

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 710**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/48 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08715174 .2**
96 Fecha de presentación: **07.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2135951**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **Método para preparar la proteína BETA-NGF humana**

30 Prioridad:
07.03.2007 CN 200710086017

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.08.2012

73 Titular/es:
**Staidson (Beijing) BioPharmaceutical Co., Ltd
NO.5 RONGJINGDONG ST.
BEIJING ECONOMIC-TECHNOLOGICAL, CN**

72 Inventor/es:
**ZHOU, Zhiwen;
CHEN, Hongbo y
ZHANG, Hongshan**

74 Agente/Representante:
Trigo Peces, José Ramón

ES 2 386 710 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

Método para preparar la proteína β -NGF humana.

5 **Sector de la técnica**

[0001] La presente invención hace referencia al método de preparar la proteína β -NGF humana de un gen objetivo ("target") utilizando el roedor transgénico que expresa el gen objetivo de forma estable utilizando la tecnología de cultivo de células madre embrionarias (ME) y la tecnología de recombinación homóloga para integrar el gen objetivo en el genoma y sustituir el correspondiente gen del roedor.

10 **Estado de la técnica**

[0002] El NGF (Factor de Crecimiento Nervioso) fue el primer regulador de crecimiento neuronal que fue descubierto y confirmado y el factor neurotrófico mejor descrito. [Ho JL, He S, Hu A et al., J Exp Med, 1995, 181 (4) :1493 - 1505.]. El NGF desempeña papeles importantes en las etapas de la proliferación y diferenciación fenotípica de las células madre neuronales, el desarrollo de neuronas, el crecimiento de axones, la síntesis de neurotransmisores y apoptosis celular, etc. [Sayada C, Denamur E, Elion J et al., Gene, 1992, 120 (1) :129-130.]. El NGF regula la diferenciación y maduración de las neuronas simpáticas y sensoriales, está involucrada en soportar el funcionamiento normal de las neuronas simpáticas adultas, y participa en la nutrición de las neuronas sensoriales adultas [Zhang D, Yang X, Berry J, et al., J Infect Dis, 1997, 176 (4): 1035-1040.]. Los desarrollos y diferenciaciones de las neuronas colinérgicas del lóbulo frontal basal y las interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado del cerebro en el sistema nervioso central también están regulados por el NGF [Pal S, Barnhart KM, Wei Q, et al., Vaccine, 1999, 17 (5) :459-465.]. Dada la importancia de la actividad fisiológica del NGF, está demostrado que tiene unos valores de aplicación clínica muy importantes.

[0003] El NGF humano se compone de tres tipos de cadenas de péptidos: α , β y γ , unidas por enlaces no covalentes en forma de $\alpha_2\beta_2\gamma_2$. También se ha demostrado que la subunidad β posee toda la bioactividad del NGF, en el que la subunidad β es un regulador compuesto de dos cadenas de 118-amino-ácidos unidas por enlaces no covalentes. En cada monómero hay tres enlaces disulfuro; y la correcta formación de los tres enlaces disulfuro (Cys58-Cys108, Cys68-Cys110, Cys15-Cys80) es la base crítica para el plegamiento de proteínas, y luego afecta a la bioactividad de la NGF- β . Debido a la concentración evanescente y al contenido de NGF- β humana en el cuerpo del adulto humano y a la indisponibilidad de tejido humano, no puede producirse en grandes cantidades a través de la extracción de tejidos humanos.

[0003] Y, el preparado de NGF- β a partir de bacterias generales (por ejemplo, E. coli) y sistemas de expresión en levaduras mediante tecnologías de recombinación muestra menos bioactividad que la NGF- β extraída de órganos de animales. Esto se debe a que no existe modificación y dimerización natural en estos dos sistemas [De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph, et al., 1999; 309:217-36. Ikemura H, Takagi H, Inouye M, et al., J Biol Chem. 1987 Jun 5;262(16):7859-64. Nishizawa M, Ozawa F, Higashizaki T, et al., Appl. Microbiol Biotechnol. 1993 Feb; 38(5):624-30.]. Teóricamente, sería más ventajoso utilizar células de mamíferos para expresar y preparar NGF- β humana; sin embargo, su bajo nivel de expresión y elevado coste tienden a obstaculizar su producción a gran escala. [C. ANTHONY ALTAR, Louis E. BURTON, GREGORY L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 281-285, January 1991]. Además, la bioactividad de la NGF- β humana preparada por el sistema celular de mamíferos no humanos es incomparable al NGF extraído de humanos. Un ensayo clínico basado en NGF humano recombinante para neuropatía diabética desarrollado por Genentech, Inc. falló en la Fase III debido al deficiente efecto terapéutico [Apfel SC. Int. Rev. Neurobiol 50: 393-413, 2002]. Mientras se escribe este texto, ningún NGF humano recombinante ha sido autorizado como medicamento en el mercado, aunque continuamente se han presentado varias estrategias y esfuerzos basados en tecnología recombinante en diferentes sistemas de expresión tales como bacterias, levaduras, células CHO y células de insectos.

[0004] El contenido de NGF en la glándula submandibular es más alto que en el resto de tejidos u órganos de ratones macho adultos. Además, los ratones se reproducen rápidamente y son fáciles de criar a gran escala de acuerdo con los requisitos industriales. Por lo tanto, se supone que los ratones son una fuente ideal para extraer y purificar NGF. El NGF- β con mayor actividad biológica y con abundancia ilimitada en el mercado se extrae de la glándula submandibular de los ratones. Sin embargo, en comparación con el NGF humano, la eficacia terapéutica del NGF del ratón sobre modelos experimentales de roedores de mioccefalitis alérgica y enfermedad de Parkinson no es tan buena como la del NGF humano. Además, teóricamente el NGF del ratón es más inmunogénico a los humanos que el factor de crecimiento nervioso humano. Y la estabilidad y seguridad del NGF humano pueden ser mejores que las del NGF de ratón cuando se aplican a los humanos.

[0005] Hay una serie de genes humanos que son homólogos a los del ratón, y el ratón es fácil de alimentar debido a su pequeño tamaño y ciclo vital relativamente más corto, por lo tanto el ratón es uno de los mejores modelos animales para investigar la función genética de los mamíferos y las enfermedades humanas. Durante los últimos años, se han modificado genéticamente muchas clases de ratones para expresar las proteínas heterogéneas a través de la tecnología "gene targeting". La función biológica del NGF y la interacción del NGF con su receptor despiertan siempre mucho interés en el campo de la neurobiología y la biología del desarrollo. Crowley et al

utilizaron la tecnología knock-out para destruir el gen NGF del ratón, e investigaron la influencia de NGF en el desarrollo de neuronas (Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, et al. Cell. 1994 Mar 25; 76(6): 1001-11.). Está demostrado que el desarrollo y supervivencia de neuronas simpáticas y sensoriales depende estrictamente del NGF, y que esta dependencia no puede ser compensada por otras neurotrofinas. Además, Smeyne et al. Aplicaron técnicas de knock-out al receptor celular de alta afinidad TrkA del NGF para investigar la función de TrkA en el desarrollo de neuronas (Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, et al. Nature. 1994 Mar 17; 368(6468):193-4.). Sin embargo, si se bloquean todos los genes NGF o los de su receptor TrkA, o bien morirá el ratón durante su desarrollo embrionario temprano o bien nacerá con poca vitalidad debido a la reducción de la actividad fisiológica del NGF. Esta puede ser también una de las razones para que no se investigue la aplicación de la estrategia del bloqueo al estudio de la interacción específica entre el NGF y su receptor. El NGF mutante obtenido in vitro proporciona una buena base para investigar la interacción entre el NGF y su receptor. Por ejemplo, el NGF mutante que une al TrkA solamente (en lugar del receptor de baja afinidad P75) puede ser utilizado para investigar la función del P75, lo cual hace que la investigación esté más centrada, y sea más pertinente y específica (Horton A, Laramée G, Wyatt S, et al., Mol Cell Neurosci. 1997; 10(3-4):162-72. Ryden M, Hempstead B, Ibanez CF, et al., J Biol Chem. 1997 Jun 27; 272 (26):16322-8). Pero la mutación genética in vitro no puede revelar el efecto de las mutaciones durante el desarrollo individual en la compleja situación in vivo. Por lo tanto, queda por elucidar cómo modificar el gen NGF de animales para expresar establemente muteínas de NGF de dicho animal y estudiar la función del NGF mutante y su receptor a nivel de todo el animal.

Descripción breve de la invención

[0006] El objeto de la presente invención es resolver los problemas de la técnica anterior: la expresión de la NGF- β humana y su mutación utilizando células de mamífero presenta poca producción y es difícil de realizar a gran escala; el NGF de ratón es de bajo efecto terapéutico y de posible gran inmunogenicidad; y existen algunas limitaciones asociadas al método de bloqueo genético para investigar las interacciones específicas entre el NGF y su receptor.

[0007] La presente invención proporciona un método para fabricar la proteína NGF- β humana a gran escala, caracterizado por que comprende las etapas de:

- 1) sustituir el gen NGF- β de un ratón por el gen NGF- β humano utilizando las técnicas de recombinación homóloga, haciendo que el ratón así obtenido exprese el gen NGF- β humano, y fabricando por lo tanto proteína NGF- β humana,
- 2) extraer la proteína NGF- β humana de las glándulas submandibulares, que pueden expresar la proteína NGF- β humana, del ratón obtenido en la etapa 1).

[0008] Una proteína NGF- β humana preparada por el método de la presente invención puede ser formulada en un compuesto farmacéutico farmacéuticamente aceptable. En la presente invención, "compuesto farmacéutico" hace referencia a un compuesto que comprende o consiste en una cantidad terapéuticamente efectiva de agente farmacéuticamente activo. De manera preferente, un compuesto farmacéutico de la presente invención puede comprender un soporte farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente, o la combinación de ellos. Un soporte farmacéuticamente aceptable o diluyente puede ser cualquiera de los empleados en farmacia. La selección de un soporte, excipiente o diluyente farmacéutico puede realizarse de acuerdo con las vías de administración deseada y las prácticas farmacéuticas estándar. Dichos compuestos farmacéuticos pueden comprender (o comprenden adicionalmente) un excipiente, un diluyente, cualquier aglutinante adecuado, lubricante, agente suspensor, agente de revestimiento y disolvente. Ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables incluyen el agua, solución salina, etanol, resina de silicona, cera, aceite de vaselina, gelatina de petróleo, aceite vegetal, polietilenglicol, propanediol, liposoma, azúcar, gel, lactosa, azúcar de almidón, estearato de magnesio, mica, agente tensoactivo, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, monoglicérido y diglicérido, éster de ácido graso de hidrocarburo de petróleo, hydroxil metilcelulosa, polivinilpirrolidona, manitol, aminoácido, etc. Dichas proteínas se formulan preferentemente en dosis de inyección o colirios.

[0009] La presente invención utiliza tecnología knock-in para proporcionar una nueva forma de producir NGF humano. El gen NGF- β de un roedor es sustituido por el gen NGF- β humano utilizando técnicas de recombinación homóloga y el cultivo de células madre embrionarias de un roedor (por ej. un ratón), después de lo cual se extrae proteína NGF- β humana madura de las glándulas submandibulares del roedor transgénico, por lo que puede ser utilizada para investigar y producir tales proteínas a gran escala.

[0010] Cuando se compara con la tecnología existente para expresar la proteína NGF- β humana utilizando células de mamífero, las ventajas de la presente invención son las siguientes:

Primero, la proteína NGF- β humana obtenida utilizando células de mamífero en el nivel celular es el producto de un cultivo in vitro. Ello se debe a no se pueden repetir completamente todos los tipos de complejos entornos in vivo que se producen durante el crecimiento y desarrollo de un animal (como por ejemplo el cambio de hormona, la interacción de subunidad α con subunidad γ , la formación de una estructura cuaternaria de reguladores de subunidad β). Por lo tanto la producción de proteína NGF- β humana es baja, y la diferencia entre dicha proteína NGF- β humana y la proteína NGF- β humana natural es grande. Dado que la presente

invención produce las proteínas NGF- β humanas a nivel de animal completo después de pasar por todo el proceso de desarrollo y crecimiento, utilizar este método es lo que más se acerca a la forma natural, por lo que la diferencia entre tales proteínas NGF- β humanas con las naturales es pequeña, y por ello dichas proteínas NGF- β humanas tienen una elevada actividad.

5

Segundo, las células de mamífero tienen a mutar durante el cultivo, lo cual provoca la degeneración que conduce a una producción inestable y discontinua de proteína NGF- β humana. En cambio, la frecuencia de mutación de un roedor transgénico actual durante el curso de la alimentación y proliferación es mucho menor que la de las células de mamífero cultivadas in vitro. La progenie de roedores transgénicos homocigotos y heterocigotos será capaz de producir proteína NGF- β humana de forma estable, siempre y cuando lleven el gen que les ha sido transferido.

