



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 350 078**

② Número de solicitud: 200930183

⑤ Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 5/0786** (2000.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.05.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**18.01.2011**

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Hotter Corripio, Georgina;**  
**Jung, Michaela y**  
**Sola Martínez, Anna**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Célula del SMF modificada genéticamente para sobreexpresar NGAL y su uso como medicamento.**

㉖ Resumen:

Célula del SMF modificada genéticamente para sobreexpresar NGAL y su uso como medicamento.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico o SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, en sus siglas en inglés), a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperusión o toxinas, fallo agudo o rechazo al trasplante de un órgano.

ES 2 350 078 A1

## DESCRIPCIÓN

Célula del SMF modificada genéticamente para sobreexpresar NGAL y su uso como medicamento.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, la presente invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico o SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL, en sus siglas en inglés), a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxinas, fallo agudo o rechazo al  
10 trasplante de un órgano.

### Estado de la técnica anterior

15 La patología de origen isquémico es la principal causa de muerte en los países desarrollados. En el caso del riñón, el fallo renal agudo (FRA) es una enfermedad que conlleva una mortalidad de más del 50%, cifra que no ha experimentado cambios significativos en las 4 últimas décadas. Normalmente los pacientes con síntomas clínicos de fallo renal, son tratados después de que el daño se haya desarrollado, excepto en el caso de pacientes a los que se les va practicar un trasplante renal. Puesto que la enfermedad está desarrollada cuando el paciente llega al hospital, se requiere urgentemente disponer de vías de curación mediante la estimulación del proceso regenerativo y curativo en  
20 general.

Una aproximación terapéutica dirigida a disminuir la inflamación y el daño renal ha sido la terapia celular con macrófagos modificados genéticamente. En este sentido, la alteración genética de los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio, mediante el tratamiento con adenovirus recombinante para expresar IL-1ra y su posterior inyección en modelos inflamatorios de enfermedad renal puede reducir la infiltración, la inflamación glomerular e incluso la proteinuria (Holdsworth *et al.* Lab Invest. 1984, 51:172-180; Kitamura *et al.* Kidney Int. 2000, 57:709-716; Kluth *et al.* Gene Ther. 2000, 7:263-270).  
25

En cuanto a la regeneración del riñón dañado, las medidas terapéuticas empleadas hasta ahora, han sido: la aplicación de factores de crecimiento (Hirschberg *et al.* Kidney Int. 1999, 55:2423-2432; Miller y Padanilam. Chapter 17: Molecular responses and growth factors, in: Atlas of diseases of the kidney, Robert W Schrier, p. 17.1-17.16, Blackwell Science Press, Philadelphia, USA. 1999) o ensayos con células madre (Brodsky *et al.* Am J Physiol Renal Physiol. 2002, 282: F1140-F1149; Kale *et al.* J Clin Invest. 2003, 112:42-49; Lin F *et al.* J Am Soc Nephrol. 2003, 14:1188-1199; Gupta *et al.* Kidney Int. 2002, 62: 1285-1290; Oliver *et al.* Clin Invest. 2004, 114: 795-803), pero no se ha conseguido el resultado regenerativo deseado. Estudios previos han demostrado la capacidad de la terapia con macrófagos para inducir la regeneración en modelos animales de isquemia/reperfusión (I/R), si éstos eran administrados en la fase no inflamatoria (Vinuesa *et al.* Journal of Pathology; 2007, 213: 2008 Jan; 214(1):104-13).  
30  
35

NGAL es una proteína de 25 kDa de la superfamilia de las lipocalinas (Flower. FEBS Lett. 1994, 354: 7-11) que actúa sobre la proliferación en múltiples tipos celulares (Cowland *et al.* J Immunol. 2003, 171: 6630-6639; Gwira *et al.* J Biol Chem. 2005, 280: 7875-7882). Se trata de una proteína expresada en células tubulares, que aumenta notablemente en respuesta a estímulos dañinos como la isquemia o toxicidad. También se ha descrito que mejora la apoptosis de la célula tubular (Mishra *et al.* J Am Soc Nephrol. 2004, 15: 3073-3082). Estudios previos han demostrado la capacidad de NGAL para inducir la regeneración en modelos animales de isquemia/reperfusión (I/R) en la fase no inflamatoria del daño renal, pero el efecto es el contrario en la fase inflamatoria (Vinuesa E *et al.* Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Nov; 295(5):F1554-62.).  
40  
45

Por tanto, existen estudios que indican la capacidad del macrófago para modular y resolver la inflamación renal, dependiendo de su fenotipo, y también existen estudios que indican que se puede regenerar el riñón dañado, pero no se conocen terapias que posean la doble función antiinflamatoria por una parte y potenciadora de la regeneración por otra. Existe por tanto la necesidad de disponer de terapias que permitan reducir la inflamación y el daño renal, potenciando la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal.  
50

### Explicación de la invención

55 La presente invención se refiere a una célula del SMF, preferiblemente un monocito o un macrófago, modificada genéticamente para sobreexpresar NGAL, a un método para su obtención y a su uso para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o toxinas, de un fallo agudo o del rechazo al trasplante de un órgano.  
60

En la presente invención se demuestra que macrófagos modificados genéticamente para que sobreexpresen NGAL, son capaces de disminuir la inflamación y el daño renal, además de inducir la regeneración en un modelo animal de isquemia-reperfusión renal, cuando son administrados en la fase inflamatoria del daño renal. La invención, por tanto, provee una terapia que reduce la inflamación y el daño renal, potenciando la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Esta terapia asimismo puede emplearse en la prevención o el tratamiento del daño por isquemia, isquemia seguida de reperfusión o causada por toxinas, de un fallo agudo o del rechazo al trasplante de otros órganos.  
65

El macrófago tiene su origen en las células progenitoras pluripotenciales granulo-monocíticas (CGp-GM) de la médula ósea. Por acción de los factores de estimulación colonial (CSF), la CGp-GM se diferencia en célula progenitora monopotencial monocítica (CGm-M), la cual, se diferencia en monoblasto, y éste, a su vez, en promonocito, la primera célula morfológicamente identificable como precursora del macrófago y que ya posee algunas de sus características, como adherencia al vidrio y capacidad fagocítica. Por división del promonocito y posterior diferenciación aparecen los monocitos, que abandonan la médula ósea pasando a la sangre. Los monocitos circulantes pasan por diapédesis a través del endotelio vascular, emigrando hacia los tejidos en los que se diferenciarán en macrófagos, que, a su vez, pueden presentarse en diferentes estados funcionales: residentes, inflamatorios y activados. El conjunto formado por los precursores medulares, los monocitos y los macrófagos tisulares, se engloba actualmente bajo la denominación de Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF).

Un primer aspecto de la invención se refiere a una célula del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) aislada modificada genéticamente caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno (en adelante, el polinucleótido de la invención) que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:

- a. al menos, un 50%,
- b. al menos, un 60%,
- c. al menos, un 70%,
- d. al menos, un 80%, y
- e. al menos, un 90%,

donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el Ejemplo que acompaña esta descripción.

La expresión “fase inflamatoria” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una primera fase del daño renal caracterizada por un aumento de mediadores inflamatorios, típicamente durante las primeras 24 horas después de un insulto isquémico. A su vez, este ambiente promueve el daño del tejido renal por apoptosis y necrosis. La fase regenerativa se inicia con un cambio del ambiente inflamatorio. El macrófago juega un papel importante en eliminar células muertas que a su vez, estimulan su cambio de fenotipo hacia anti-inflamatorio y pro-proliferativo, permitiendo asimismo la inducción de la regeneración renal.

La expresión “modificada genéticamente” tal y como se utiliza en la presente descripción, incluye aquí cualquier célula del SMF en la cual el genotipo ha sido alterado de manera que comprende un polinucleótido exógeno, introducido experimentalmente, que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:

- a. al menos, un 50%,
- b. al menos, un 60%,
- c. al menos, un 70%,
- d. al menos, un 80%, y
- e. al menos, un 90%,

donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

En una primera realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 1, que corresponde a la secuencia nucleotídica del cDNA de la proteína NGAL humana (Número de referencia del *Genbank*: NM\_005564).

En una segunda realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 2, del cDNA de la proteína NGAL de ratón (Número de referencia del *Genbank*: NM\_008491).

## ES 2 350 078 A1

En una tercera realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- 5 a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- 10 d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

15 “Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que afectan la expresión de las secuencias a las que están ligadas. En células eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores o silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

20 “Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” al polinucleótido, está ligada al mismo de tal manera que se consigue la expresión de la secuencia codificadora del polinucleótido.

25 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del DNA situada en posición 5’ con respecto al punto de inicio de la transcripción y que resulta necesaria o facilita dicha transcripción en una célula animal. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

30 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la proteína NGAL.

35 En una cuarta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica una secuencia aminoacídica que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de la lista que consiste en:

- a. al menos, un 50%,
- 40 b. al menos, un 60%,
- c. al menos, un 70%,
- d. al menos, un 80%, y
- 45 e. al menos, un 90%,

50 donde dicha célula del SMF es capaz de inducir la regeneración renal durante la fase inflamatoria del daño renal. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en el Ejemplo que acompaña a esta descripción.

Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

55 En una quinta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3, que corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína NGAL humana (Número de referencia del *Genbank*: NP\_005555).

60 En una sexta realización preferida de este primer aspecto de la invención, la célula del SMF modificada genéticamente está caracterizada porque comprende un polinucleótido exógeno que codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4, que corresponde a la secuencia aminoacídica de la proteína NGAL de ratón (Número de referencia del *Genbank*: NP\_032517).

65 Los términos “NGAL”, “lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos” o “lipocalina-2” se refieren a una proteína de 25 kDa de la superfamilia de las lipocalinas.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser verificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

5

Preferiblemente, la célula del SMF es una célula de mamífero, y más, preferiblemente, de un humano. Aún más preferiblemente, la célula del SMF es un monocito o un macrófago.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula del SMF, preferiblemente, un monocito o un macrófago, modificada genéticamente según se ha descrito anteriormente en este documento (de ahora en adelante, célula de la invención) para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento de terapia génica. En general, se entiende por medicamento de terapia génica cualquier producto obtenido mediante un conjunto de procesos de fabricación destinados a transferir, bien *in vivo* bien *ex vivo*, un ácido nucleico profiláctico, de diagnóstico o terapéutico a células animales, preferiblemente humanas, y su posterior expresión *in vivo*. Entre los medicamentos de terapia génica se encuentran, pero sin limitarse los siguientes, ácido nucleico desnudo, vectores no virales, vectores virales o células modificadas genéticamente. Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “medicamento de terapia génica”, se refiere a cualquier medicamento que comprende una célula del SMF modificada caracterizada porque comprende el polinucleótido de la invención. Puede tratarse de medicamentos de terapia génica basados en células autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales).

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento de terapia génica para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en un tejido o un órgano. Preferiblemente, el tejido o el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente, el órgano es el riñón.

El término “isquemia” se refiere a una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en un tejido o un órgano, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno. El conjunto de los daños que sufre el tejido o el órgano debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia”.

El término “reperusión” se refiere a la restauración del suministro de sangre a un tejido o un órgano que está isquémico como consecuencia de una disminución del riego normal de sangre. La recuperación del riego sanguíneo restaura el aporte de oxígeno y nutrientes al tejido, permitiendo la recuperación del tejido o del órgano isquémico. Sin embargo, la reperusión en sí misma puede lesionar el tejido o el órgano isquémico, ocasionando lo que se conoce como “daño causado por reperusión”.

La expresión “daño por isquemia-reperusión” se refiere al conjunto de los daños que sufre un tejido o un órgano debido a una disminución del riego sanguíneo (isquemia) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperusión).

La expresión “daño causado por toxinas” se refiere al conjunto de los daños que sufre un tejido o un órgano como consecuencia de su exposición a toxinas como, por ejemplo, pero sin limitarse, antibióticos, anestésicos, quimioterapéuticos, contrastes radiológicos, metales pesados, fungicidas, pesticidas, solventes orgánicos, venenos animales, tóxicos fúngicos o tóxicos de origen endógeno.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia en el riñón o isquemia renal. La isquemia renal consiste en una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno al riñón, como consecuencia, por ejemplo, pero sin limitarse de una disminución del volumen sanguíneo total, una redistribución de la sangre o una obstrucción. La disminución del riego sanguíneo puede ser unilateral, cuando afecta únicamente a un riñón, o bilateral, cuando afecta a los dos riñones. El conjunto de los daños que sufre el tejido o el órgano debido a la isquemia se conoce como “daño causado por isquemia renal”.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia-reperusión en el riñón o isquemia-reperusión renal. La expresión “daño por isquemia-reperusión renal” se refiere al conjunto de los daños que sufre el riñón debido a una disminución del riego sanguíneo (isquemia renal) seguida de una restauración del riego sanguíneo (reperusión).

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño que sufre el tejido renal o el riñón como consecuencia de su exposición a toxinas como, por ejemplo, pero sin limitarse, antibióticos, anestésicos, quimioterapéuticos, contrastes radiológicos, metales pesados, fungicidas, pesticidas, solventes orgánicos, venenos animales, tóxicos fúngicos o tóxicos de origen endógeno.

## ES 2 350 078 A1

Como consecuencia de los daños causados por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en un órgano puede producirse un fallo agudo orgánico. Los términos “fallo agudo”, “fallo orgánico agudo” o “fracaso orgánico agudo”, se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro brusco de la función de un determinado órgano.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano. Preferiblemente, el tejido o el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente, el órgano es el riñón.

10 Como consecuencia de los daños causados por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en el riñón puede producirse un fallo renal agudo (FRA). Los términos “fallo renal agudo”, “fracaso renal agudo” o “insuficiencia renal aguda (IRA)” se refieren a un síndrome clínico que se caracteriza por un deterioro brusco de la función renal que tiene como consecuencia una disminución del filtrado glomerular y una acumulación de productos nitrogenados séricos (como, por ejemplo, urea o creatinina), pudiendo también producirse alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y del equilibrio ácido base. El FRA puede clasificarse en tres grandes grupos: FRA funcional, FRA parenquimatoso o FRA obstructivo. En el FRA funcional existe una inadecuada perfusión renal que compromete el filtrado glomerular, pero el parénquima glomerular está íntegro. La insuficiencia renal que se produce durante el FRA funcional es reversible tras restaurar el flujo plasmático, pero si persiste la situación que lo ha desencadenado evolucionará hacia un FRA parenquimatoso. En el FRA parenquimatoso la causa del deterioro de la función renal es un daño en las diferentes estructuras anatómicas renales, que da lugar a diferentes síndromes clínicos: el túbulo (necrosis tubular aguda), el glomérulo (necrosis glomerular), el intersticio tubular (necrosis tubular intersticial) o los vasos sanguíneos. En el FRA obstructivo se produce un aumento de la presión en la vía urinaria, que se transmite retrógradamente, comprometiendo el filtrado glomerular normal, como consecuencia de la obstrucción de alguno de los conductos del riñón.

25 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un FRA.

30 Una de las situaciones más frecuentes de daño causado por isquemia-reperusión tiene lugar en el transplante de órganos. De hecho, el fallo orgánico agudo es una de las primeras causas por las que se produce el rechazo de órganos transplantados.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. Preferiblemente, el tejido o el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Más preferiblemente, el órgano es el riñón.

El FRA asociado al daño causado por isquemia-reperusión es una de las principales causas por las que se produce el retraso inicial en la función o el rechazo de un riñón transplantado.

40 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la célula de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en un tejido o un órgano. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en un órgano de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperusión o toxinas en el riñón.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Una realización más preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento de un FRA.

60 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado de la lista que comprende riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la célula de la invención para la prevención o el tratamiento del rechazo de un riñón transplantado.

## ES 2 350 078 A1

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica según se ha descrito anteriormente en este documento, comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende además otro principio activo. En una realización más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, además, otro principio activo.

Como se emplea aquí, los términos “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” se refiere a cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o función del cuerpo del ser humano u otros animales.

Las composiciones pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal y, más preferiblemente, a un mamífero, incluyendo a un humano, por una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraaricular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular o tópica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, edad, peso, sexo o tolerancia del animal. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de la composición farmacéuticamente efectiva que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y del efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” o “vehículos” farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para obtener la célula de la invención que comprende:

- a. obtener una célula del SMF aislada, y
- b. transfectar la célula del paso (a) con un ácido nucleico que comprende un polinucleótido, donde dicho polinucleótido presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista consiste en:
  - i) al menos, un 50%,
  - ii) al menos, un 60%,
  - iii) al menos, un 70%,
  - iv) al menos, un 80%, y
  - v) al menos, un 90%.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) del método de la invención es la SEQ ID NO: 1.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) del método de la invención es la SEQ ID NO: 2.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido comprendido en el ácido nucleico transfectado en el paso (b) está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- d. una señal de poliadenilación, o
- e. un activador transcripcional.

El término “transfectar”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a introducir un ácido nucleico exógeno al interior de una célula eucariota.

El ácido nucleico del paso (b) del método de la presente invención puede ser introducido al interior de la célula del SMF aislada obtenida en el paso (a), por ejemplo, pero sin limitarse, como ácido nucleico desnudo o mediante un vector.

Tal como se utiliza en la presente invención los términos “vector” o “vector de transferencia génica”, se refieren a sistemas utilizados en el proceso de transfección de un ácido nucleico exógeno al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación del ácido nucleico al interior de la célula.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la célula del SMF se pone en contacto con un vector de transferencia génica, el cual comprende el ácido nucleico que comprende el polinucleótido del paso (b), de tal manera que el ácido nucleico es introducido en la célula bajo las condiciones apropiadas para que dicho polinucleótido sea expresado en el interior de la célula. El vector puede ser viral o no viral. Existen numerosos vectores virales y no virales para introducir DNA exógeno dentro de las células madre que son bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales y vectores derivados de coronavirus. Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a los siguientes: *gene gun*, liposomas, poliaminas, péptidos, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-policación, proteínas y sistemas de transferencia génica mediados por receptor.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, la transfección del ácido nucleico del paso (b) se realiza empleando un vector adenoviral.

