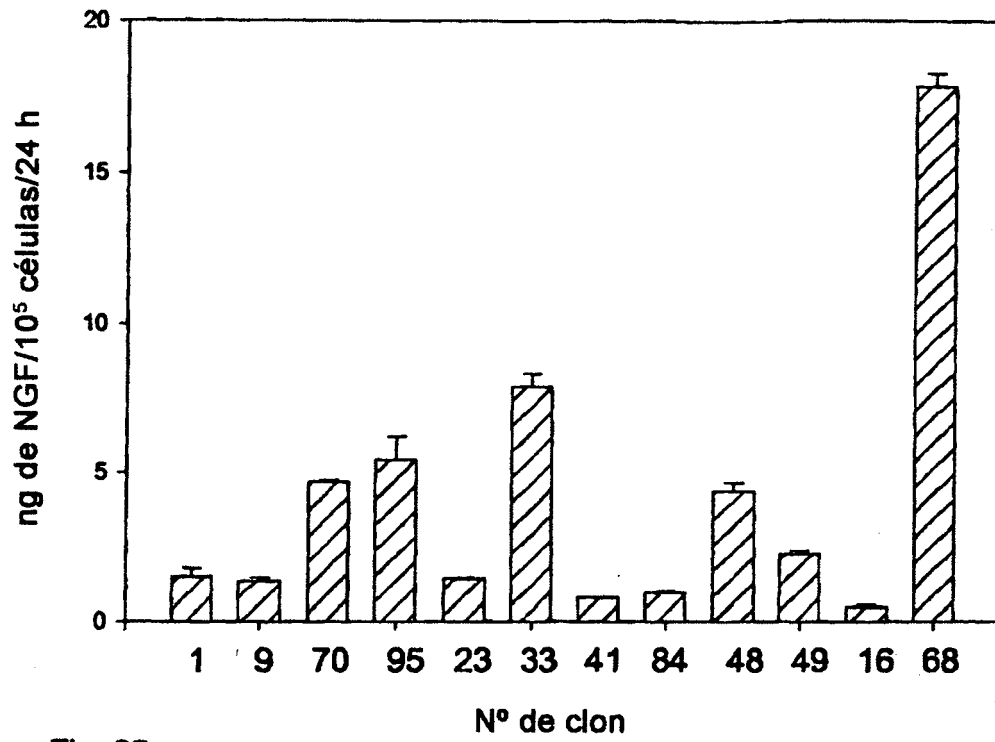


Fig. 22

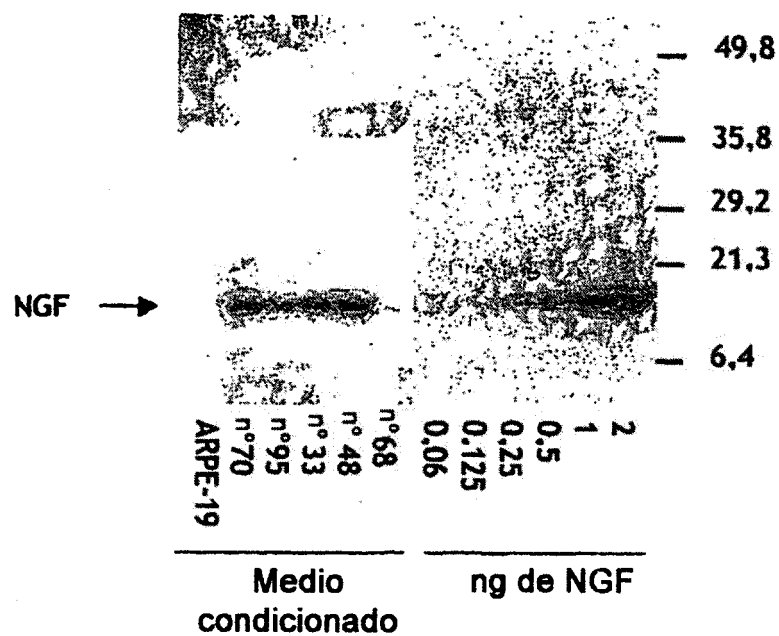


Fig. 23

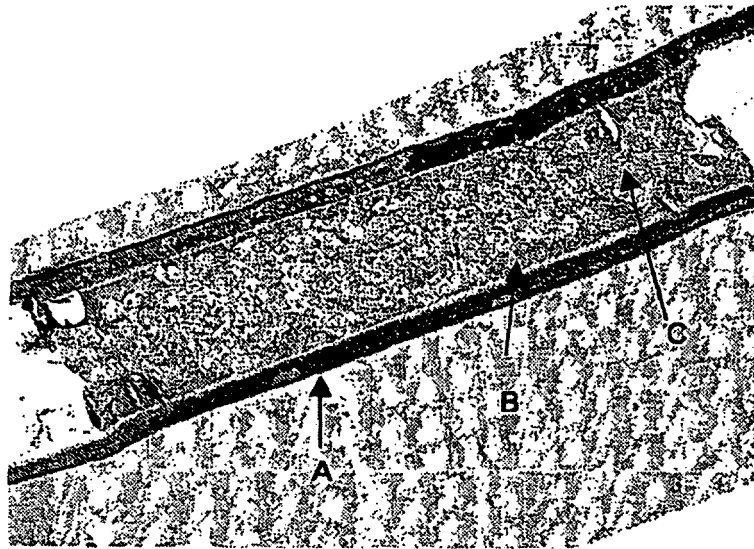


Fig. 24a

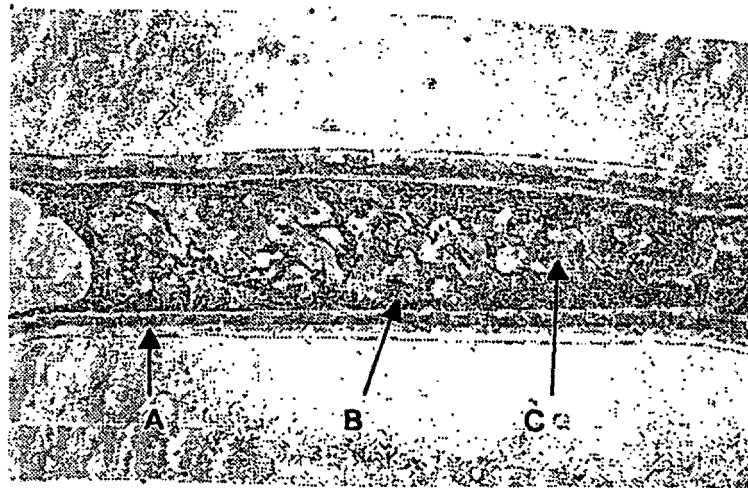


Fig. 24b

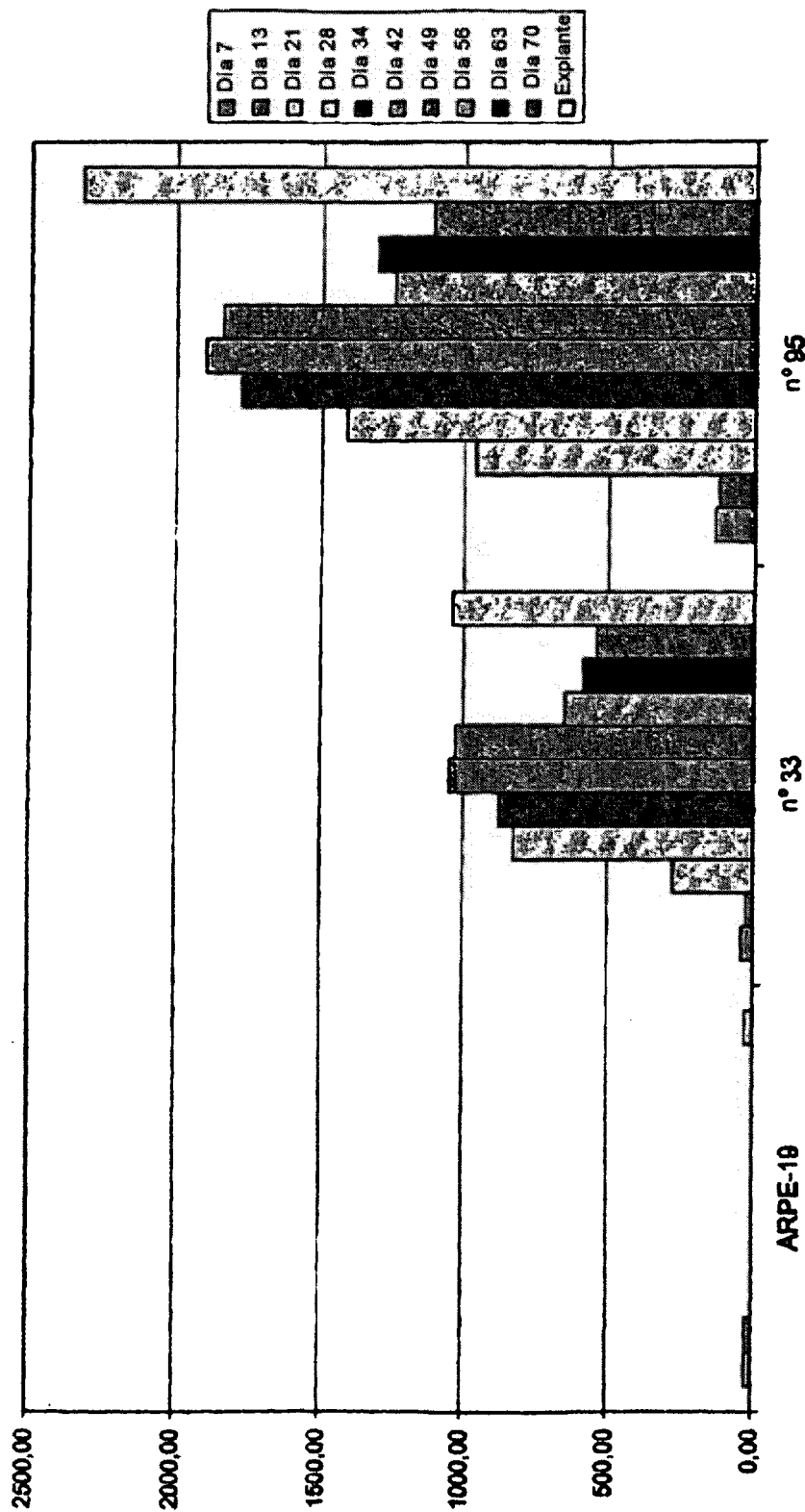


Fig. 25

ES 2 315 842 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NsGene A/S
Tornøe, Jens
5 Kusk, Philip
Wahlberg, Lars

<120> Células terapéuticas humanas que secretan factor de crecimiento nervioso

10 <130> Documento 515-204-WO

<150> Documento DK PA 2004 00064
15 <151> 19-01-2004

<150> Documento DK PA 2004 00673
<151> 30-04-2004

20 <150> Documento US 60/537.033
<151> 20-01-2004

25 <150> Documento US 60/575.087
<151> 28-05-2004

<160> 29
30 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 723
35 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
40 <221> CDS
<222> (1)..(723)
<223>

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(363)
50 <223> Propéptido

<220>
<221> péptido señal
55 <222> (1)..(57)
<223>

<220>
60 <221> péptido maduro
<222> (364)..()
<223>

65

ES 2 315 842 T3