10

Tercero, mientras que cultivar células de mamífero supone unos costes comparativamente elevados, condiciones limitadas y baja producción, el presente roedor transgénico es fácilmente alimentado y criado, permitiendo extraer la proteína NGF- β humana de manera abundante y económica.

15

Descripción breve de las figuras

[0011]

20

La Fig. 1A es el diagrama esquemático que muestra la estructura del plásmido vector pLoxPneo;

La Fig. 1B es el diagrama esquemático que muestra la estructura del vector direccionador pm-hNGF;

La Fig. 1C es el diagrama esquemático que muestra el proceso de construir el vector direccionador pm-hNGF;

La Fig. 2A es el diagrama esquemático que muestra la estructura del vector direccionador pm-mNGF;

25

La Fig. 2B es el diagrama esquemático que muestra el proceso de construir el vector direccionador pm-mNGF;

La Fig. 3A es el diagrama esquemático que muestra la comparación de una secuencia genómica NGF- β de un ratón sin manipular con la secuencia genómica de gen que codifica un péptido maduro de NGF- β humana de célula madre embrionaria de ratón knock-in;

La Fig. 3B es la fotografía que muestra el resultado de la técnica "Southern blotting" de células madre embrionarias de un ratón sin manipular y las de un péptido maduro de NGF- β humana de ratón knock-in, en la que Ec representa un fragmento digerido EcoR I; T representa la célula madre embrionaria de un péptido maduro de NGF- β humana de ratón knock-in; y WT representa la célula madre embrionaria de un ratón sin manipular;

30

La Fig. 4A es el diagrama esquemático que muestra la célula madre embrionaria de un péptido maduro de NGF- β humana de ratón knock-in;

35

La Fig. 4B es la fotografía que muestra el resultado PCR de un de un péptido maduro de NGF- β humana de ratón knock-in, donde M representa un marcador de peso molecular estándar, T representa la célula madre embrionaria de ratón knock-in, y WT representa la célula madre embrionaria de ratón sin manipular;

La Fig. 5A es el diagrama esquemático que muestra la comparación de la secuencia genómica de la NGF- β de un ratón sin manipular con la secuencia genómica de NGF- β mutante de un ratón knock-in;

40

La Fig. 5B es la fotografía que muestra el resultado de la técnica "Southern blotting" que identifica la célula madre embrionaria de un ratón sin manipular y la NGF- β mutante de un ratón knock-in, en la que Ba representa el fragmento digerido BamH I, T representa la célula madre embrionaria de ratón knock-in, y WT representa la célula madre embrionaria de ratón sin manipular;

La Fig. 6A es el diagrama esquemático que muestra el proceso de identificación del genotipo de NGF β humana de un ratón knock-in por PCR;

45

La Fig. 6B es el diagrama esquemático que muestra la comparación de PCR-SDS PAGE para la identificación del genotipo de un ratón C57BL/6J sin manipular, un ratón transgénico heterocigoto con NGF- β humana y un ratón transgénico homocigoto con NGF- β humana, donde M representa el marcador molecular estándar, S+/+ representa al ratón transgénico homocigoto, S+/- representa al ratón transgénico heterocigoto, y WT representa un ratón sin manipular;

50

La Fig. 7A es el diagrama esquemático que muestra la comparación de la secuencia genómica de la NGF- β de un ratón sin manipular y la secuencia genómica de un péptido maduro NGF humano de un ratón knock-in;

La Fig. 7B es el diagrama esquemático que muestra la comparación del resultado de la técnica "Southern blotting" de un ratón C57BL/6J sin manipular, un ratón transgénico heterocigoto con NGF- β humana, un ratón transgénico homocigoto con NGF- β humana, donde Ec representa los fragmentos digeridos EcoR I, S+/+ representa el ratón transgénico homocigoto, S+/- representa el ratón transgénico heterocigoto, y WT representa un ratón sin manipular;

55

La Fig. 8A es el diagrama esquemático que muestra la comparación entre la secuencia genómica de un ratón sin manipular y la secuencia genómica de la NGF- β mutante de un ratón knock-in;

La Fig. 8B es el diagrama esquemático que muestra la comparación del resultado de la técnica "Southern blotting" de un ratón C57BL/6J sin manipular, un ratón transgénico heterocigoto NGF- β mutante, un ratón transgénico homocigoto NGF- β mutante, donde Ba representa el fragmento digerido BamH I, S+/+ representa al ratón transgénico homocigoto, S+/- representa al ratón transgénico heterocigoto, y WT representa un ratón sin manipular;

60

La Fig. 9 es el diagrama esquemático que muestra el peso molecular de la proteína extraída utilizando la técnica SDS-PAGE;

La Fig. 10 es el diagrama esquemático que muestra el resultado de la proteína extraída utilizando electroforesis de isoelectroenfoque;

65

La Fig. 11 es el diagrama esquemático que muestra la actividad relativa del NGF humano extraído;
La Fig. 12 es el diagrama esquemático que muestra el resultado de la unión al receptor de la NGF-β mutante extraída.

5 **Descripción detallada de la invención**

Ejemplo 1: Construcción de un vector direccional de péptido NGF humano maduro

1) Se sintetizaron los siguientes cebadores:

[0012]

- P1 Eco RI CGGAATTCgtccctagctcacttcattcaagga (SEQ ID No.1)
- P2 ggaagatgggatgggaggatgagcgtgtgctccggtgagt (SEQ ID No.2)
- 15 P3 actcaccggagcaagcgtctatcctccatccccatctccacagggcgga (SEQ ID No.3)
- P4 gggctgcaggcaagtcaggctctctcacagcctt (SEQ ID No.4)
- P5 aaggctgtgagaagagcctgacttgctgcagccccctccacct (SEQ ID No.5)
- P6 Bgl II ACCAGATCTgcatgacaggcctcaggaga (SEQ ID No.6)
- P7 Sal I CGGAATTCGTCGACgggtttcatgtaagattgccttgctc (SEQ ID No.7)
- 20 P8 Not I CGGAATTCGCGCCGCtcttggaccaggagtcagaggaatggat (SEQ ID No.8)

2) Construcción de un brazo largo aguas arriba:

[0013] Utilizando ADN genómico de un ratón (1µg) como plantilla, P1+P2 como cebadores (100ng cada uno), polimerasa de alta fidelidad de Pfu (2,5U), 250µmol/L dNTPs, 2,5mmol/L MgCl₂ y 25mmol/L Tris HCl (pH8,3), se llevó a cabo una reacción PCR (94 °C 30s, 55 °C 30s, 72 °C 4min, 30 ciclos, Amplificador Perkin Elmer 9700 PCR). Se utilizó un Kit de Extracción de Gel Qiagen (de QIAGEN) y se utilizó electroforesis en agarosa al 1%. Se purificó el producto de PCR, y luego se obtuvieron fragmentos de ADN de aproximadamente 4,4kb. La reacción de amplificación de PCR (en las mismas condiciones que la anterior, salvo que el tiempo de extensión a 72° fue de 45s) se realizó utilizando ADN genómico humano (1µg) como plantilla y P3+P4 como cebadores (100ng cada uno) para obtener fragmentos amplificados de ADN de 0,37kb. A continuación, el aislamiento y purificación fueron llevados a cabo utilizando la misma electroforesis que arriba. La amplificación de PCR (en las mismas condiciones que las de arriba) se realizó utilizando ADN genómico de ratón como plantilla y P5+P6 como cebadores (100ng cada uno). Luego se purificaron y obtuvieron fragmentos de ADN de 0,65kb, y luego el aislamiento y purificación fueron llevados a cabo utilizando la misma electroforesis que arriba. Se mezclaron las tres clases anteriores de fragmentos de producto de ADN (100ng cada uno) como plantilla de PCR, se realizó la reacción de amplificación de PCR (en las mismas condiciones que la anterior, salvo que el tiempo de extensión a 72° fue de 5 minutos) utilizando P1+P6 como cebadores (100ng cada uno) obteniendo fragmentos de ADN de 5,4kb, y luego el aislamiento y purificación fueron llevados a cabo utilizando la misma electroforesis que arriba.

3) Construcción de un brazo corto aguas abajo:

[0014] Se realizó la reacción de amplificación de PCR (en las mismas condiciones que la anterior, salvo que el tiempo de extensión a 72° fue de 2 min) con ADN genómico de ratón (1µg) como plantilla y P7+P8 (100ng cada uno) como cebadores obteniendo fragmentos de ADN de 2kb, y luego el aislamiento y purificación fueron llevados a cabo utilizando la misma electroforesis de agarosa que arriba.

4) Construcción de un vector de direccionamiento:

[0015] El vector pLoxPneo (Fig. 1A) con Eco RI+Kpn I (Biolabs, en lo sucesivo utiliza el mismo nombre) fue digerido y purificado con un Kit de Extracción de Gel Qiagen después de la electroforesis en 1% de agarosa. El fragmento de ADN del brazo largo aguas arriba con Eco RI+Kpn I fue digerido y el fragmento de ADN 2,06kb fue purificado después de la misma electroforesis que la anterior (fragmento medio). El fragmento fue ligado con el vector, y el producto de la unión fue transformado en E. coli DH5α, y se seleccionó un clon positivo. Después del análisis de secuencias, el plásmida positivo con Kpn I+Bam HI fue digerido y purificado como vector de clonación. El fragmento de ADN del brazo largo aguas arriba con Kpn I+Bgl II fue digerido, el fragmento de ADN 3,4kb fue purificado e introducido en el vector anterior, y luego transformado en E. coli DH5α; y se seleccionó un clon positivo. El plásmida positivo con Xho I+Not I fue digerido y purificado después de electroforesis como vector de clonación. El fragmento de ADN de brazo corto aguas abajo con Sal I+Not I fue digerido, ligado el fragmento con el vector después de purificación utilizando electroforesis, y obtenido el vector direccional pm-hNGF (Fig. 1B). La Fig. 1C muestra el proceso de construcción. Después de confirmación por secuenciación, el vector construido será utilizado para direccionamiento de genes.

Ejemplo comparativo 2: Construcción de un vector de direccionamiento del NGF mutante

[0016] Este ejemplo cambió tres aminoácidos de péptido maduro de NGF-β de ratón.

1) Se sintetizaron los siguientes cebadores:

[0017]

P2' 5'ggaagactgggtgggtggatgagcgcttgctccgggtgagt 3' (SEQ ID No.9)
 P3' 5'actcaccggagaagcgctcatccaccaccagcttccacatggggg 3' (SEQ ID No.10)
 P4' 5'gggctgcaggcaagtgcctcttctgtagcctt 3' (SEQ ID No.11)
 P5' 5'aaggctacaagaagaggctgactgctgcagccccctccccact 3' (SEQ ID No.12)

2) Construcción de un NGF mutante:

[0018] Utilizando ADN genómico de un ratón (1µg) como plantilla, P3'+P4' como cebadores (100ng cada uno), polimerasa de alta fidelidad de Pfu (2,5U), 250µmol/L dNTPs, 2,5mmol/L MgCl₂ y 25mmol/L Tris HCl (pH8,3), se llevó a cabo una reacción PCR (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 4min, 30 ciclos, Amplificador Perkin Elmer 9700 PCR). El producto PCR fue purificado utilizando un Kit de Extracción de Gel Qiagen (de QIAGEN) después de electroforesis en agarosa al 1% y se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 0,37kb. Utilizando este fragmento de ADN como plantilla, Lys32, Lys34 y Glu35 en péptido maduro de NGF fueron cambiados a Ala utilizando el Kit de Mutaciones de Stratagene (para más información, ver las instrucciones del Kit de Stratagene).

3) Construcción de un brazo largo aguas arriba:

[0019] Utilizando ADN genómico de un ratón (1µg) como plantilla, P1+P2' como cebadores (100ng cada uno), polimerasa de alta fidelidad de Pfu (2,5U), 250µmol/L dNTPs, 2,5mmol/L MgCl₂ y 25mmol/L Tris HCl (pH8,3), se llevó a cabo una reacción PCR (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 4min, 30 ciclos, Amplificador Perkin Elmer 9700 PCR). El producto PCR fue purificado utilizando un Kit de Extracción de Gel Qiagen (de QIAGEN) después de electroforesis en 1% de agarosa, y luego se obtuvieron fragmentos de ADN de 4,4kb. En las mismas condiciones que en el caso anterior, se realizó una reacción PCR utilizando ADN genómico de un ratón (1µg) como plantilla y P5'+P6' como cebadores (100ng cada uno), se obtuvieron fragmentos de ADN de 0,65kb, y el aislamiento y la purificación se llevaron a cabo utilizando la misma electroforesis en agarosa que la mencionada arriba. Los dos fragmentos de ADN arriba mencionados y el fragmento NGF mutante (100ng cada producto PCR) fueron mezclados como plantilla PCR y se llevó a cabo una reacción PCR (en las mismas condiciones que la anterior salvo el tiempo de extensión a 72°C que fue de 5 minutos) utilizando P1+P6' como cebadores (100ng cada), se obtuvieron fragmentos de ADN de 5,4kb y el aislamiento y la purificación se llevaron a cabo utilizando la misma electroforesis en agarosa que la anterior.