20 Preferiblemente, la célula del SMF obtenida en el paso (a) es una célula de mamífero, y más, preferiblemente, de un humano. Aún más preferiblemente, la célula del SMF es un monocito o un macrófago.

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

### Descripción de las figuras

30 Figura 1. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre el daño renal. A. Efecto sobre la expresión del marcador de daño funcional del riñón BUN. B. Efecto sobre la expresión del marcador de daño funcional del riñón creatina. A y B. Datos representados como la media +/- SEM;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ . C. Efecto sobre el daño histológico analizado en secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. Magnificación original x 400.

40 Figura 2. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la proliferación y la regeneración renal. A. Efecto sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración renal *Ki67*. B. Efecto sobre la expresión del marcador de proliferación y regeneración renal *creatina*. A y B. Datos representados como la media +/- SEM;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ . C. Efecto sobre la expresión de los marcadores regenerativos PCNA y Statmina analizada mediante inmunofluorescencia. El PCNA se caracteriza por una tinción nuclear de las células durante la fase G1 tardía y fase S. La Statmina sin embargo es una proteína citosólica que actúa en la transición de la fase G2 a M (ver flechas). Magnificación original x 400.

45 Figura 3. Muestra el efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la inflamación. Efecto sobre la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *TNF- $\alpha$*  (A) e *IL-1* (B). Efecto sobre la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias *IL-10* (C) e *IL-4* (D). A-C. Datos representados como la media +/- SEM;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

### 50 Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

#### Ejemplo 1

60 *Macrófagos modificados genéticamente para la sobreexpresión de NGAL para inducir la regeneración en un modelo animal de isquemia-reperfusión renal*

#### *Material y métodos empleados*

##### *Modelo de isquemia-reperfusión renal*

65 Se utilizaron ratas de la cepa Sprague Dawley, machos de un peso aproximadamente de 225-250 g (Charles River, Francia). Todas las intervenciones se realizaron bajo la supervisión del comité ético de nuestra institución y siguieron las pautas de la Unión Europea. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes, la temperatura fue de 21-



## ES 2 350 078 A1

22°C, la humedad relativa del 70% y los ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar de pienso AO4 (Panlab, Barcelona) y agua de la red de Barcelona *ad libitum*.

Los animales fueron anestesiados con Isoflurane, se colocaron en posición supina y se mantuvo la temperatura corporal entre 36 y 37°C. Después de realizar una laparotomía media para acceder al riñón apartando cuidadosamente el paquete intestinal, se indujo la isquemia bilateral mediante el clampaje de ambos pedículos arteriovenosos renales durante 45 minutos con un clamp microvascular no-traumático. Posteriormente se inició el período de reperfusión, con la retirada del clamp y se verificó visualmente con la observación del regreso del flujo sanguíneo al riñón. A continuación se suturó el animal y se administró Buprex subcutáneo (4,16 µg/100 g de peso). Animales sujetos a una operación *sham* fueron utilizados como controles. Durante todo el proceso de operación, los animales fueron bien hidratados y la temperatura corporal se mantuvo alrededor de 37°C. Durante el tiempo de reperfusión, los animales se estabilizaron bajo el control de un veterinario. Pasadas 24 h de reperfusión, el animal se sacrificó para la extracción de los riñones y de sangre. El tejido fue conservado inmediatamente en formol para las pruebas histológicas o congelado en nieve carbónica y posteriormente almacenado a - 80°C.

### *Grupos de estudio*

*I/R*.- Animales sometidos a 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión.

*I/R NGAL*.- Animales sometidos a *I/R* pero con inyección de  $10 \times 10^6$  macrófagos genéticamente modificados para expresar NGAL por animal, mediante punción directa de la vena cava inferior, 1 hora después del inicio del tiempo de reperfusión.

*I/R bgal*.- Animales sometidos a *I/R* pero con inyección de  $10 \times 10^6$  macrófagos con el virus control para expresar la  $\beta$ -Galactosidasa por animal, mediante punción directa de la vena cava inferior, 1 hora después del inicio del tiempo de reperfusión.

*Sham NGAL*.- Animales control, no sometidos a isquemia/reperfusión y con administración de  $10 \times 10^6$  macrófagos modificados genéticamente para expresar NGAL por animal.

*Sham bgal*.- Idem que SHAM NGAL, pero con inyección de macrófagos con el virus control para expresar la  $\beta$ -Galactosidasa.

*Cultivo celular de macrófagos primarios derivados de la médula ósea, transfección viral y posterior infusión al animal*

Células derivadas de la médula ósea de ratas Sprague Dawley fueron recogidas mediante la aspiración de los fémures y se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM):F-12 1:1 (volumen/volumen) con concentración alta de glucosa, 15 mM HEPES y glutamina estable, suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomina, 10% (volumen final) suero bovino fetal inactivado, y 10 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Invitrogen, Barcelona). Las células se mantuvieron en frascos de teflón, no adherentes, durante 7 días para la maduración a macrófagos.

Posteriormente, los macrófagos fueron separados mediante adherencia diferencial. Las células se mantuvieron en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> en aire, a 37°C.

Para la transfección viral,  $10 \times 10^6$  células fueron transfectadas con un adenovirus para sobreexpresar el NGAL (Ad-NGAL; producido y purificado por Viraquest, USA). Como virus control utilizamos un vector similar para la expresión de  $\beta$ -Galactosidasa (Ad-bgal), que fue producido en células HEK 293 y purificado por gradiente de cloruro de cesio. El título de cada virus fue determinado mediante análisis en placa en células HeLa. La eficiencia de cada transfección fue medida mediante la determinación de proteína por ELISA en el sobrenadante del cultivo celular. La transfección viral se estableció con una multiplicidad de infección (MOI) de 50. A las 48 horas post-transfección, los macrófagos fueron recogidos en un tubo y se mantuvieron en PBS hasta su posterior infusión en el animal.

### *Marcadores de daño funcional del riñón*

Nitrógeno ureico en sangre (BUN) y creatinina en plasma fueron analizados como marcadores de función renal utilizando un ADVIA 2400 (Siemens Medical Diagnostics) del Hospital Clínico de Barcelona.

### *Análisis histológico*

Las muestras fueron incluidas en parafina, cortadas en secciones de 4 µm, y teñido con hematoxilina y eosina (H&E). Evaluación del daño histológico fue determinado mediante microscopía convencional.

### *Inmunofluorescencia de los marcadores regenerativos PCNA y Statmina*

Todas las muestras se fijaron en formaldehído al 4% y posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de 4 µm que fueron lavados en xilol, y deshidratados mediante alcoholes de graduación decreciente, con lavado

## ES 2 350 078 A1

en PBS y posterior bloqueo de uniones inespecíficas con suero de cabra durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las muestras con PCNA (Santa Cruz Biotechnology) y Statmina (Calbiochem) para detectar la regeneración en el tejido renal. Las muestras se incubaron con anticuerpos fluorescentes secundarios para revelar la tinción con PCNA y Statmina en el tejido (rabbit anti-goat IgG conjugado con Alexa Fluor 488 para Statmina y goat anti-mouse IgG conjugado con Alexa Fluor 568 para PCNA; Molecular Probes) durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Los cortes fueron montados con mowiol (Calbiochem) y las imágenes se obtenían mediante un microscopio confocal láser Leica TCS NT (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) a una magnificación original de x400.

### RT-PCR a tiempo real

El RNA de las muestras de riñón fue extraído mediante el reactivo TRIzol de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Barcelona). Se extrajo el RNA total de las células con el RNeasy mini Kit de Qiagen (Madrid) acorde a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA fueron calculadas por determinación de absorbancia a 260 nm. La integridad del RNA así obtenido se examinó mediante análisis de las bandas de RNA ribosomal 18S y 28S detectado y analizado en el Bioanalyzer del Hospital Clínico Barcelona (Agilent).

La expresión de los genes analizados se midió mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real normalizada con el gen constitutivo (o *housekeeping*, en inglés) de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las RT-PCRs a tiempo real se llevaron a cabo en un Termociclador Bio-Rad (iCycler iQ Real-Time PCR detection System, Bio-Rad, Barcelona) y las amplificaciones se hicieron en reacciones de 20  $\mu$ l con el RT-PCR Kit con SYBR-Green en dos pasos (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Los primeros fueron los siguientes: *Ki-67*: directo, SEQ ID NO: 5; inverso, SEQ ID NO: 6; *PCNA*: directo, SEQ ID NO: 7; inverso, SEQ ID NO: 8; *NGAL*: directo, SEQ ID NO: 9; inverso, SEQ ID NO: 10; *TNF- $\alpha$* : directo, SEQ ID NO: 11; inverso, SEQ ID NO: 12; *GAPDH*: directo, SEQ ID NO: 13; inverso, SEQ ID NO: 14. Los datos de las demás citoquinas (*IL-1*, *IL-10*, *IL-4*) fueron obtenidas usando primeros pre-validados de Qiagen (Barcelona, España) con los números de referencia QT00181657, QT00106169 y QT00160678, respectivamente.