<400> 1

5	atg tcc atg ttg ttc tac act ctg atc aca gct ttt ctg atc ggc Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly -120 -115 -110	45
10	ata cag gcg gaa cca cac tca gag agc aat gtc cct gca gga cac acc Ile Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr -105 -100 -95	93
15	atc ccc caa gtc cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt gac act gcc Ile Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala -90 -85 -80 -75	141
20	ctt cgc aga gcc cgc agc gcc ccg gca gcg gcg ata gct gca cgc gtg Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val -70 -65 -60	189
25	gcg ggg cag acc cgc aac att act gtg gac ccc agg ctg ttt aaa aag Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys -55 -50 -45	237
30	cgg cga ctc cgt tca ccc cgt gtg ctg ttt agc acc cag cct ccc cgt Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg -40 -35 -30	285
35	gaa gct gca gac act cag gat ctg gac ttc gag gtc ggt ggt gct gcc Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala -25 -20 -15	333
40	ccc ttc aac agg act cac agg agc aag cgg tca tca tcc cat ccc atc Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile -10 -5 -1 1 5	381
45	ttc cac agg ggc gaa ttc tgc gtg tgt gac agt gtc agc gtg tgg gtt Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val 10 15 20	429
50	ggg gat aag acc acc gcc aca gac atc aag ggc aag gag gtg atg gtg Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val 25 30 35	477
55	ttg gga gag gtg aac att aac aac agt gta ttc aaa cag tac ttt ttt Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe 40 45 50	525
60	gag acc aag tgc cgg gac cca aat ccc gtt gac agc ggg tgc cgg ggc Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly 55 60 65 70	573
65	att gac tca aag cac tgg aac tca tat tgt acc acg act cac acc ttt Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe 75 80 85	621
70	gtc aag gcg ctg acc atg gat ggc aag cag gct gcc tgg cgg ttt atc Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile 90 95 100	669
75	cgg ata gat acg gcc tgt gtg tgt gtg ctc agc agg aag gct gtg aga Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg 105 110 115	717
80	aga gcc Arg Ala 120	723

