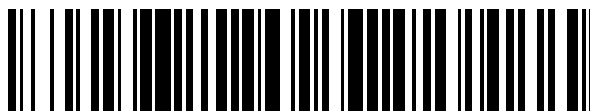


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 545**

51 Int. Cl.:

A61P 25/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2002** **E 02798797 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2012** **EP 1443955**

54 Título: **PDGF-BB para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

19.09.2001 US 323381 P
28.09.2001 US 326044 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2013

73 Titular/es:

NEURONOVA AB (100.0%)
FISKARTORPSVÄGEN 15 A-D
114 33 STOCKHOLM, SE

72 Inventor/es:

DELFANI, KIOUMARS;
JANSON, ANN, MARIE;
KUHN, GEORG, H.;
PLATE, KARLHEINZ;
SCHANZER, ANNE;
WACHS, FRANK-PETER y
ZHAO, MING

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 396 545 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

PDGF-BB para el tratamiento de la enfermedad de parkinson

5 **Campo de la invención**

10 **[0001]** La invención se refiere de forma general a la estimulación ejercida sobre los neurocitoblastos y los hemocitoblastos neurales para producir progenie que pueda sustituir las neuronas dañadas o desaparecidas. Más específicamente, la memoria describe la exposición de un paciente que sufre un trastorno a un reactivo que regula la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las células del sistema nervioso central mediante la modulación de la señalización de PDGF o VEGF. Estos procedimientos son útiles para reducir al menos un síntoma del trastorno.

15 **Antecedentes de la invención**

20 **[0002]** El sistema nervioso de los mamíferos comprende un sistema nervioso periférico (SNP) y un sistema nervioso central (SNC, que comprende el cerebro y la médula espinal), y está compuesto por dos tipos principales de células; las neuronas y las células gliales. Las células gliales rellenan los huecos entre las neuronas, nutriendolas y modulando su función. Algunas células gliales, tales como las células de Schwann en el SNP y los oligodendrocitos en el SNC, también están provistos de una vaina de mielina que rodea los procesos neurales. La vaina de mielina permite una conducción rápida a lo largo de la neurona. En el sistema nervioso periférico, los axones de múltiples neuronas pueden enredarse a fin de formar una fibra nerviosa. Esta, a su vez, puede combinarse en fascículos o haces.

25 **[0003]** Se ha establecido que los neurocitoblastos (NSC) existen en el cerebro del mamífero adulto. Este hecho es de particular importancia ya que se pensaba que el cerebro adulto tenía una capacidad regenerativa muy limitada. Se añaden continuamente nuevas neuronas a regiones específicas del SNC del mamífero adulto. Estas neuronas se derivan de citoblastos histoespecíficos que se originan a partir de la capa endimaria en la pared ventricular lateral (Johansson y col., Cell 96: 25 – 34 (1999)). Las células endimarias son el origen de células proliferativas en la zona subventricular de la pared del ventrículo, que a su vez forman los neuroblastos. Tras la migración y la diferenciación, los neuroblastos generan neuronas. Los NSC existen también en el giro dentado del hipocampo (Gould y col., Biol. Psychiatry 48: 715 – 720 (2000)). Recientemente se ha demostrado que el ventrículo lateral humano y el hipocampo también albergan células capaces de generar neuronas y glía (Johansson y col., Exp Cell Research 253: 733 – 736 (1999)). El uso de citoblastos derivados de adulto para la reparación del tejido puede ayudar a superar los problemas éticos de la investigación con células embrionarias.

40 **[0004]** El papel de los citoblastos en el adulto es sustituir las células que se han perdido por muerte celular natural, lesión o enfermedad. La característica de identificación de un citoblasto es su capacidad para presentar autorrenovación o generar más de sí misma y, por tanto, la definición más sencilla de un citoblasto sería la de una célula con la capacidad de automantenimiento. Una definición más restrictiva de un citoblasto la proporcionan Potten y Loeffler (Development, 110: 1001, 1990), que han definido los citoblastos como “células indiferenciadas capaces de a) proliferación, b) automantenimiento, c) la producción de un gran número de progenie funcional diferenciada, d) regeneración del tejido después de lesión y e) una flexibilidad en el uso de estas opciones”.