4) Construcción de un brazo corto aguas abajo: Igual que en el ejemplo 1.

5) Construcción de un vector de direccionamiento:

[0020] El vector pLoxPneo con Eco RI+Kpn I (Biolabs, en lo sucesivo utiliza el mismo nombre) fue digerido y luego purificado. El fragmento de ADN del brazo largo aguas arriba con Eco RI+Kpn I fue digerido y el fragmento de ADN 2,06kb fue purificado. El fragmento fue ligado con el vector, y el producto de la unión fue transformado en E. coli DH5α, y se seleccionó un clon positivo. Después de la secuenciación, el plásmida positivo con Kpn I+Bam HI fue digerido y purificado como vector de clonación. El fragmento de ADN del brazo largo aguas arriba con Kpn I+Bgl II fue digerido; el fragmento de ADN 3,4kb fue purificado e introducido en el vector anterior, y luego transformado en E. coli DH5α, y se seleccionó un clon positivo. Después de la secuenciación, el plásmida positivo con Xho I+Not I fue digerido y purificado como vector de clonación utilizando electroforesis. El fragmento de ADN de brazo corto aguas abajo con Sal I+Not I fue digerido, introducido en el vector después de purificación y se obtuvo un vector de direccionamiento pm-mNGF (Fig. 2A). (La Fig. 2B muestra el proceso de la construcción.) Después de confirmación de la secuenciación, el vector construido será utilizado en el direccionamiento de genes.

Ejemplo 3: Gen que codifica péptido maduro del NGF humano knock-in obtenido de células madre embrionarias de ratón.

1) Cultivo y tratamiento de trofoblastos:

[0021] Fibroblastos primarios de ratón fueron descongelados en dos placas de 100mm, se añadió medio de cultivo de trofoblastos (DMEM, 15%FBS, 0,1mM β-mercaptoetanol, 0,1mmol/L ampicilina-estreptomicina, 0,1mmol/L L-glutamina, 0,1mM de aminoácidos no esenciales) y se incubaron las células a 37°C en una incubadora de CO₂ conteniendo CO₂ al 0,05%. Al cabo de tres días, estas células fueron digeridas con tripsina y transferidas a seis placas de cultivo de tejido de 150mm. Tres días después, estas células fueron transferidas a cuarenta placas de cultivo de tejido de 150mm y siguieron siendo cultivadas durante 3 a 4 días hasta que el fondo de las placas se cubrió de células. Los fibroblastos fueron tratados con Mitomicina C (concentración final: 10µg/ml) y las células fueron incubadas a 37°C durante 2 a 3h. Los fibroblastos tratados con Mitomicina C fueron congelados y perdieron actividad mitótica, y luego fueron formulados en el trofoblasto.

2) Transfección de células madre embrionarias por electroporación:

[0022] Después de formar el trofoblasto, se inocularon células madre embrionarias de ratón 129/ter en trofoblastos y las células fueron cultivadas con medio de cultivo de trofoblastos con la presencia de LIF 1000U/ml. Las células fueron tratadas con 1ml de tripsina 0,25%, y luego lavadas con 3,5ml de medio de cultivo de células madre embrionarias y suspendidas en PBS. Se mezclaron 50µg de plásmida pm-hNGF Not I linearizado con 1ml de la mezcla de células madre arriba mencionada. Las células fueron transfectadas utilizando un sistema pulsador de genes (Biorad) 600V, 25mF. Un minuto más tarde a temperatura ambiente, se añadieron 7ml de medio de cultivo de células madre embrionarias y las células fueron transferidas a cuatro placas cubiertas con trofoblastos. Después de dejar crecer las células durante 24 horas, se añadieron 280µg/ml G418 y 2µmol/L de gancyclovir y siguieron siendo cultivadas durante siete días (el medio se cambió cada día). Luego se seleccionaron los clones.

3) Caracterización en ratones del péptido maduro del NGF humano knock-in obtenido de células madre embrionarias

(1) Técnica del "Southern blotting":

[0023] Como se indica en la Fig. 3A, se extrajeron el ADN genómico de células ME y el clon doblemente resistente G418/FIAU, y fueron digeridos con EcoR I; y luego se realizó la técnica del "southern blotting" utilizando la sonda a del vector de direccionamiento extremo 5'. Hubo solo una franja de aproximadamente 10kb en células sin manipular en comparación con las células ME recombinantes que mostraron otra franja de 5kb aprox. (ver Fig. 3B) debido al sitio de la enzima EcoR I en el gen que codifica el péptido maduro de NGF humano.

(2) Caracterización PCR:

[0024] Como se indica en la Fig. 4A, el cebador 1 (5'gctcatcctccatccatctccaca 3' (SEQ ID No.13)) se sitúa en el extremo 5' del péptido maduro, y el cebador 2 (5'gaacgagatcagcagcctctgttc ca 3' (SEQ ID No.14)) se sitúa en el gen Neo. Cuando se utiliza el cebador 1 y el cebador 2 para amplificar el genoma, no hay ninguna franja en las células ME sin manipular. Pero en células MA recombinantes, hay una franja de 1200bp aproximadamente amplificada (Fig. 4). El producto PCR fue verificado por digestión con EcoR I y secuenciación de ADN, y confirmó que el gen que codifica el péptido maduro de NGF en el genoma del ratón había sido sustituido por el del genoma humano.

Ejemplo comparativo 4: Construcción del NGF mutante knock-in a partir de células madre embrionarias de ratón

1) El método para construir NGF mutante knock-in a partir de células madre embrionarias de ratón es el mismo que el del Ejemplo 3.

2) Caracterización del NGF mutante knock-in a partir de células madre embrionarias de ratón:

(1) Técnica "Southern blotting":

[0025] Como se muestra en la Fig. 5A, se extrajeron el ADN genómico de células ME y el clon doblemente resistente G418/FIAU, y el ADN genómico fue digerido con BamHI. Y luego se practicó la técnica del "southern blotting" utilizando la sonda b del extremo aguas abajo 5' del brazo de homología. Había solo una franja de aproximadamente 800bp en células no manipuladas cuando se comparó con las células ME recombinantes, que mostraron una franja de aproximadamente 2,7kb (Fig. 5B). Esto es debido a la introducción del gen Neo entre los dos sitios de la enzima BamH I.

(2) Caracterización PCR:

[0026] Se designaron el cebador 1 (5'gctcatccaccaccagctctcca ca 3' (SEQ ID No.15)) que se encuentra en el extremo 5' del péptido maduro del NGF y el cebador 2 (5'gaacgagatcagcagcctctgtcca 3' (SEQ ID No.16)) que se encuentra en el gen Neo. Cuando se utiliza el cebador 1 y el cebador 2 para amplificar el genoma, no hay ninguna franja en las células ME no manipuladas. Pero en las células ME recombinantes, hay una franja de aproximadamente 1200bp amplificada. El producto PCR fue verificado por la secuenciación del ADN, y se confirmó que el gen que codifica el péptido maduro de NGF en el genoma del ratón ya había sido sustituido por el gen mutante.

Ejemplo 5: Construcción de un ratón knock-in con gen NGF humano.

1) Preparación del blastocisto donante:

[0027] Se seleccionaron ratones hembra en anestro C57BL/6J de 4 a 6 semanas de edad, y se les inyectó intraperitonealmente 5 unidades de gonadotropina de suero de yegua; 48 horas después se les inyectaron 5 unidades de gonadotropina coriónica humana y luego fueron trasladadas a jaulas en las que había ratones macho adultos para que se aparearan. Se examinó a los ratones 48 horas después y se estableció una nueva jaula para las que presentaban tapones vaginales. El cuarto día después del apareamiento, las hembras donantes fueron

sacrificadas mediante dislocación cervical; se dejó a la vista el útero y los dos úteros en la zona de conexión entre las trompas de Falopio con cuernos uterinos se cortaron con tijeras, y a continuación se cortó cuidadosamente la sección conectada del útero y colocada en una placa de Petri estéril de 60 mm. Y las trompas de Falopio y cuernos uterinos situados respectivamente en el lado de la cabeza uterina y en un extremo fueron cortados utilizando un par de tijeras, parara obtener dos úteros separados perfectos. Mediante una jeringa desechable llena de medio BMOC-3 (GIBCO BRL) de Brinster con una aguja del 5# y mirando a través de un estéreo microscopio, se introdujo la jeringa en la cavidad uterina, con la que se aspiraron los embriones de ratón que fueron rápidamente depositados en el fondo de la placa de Petri. Se cogió una placa de 35 mm, se dejó caer un medio de cultivo y se cubrió la superficie con aceite mineral. Los embriones fueron recogidos mediante vaciado bajo un estéreo microscopio y luego trasladados a un recipiente y luego incubados a 37 °C, 5% en una incubadora de CO₂ durante 2 horas.

2) Microinyección de blastocistos:

[0028] Las células ME para su inyección fueron congeladas varios días antes del uso, cambiadas por medio de cultivo de células ME frescas en la mañana de la inyección, tripsinizadas después de 1 a 2 horas, y mantenidas luego en medio BMOC-3 de Brinster como suspensión de células individuales. Se seleccionaron de una placa de Petri de 35mm, aproximadamente 10 blastocistos que mostraban forma completa, un borde claro y una cavidad blastocele visible, y luego fueron trasladados a una ranura de inyección que había sido instalada con un tubo porta-óvulos y una aguja. Se cargaron de 10 a 15 células ME pequeñas y redondas en la aguja de inyección bajo una lente 10x, y luego se aspiró un lado del blastocisto sujetando una pipeta bajo una lente de 40x, ajustando la aguja de inyección en una posición que apuntaba al centro del blastocisto y en una misma horizontal. Se hizo girar la palanca de la aguja de inyección utilizando la punta de la aguja para pinchar rápidamente la pared del blastocisto y entrar en el blastocele, se accionó la bomba de inyección para que expulsara células ME en el blastocele en secuencia, y luego se retiró cuidadosamente la aguja. Se determinó el número de blastocistos a inyectar de acuerdo con el estado de los blastocistos de ratón y el número de ratones receptores. Después de la inyección los blastocistos fueron cultivados en gotitas de medio BMOC-3 de Brinster.

3) Traslado de los embriones al útero receptor

[0029] Los ratones receptores, ratones blancos de especie Kunming para pseudoembarazos, eran hembras apareadas con machos vasectomizados. La espalda de los receptores fue esterilizada con etanol y luego se les hizo una incisión transversal de aproximadamente 1 cm de longitud en el lado derecho justo cerca de la primera vértebra lumbar. Se llegó hasta el ovario derecho y hasta que apareció su almohadilla grasa a través del peritoneo. Se practicó una abertura de 3mm en el peritoneo con pinzas. Se sujetó y se extrajo la almohadilla grasa con la mano izquierda del operario, después de lo cual el útero quedó a la vista. Se sujetaron unos pequeños fórceps hemostáticos a un pequeño trozo de la almohadilla grasa para tener una ligera sujeción. Se colocó una pipeta de control bucal sobre una pipeta de transferencia. A continuación, bajo un estéreo microscopio, el cultivo fue cuidadosamente aspirado en la secuencia siguiente: medio, burbujas, medio, burbujas, el blastocisto inyectado, burbujas, y una pequeña cantidad de medio. El operario sujetó las pinzas con la mano izquierda para sujetar la pared del útero a 2 mm de la interfaz del útero y las trompas de Falopio, mientras sujetaba una jeringa 4# y una pipeta de transferencia con su mano derecha. Se utilizó la aguja bajo lentes anatómicas para hacer un pequeño agujero cerca de las pinzas (evitando el recipiente), y luego se introdujo la punta de la pipeta de transferencia en el pequeño agujero. Los embriones fueron depositados soplando suavemente en el útero. El útero y el mesenterio fueron reintroducidos en la cavidad abdominal y luego se suturó la incisión. (Ver, Gene Targeting Technology, p133, Xiao Yang, et.al., by Science Press).

4) Producción de ratones transgénicos

[0030] La cirugía de trasplante fue un éxito y al cabo de 17 días nacieron pequeños ratones y unos días después se determinó si se había obtenido un ratón con elevado quimerismo a partir de los patrones de color. Dichos ratones con elevado quimerismo, al ser seleccionados para aparearse con los ratones C57BL/6J, dieron lugar a camadas de ratones heterocigotos transgénicos de color marrón puro. El apareamiento entre estos ratones heterocigotos puede filtrar la aparición de ratones transgénicos homocigotos.

Ejemplo comparativo 6: Construcción de un gen que codifica la proteína NGF-β of de un ratón knock-in

[0031] Los detalles del método son los mismos que los del Ejemplo 5.