### ELISA de NGAL

El sobrenadante de las células fue recogido, centrifugado y guardado a -80°C hasta su uso. La placa de ELISA de 96 pocillos se preincubó con Anti-mouse Lipocalin-2/NGAL (R&D Systems, Madrid), mediante la adición de 1  $\mu$ l de la solución madre del anticuerpo, diluido en 99  $\mu$ l de tampón carbonato 1:100 durante 18 horas a 4°C. Tras lavado de la placa, se bloquearon las uniones inespecíficas durante 1 h a temperatura ambiente.

Se añadieron 50  $\mu$ L de cada muestra a la placa de ELISA y se mantuvieron 1 hora a temperatura ambiente. Tras otro lavado, se añadieron 100  $\mu$ l de un anticuerpo de detección biotinilado, Anti-Mouse Lipocalin-2/NGAL (R&D Systems, Madrid), obtenido tras dilución de 1  $\mu$ l de la solución madre en 99  $\mu$ l de tampón de dilución 1:100. El anticuerpo biotinilado se incubó durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ l de avidina HRP-conjugada (Zymed, Invitrogen, Barcelona), obtenida tras dilución de 1  $\mu$ l de la solución madre en 1999  $\mu$ l de tampón de dilución 1:2000. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, para reconocer la unión del anticuerpo biotinilado.

Finalmente se aplicó el agente colorante (OPD tablets, Dako, Barcelona) para medir la absorbancia a 492 nm.

### Análisis estadístico

Los datos se muestran como media +/- el error estándar de la media (SEM), y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

### Resultados obtenidos

#### Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre el daño renal

Como se observa en la figura 1A, el nitrógeno ureico en sangre (BUN), marcador de daño renal funcional, se incrementa significativamente en el grupo de isquemia-reperfusión. Sin embargo, al administrar macrófagos genéticamente modificados para sobreexpresar NGAL se observa un descenso significativo de este parámetro de daño. En ninguno de los grupos a los que se administró macrófagos transfectados con el virus control (Sham bgal; I/R bgal) se pudo detectar ningún efecto protector respecto a sus respectivos controles (Sham; I/R). Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

Como se observa en la figura 1B, la creatinina en sangre, marcador de daño renal funcional, se incrementa significativamente en el grupo de isquemia-reperfusión. Sin embargo, al administrar macrófagos genéticamente modificados para sobreexpresar NGAL se observa un descenso significativo de este parámetro de daño. En ninguno de los grupos a

los que se les administró macrófagos transfectados con el virus control (Sham bgal; I/R bgal) se pudo detectar ningún efecto protector respecto a sus respectivos controles (Sham; I/R). Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

5

El análisis histológico de cortes del tejido renal (figura 1C) revela que el área más afectada se encuentra en la médula del riñón. A las 24 horas de reperfusión se observa edema intersticial grave, infiltración de células, necrosis, y la deposición de material proteico en el lumen tubular. Sin embargo, el tratamiento con macrófagos previamente modificados para sobreexpresar el NGAL preserva la integridad del tejido renal. Los macrófagos tratados con el virus control no tienen este efecto protector y se observa un grado de daño parecido a las 24 horas de reperfusión. En la figura 1C se muestran fotos representativas de los tres grupos principales (Sham; I/R; I/R NGAL).

10

*Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la proliferación y la regeneración*

15

En la figura 2A se muestra la expresión de Ki-67, marcador de proliferación celular y regeneración que se expresa durante todas las fases del ciclo celular, excepto G0. Los resultados de la RT-PCR a tiempo real muestran que a las 24 horas de reperfusión no se expresa Ki-67 en las células epiteliales tubulares del riñón y por lo tanto no hay regeneración en este tiempo en que las células probablemente están muriendo por apoptosis inducida por la isquemia-reperfusión. Al contrario, al administrar macrófagos sobreexpresando el NGAL detectamos un aumento significativo de la proliferación celular en el tejido y por lo tanto una avanzada regeneración al tiempo de 24 horas de reperfusión. Los macrófagos tratados con el virus control no tuvieron la capacidad de inducir la proliferación en el tejido renal lo que nos indica que es el NGAL el responsable de promover la regeneración renal. Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

20

En la figura 2B se muestra la expresión de PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), marcador de proliferación celular y regeneración que tiene un pico de expresión en la fase S del ciclo celular, y por lo tanto en células mitóticamente activas. Los resultados de la RT-PCR a tiempo real muestran que solo se encuentra sobreexpresado en el grupo de macrófagos sobreexpresando NGAL. Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

25

La figura 2C muestra el perfil de regeneración mediante inmunofluorescencia de PCNA y Statmina. Recientemente, la Statmina se ha descubierto como nuevo marcador de proliferación en la reparación tras un insulto agudo por isquemia renal. Es una fosfoproteína citosólica y está asociada a la inducción de proliferación y la reentrada de células en el ciclo celular. El PCNA sin embargo interactúa con diversas moléculas, y afecta al metabolismo celular, a los mecanismos de reparación del DNA y a su síntesis. Detectamos mediante microscopía confocal que el tratamiento con macrófagos sobreexpresando la NGAL efectivamente inducen tanto la expresión de PCNA como de Statmina a un nivel muy alto. Estas observaciones confirman el papel clave de la NGAL en la inducción de la regeneración renal. Al contrario, cuando administramos macrófagos transfectados con el virus control, no se detecta ningún efecto sobre la proliferación celular y los niveles de expresión de PCNA y Statmina se parecen al grupo de 24 horas de reperfusión.

30

*Efecto de la administración de los macrófagos modificados genéticamente para sobreexpresar NGAL sobre la inflamación*

35

La figura 3 muestra los resultados de RT-PCR que indican la expresión de citoquinas tanto pro- como antiinflamatorias tras el tratamiento con macrófagos genéticamente modificadas con Ad-NGAL. Los resultados muestran una disminución de citoquinas proinflamatorias, representadas por TNF- $\alpha$  e IL-1, cuando administramos macrófagos tratados con el virus portador de NGAL (en los animales del grupo I/R NGAL) comparado con los niveles de inflamación a las 24 horas de reperfusión en los animales no tratados (I/R) o tratados con el virus control (I/R bgal). Al contrario, las citoquinas antiinflamatorias, representadas por IL-10 e IL-4, muestran un aumento tras el tratamiento con macrófagos que sobreexpresan NGAL. Por lo tanto podemos deducir un efecto protector y antiinflamatorio con el tratamiento de macrófagos genéticamente modificados y el papel clave de NGAL en estos procesos. Los datos se muestran como media +/- SEM, y los valores de  $p > 0,05$  se consideraron significativos. Las diferencias estadísticas entre grupos se analizaron con un análisis ANOVA, y en caso de significancia se aplicó la t-Student.

40

45

50

55

## ES 2 350 078 A1

### REIVINDICACIONES

5 1. Célula del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) aislada modificada genéticamente **caracterizada** porque comprende un polinucleótido exógeno que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista que consiste en:

- 10 a. al menos, un 50%,
- b. al menos, un 60%,
- c. al menos, un 70%,
- d. al menos, un 80%, y
- 15 e. al menos, un 90%,

donde dicho polinucleótido codifica para una variante funcional de SEQ ID NO: 1.

20 2. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 1 **caracterizada** porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 1.

3. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 1 **caracterizada** porque comprende el polinucleótido exógeno con la SEQ ID NO: 2.

25 4. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polinucleótido exógeno está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- 30 a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,
- b. una señal de inicio de la transcripción,
- c. una señal de terminación de la transcripción,
- d. una señal de poliadenilación, o
- 35 e. un activador transcripcional.

40 5. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el polinucleótido exógeno codifica una secuencia aminoacídica que presenta una identidad con la SEQ ID NO: 3 seleccionada de la lista que consiste en:

- a. al menos, un 50%,
- b. al menos, un 60%,
- 45 c. al menos, un 70%,
- d. al menos, un 80%, y
- 50 e. al menos, un 90%,

donde dicho polinucleótido codifica para una variante funcional de SEQ ID NO: 3.

55 6. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 5 donde el polinucleótido exógeno codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

7. Célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 5 donde el polinucleótido exógeno codifica la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4.

60 8. Célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde dicha célula es un monocito o un macrófago.

9. Composición farmacéutica que comprende la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

65 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## ES 2 350 078 A1

11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 que además comprende otro principio activo.

5 12. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la elaboración de un medicamento.

10 13. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del daño causado por isquemia, isquemia-reperfusión o toxinas en un tejido o un órgano.

14. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un fallo agudo de un órgano.

15 15. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 12 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del rechazo de un órgano transplantado.

20 16. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 donde el órgano es de la lista que comprende: riñón, hígado, cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, colon, páncreas, vejiga, útero o piel.