45 **[0005]** Los trastornos del SNC abarcan numerosas afecciones, tales como, enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Alzheimer y Parkinson), lesión cerebral aguda (por ejemplo, ictus, traumatismo craneoencefálico, parálisis cerebral) y un gran número de disfunciones del SNC (por ejemplo, depresión, epilepsia, y esquizofrenia). La degeneración en una región del cerebro conocida como ganglio basal puede conducir a enfermedades con diversos síntomas cognitivos y motores, dependiendo de la localización exacta. El ganglio basal consta de muchas regiones separadas, que incluyen el cuerpo estriado (que consta del cuerpo caudado y el putamen), el globo pálido, la sustancia negra, sustancia innominada, globo pálido ventral, núcleo basal de Meynert, área tegmental ventral y el núcleo subtalámico. Muchos déficits motores son un resultado de la degeneración neuronal en el ganglio basal. La corea de Huntington está asociada con la degeneración de las neuronas en el cuerpo estriado, que conduce a movimientos producidos por espasmos musculares involuntarios. La degeneración de una pequeña región denominada el núcleo subtalámico está asociada con movimientos violentos de lanzamiento de las extremidades en una dolencia denominada balismo, mientras que la degeneración en el putamen y el globo pálido está asociada con una dolencia manifestada por movimientos con lentas contorsiones o atetosis. Se pueden producir otras formas de afecciones neurológicas como resultado de la degeneración neuronal, tales como parálisis cerebral, o como resultado de trauma en el SNC, tal como ictus y epilepsia.

60 **[0006]** Otro ejemplo es la enfermedad de Parkinson, que es una enfermedad neurodegenerativa crónica que afecta particularmente a las neuronas de la pars compacta de la sustancia negra y sus proyecciones nigroestriadas. Aunque la enfermedad de Parkinson se considera una enfermedad multisistémica, es principalmente un trastorno del movimiento producido por una degeneración continua duradera de las neuronas dopaminérgicas que se localizan en la pars compacta de la sustancia negra mesencefálica.

[0007] La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por temblores, hipocinesia, rigidez y posturas anormales como los síntomas visibles principales. Los temblores en la EA son de tipo en reposo, debido a que se producen cuando los músculos están en estado de relajación. Su característica patológica principal es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas que tienen sus cuerpos celulares en la sustancia negra, y sus terminales en proyección hacia el neostriado. La dopamina se agota significativamente de esta manera en el neostriado de los pacientes con EP. Los cambios en la sustancia negra y el complejo neostriatal están relacionados con los temblores que se observan en la EP. Los complejos que dañan el sistema dopaminérgico nigroestriatal y producen hipocinesia, rigidez y temblores tienen el potencial de utilizarse como modelos para estudiar la EP. Agentes químicos tales como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y 6-hidroxidopamina (6-OHDA) dañan las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y se utilizan ampliamente para inducir los síntomas de la EP. La eficacia de estos compuestos se basa en su capacidad para producir daño significativo al sistema dopaminérgico nigroestriatal. Los niveles de los síntomas son aparentemente dependientes del grado de daño nigroestriatal, que es algo difícil de controlar. Como resultado, los síntomas producidos por estos agentes son predominantemente rigidez, hipocinesia y movimientos que no son ya consistentes. El temblor, el síntoma más conspicuo de la EP no es un rasgo característico de los modelos de la MPTP y la 6-OHDA.