Ejemplo 7

Identificación de un péptido maduro en NGF-β humana de ratón knock-in:

1) Preparación de ADN genómico de ratón:

[0032] Se cortó aproximadamente 0,5cm de la cola de un ratón de 15 días y fue colocada en un tubo Eppendorf. Se añadieron 400µl de buffer de lisis de cola (0,5%SDS, 0,1M NaCl, 0,05M EDTA, 0,01M Tris-HCl pH8,0, 200µg/ml

proteinas K) a cada tubo y los tubos fueron incubados a 50° C durante la noche. Se añadió 200ul de NaCl saturado (6M) a cada tubo, se removió vigorosamente y se dejó en hielo durante 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se trasladó el sobrenadante de cada tubo a un nuevo tubo Eppendorf. Se añadieron 0,8ml de etanol a cada tubo y se mezclaron bien. Los tubos fueron centrifugados a continuación a 14.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejaron secar los gránulos y el ADN de cada tubo fue disuelto en 50 a 100 µl de TE.

2) Identificación del genotipo del ratón por PCR:

[0033] Tal como se indica en la Fig. 6A, el cebador 1 (5' acaggactcaccggagcaagcgctcat 3'(SEQ ID No.17)) está situado en el extremo 5' del péptido maduro; el cebador 2 (5'gaacgagatcagcagcctctgttcca3'(SEQ ID No.18)) está situado en el gen Neo; el cebador 3 (5'gaactcccagtggtgataagtaga3'(SEQ ID No.19)) está situado en una región codificadora aguas abajo del gen péptido maduro; el cebador 4 (5'aatagtagagaagcagccatcagagca 3'(SEQ ID No.20)) está situado en el extremo 5' del brazo de homología aguas abajo. Utilizando ADN genómico de ratón (1µg) como plantilla, el cebador 1 + cebador 2 como cebadores (100ng cada uno), polimerasa de alta fidelidad de Pfu (2,5U), 250mmol/L dNTPs, 2,5mmol/L MgCl2 y 25mmol/L Tris-HCl (pH8,3), se llevó a cabo la reacción PCR (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 ciclos, amplificador PCR Perkin Elmer 9700). Después de electroforesis del producto PCR en agarosa al 1%, no hay ninguna franja amplificada específica en el ratón C57BL/6J sin manipular. Pero en el ratón transgénico heterocigoto y homocigoto, había una franja amplificada de aproximadamente 1200bp. El producto PCR fue verificado por secuenciación de ADN y se confirma que el gen que codifica el péptido maduro NGF en el genoma de ratón ya había sido sustituido por el gen humano. Se realizó una reacción PCR utilizando el cebador 3 + cebador 4 (100ng cada uno) (en las mismas condiciones que la anterior salvo en que la extensión a 72°C es de 2 min). Después de electroforesis del producto PCR en agarosa al 1%, hay una franja de aproximadamente 190bp en un ratón C57BL/ 6J sin manipular; en el ratón heterocigoto, hay otra franja de aproximadamente 2000bp además de las franjas de 190bp; En cuanto al ratón homocigoto, solo hay una franja de aproximadamente 2000bp.

3) Secuenciación genética de gen que codifica péptido maduro NGF en ratón homocigoto:

[0034] Se cortó aproximadamente 0,5cm de la cola de un ratón homocigoto y fue colocada en un tubo Eppendorf. Se añadieron 400µl de buffer de lisis de cola (0.5%SDS, 0.1M NaCl, 0.05M EDTA, 0.01M Tris-HCl pH8.0, 200µg/ml proteinasa K) y los tubos fueron incubados a 50° C durante la noche. Se añadió 200µl de NaCl saturado (6M) a cada tubo, se removió vigorosamente y se dejó en hielo durante 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se trasladó el sobrenadante de cada tubo a un nuevo tubo Eppendorf. Se añadieron 0,8ml de etanol a cada tubo y se mezclaron bien. Los tubos fueron centrifugados a continuación a 14.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se dejaron secar los gránulos y el ADN de cada tubo fue disuelto en 50 a 100 µl de TE.

[0035] Se designó el cebador (5'AATCCCTTTCAACAGGACTCACCGGAG CAA 3' (SEQ ID No.21)) y el cebador (5'AAGGGGGCTGCAG GCAAGTCAGCCTCTTC 3' (SEQ ID No.22)) aguas arriba y aguas abajo respectivamente, del gen que codifica el péptido maduro NGF. Utilizando ADN genómico de ratón (1µg) como plantilla, polimerasa de alta fidelidad de Pfu (2,5U), se llevó a cabo una reacción PCR (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 ciclos, amplificador PCR Perkin Elmer 9700). Después de electroforesis en agarosa al 1% y clonación TA, el producto PCR fue secuenciado. El resultado muestra que el gen que codifica el péptido maduro es un gen de NGF- β humano. La secuencia es como sigue:

```
TCATCATCCCATCCCATCTTCCACAGGGGCGAATTCTCGGTGTGTGACAGTGTGACAGCGTGT
GGGTTGGGGATAAGACCACCGCCACAGACATCAAGGGCAAGGAGGTGATGGTGTGGGAGAGGT
GAACATTAACAACAGTGTATTCAAACAGTACTTTTTTTGAGACCAAGTGCCGGGACCCAAATCCC
GTTGACAGCGGGTGCCGGGGCATTGACTCAAAGCACTGGAACTCATATTGTACCAGACTCACA
CCTTTGTCAAGGCGCTGACCATGGATGGCAAGCAGGCTGCCTGGCGTTTTATCCGGATAGATAC
GGCCTGTGTGTGTGTGCTCAGCAGGAAGGCTGTGAGAAGAGCCTGA (SEQ ID No.23)
```

4) Identificación mediante la técnica del "Southern blotting":

[0036] Como se indica en la Fig. 7A, el ADN genómico de la cola de ratón fue extraído y digerido con EcoR I. Se realizó un "southern blotting" por sonda a de extremo 5' de vector de direccionamiento. Hay una franja de aproximadamente 10kb en un ratón C57BL/6J sin manipular. Debido al sitio de la EcoR I en el gen del péptido maduro NGF, en el ratón heterocigoto, hay otra franja de aproximadamente 5kb junto a la franja de 10kb. Mientras que en el ratón homocigoto, solo una franja de 5kb. (Fig. 7B)

nuevo con buffer Tris pH9,0 0,05M hasta que el pico de impurezas alcanza el valor de referencia, y luego se lavó gradualmente con NaCl 0 a 0,4M y se recogió el pico de proteínas deseado. Después de cromatografía por filtración en gel (columna Superdex G75 prep grade equilibrada con Tris pH9,0 0,05M (conteniendo NaCl 0,15M)), se filtró la solución de proteína con una membrana filtrante (20nm apertura) para retirar el virus. Se recogió el filtrado.

5

2) Identificación por electroforesis.

[0041] Se utilizó SDS-PAGE para examinar el peso molecular de la proteína (el resultado se muestra en la Fig. 9). Se midió el IP utilizando enfoque isoelectrico (el resultado se muestra en la Fig. 10).

10

Ejemplo comparativo 10:

Extracción de NGF de las glándulas submandibulares de NGF mutante de ratón knock-in

15

[0042] Los métodos son los mismos que en el ejemplo 9. Los resultados SDS-PAGE se muestran en la Fig. 9.

Ejemplo 11:

Medición de la actividad relativa del NGF humano y nueva identificación de la proteína extraída en el Ejemplo 9

20

Método: medición del cultivo de ganglios de la raíz dorsal de embrión de pollo:

[0043] Se cubrió el fondo de un matraz de cultivo con adhesivo mucilaginoso de ratón y luego se secó y lavó dos veces con DMEM conteniendo FCS al 10%. Se añadió 3ml de DMEM y se equilibró durante la noche. El medio fue desechado justo antes del uso. Se inocularon ganglios de la raíz dorsal (DRG) de un embrión de pollo (8 días de edad) en el matraz lleno de adhesivo mucilaginoso de ratón (3-5 ganglios cada matraz). Los matraces fueron puestos en una incubadora (5% CO₂) durante 2 horas a 37°C. La muestra de NGF fue gradualmente diluida y la dilución se añadió a los matraces.

25

[0044] Los criterios de evaluación de los resultados son los siguientes: "-" representa que no hay crecimiento de neuritas; "+" representa un bajo crecimiento de neuritas. Largos crecimientos de neuritas, si son muchos, pueden ser representados por "++" a "+++" en función de la densidad y la longitud, mientras que el símbolo "++++" representa el más denso y "#" representa la sobre-inhibición. La cantidad (por ml) de muestra con el crecimiento más denso y largo se utiliza como unidad de actividad. El resultado se indica en la Fig. 11, que muestra la diferenciación de DRG inducida por NGF humano recombinante. 1:27ng/ml NGF;2:9ng/ml NGF ; 3 : 3ng/ml NGF ; 4 : 1ng/ml NGF ; 5 : 0,33ng/ml NGF ; 6: control negativo, DRG se cultiva en DMEM).

30

35

Ejemplo comparativo 12

40

Identificación de las características biológicas del NGF mutante y la medición de su actividad

1) Experimento de unión del receptor del NGF mutante:

[0045] El NGF de ratón no manipulado y el NGF mutante NGF fueron etiquetados con I¹²⁵, y luego añadidos tanto a las células que expresan TrkA y a las células tumorales A875 que expresan P75. El ligando y el receptor fueron reticulados por N-hidroxisuccinimidil-4-acidobenzoato, las células fueron lisadas, y el complejo reticulado fue inmunoprecipitado durante la noche a 4°. Después de SDS-PAGE y autorradiografía, los resultados muestran que tanto el NGF sin manipular como el NGF mutante pueden unir TrkA, mientras que el NGF mutante no puede unir P75. (La Fig. 12 muestra los resultados de la auto-radiografía. 1: complejo TrkA- NGF sin manipular; 2: complejo TrkA-NGF mutante; 3: complejo NGF sin manipular - P75; 4. complejo P75-NGF mutante).

45

50

2) Medición de la actividad relativa de NGF mutante

Método: medición del cultivo de ganglios de la raíz dorsal de embrión de pollo

55

[0046] Se cubrió el fondo de un matraz de cultivo con adhesivo mucilaginoso de ratón y luego se secó y lavó dos veces con DMEM que contenía FCS al 10%. Se añadieron 3ml de DMEM y se equilibró durante la noche. El medio fue desechado antes del uso. Se inocularon ganglios de la raíz dorsal (DRG) de un embrión de pollo (8 días de edad) en el matraz lleno de adhesivo mucilaginoso de ratón (3-5 ganglios cada matraz).

60

[0047] Los criterios de evaluación de los resultados son los siguientes: "-" representa que no hay crecimiento de neuritas; "+" representa un bajo crecimiento de neuritas. Largos crecimientos de neuritas, si son muchos, pueden ser representados por "++" a "+++" en función de la densidad y la longitud. El símbolo "++++" representa el más denso, y "#" representa sobre-inhibición. Los resultados muestran que, a una concentración elevada, el NGF mutante tiene la misma capacidad que el NGF sin manipular para inducir el crecimiento de ganglios (27ng/ml, 9ng/ml). A baja concentración, sin embargo, esta capacidad disminuye obviamente (3ng/ml, 1ng/ml, and 0,3ng/ml).

65

[0048] El método de medición es el mismo que en el ejemplo 11.

Ejemplo 13

5

Formulación del NGF humano:

1) Formulación de la liofilización del NGF humano:

10

[0049] Se midió el contenido del NGF semi-elaborado con el método de Lowry. La solución de proteínas fue diluida con PB pH6,8 25mM libre de agentes pirógenos (conteniendo albúmina de sangre humana al 0,05% y 5% de Mannitol) hasta el volumen necesario. La solución fue filtrada con un filtro de 0,22µm y guardada en alícuotas en medio estéril. Luego las alícuotas fueron congeladas, secadas, taponadas y almacenadas a 4°C.

15

2) Inyección acuosa de NGF humano

20

[0050] Se midió el contenido del NGF semi-elaborado con el método de Lowry. La solución de proteínas fue diluida con PB pH6,8 25mM libre de agentes pirógenos (conteniendo albúmina de sangre humana al 0,05%) hasta el volumen necesario. La solución fue filtrada con un filtro de 0,22µm y guardada en alícuotas en medio estéril. Luego las alícuotas fueron taponadas y almacenadas a -20°C.

3) Colirio NGF

25

[0051] Se midió el contenido del NGF semi-elaborado con el método de Lowry. La solución de proteínas fue diluida con PB pH6,8 20mM libre de agentes pirógenos, (conteniendo glicina, alanina, arginina, 3,33mg/ml (concentración final) respectivamente, y NaCl al 0,5%) hasta el volumen necesario. La solución fue filtrada con un filtro de 0,22µm y guardada en alícuotas en medio estéril. Luego las alícuotas fueron taponadas y almacenadas a -20°C.

Ejemplo comparativo 14

30

[0052] Formulación del NGF mutante:

[0053] Los métodos son los mismos que en el ejemplo 13.