17. Uso de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 16 donde el órgano es el riñón.

25 18. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:

a. obtener una célula del SMF aislada, y

b. transfectar la célula del paso (a) con un ácido nucleico que comprende un polinucleótido, donde dicho polinucleótido presenta una identidad con la SEQ ID NO: 1 seleccionada de la lista consiste en:

30 i) al menos, un 50%,

ii) al menos, un 60%,

35 iii) al menos, un 70%,

iv) al menos, un 80%, y

v) al menos, un 90%.

40 y además dicho polinucleótido codifica para una variante funcional de SEQ ID NO: 1.

45 19. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 18 donde el polinucleótido del paso (b) es la SEQ ID NO: 1.

20. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según la reivindicación 18 donde el polinucleótido del paso (b) es la SEQ ID NO: 2.

50 21. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 donde el polinucleótido del paso (b) está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

a. un promotor que dirija la transcripción de dicho polinucleótido,

55 b. una señal de inicio de la transcripción,

c. una señal de terminación de la transcripción,

d. una señal de poliadenilación, o

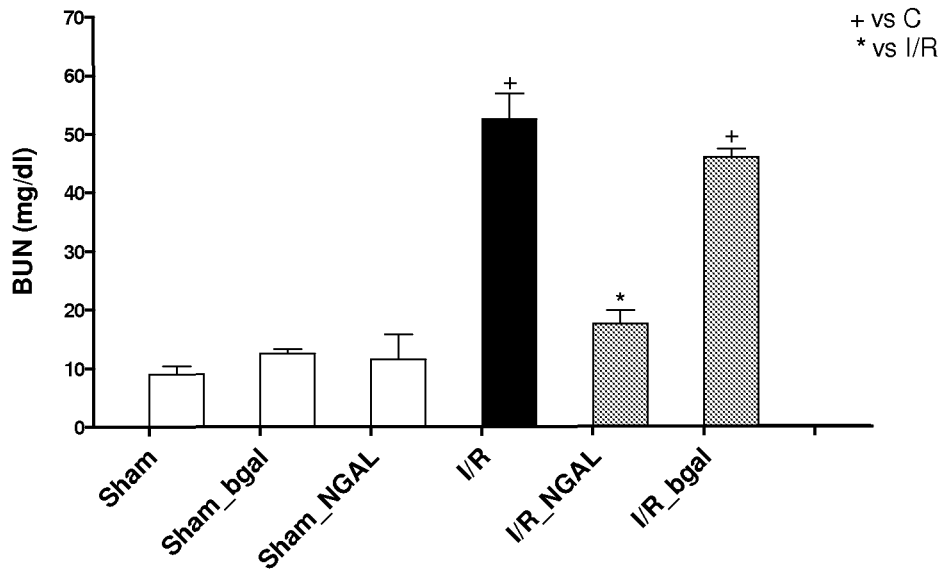
60 e. un activador transcripcional.

22. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 donde la transfección del ácido nucleico del paso (b) se realiza empleando un vector adenoviral.

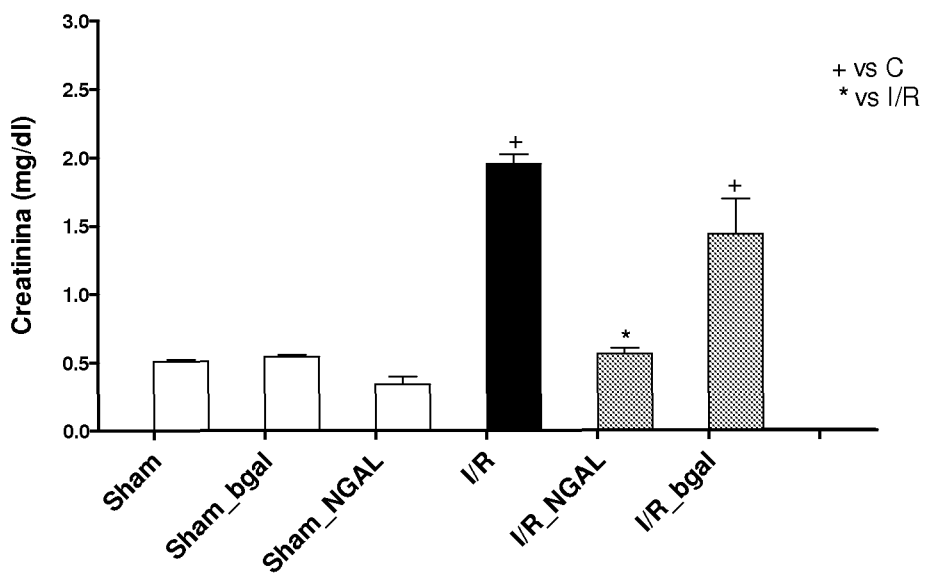
65 23. Método de obtención de la célula del SMF modificada genéticamente según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22 donde la célula del SMF aislada en el paso (a) es un monocito o un macrófago.

**FIG.1**

**A.**

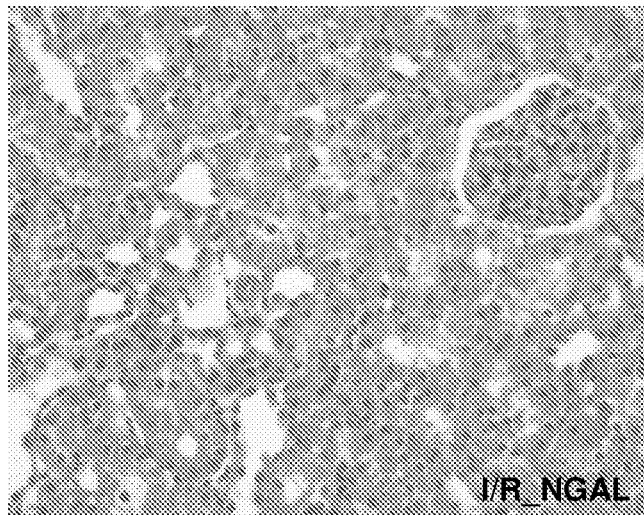
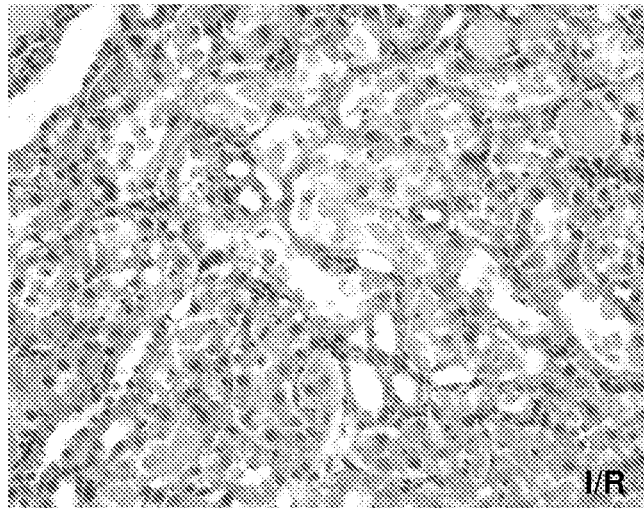
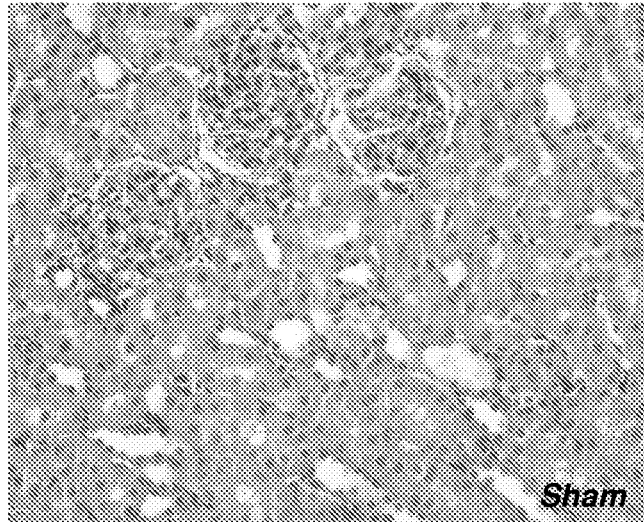