<210> 2

65 <211> 241

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 315 842 T3

<220>

<221> misc_feature

<222> (58)..(363)

5 <223> Propéptido

<400> 2

```

10      Met Ser  Met Leu Phe Tyr Thr  Leu Ile Thr Ala Phe  Leu Ile Gly
      -120                      -115                      -110

      Ile Gln  Ala Glu Pro His Ser  Glu Ser Asn Val  Pro Ala Gly His Thr
      -105                      -100                      -95

15      Ile Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala
      -90                      -85                      -80                      -75

      Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val
      -70                      -65                      -60

20      Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys
      -55                      -50                      -45

      Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg
      -40                      -35                      -30

25      Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala
      -25                      -20                      -15

      Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile
      -10                      -5                      -1 1                      5

      Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val
      10                      15                      20

35      Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val
      25                      30                      35

      Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe
      40                      45                      50

40      Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly
      55                      60                      65                      70

      Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe
      75                      80                      85

45      Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile
      90                      95                      100

      Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
      105                      110                      115

50      Arg Ala
      120

```

55 <210> 3

<211> 307

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

60

<220>

<221> péptido maduro

<222> (188)..()

65

<223>

ES 2 315 842 T3

<400> 3

Met Leu Cys Leu Lys Pro Val Lys Leu Gly Ser Leu Glu Val Gly
-185 -180 -175

His Gly Gln His Gly Gly Val Leu Ala Cys Gly Arg Ala Val Gln
-170 -165 -160

Gly Ala Gly Trp His Ala Gly Pro Lys Leu Thr Ser Val Ser Gly
-155 -150 -145

Pro Asn Lys Gly Phe Ala Lys Asp Ala Ala Phe Tyr Thr Gly Arg
-140 -135 -130

Ser Glu Val His Ser Val Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile
-125 -120 -115

Thr Ala Phe Leu Ile Gly Val Gln Ala Glu Pro Tyr Thr Asp Ser
-110 -105 -100

Asn Val Pro Glu Gly Asp Ser Val Pro Glu Ala His Trp Thr Lys Leu
-95 -90 -85

Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Thr
-80 -75 -70

Ala Pro Ile Ala Ala Arg Val Thr Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val
-65 -60 -55 -50

Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg Leu His Ser Pro Arg Val Leu
-45 -40 -35

Phe Ser Thr Gln Pro Pro Pro Thr Ser Ser Asp Thr Leu Asp Leu Asp
-30 -25 -20

Phe Gln Ala His Gly Thr Ile Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys
-15 -10 -5

Arg Ser Ser Thr His Pro Val Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys
-1 1 5 10 15

Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile
20 25 30

Lys Gly Lys Glu Val Thr Val Leu Ala Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser
35 40 45

Val Phe Arg Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Ala Ser Asn Pro
50 55 60

Val Glu Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr
65 70 75

Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp Glu Lys
80 85 90 95

Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val
100 105 110

Leu Ser Arg Lys Ala Thr Arg Arg Gly
115 120

<210> 4

<211> 241

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

ES 2 315 842 T3

<221> péptido maduro

<222> (122)..()

<223>

5

<400> 4

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly
-120 -115 -110

Val Gln Ala Glu Pro Tyr Thr Asp Ser Asn Val Pro Glu Gly Asp Ser
-105 -100 -95

Val Pro Glu Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala
-90 -85 -80 -75

Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Glu Pro Ile Ala Ala Arg Val
-70 -65 -60

Thr Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Lys Leu Phe Lys Lys
-55 -50 -45

Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Pro
-40 -35 -30

Thr Ser Ser Asp Thr Leu Asp Leu Asp Phe Gln Ala His Gly Thr Ile
-25 -20 -15

Ser Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Thr His Pro Val
-10 -5 -1 1 5

Phe His Met Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val
10 15 20

Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Thr Val
25 30 35

Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe
40 45 50

Glu Thr Lys Cys Arg Ala Pro Asn Pro Val Glu Ser Gly Cys Arg Gly
55 60 65 70

Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe
75 80 85

Val Lys Ala Leu Thr Thr Asp Asp Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile
90 95 100

Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Ala Arg
105 110 115

Arg Gly
120

```

<210> 5

<211> 241

<212> PRT

<213> *Pan troglodytes*

<220>

<221> péptido maduro

<222> (122)..()

<223>

ES 2 315 842 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (106)..(106)

5 <223> aminoácido desconocido

<400> 5

```

10      Met Ser  Met Leu Phe Tyr Thr  Leu Ile Thr Ala Phe  Leu Ile Gly
      -120                      -115                      -110