[0008] La levodopa ha sido históricamente la medicación de elección en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, las preparaciones de levodopa actualmente disponibles son eficaces solo durante un periodo de tiempo relativamente corto y pueden ser incluso perjudiciales en determinadas condiciones. La administración de levodopa es especialmente satisfactoria durante las etapas iniciales de la enfermedad. Los efectos adversos de la levodopa, tales como discinesias y alucinaciones que se producen en las etapas iniciales de la enfermedad son dependientes de la dosis. Estos efectos adversos se atribuyen a la hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos estriatales denervados a la dopamina exógena. En las últimas etapas de la enfermedad, aparecen tipos adicionales de efectos adversos, ya que la respuesta a la levodopa llega a ser impredecible, fluctuante y la duración de la respuesta es reducida.

[0009] Para curar la enfermedad de Parkinson, se debe desarrollar bien un procedimiento de injerto de tejidos neurales para restaurar la innervación del cuerpo estriado respecto a la dopamina o una intervención farmacológica que evite la degeneración neural y estimule la renovación de las células de la sustancia negra. Recientemente, se ha aplicado el trasplante de neuronas dopaminérgicas embrionarias con grados variables de éxito (Piccini y col., Ann. Neurol. 48: 689 – 695 (2000); Freed y col., New Engl. J. Med. 344: 710 – 719 (2001)). Sin embargo, aunque las soluciones de trasplantes representan una mejora sobre los tratamientos actualmente disponibles, soportan numerosos inconvenientes significativos. Por ejemplo, tras el trasplante, algunos tipos de células fracasan en integrarse con el tejido hospedador. Otra desventaja es que la incompatibilidad inmunológica entre donante y hospedador podría dar como resultado el rechazo de las células implantadas. Existe también el potencial de que las células trasplantadas pueden dar como resultado la formación de un tumor o transmitir agentes infecciosos desde el tejido donante al hospedador. Otro inconveniente significativo de los procedimientos de trasplante es el debido a la invasividad de los procedimientos, que aumenta los riesgos implicados en cualquier operación neuroquirúrgica mayor, lo que podría producir daño al tejido cerebral sano.

[0010] Se han sugerido también diversos tratamientos con hormonas (Patente de los Estados Unidos N° 5.116.873) y mitógenos (Patente de los Estados Unidos N° 6.165.783) para restaurar los niveles de dopamina estriatales mediante la renovación de las células que secretan dopamina. Sin embargo, ninguno de los tratamientos curativos ha llegado al mercado de poblaciones más grandes de pacientes.

[0011] El documento US 6040157 describe polipéptidos VEGF-2 humanos, que corresponden a polinucleótidos y anticuerpos, y sus usos terapéuticos.

[0012] El documento WO 99/47677 describe polipéptidos homólogos con VEGF y BMP1.

[0013] El documento WO 99/37751 describe poblaciones purificadas de citoblastos, procedimientos de aislamiento de los mismos y sus usos.

[0014] El documento EP 1132098 describe la terapia génica de los trastornos cerebrovasculares, utilizando HGF y/o VEGF.

[0015] El documento WO 01/49849 describe el homólogo de FGF, ZFGF11.

[0016] Grinspan J.B., y col., Annals of Neurology, Vol. 36, No. Supl., 1994, páginas S140 – S142, describe factores de crecimiento de proteínas, como terapias potenciales para los trastornos desmielinativos del SNC.

[0017] Valenzuela C Fernando y col., Brain Res. Reviews, Vol. 24, NO. 1, 1997, páginas 77 – 89, describe los papeles del factor de crecimiento derivado de plaquetas en el desarrollo de los sistemas nerviosos maduros.

[0018] El documento WO 01/76620 describe el uso de VEGF y sus homólogos para tratar trastornos neuronales.

[0019] El documento WO 93/10806 describe un medicamento para promover el crecimiento de los nervios en mamíferos.

[0020] De esta manera, existe una necesidad de terapias mejoradas para tratar las enfermedades neurodegenerativas. Es también necesario encontrar terapias para potenciar, mejorar, reparar, restaurar y/o proteger la función del sistema nervioso central en un mamífero, particularmente en un ser humano en riesgo de, o que padece de, un trastorno o disfunción del SNC asociado con células del SNC dañadas. Por tanto, esta invención cumple una necesidad en la técnica de un procedimiento para tratar una enfermedad del sistema nervioso central que implica reemplazar las células perdidas debido a la enfermedad.