35

[0054] De acuerdo con la exposición anterior, se pueden hacer muchas modificaciones en la presente invención. Por lo tanto, hay otros métodos para llevar a la práctica la presente invención, además de los tratados más arriba, dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

40

[0055]

<110> Staidson (Beijing) Pharmaceutical Co., LTD

^

45

<120> Roedor transgénico con gen NGF-| A Mutante y el método de obtenerlo, Método para preparar la correspondiente muteína y dicha muteína

<130> D002.002 WO/EP

50

<140> EP08715174.2 - 1212 PCT/CN2008070438

<141> 2008.03.07

<150> CN20071086017

<151> 2007.03.07

55

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

60

<210> 1

<211> 33

<212> ADN

<213> secuencia artificial

65

<400> 1

cggaattcgt ccctagctca cttcattcaa gga 33

ES 2 386 710 T3

<210> 2
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial
5
<400> 2
ggaagatggg atgggaggat gagcgctgc tccggtgagt 40
<210> 3
<211> 50
<212> ADN
<213> secuencia artificial
10
<400> 3
actcaccgga gcaagcgctc atctcccat cccatctcc acaggggcca 50
<210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> secuencia artificial
20
<400> 4
gggctgcagg caagtcaggc tctctcaca gcctt 35
<210> 5
<211> 47
<212> ADN
<213> secuencia artificial
25
<400> 5
aaggctgtga gaagagcctg acttgctgc agccccctc cccacct 47
<210> 6
<211> 30
<212> ADN
<213> secuencia artificial
35
<400> 6
accagatctg ccatgacagg cctcaggaga 30
<210> 7
<211> 41
<212> ADN
<213> secuencia artificial
40
<400> 7
cggaattcgt cgacggttc atgtaagat tgccttgct c 41
<210> 8
<211> 46
<212> ADN
<213> secuencia artificial
45
<400> 8
cggaattcgc ggccgctcct ggaaccagga gtcagagga atggat 46
<210> 9
<211> 40
<212> ADN
<213> secuencia artificial
55
<400> 9
ggaagactgg gtgggtgat gagcgctgc tccggtgagt 40
<210> 10
<211> 49
<212> ADN

ES 2 386 710 T3

<213> secuencia artificial

<400> 10
5 actcaccgga gcaagcgctc atccaccac ccagtctcc acatggggg 49

<210> 11
<211> 35
<212> ADN
10 <213> secuencia artificial

<400> 11
gggctgcagg caagtcagcc tcttctgta gcctt 35

<210> 12
15 <211> 47
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<400> 12
20 aaggctacaa gaagaggctg acttgcctgc agccccctc cccacct 47

<210> 13
<211> 27
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<400> 13
gctcatcctc ccatccatc ttccaca 27

<210> 14
30 <211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<400> 14
35 gaacgagatc agcagcctct gtcca 26

<210> 15
40 <211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<400> 15
45 gctcatccac ccaccagtc ttccaca 27

<210> 16
50 <211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<400> 16
gaacgagatc agcagcctct gtcca 26

<210> 17
55 <211> 27
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<400> 17
60 acaggactca ccggagcaag cgctcat 27

<210> 18
65 <211> 26
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 386 710 T3

<400> 18
 gaacgagatc agcagcctct gttcca 26

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <400> 19
 gaactcccag tgtggataag taga 24

 <210> 20
 <211> 27

 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <400> 20
 aatagtagag aagcagccat cagagca 27

 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <400> 21
 aatcccttc aacaggactc accggagcaa 30

 <210> 22
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <400> 22
 aagggggctg caggcaagtc agcctctc 29

 <210> 23
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> resultados de la secuenciación

 <400> 23

tcatcatccc atcccatctt ccacaggggc gaattctcgg tgtgtgacag tgtcagcgtg 60
 tgggttgggg ataagaccac cgccacagac atcaagggca aggaggtgat ggtgttggga 120
 gaggtgaaca ttaacaacag tgtattcaaa cagtactttt ttgagaccaa gtgccgggac 180
 ccaaatcccg ttgacagcgg gtgccggggc attgactcaa agcactggaa ctcatattgt 240
 accacgactc acacctttgt caaggcgctg accatggatg gcaagcaggc tgcttggcgg 300
 tttatccgga tagatacggc ctgtgtgtgt gtgctcagca ggaaggctgt gagaagagcc 360
tga 363

 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <400> 24
 aatcccttc aacaggactc accggagcaa 30

 <210> 25
 <211> 29

ES 2 386 710 T3

<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <400> 25
aagggggctg caggcaagtc agcctcttc 29

10 <210> 26
<211> 363
<212> ADN
<213> resultados de la secuenciación

<400> 26
tcattccacc acccagtctt ccacatgggg gagttctcag tgtgtgacag tgtcagtgtg 60
tgggttggag ataagaccac agccacagac atcgccggcg cggctgtgac agtgctggcc 120
gaggtgaaca ttaacaacag tgtattcaga cagtactttt ttgagaccaa gtgccgagcc 180
tccaatcctg ttgagagtgg gtgccggggc atcgactcca aacctggaa ctcatactgc 240
accacgactc acaccttcgt caaggcgttg acaacagatg agaagcaggc tgcctggagg 300
ttcatccgga tagacacagc ctgtgtgtgt gtgctcagca ggaaggctac aagaagaggc 360
tga 363

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para fabricar la proteína NGF- β humana a gran escala, caracterizado por que comprende las etapas de:
- 10 1) sustituir el gen NGF- β de un ratón por el gen NGF- β humano utilizando las técnicas de recombinación homóloga, haciendo que el ratón así obtenido exprese el gen NGF- β humano y fabricando de ese modo la proteína NGF- β humana,
2) extraer proteína NGF- β humana de las glándulas submandibulares, que puede expresar la proteína NGF- β humana, del ratón obtenido en la etapa 1).
- 15 2. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que dicha proteína se formula en una fórmula farmacéuticamente aceptable.
3. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que dicha proteína se formula en forma de inyección o colirio.