      Thr Gln  Ala Glu Pro His Ser  Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Th
      -105                      -100                      -95

15      Ile Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala
      -90                      -85                      -80                      -75

      Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val
      -70                      -65                      -60

      Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys
      -55                      -50                      -45

25      Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Pro
      -40                      -35                      -30

      Glu Ala Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Xaa Val Gly Gly Ala Ala
      -25                      -20                      -15

30      Pro Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile
      -10                      -5                      -1 1                      5

      Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val
      10                      15                      20

      Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val
      25                      30                      35

40      Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe
      40                      45                      50

      Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly
      55                      60                      65                      70

      Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe
      75                      80                      85

50      Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile
      90                      95                      100

      Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
      105                      110                      115

55      Arg Ala
      120

```

60 <210> 6

<211> 229

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

65

<220>

ES 2 315 842 T3

<221> péptido maduro

<222> (110)..()

<223>

5

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

10

<223> Extremo N-terminal incompleto

<400> 6

15

Leu Ile Gly Ile Gln Ala Glu Pro His Thr Glu Ser Asn Val Pro Ala
-105 -100 -95

20

Gly His Ala Ile Pro Gln Ala His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu
-90 -85 -80

Asp Thr Ala Leu Arg Arg Ala His Ser Ala Pro Ala Gly Ala Asn Ser
-75 -70 -65

25

Ala Arg Val Ala Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Lys Leu
-60 -55 -50

Phe Lys Lys Arg Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln
-45 -40 -35 -30

30

Pro Pro Pro Val Ala Ala Asp Thr Gln Asp Pro Asp Leu Glu Ala Ser
-25 -20 -15

Gly Ala Ala Ser Phe Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser
-10 -5 -1 1

35

His Pro Val Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser
5 10 15

40

Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu
20 25 30 35

Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln
40 45 50

45

Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly
55 60 65

Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr
70 75 80

50

His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp
85 90 95

55

Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys
100 105 110 115

Ala Gly Arg Arg Ala
120

60

<210> 7

<211> 118

65

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 315 842 T3

<400> 7

```

5      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Ala
      1          5          10          15

      Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
          20          25          30

10     Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
          35          40          45

      Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
          50          55          60

15     Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Gln Cys
      65          70          75          80

      Lys Thr Thr Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
          85          90          95

      Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
          100          105          110

25     Ser Arg Lys Ala Val Arg
          115

```

<210> 8

<211> 118

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

35

      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Ala
      1          5          10          15

40     Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
          20          25          30

      Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
          35          40          45

45     Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
          50          55          60

      Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65          70          75          80

      Lys Thr Thr Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
          85          90          95

55     Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
          100          105          110

60     Ser Arg Lys Ala Val Arg
          115

```

<210> 9

<211> 120

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 315 842 T3

<400> 9

```

5      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
      1          5          10          15

      Ser Val Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
              20          25          30

10     Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
              35          40          45

      Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
              50          55          60

15     Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65          70          75          80

      Thr Thr Thr Gln Thr Tyr Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
      85          90          95

20     Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
              100          105          110

      Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
      115          120

```

<210> 10

<211> 120

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

35     Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
      1          5          10          15

40     Ser Val Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Ile Asp Ile Lys
              20          25          30

      Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
              35          40          45

45     Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
              50          55          60

      Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65          70          75          80

50     Thr Thr Thr Gln Thr Tyr Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
              85          90          95

55     Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
              100          105          110

      Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
      115          120

```

<210> 11

<211> 120

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 315 842 T3

<400> 11

```

5      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
      1          5          10          15

      Ser Val Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
          20          25          30

10     Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
          35          40          45

      Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
          50          55          60

15     Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65          70          75          80

      Lys Thr Thr Gln Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
          85          90          95

      Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
          100          105          110

25     Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
          115          120

```

<210> 12

<211> 120

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

```

35

      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
      1          5          10          15

40     Ser Glu Ser Val Trp Val Thr Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys
          20          25          30

      Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
          35          40          45

45     Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
          50          55          60

      Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65          70          75          80

      Lys Thr Thr Gln Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
          85          90          95

55     Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
          100          105          110

      ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
          115          120

60

```

<210> 13

<211> 120

65 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 315 842 T3

<400> 13