**B.**



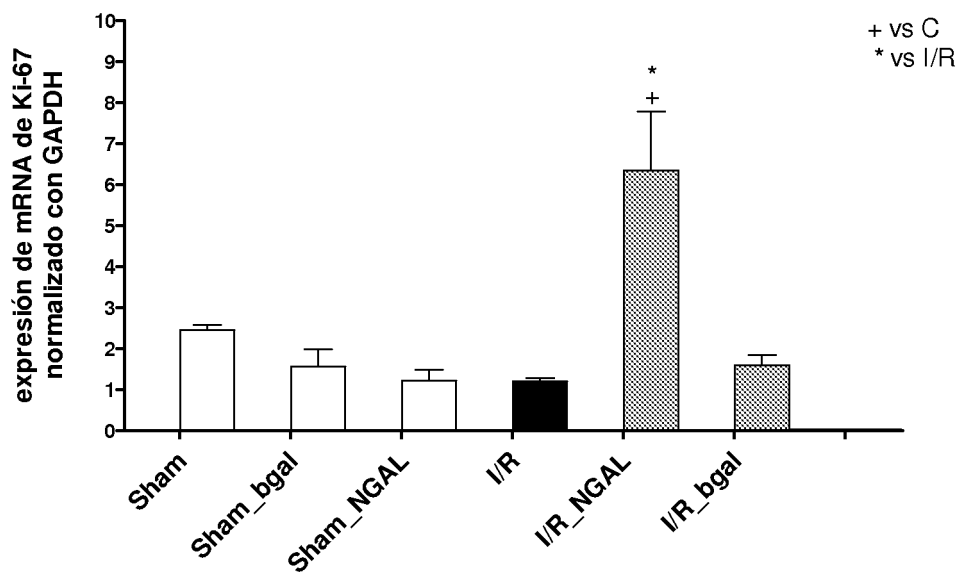
**FIG.1**

**C.**

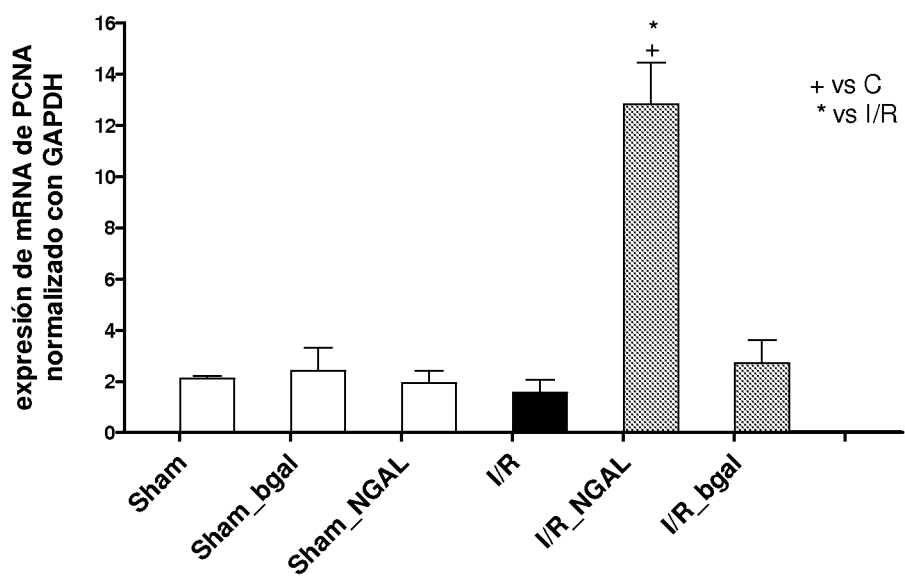


**FIG.2**

**A.**



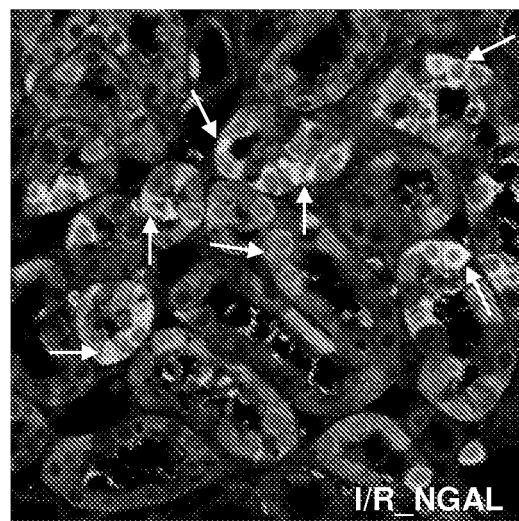
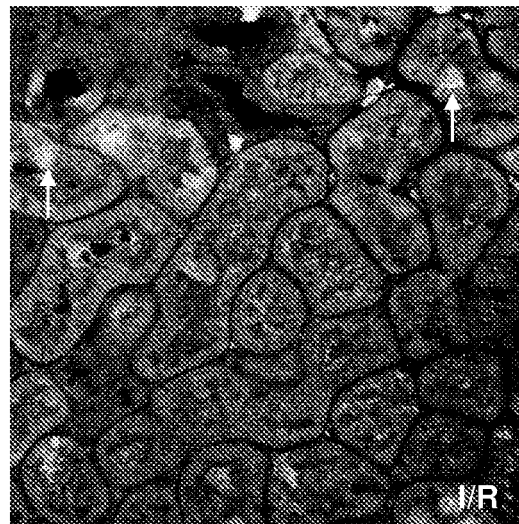
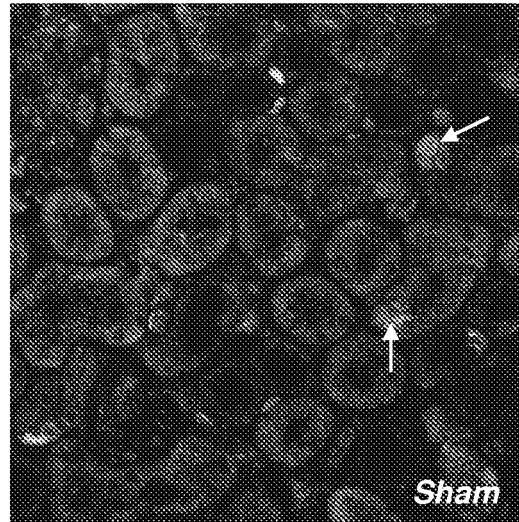
**B.**