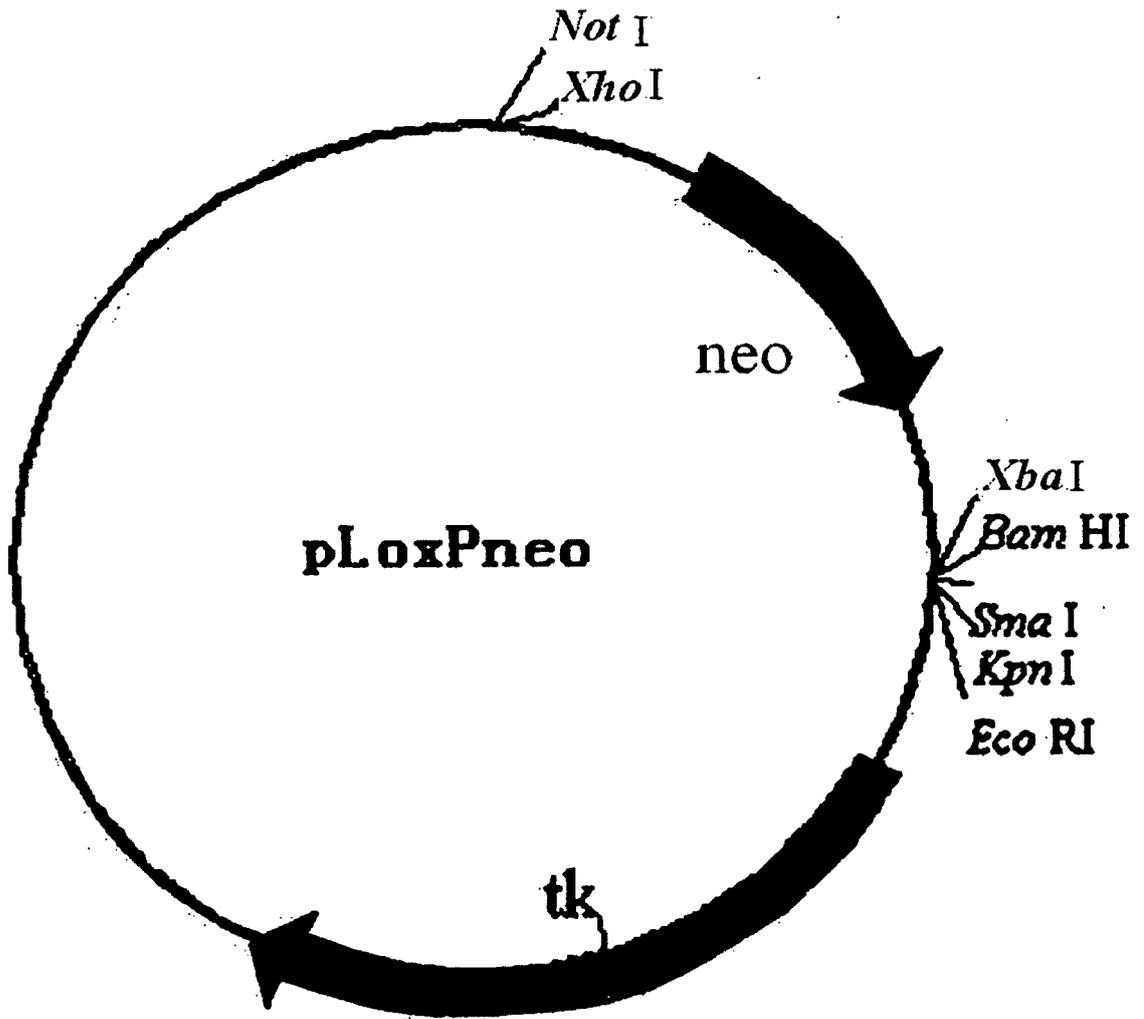


Fig. 1A

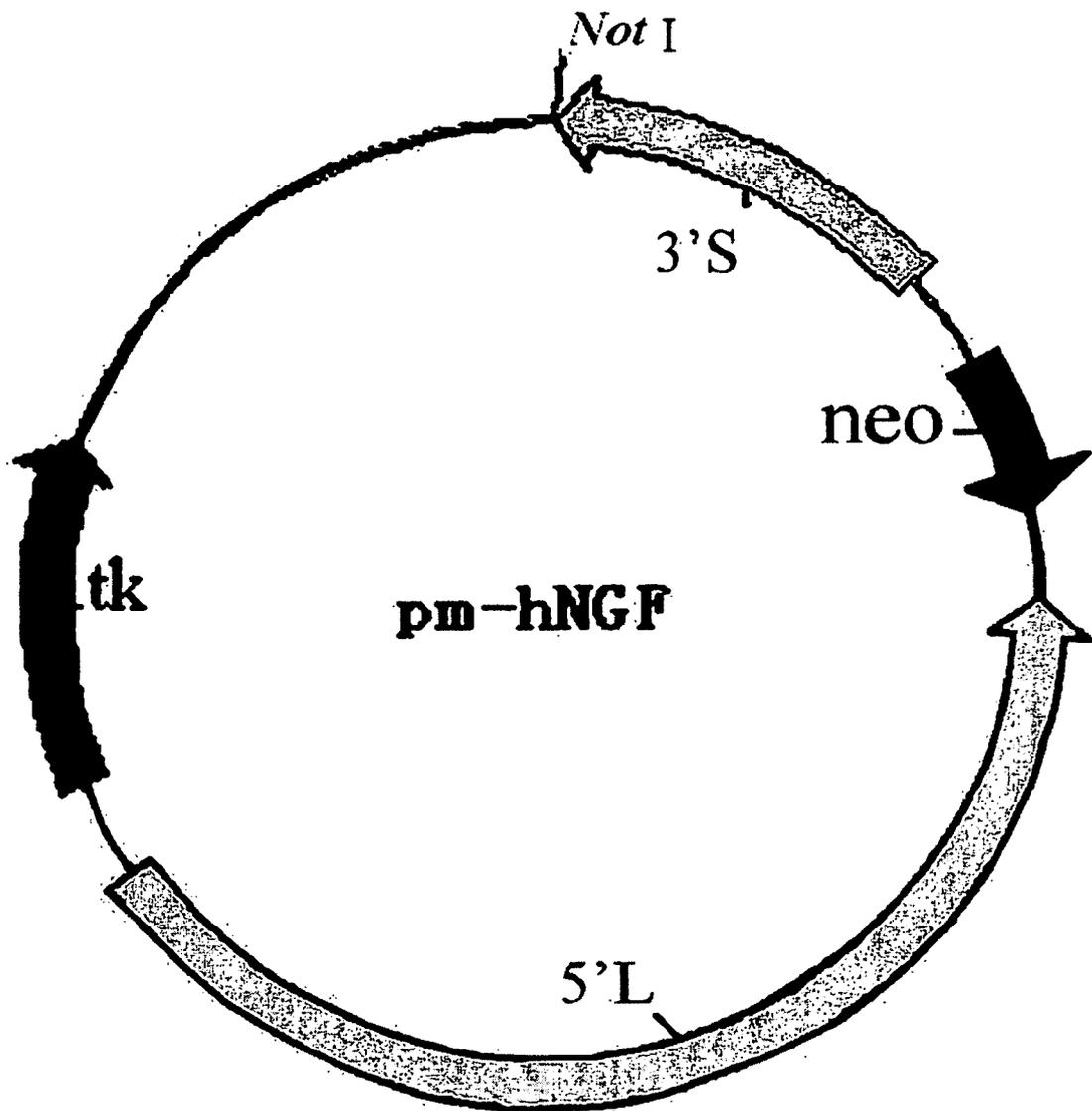


Fig. 1B

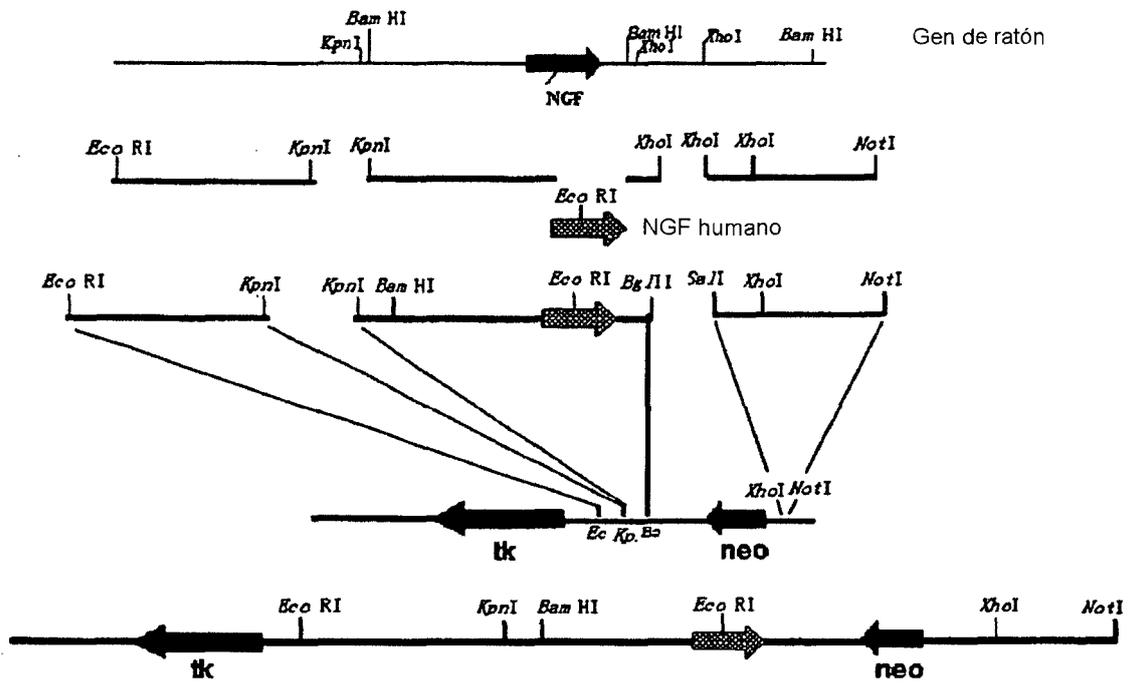


Fig. 1C

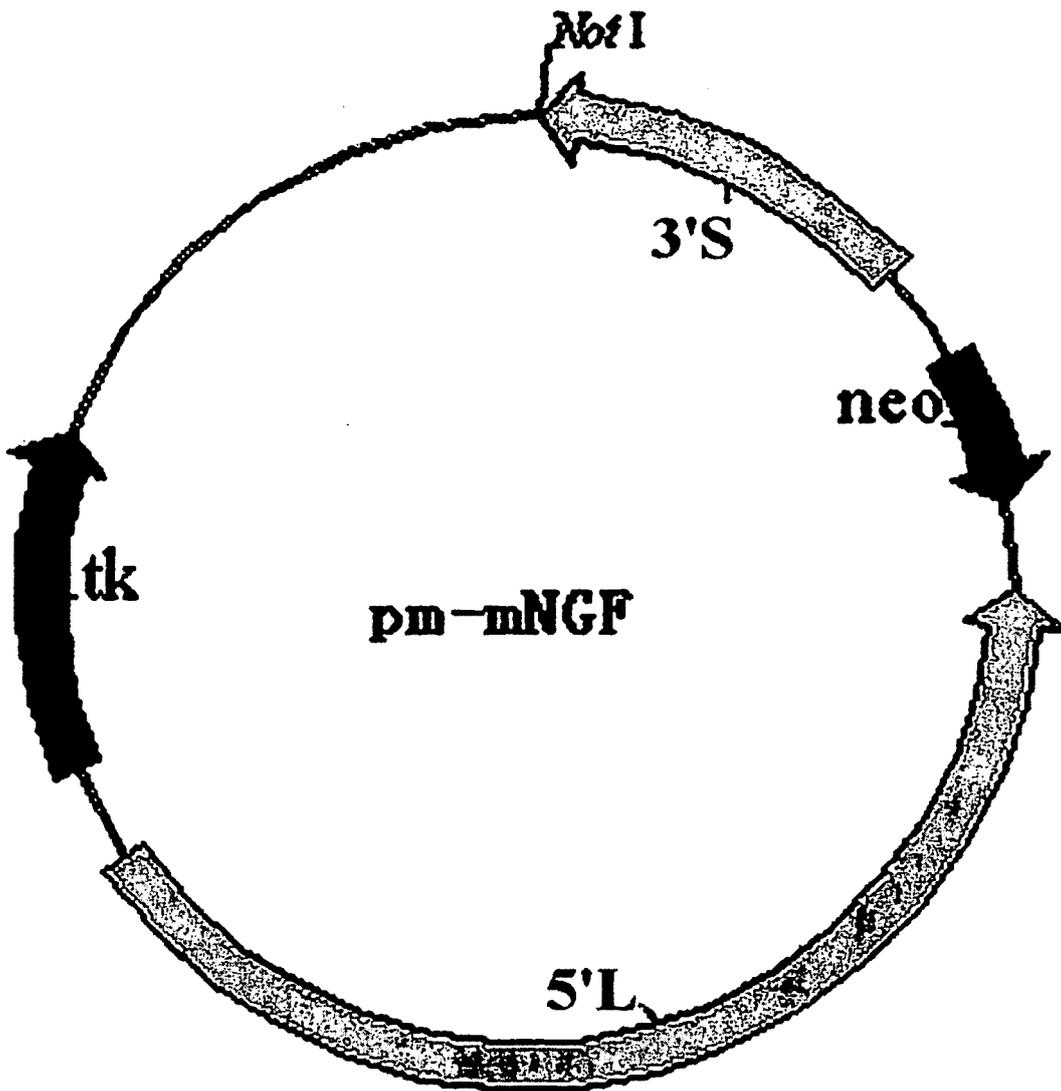


Fig. 2A

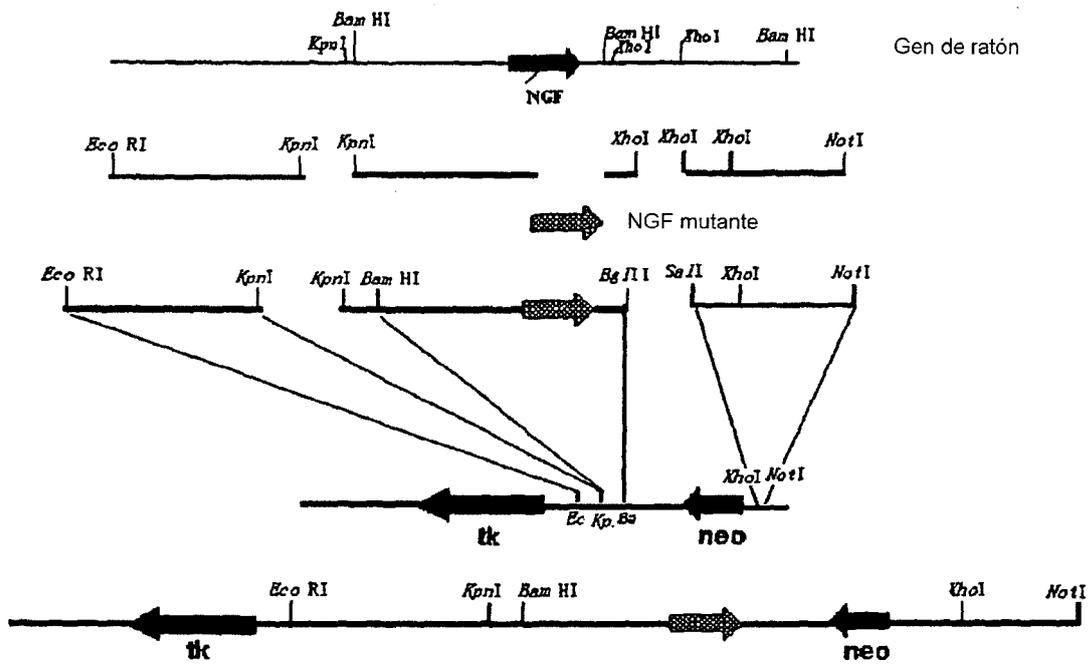


Fig. 2B

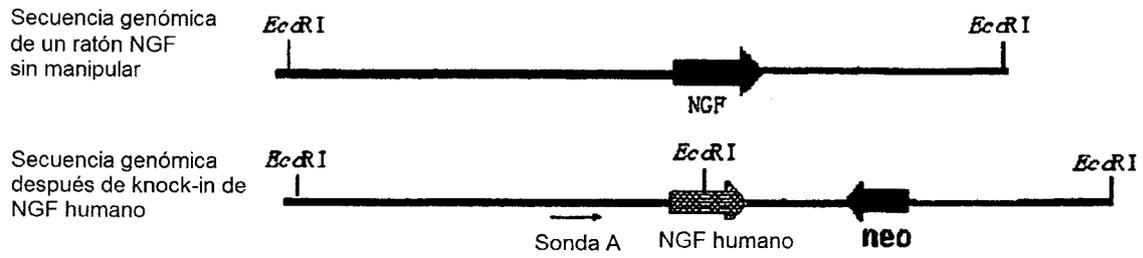


Fig. 3A

T/Ec WT/Ec

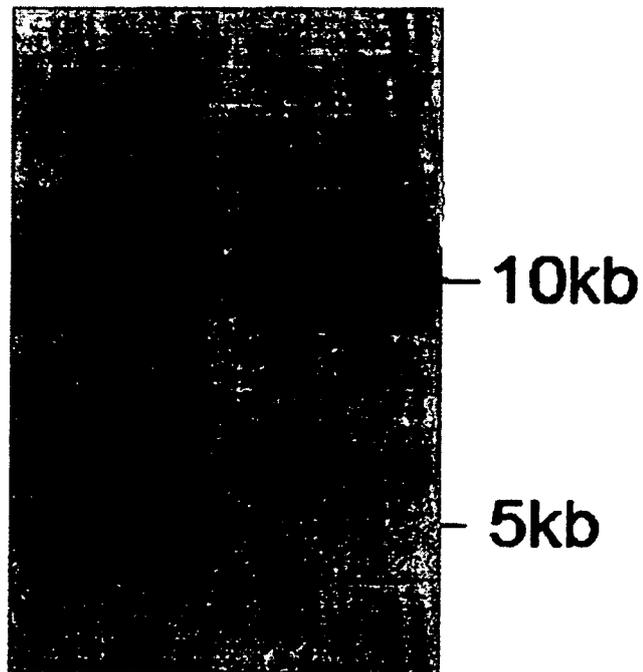


Fig. 3B

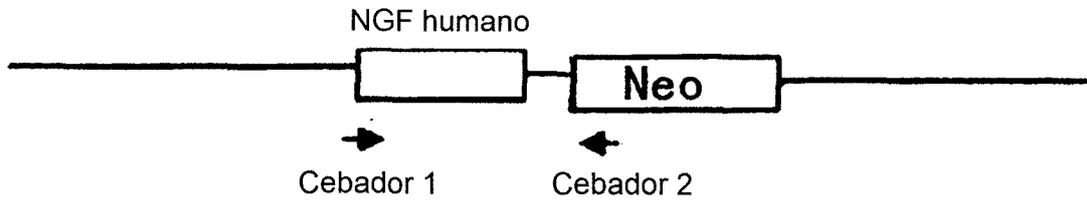


Fig. 4A

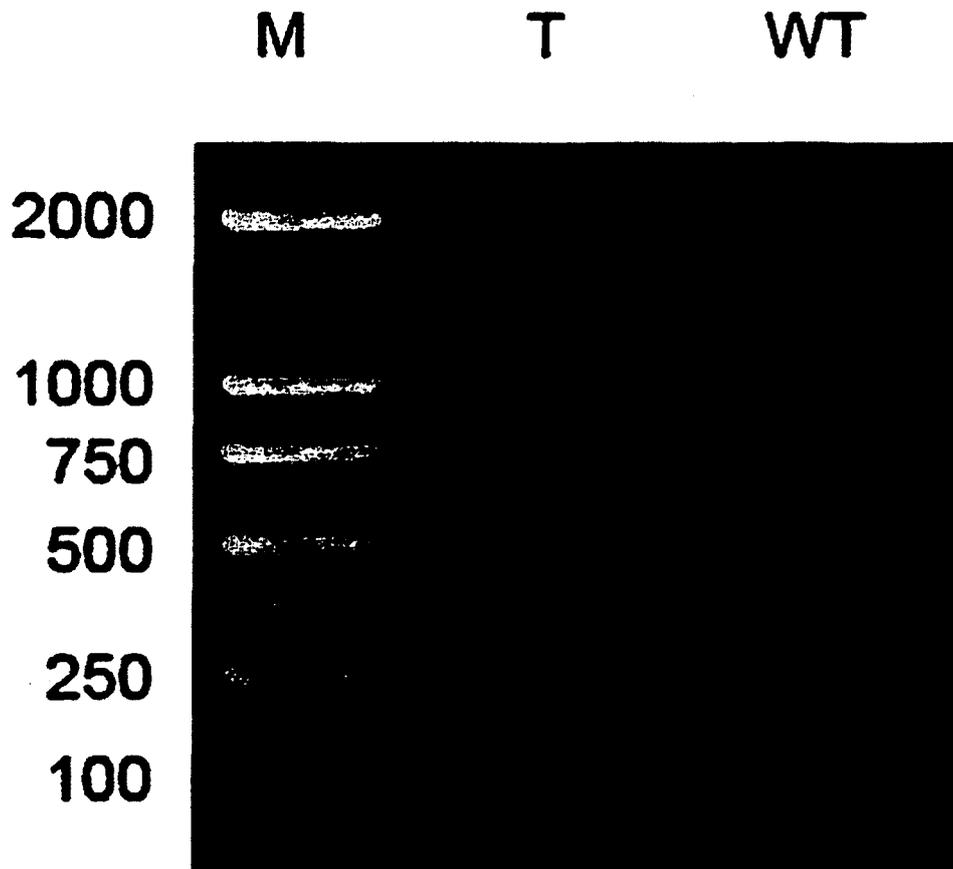


Fig.4B

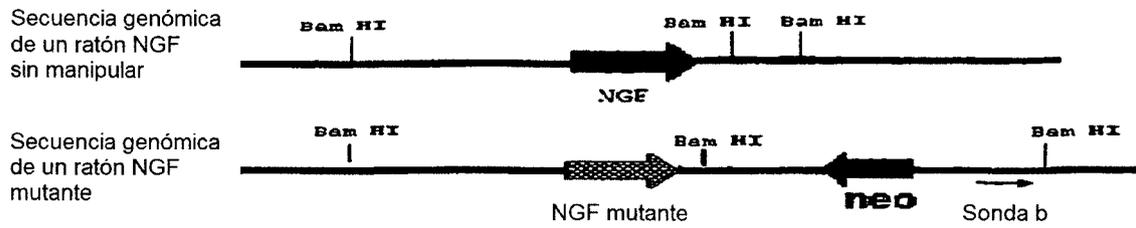


Fig. 5A

Wt/Ba T/Ba

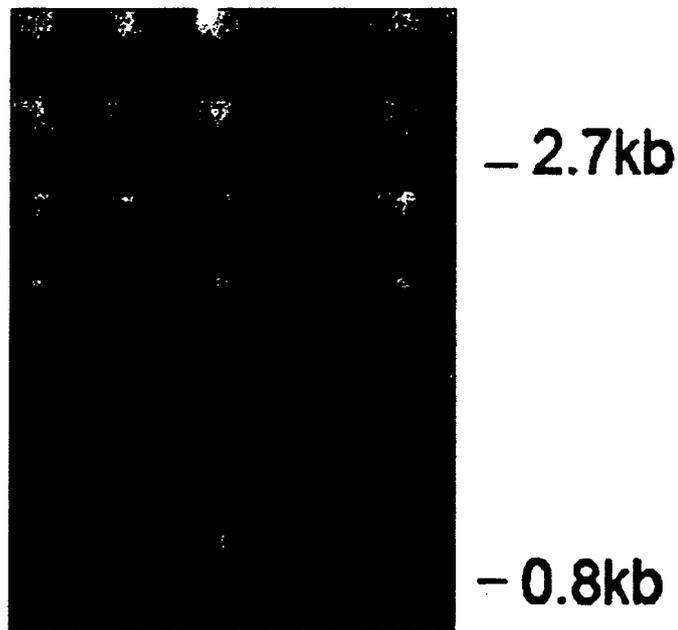


Fig. 5B

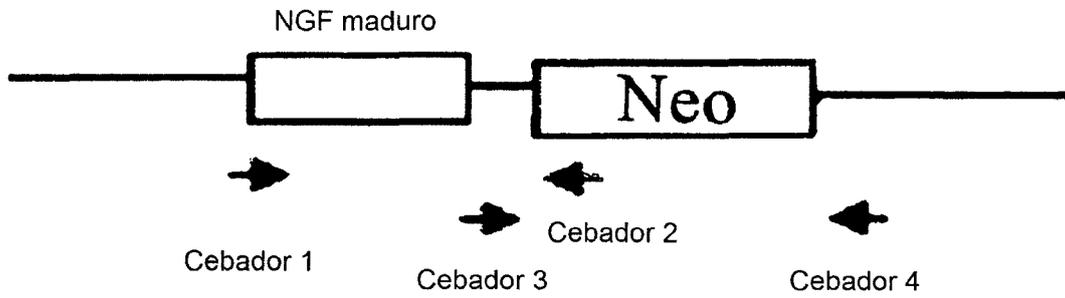


Fig. 6A

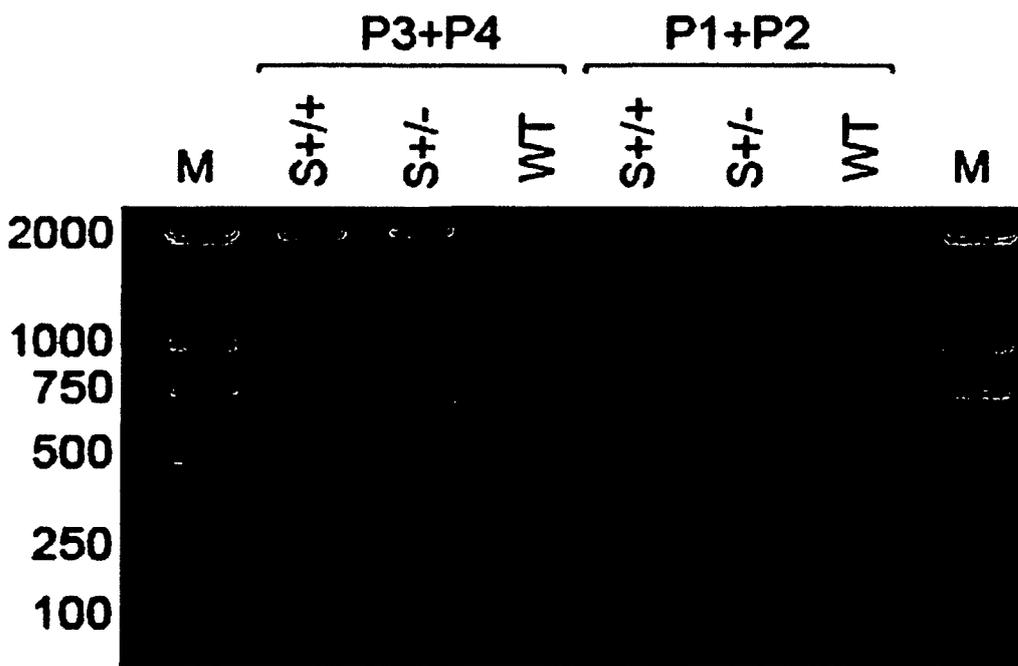


Fig. 6B

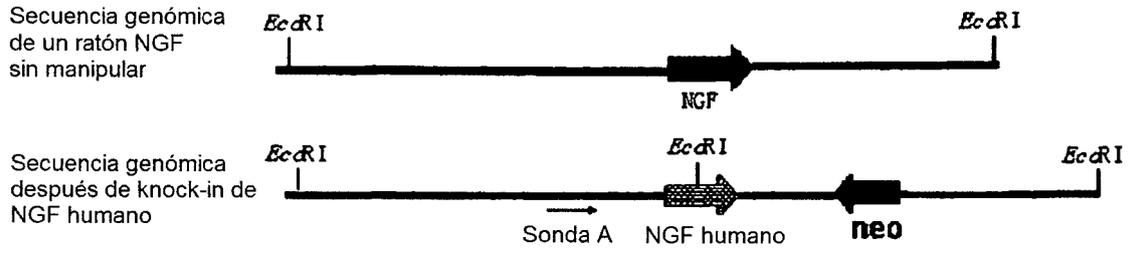


Fig. 7A

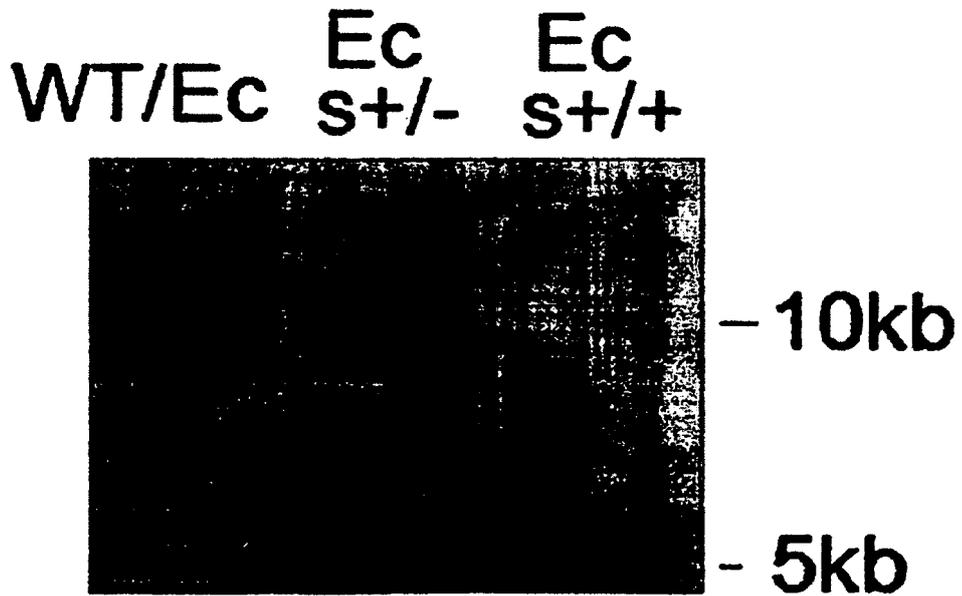


Fig.7B

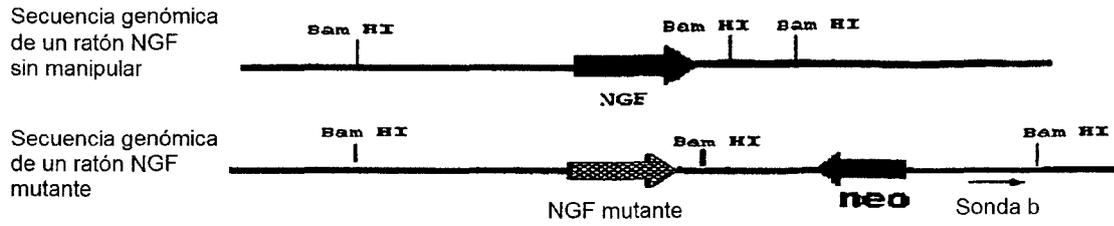


Fig. 8A

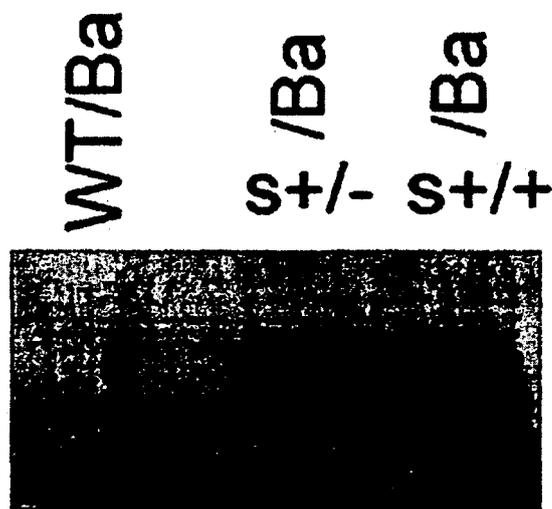


Fig. 8B

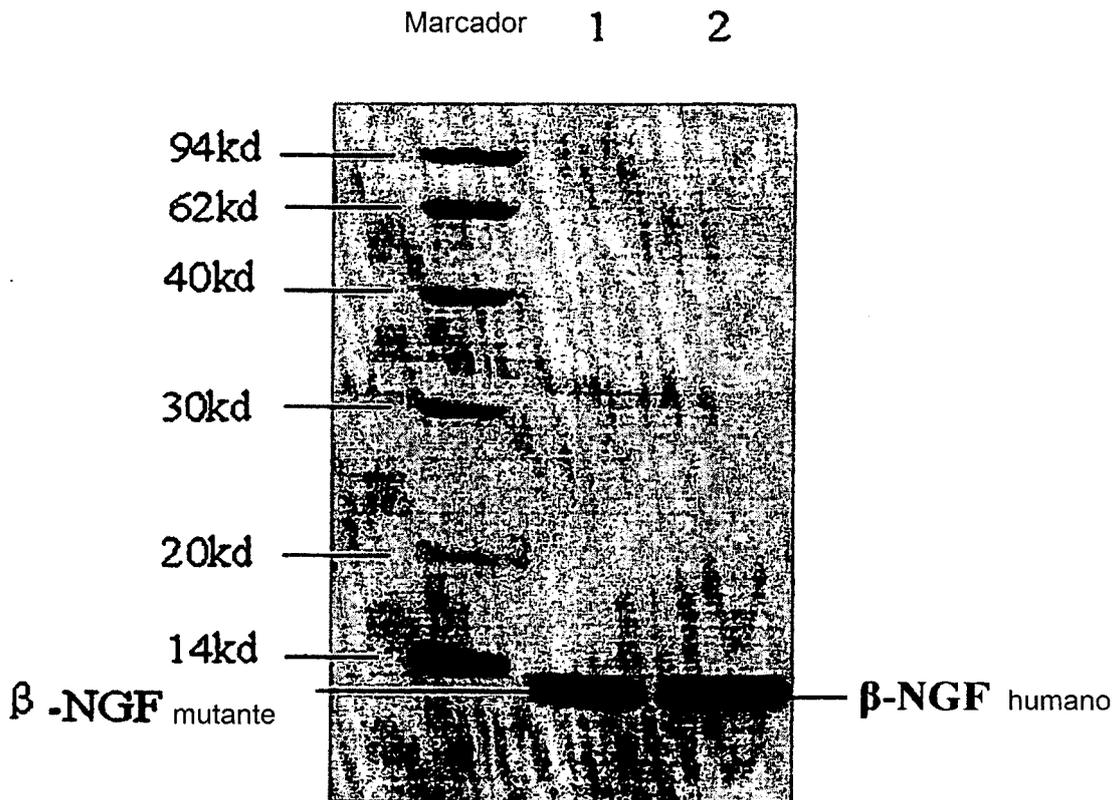