```

5      Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp
      1      5      10      15
      Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ala
      20      25      30
10     Gly Ala Ala Val Met Val Leu Gly Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val
      35      40      45
      Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val
      50      55      60
15     Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys
      65      70      75      80
      Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln
      85      90      95
20     Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu
      100      105      110
      Ser Arg Lys Ala Val Arg Arg Ala
      115      120

```

25

<210> 14

<211> 1400

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> pCIn.hNGF

<220>

<221> ARN precursor

40

<222> (744)..(1400)

<223>

<220>

<221> Intrón

45

<222> (890)..(1022)

<223>

<220>

50

<221> CDS

<222> (1214)..(1399)

<223>

55

<400> 14

60

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

65

ES 2 315 842 T3

	aatatgaccg ccatgttgge attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
	gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
5	gcctggctga ccgccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
	agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
	ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccagtcgc cccctattg acgtcaatga	420
10	cggtaaattg ccgcctggc attatgccc gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
	caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgaagt	600
15	caatgggagt ttgttttgcc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg	660
	cgatcgcccg ccccggtgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata	720
	agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac	780
20	agttaaattg ctaacgcagt cagtgttctt gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt	840
	gactctctta aggtagcctt gcagaagtgt gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa	900
25	ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact	960
	cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac	1020
	aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact	1080
30	ataggctagc gtttaaaact aagcttggtc ccgagctcgg atccctctga gggaccaga	1140
	aactgccttt tgactgcatt tagtactcca tgaagtcacc ctcatttctt tttcattcca	1200
	ggtgcatagc gta atg tcc atg ttg ttc tac act ctg atc aca gct ttt	1249
35	Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe	
	1 5 10	
	ctg atc ggc ata cag gcg gaa cca cac tca gag agc aat gtc cct gca	1297
40	Leu Ile Gly Ile Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala	
	15 20 25	
	gga cac acc atc ccc caa gtc cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt	1345
	Gly His Thr Ile Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu	
	30 35 40	
45	gac act gcc ctt cgc aga gcc cgc agc gcc ccg gca gcg gcg ata gct	1393
	Asp Thr Ala Leu Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala	
	45 50 55 60	
	gca cgc g	1400
50	Ala Arg	

<210> 15

<211> 62

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> pCIn.hNGF

65

ES 2 315 842 T3

<400> 15

```

5      Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile
      1          5          10          15

      Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile
          20          25          30

10     Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu
          35          40          45

      Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg
          50          55          60

```

15

<210> 16

<211> 1400

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> pCIn.KhNGF

25

<220>

<221> ARN precursor

<222> (744)..(1400)

30

<223>

<220>

<221> Intrón

35

<222> (890)..(1022)

<223>

<220>

40

<221> CDS

<222> (1134)..(1400)

<223>

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (1128)..(1133)

50

<223> secuencia consenso de Kozak

55

60

65

ES 2 315 842 T3

<400> 16

5	tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
	ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatatg gctcatgtcc	120
	aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
10	gtcattagtt catagcccat atatggagt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
	gcctggctga ccgccaaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
	agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
15	ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttectacttg	480
20	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcatgacac	540
	caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
	caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg	660
25	cgatcgcccg ccccgcttgac gcaaattggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata	720
	agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac	780
	agttaaattg ctaacgcagt cagtgcctct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt	840
30	gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa	900
	ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact	960
	cttgcgcttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac	1020
35	aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact	1080
	ataggctagc gtttaaactt aagcttggtg ccgagctcgg atccgcccgc gcc atg	1136
		Met
		1
40	tcc atg ttg ttc tac act ctg atc aca gct ttt ctg atc ggc ata cag	1184
	Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile Gln	
	5 10 15	
45	gcg gaa cca cac tca gag agc aat gtc cct gca gga cac acc atc ccc	1232
	Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro	
	20 25 30	
50	caa gtc cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt gac act gcc ctt cgc	1280
	Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg	
	35 40 45	
55	aga gcc cgc agc gcc ccg gca gcg gcg ata gct gca cgc gtg gcg ggg	1328
	Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly	
	50 55 60 65	
60	cag acc cgc aac att act gtg gac ccc agg ctg ttt aaa aag cgg cga	1376
	Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg	
	70 75 80	
	ctc cgt tca ccc cgt gtg ctg ttt	1400
	Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe	
	85	

<210> 17

<211> 89

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 315 842 T3

 $\langle 220 \rangle$

<223> pCIn.KhNGF

5 $\langle 220 \rangle$

<221> misc feature

<222> (1128)..(1133)

<223> secuencia consenso de Kozak

10

<400> 17

15

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile
1 5 10 15

Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile
20 25 30

20

Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu
35 40 45

Arg Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala
50 55 60

25

Gly Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg
65 70 75 80

Arg Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe
85

30

<210> 18

<211> 1400

<212> ADN

35

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

40

<223> EF1alpha.KhNGF

 $\langle 220 \rangle$

<221> ARN precursor

45

<222> (199)..(1400)

 $\langle 223 \rangle$ $\langle 220 \rangle$

50

<221> Intrón

<222> (232)..(1171)

 $\langle 223 \rangle$

55

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1249)..(1398)

 $\langle 223 \rangle$

60

 $\langle 220 \rangle$

<221> misc_feature

65

<222> (1240)..(1248)

<223> secuencia consenso de Kozak

ES 2 315 842 T3

<400> 18