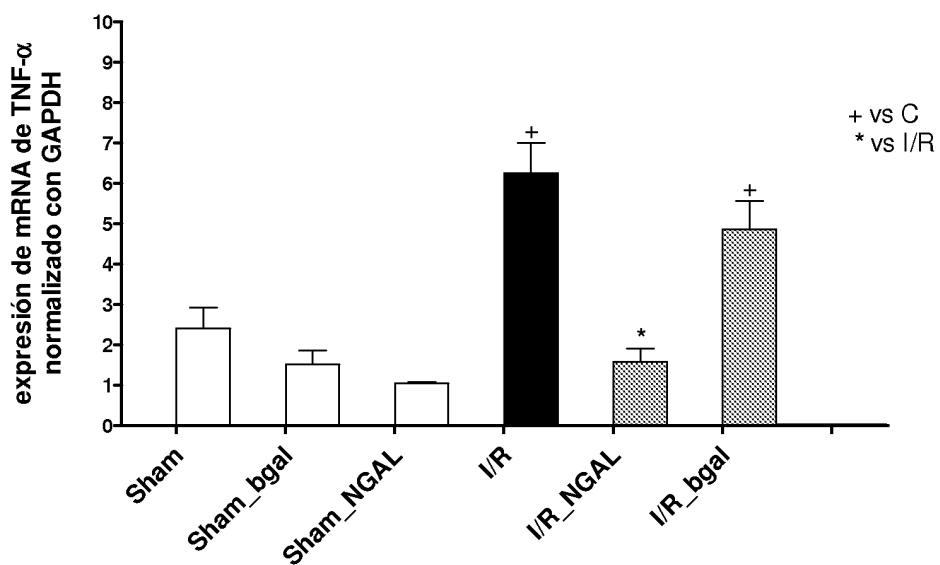
**FIG.2**

**C.**

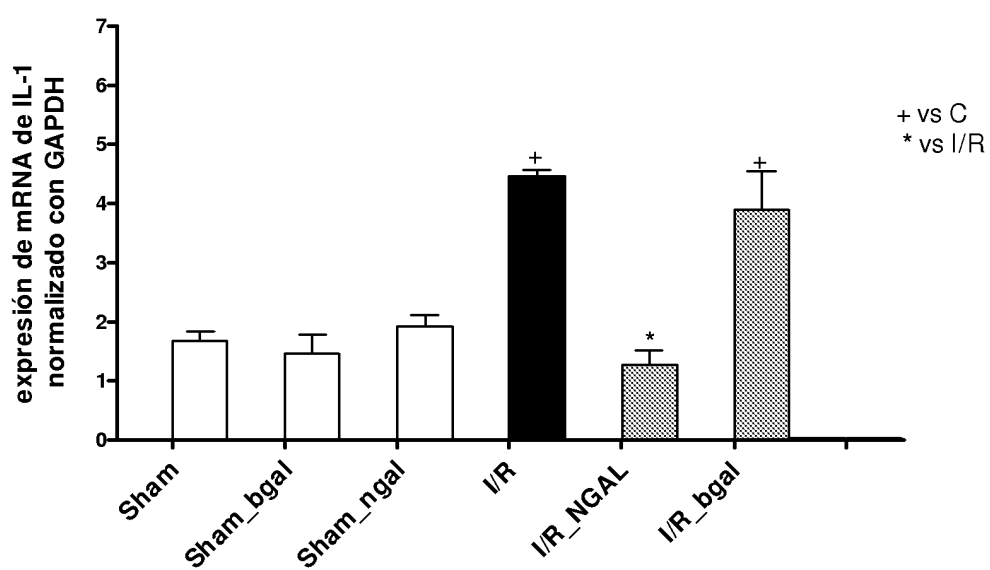


**FIG.3**

**A.**

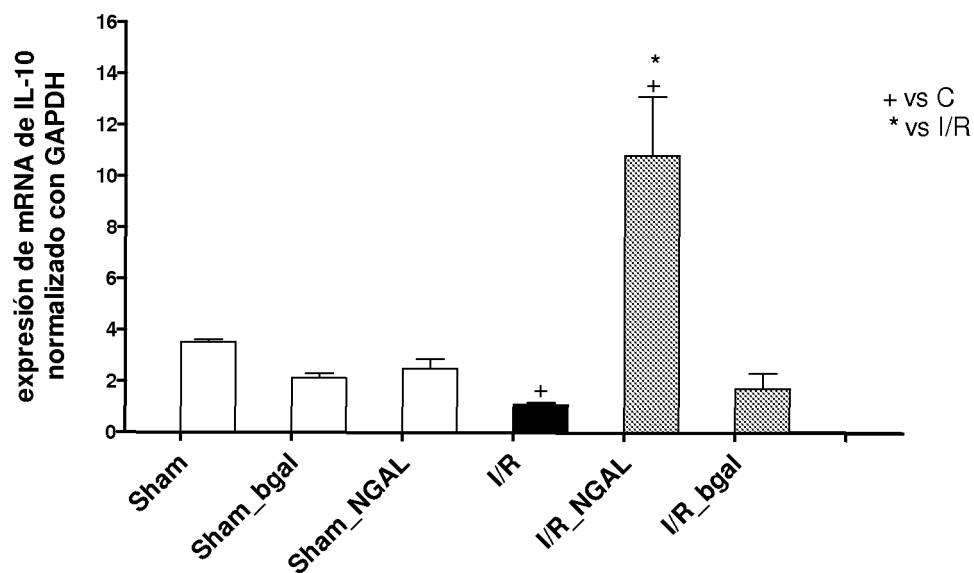


**B.**

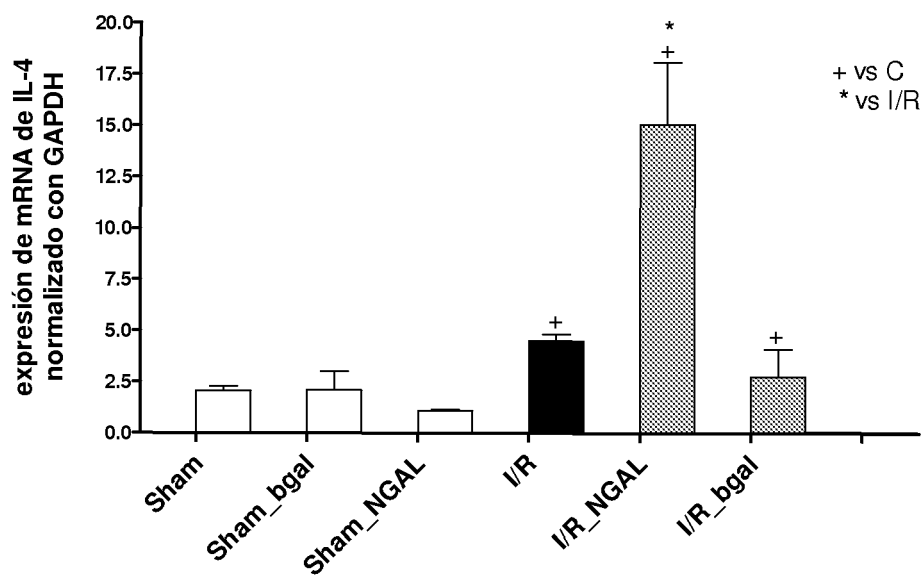


**FIG.3**

**C.**



**D.**



# ES 2 350 078 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
- 5 <120> Célula del SMF modificada genéticamente para sobreexpresar NGAL y su uso como medicamento
- <130> ES1641.214
- 10 <160> 14
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1  
<211> 597  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1
- 25 atgcccctag gtctcctgtg gctgggccta gccctggttg gggctctgca tgcccaggcc 60  
caggactcca cctcagacct gatcccagcc ccacctctga gcaagggtccc tctgcagcag 120  
aacttccagg acaaccaatt ccaggggaag tggatatgtg taggcctggc agggaatgca 180  
30 attctcagag aagacaaaga cccgcaaaag atgtatgcca ccatctatga gctgaaagaa 240  
gacaagagct acaatgtcac ctccgtcctg tttaggaaaa agaagtgtga ctactggatc 300  
35 aggacttttg ttccaggttg ccagcccggc gagttcacgc tgggcaacat taagagttac 360  
cctggattaa cgagttacct cgtccgagtg gtgagcacca actacaacca gcatgctatg 420  
gtgttcttca agaaagtttc tcaaaacagg gagtacttca agatcacctt ctacgggaga 480  
40 accaaggagc tgacttcgga actaaaggag aacttcatcc gcttctccaa atctctgggc 540  
ctccctgaaa accacatcgt cttccctgtc ccaatcgacc agtgtatcga cggctga 597
- 45 <210> 2  
<211> 603  
<212> DNA  
50 <213> *Mus musculus*
- 55
- 60
- 65

## ES 2 350 078 A1

<400> 2

5	atggccctga gtgtcatgtg tctgggcctt gccctgcttg gggtcctgca gagccaggcc	60
	caggactcaa ctcagaactt gatccctgcc ccactctctgc tcaactgtccc cctgcagcca	120
	gacttccgga gcgatcagtt ccggggcagg tggtagcttg tgggcctggc aggcaatgcg	180
10	gtccagaaaa aacagaagg cagctttacg atgtacagca ccatctatga gctacaagag	240
	aacaatagct acaatgtcac ctccatcctg gtcagggacc aggaccaggg ctgtcgctac	300
15	tggatcagaa catttgttcc aagctccagg gctggccagt tcaactctggg aaatatgcac	360
	aggtatcctc aggtacagag ctacaatgtg caagtggcca ccacggacta caaccagttc	420
	gccatggtat ttttccgaaa gacttctgaa aacaagcaat acttcaaaat taccctgtat	480
20	ggaagaacca aggagctgtc ccctgaactg aaggaacgtt tcacccgctt tgccaagtct	540
	ctgggcctca aggacgacaa catcatcttc tctgtcccca ccgaccaatg cattgacaac	600
25	tga	603

<210> 3

30 <211> 198

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 350 078 A1

<400> 3

5 Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu  
 1 5 10 15  
 10 His Ala Gln Ala Gln Asp Ser Thr Ser Asp Leu Ile Pro Ala Pro Pro  
 20  
 15 Leu Ser Lys Val Pro Leu Gln Gln Asn Phe Gln Asp Asn Gln Phe Gln  
 35 40 45  
 20 Gly Lys Trp Tyr Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Arg Glu  
 50 55 60  
 25 Asp Lys Asp Pro Gln Lys Met Tyr Ala Thr Ile Tyr Glu Leu Lys Glu  
 65 70 75 80  
 30 Asp Lys Ser Tyr Asn Val Thr Ser Val Leu Phe Arg Lys Lys Lys Cys  
 85 90 95  
 35 Asp Tyr Trp Ile Arg Thr Phe Val Pro Gly Cys Gln Pro Gly Glu Phe  
 100 105 110  
 40 Thr Leu Gly Asn Ile Lys Ser Tyr Pro Gly Leu Thr Ser Tyr Leu Val  
 115 120 125  
 45 Arg Val Val Ser Thr Asn Tyr Asn Gln His Ala Met Val Phe Phe Lys  
 130 135 140  
 50 Lys Val Ser Gln Asn Arg Glu Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr Gly Arg  
 145 150 155 160  
 55 Thr Lys Glu Leu Thr Ser Glu Leu Lys Glu Asn Phe Ile Arg Phe Ser  
 165 170 175  
 60 Lys Ser Leu Gly Leu Pro Glu Asn His Ile Val Phe Pro Val Pro Ile  
 180 185 190  
 65 Asp Gln Cys Ile Asp Gly  
 195

<210> 4

<211> 200

60 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 350 078 A1

<400> 4

Met Ala Leu Ser Val Met Cys Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu  
 1 5 10 15  
 5 Gln Ser Gln Ala Gln Asp Ser Thr Gln Asn Leu Ile Pro Ala Pro Ser  
 20 25 30  
 10 Leu Leu Thr Val Pro Leu Gln Pro Asp Phe Arg Ser Asp Gln Phe Arg  
 35 40 45  
 15 Gly Arg Trp Tyr Val Val Gly Leu Ala Gly Asn Ala Val Gln Lys Lys  
 50 55 60  
 20 Thr Glu Gly Ser Phe Thr Met Tyr Ser Thr Ile Tyr Glu Leu Gln Glu  
 65 70 75 80  
 25 Asn Asn Ser Tyr Asn Val Thr Ser Ile Leu Val Arg Asp Gln Asp Gln  
 85 90 95  
 30 Gly Cys Arg Tyr Trp Ile Arg Thr Phe Val Pro Ser Ser Arg Ala Gly  
 100 105 110  
 35 Gln Phe Thr Leu Gly Asn Met His Arg Tyr Pro Gln Val Gln Ser Tyr  
 115 120 125  
 40 Asn Val Gln Val Ala Thr Thr Asp Tyr Asn Gln Phe Ala Met Val Phe  
 130 135 140  
 45 Phe Arg Lys Thr Ser Glu Asn Lys Gln Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 50 Gly Arg Thr Lys Glu Leu Ser Pro Glu Leu Lys Glu Arg Phe Thr Arg  
 165 170 175  
 55 Phe Ala Lys Ser Leu Gly Leu Lys Asp Asp Asn Ile Ile Phe Ser Val  
 180 185 190  
 60 Pro Thr Asp Gln Cys Ile Asp Asn  
 195 200