Fig. 9

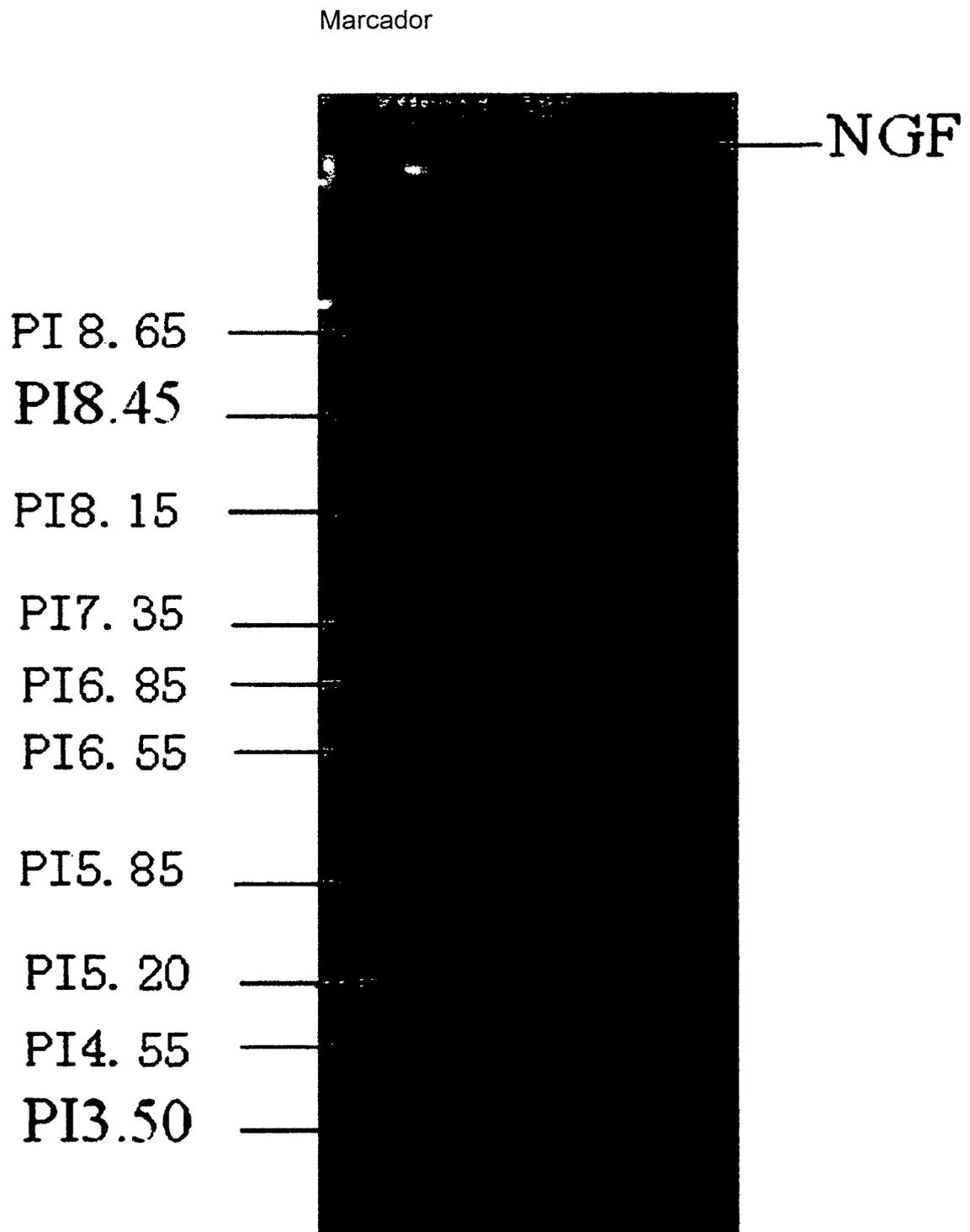


Fig. 10

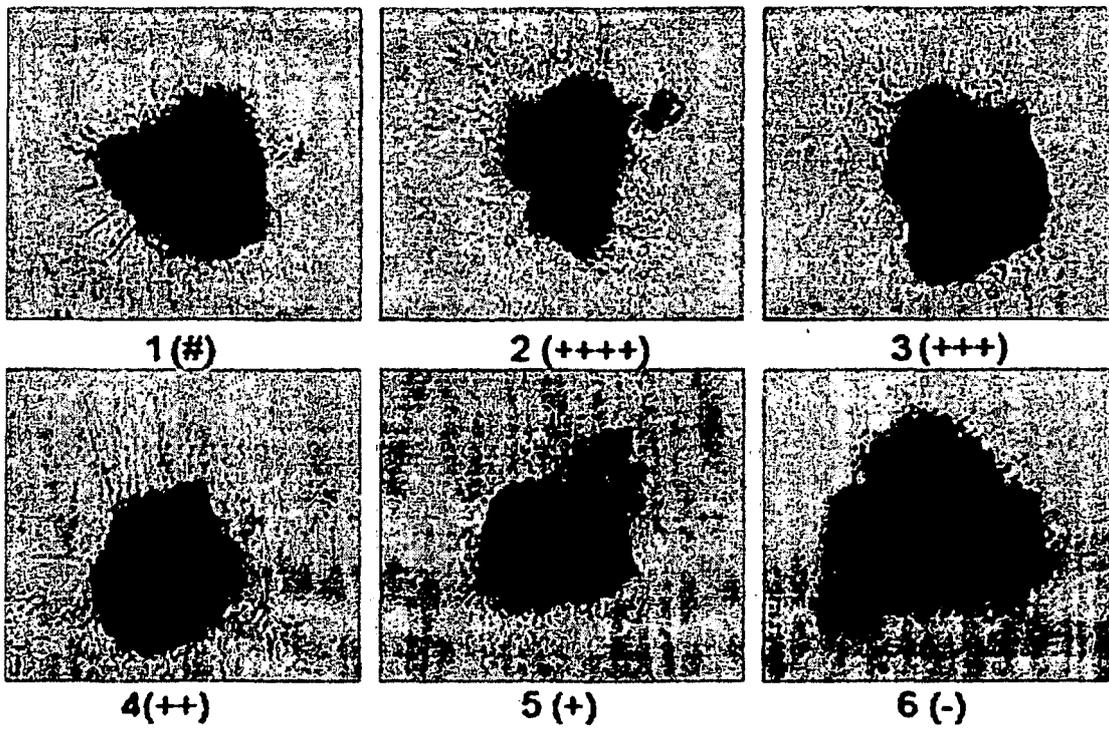


Fig. 11

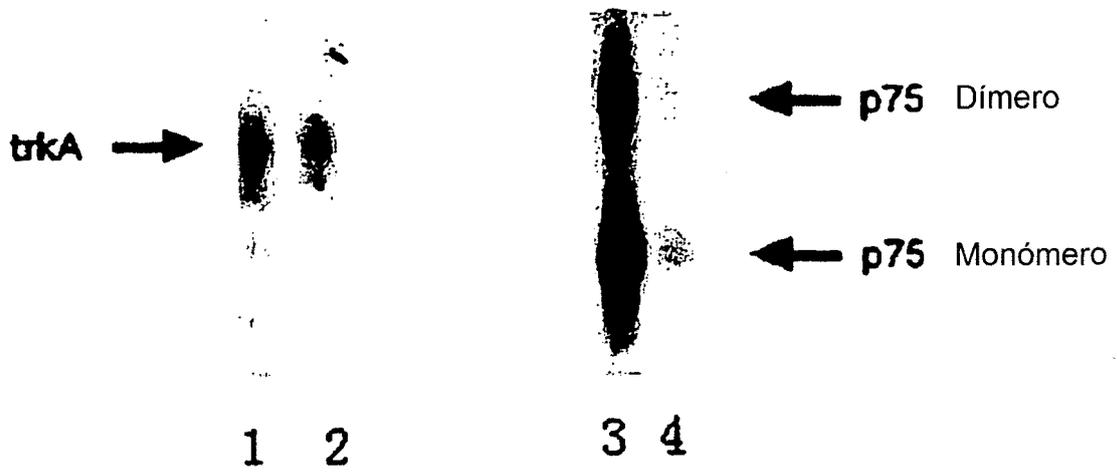


Fig. 12

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se incluye únicamente para comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto un gran cuidado en la compilación de las referencias, no se puede excluir la presencia de errores u omisiones y el EPO no asume ninguna responsabilidad al respecto.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10
- EP 0871517421212 A [0055]
 - CN 2008070438 W [0055]
 - CN 20071086017 [0055]

15 **Literatura no correspondiente a patentes citada en la descripción**

- HoJL;HeS;HuAetal. J Exp Med, 1995, vol. 181 (4), 1493-1505 [0002]
- Sayada C ; Denamur E ; Elion J et al. Gene, 1992, vol. 120 (1), 129-130 [0002]
- Zhang D ; Yang X ; Berry J et al. J Infect Dis, 1997, vol. 176 (4), 1035-1040 [0002]