```

5      ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgtgg      60
      ggagggggtcg gcaattgaac cggtagcctag agaagggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt      120
      gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtggg  gagaaccgta tataagtgca      180
10     gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc      240
      gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgctg gccttgaatt      300

      acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg      360
15     gagagttega ggccttgccg ttaagagacc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg      420
      cctgggcgct ggggcccgcg cgtgcgaatc tggtagcacc ttcgcgcctg tctcgctgct      480
      ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgaagacctg ctgcgacgct tttttctgg      540
20     caagatagtc ttgtaaagtc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc      600
      gcggggggcg acggggggcg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga      660
      gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct      720
25     ggcctcgccg cgcctgttat cggcccgccc tgggcggcaa ggctggcccg gtcggcacca      780
      gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggccctgctg cagggagctc aaaatggagg      840
      acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg      900
30     tcttcagccg tcgcttcagt tgactccacg gagtaccggg cgcctccag gcacctcgat      960
      tagttctcga gcttttgag taccgtctct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg      1020
      gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgcca cttgatgtaa      1080
35     ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttggg tcattctcaa gcctcagaca      1140
      gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtgag gaattagctt ggtaccggag      1200
40     ctagcgttta aacttaagct tggtagcgag ctcggatccg ccgcccgc atg tcc atg      1257
                               Met Ser Met
                               1

      ttg ttc tac act ctg atc aca gct ttt ctg atc ggc ata cag gcg gaa      1305
      Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile Gln Ala Glu
      5              10              15

      cca cac tca gag agc aat gtc cct gca gga cac acc atc ccc caa gtc      1353
      Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro Gln Val
      20              25              30              35

50     cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt gac act gcc ctt cgc aga gc      1400
      His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg Arg
      40              45              50

```

55 <210> 19

<211> 50

<212> PRT

60 <213> secuencia artificial

<220>

<223> EF1alpha.KhNGF

65

<220>

<221> misc_feature

ES 2 315 842 T3

<222> (1240)..(1248)

<223> secuencia consenso de Kozak

5 <400> 19