<210> 5

<211> 20

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> cebador directo para la secuencia del gen Ki67 de *Mus musculus*

<400> 5

65 agacgtgact gggtcccaac

<210> 6

## ES 2 350 078 A1

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
5	<220>	
	<223> cebador inverso para la secuencia del gen Ki67 de <i>Mus musculus</i>	
10	<400> 6	
	actgcttccc gagaactgaa	20
	<210> 7	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
20	<220>	
	<223> cebador directo para la secuencia del gen PCNA de <i>Mus musculus</i>	
	<400> 7	
25	aggacggggt gaagttttct	20
	<210> 8	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
35	<223> cebador inverso para la secuencia del gen PCNA de <i>Mus musculus</i>	
	<400> 8	
	cagtggagtg gcttttgtga	20
40	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
45	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> cebador directo para la secuencia del gen NGAL de <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 9	
	caagtggccg acactgacta	20
55	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
60	<220>	
	<223> cebador inverso para la secuencia del gen ngal de <i>Mus musculus</i>	
65	<400> 10	
	ggtgggaaca gagaaaacga	20



## ES 2 350 078 A1

	<210> 11		
	<211> 20		
	<212> DNA		
5	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador directo para la secuencia del gen TNFalfa de <i>Mus musculus</i>		
10	<400> 11		
	aactcccaga aaagcaagca		20
15	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> DNA		
20	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> cebador inverso para la secuencia del gen TNFalfa de <i>Mus musculus</i>		
25	<400> 12		
	cgagcaggaa tgagaagagg		20
	<210> 13		
30	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
35	<220>		
	<223> cebador directo para la secuencia del gen GAPDH de <i>Mus musculus</i>		
40	<400> 13		
	cccccaatgt atccgttgtg		20
	<210> 14		
45	<211> 24		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
50	<220>		
	<223> cebador inverso para la secuencia del gen Gapdh de <i>Mus musculus</i>		
55	<400> 14		
	tagcccagga tgatgccctt tagt		24
60			
65			



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200930183

② Fecha de presentación de la solicitud: 19.05.2009

③ Fecha de prioridad: 00-00-0000  
00-00-0000  
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y		MISHRA, J., et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase- associated lipocalin. Journal of the American Society of Nephrology: JASN. Diciembre-2004. Vol. 15, nº 12, páginas 3073-3082. ISSN 1046-6673. Ver todo el documento.	1-23
Y		KLUTH, D.C., et al. Gene transfer into inflamed glomeruli using macrophages transfected with adenovirus. Gene therapy. Febrero-2000. Vol. 7, nº 3, páginas 263-270. ISSN 0969-7128. Ver resumen, resultados (primer párrafo) y materiales y métodos.	1-23
Y		VINUESA, E., et al. Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. American journal of physiology. Renal Physiology. Noviembre-2008. Vol. 295, nº 5, páginas F1554-F1562. ISSN 0363-6127. Ver resumen y resultados.	1-23
Y		KITAMURA, M. Adoptive transfer of nuclear factor- kappaB- inactive macrophages to the glomerulus. Kidney international. Febrero-2000. Vol. 57, nº 2, páginas 709-716. ISSN 0085-2538. Ver resumen y métodos (2º epígrafe).	1-23
A		WO 2006066587 A1 (ANTIBODYSHOP A/S) 29.06.2006, todo el documento.	
A		ROUDKENAR, M.H., et al. Neutrophil gelatinase- associated lipocalin acts as a protective factor against H(2)O(2) toxicity. Archives of medical research. Agosto-2008. Vol. 39, nº 6, páginas 560-566. ISSN 0188-4409. Ver todo el documento.	

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
16.09.2010

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 5/0786** (2010.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, Euro Patents, Japan Patents, US Patents, PDB, EMBL All, EMBL human, EMBL Mouse).

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.09.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SÍ</b> <b>NO</b>
	Reivindicaciones _____	
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones _____	<b>SÍ</b> <b>NO</b>
	Reivindicaciones 1-23	

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MISHRA, J., et al.	Dic-2004
D02	KLUTH, D.C., et al.	Febr-2000
D03	VINUESA, E., et al.	Nov-2008
D04	KITAMURA, M.	Febr-2000
D05	WO 2006066587 A1	29.06.2006
D06	ROUDKENAR, M.H., et al.	Ago-2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente describe una célula del sistema mononuclear fagocítico (SMF), más concretamente un macrófago, modificada genéticamente de modo que contiene las secuencias del gen NGAL (lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos), o de la proteína correspondiente. La solicitud reivindica también el método de obtención de esta célula y su uso como medicamento para el tratamiento de daño causado por isquemia, toxinas, fallo agudo o rechazo a transplante de un órgano.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue la célula reivindicada ni su uso, por lo que la invención es nueva según el artículo 6 de la Ley de Patentes.

Sin embargo, no se considera que la solicitud cumpla el requisito de actividad inventiva del artículo 8 de la Ley de Patentes, pues se han encontrado algunos documentos cuya combinación, obvia para el experto en la materia, conduciría al objeto de la invención, como se explica a continuación.

En el documento D01 se describe el uso de la proteína NGAL para el tratamiento del fallo renal agudo producido tras la isquemia. En este trabajo se demuestra que la administración intravenosa de NGAL en ratones modelo con isquemia renal inducida, resulta en un aumento de la proliferación celular, y mejora tanto el daño histopatológico (ver figura 4) como la alteración de la función renal inducida por la isquemia (ver figura 6). La diferencia entre D01 y la presente solicitud es que en ésta la proteína NGAL se aporta al organismo en forma de macrófagos modificados para sobreexpresar el gen correspondiente.

En el documento D02 se divulga un método para transfectar macrófagos mediante adenovirus recombinantes. En este artículo los macrófagos transfectados son dirigidos a la región afectada para, de este modo, reducir la inflamación. Los autores proponen este sistema como una forma muy efectiva de liberar genes en la región renal.

El experto en la materia combinaría de forma evidente la información de los documentos D01 y D02, y emplearía el método de D02 para transfectar macrófagos con el gen de NGAL, obteniendo de este modo las células de la invención. Por tanto, a la luz de lo divulgado en estos dos documentos, la presente solicitud no tendría actividad inventiva.

El documento D03 es un estudio de cómo la lipocalina endógena (Lcn2 o NGAL) induce la regeneración renal en ratones modelo con isquemia renal inducida. Este documento, además de analizar el efecto que determinadas citoquinas tienen en este gen (y, por tanto, en la regeneración renal), evidencia el uso de la proteína NGAL en el tratamiento de la isquemia renal aguda. Para llegar al objeto de la solicitud, el experto en la materia únicamente tendría que introducir esta proteína (o su gen correspondiente) en macrófagos para así dirigirla a la región del daño isquémico.

Esta información la puede obtener de lo divulgado en el documento D04. En este artículo se describe cómo introducir un factor nuclear en macrófagos empleando vectores virales (en este caso, retrovirus), y cómo estos macrófagos recombinantes son empleados para estudiar el posible papel de los macrófagos en estados normales o patológicos del riñón.

El experto en la materia podría, a partir de la información de D03 y D04, deducir de forma evidente la introducción de NGAL en macrófagos, por lo que estos dos documentos anticiparían la solicitud que, por tanto, no tendría actividad inventiva según el artículo 8 de la Ley de Patentes.

## Hoja adicional

Los documentos D05 y D06 se citan como información general del estado de la técnica, puesto que no afectan la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

Así, el documento D05 divulga la utilización de métodos de medida de la lipocalina NGAL para diagnosticar, predecir o determinar la probabilidad de sufrir desórdenes renales en humanos, incluyendo tumores, daño post-isquémico o por toxinas. Aunque la finalidad y el uso coinciden con los del método de la solicitud, en D05 no se aporta lipocalina exógena, ni se emplean técnicas para aumentar la expresión del gen en riñón, por lo que se considera un método diferente al de la solicitud.

En el documento D06 se describe la clonación del gen NGAL en un vector plasmídico, y su transfección a células humanas. Mediante esta técnica (semejante a la reivindicada en la presente solicitud), se observa el efecto de NGAL en la línea celular utilizada (en este caso, se aprecia que el gen ejerce una función protectora frente a toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).