- 20 • Pal S ; Barnhart KM ; Wei Q et al. Vaccine, 1999, vol. 17 (5), 459-465 [0002]
- Ikemura H ; Takagi H ; Inouye M et al. J Biol Chem., 05 June 1987, vol. 262 (16), 7859-64 [0003]
- Nishizawa M ; Ozawa F ; Higashizaki T et al. Appl. Microbiol Biotechnol., February 1993, vol. 38 (5), 624-30 [0003]
- C. ANTHONY ALTAR ; Louis E. BURTONt ; GREGORY L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, January 1991, vol. 88, 281-285 [0003]
- 25 • Apfel SC. Int. Rev. Neurobiol, 2002, vol. 50, 393-413 [0003]
- Crowley C ; Spencer SD ; Nishimura MC. Cell, 25 March 1994, vol. 76 (6), 1001-11 [0005]
- Smeyne RJ ; Klein R ; Schnapp A et al. Nature, 17 March 1994, vol. 368 (6468), 193-4 [0005]
- Horton A ; Laramie G ; Wyatt S et al. Mol Cell Neurosci., 1997, vol. 10 (3-4), 162-72 [0005]
- 30 • Ryden M ; Hempstead B ; Ibanez CF et al. J Biol Chem., 27 June 1997, vol. 272 (26), 16322-8 [0005]
- Xiao Yang. Gene Targeting Technology. Science Press, 133 [0029]