```

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe Leu Ile Gly Ile
1          5          10          15
Gln Ala Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile
20          25          30
Pro Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu
35          40          45
Arg Arg
50

```

<210> 20

20 <211> 1700

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> UbiC.hNGF

30 <220>

<221> señal TATA

<222> (641)..(647)

<223>

35 <220>

<221> Intrón

<222> (736)..(1547)

40 <223>

<220>

<221> CDS

45 <222> (1664)..(1699)

<223>

50

55

60

65

ES 2 315 842 T3

<400> 20

	ctagctttct gccgagtcac tgtccttgtc ccgcggcccc gggagcccc cgcgaccggc	60
5	ctgggaggct cagggagggt gaagggggct gagcaaagga agccccgtca ttacctcaaa	120
	tgtgacccaa aaataaagac ccgtccatct cgcagggtgg gccaggcgcg gtcaggagg	180
	aggggaggga gaccccgact ctgcagaagg cgctcgctgc gtgccccacg tccgccgaac	240
10	gcggggttcg cgacccgagg ggaccgcgga ggctgagggg agggggccgc gagccgcggc	300
	taaggaaacgc gggccgccca cccgtcccg gtgcagcggc ctccgcgcgc ggttttgcg	360
	cctcccgcg gcgccccct cctcacggcg agcgtgcca cgtcagacga agggcgacgc	420
15	gagcgtcctg atccttcgc ccggacgctc aggacagcg cccgtgctc ataagactcg	480
	gccttagaac ccagtatca gcagaaggac attttaggac gggacttggg tgactctagg	540
	gcactgggtt tctttccaga gagcggaaca ggcgaggaaa agtagtccct tctcgcgat	600
20	tctcgaggag gatctccgtg gggcggtgaa cgccgatgat tatataagga cgcgccgggt	660
	gtggcacagc tagttccgtc gcagccggga tttgggtcgc ggttcttgtt tgtggatcgc	720
	tgtgatcgtc acttggtgag tagcgggctg ctgggctggc cggggcttcc gtggccgcgc	780
25	ggccgctcgc tgggacggaa gcgtgtggag agaccgcaa gggctgtagt ctgggtccgc	840
	gagcaagggt gccctgaact gggggttggg gggagcgag caaaatggcg gctgttccc	900
30	agtcttgaat ggaagacgct tgtgaggcg gctgtgaggt cgttgaaaca aggtggggg	960
	catgggtggc ggcaagaacc caaggtcttg aggccttcgc taatgcggga aagctcttat	1020
	tcgggtgaga tgggctggg caccatctgg ggaccctgac gtgaagtttg tcaactgactg	1080
35	gagaactcgg tttgtcgtct gttgcggggg cggcagttat ggcggtgccg ttgggcagtg	1140
	cacccgtacc tttgggagcg cgcgccctcg tcgtgtcgtg acgtcaccgc ttctgttggc	1200
	ttataatgca ggggtggggc acctgccggt aggtgtgcg taggctttc tccgtcgag	1260
40	gacgcagggt tcgggcctag ggtaggctct cctgaatcga caggcgccgc acctctggtg	1320
	aggggaggga taagtgggc gtcagtttct ttggtcgggt ttatgtacct atcttcttaa	1380
	gtagctgaag ctccggtttt gaactatgcg ctccgggttg gcgagtgtgt tttgtgaagt	1440
45	tttttaggca ccttttgaat tgtaatcatt tgggtcaata tgtaattttc agtggttagac	1500
	tagtaaatg tccgctaaat tctggcgtt tttggctttt ttgttagacg aagcttggt	1560
	ccgagctcgc atccctctga gggacccaga aactgcctt tgactgcatt tagtactcca	1620
50	tgaagtcacc ctcatcttct tttcattcca ggtgcatagc gta atg tcc atg ttg	1675
	Met Ser Met Leu	
	1	
	ttc tac act ctg atc aca gct ttt c	1700
	Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe	
55	5 10	

<210> 21

<211> 12

60 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

65 <223> UbiC.hNGF

ES 2 315 842 T3

<400> 21

Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu Ile Thr Ala Phe
1 5 10

5 <210> 22

<211> 1000

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> rINSintrA.hNGF

15 <220>

<221> señal TATA

<222> (596)..(602)

20 <223>

<220>

<221> Intrón

25 <222> (747)..(865)

<223>

<220>

30 <221> CDS

<222> (975)..(998)

<223>

35 <400> 22

```
cgatgtacgg gccagatata cgcgttgaca ttgattattg actagttatt aatagtaato 60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 120
aatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta 180
tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg 240
gtaaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 300
cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt 360
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg 420
gcagtacatc aatgggctg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc 480
cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaatacaa cgggacttcc caaatgtcg 540
taacaactcc gccccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat 600
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac 660
gactcactat agggagaccc aagctggcta gcgtttaaac ttaagcttta agtgaccagc 720
tacagtcgga aaccatcagc aagcaggat gtactctcca ggggggcct ggcttcccca 780
gtcaagactc cagggatttg agggacgctg tgggctcttc tcttacatgt accttttgct 840
agcctcaacc ctgactatct tccaggtcat tggtccaacg gatccctctg agggaccacg 900
aaactgcctt ttgactgcat ttagtactcc atgaagtcac cctcatttct ttttcattcc 960
aggtgcatag cgta atg tcc atg ttg ttc tac act ctg at 1000
Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu
1 5
```

65 <210> 23

<211> 8

ES 2 315 842 T3

<212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5 <220>
 <223> rINSintrA.hNGF
 <400> 23
 10 **Met Ser Met Leu Phe Tyr Thr Leu**
1 5
 <210> 24
 15 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 24
 25 **tataggatcc ctctgaggga cccagaaact** 30
 <210> 25
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 25
 40 **tatactcgag caggtcaggc tcttctcac** 29
 <210> 26
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador de PCR
 <400> 26
 55 **tacaggatcc gccgccgcca tgtccatgtt gttctacac** 39
 <210> 27
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 65 <223> cebador de PCR
 <400> 27

ES 2 315 842 T3

ttgatgtctg tggcgggtggt

20

<210> 28

5

<211> 30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador de PCR

15

<400> 28

tataaagctt taagtgacca gctacagtcg

30

<210> 29

20

<211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador de PCR

<400> 29

30

taggatccgt tggaacaatg acctggaag

29

35

40

45

50

55

60

65