[0021] La presente invención proporciona PDGF-BB de origen humano para uso en el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson o de trastornos Parkinsonianos en un sujeto.

[0022] Esta invención se refiere generalmente a estimular las células del sistema nervioso central a producir la progenie que puede sustituir las neuronas dañadas o desaparecidas.

[0023] Esta memoria describe cómo aliviar los síntomas de enfermedades o trastornos del sistema nervioso que comprende administrar PDGF, VEGF o una de sus combinaciones para modular la actividad de los neurocitoblastos o los hemocitoblastos neurales *in vivo* en un paciente que padece de enfermedades o trastornos del sistema nervioso. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones pueden administrarse en una cantidad de 0,001 ng / kg / día a 10 mg / kg / día. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones pueden administrarse preferiblemente en una cantidad de 0,01 ng / kg / día a 5 mg / kg / día. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones se pueden administrar de forma más preferible en una cantidad de 0,1 ng / kg / día a 1 mg / kg / día. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones pueden administrarse lo más preferible en una cantidad de 0,1 ng / kg / día a 1 µg / kg / día. Se puede administrar una dosis más elevada durante el lapso de tiempo de 6 – 24 horas y puede ser mejor que una dosis más baja administrada durante 1 – 2 semanas. La dosis más elevada puede repetirse también intermitentemente. Se han descrito las dosificaciones preferidas pero podrían incluir también las siguientes: PDGF (estudio MPTP), 2,4 microgramos / kg / día (ratón) durante 3 días; PDGF (estudio 6OHDA), 0,12 microgramos / kg / día (rata) durante 12 días (peso aproximado); PDGF (animales sanos) 0,12 microgramos / kg / día (rata) durante 7 días (peso aproximado)

[0024] Además, es muy probable que la dosis intraparenquimal para conseguir el efecto sea inferior a la de la dosis intracerebroventricular ya que la última es un compartimento con una tasa de lavado considerablemente más alta.

[0025] El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones se puede administrar mediante inyección. La inyección se puede proporcionar por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intracerebroventricular, intraparenquimal, intratecal o intracranealmente. Intraparenquimalmente se refiere al parénquima del cerebro. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones se puede administrar también en la mucosa bucal, nasal o rectal. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones se puede administrar también mediante fusión de péptidos o administración de micelas.

[0026] Las enfermedades o trastornos del sistema nervioso se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en trastornos neurodegenerativos, trastornos de los neurocitoblastos, trastornos de los hemocitoblastos neurales, trastornos isquémicos, traumas neurológicos, trastornos afectivos, trastornos neuropsiquiátricos y trastornos del conocimiento y la memoria. Las enfermedades o trastornos del sistema nervioso serían la enfermedad de Parkinson y los trastornos parkinsonianos, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, isquemia espinal, ictus isquémico, lesión de la médula espinal y lesión cerebral / de la médula espinal relacionada con cáncer. La enfermedad o el trastorno del sistema nervioso sería la esquizofrenia y otras psicosis, depresión, depresión / trastorno bipolar o trastorno del sistema nervioso, síndromes / trastornos de ansiedad, fobias, estrés y síndromes relacionados, trastornos de la función cognitiva, agresión, drogodependencia y alcoholismo, síndromes del comportamiento obsesivos compulsivos, trastorno estacional del humor, trastorno de personalidad límite, parálisis cerebral, drogas relacionadas con el estilo de vida (fármacos ultraespecíficos), demencia multiinfarto, demencia de cuerpos de Lewy, demencia geriátrica relacionada con la edad, epilepsia y lesión relacionada con epilepsia, lesión de la médula espinal, lesión cerebral, lesión cerebral / de la médula espinal relacionada con trauma, lesión del tejido cerebral / de la médula espinal relacionada con tratamiento anticanceroso (radiación y citostáticos), lesión cerebral / de la médula espinal relacionada con infección e inflamación, lesión cerebral / de la médula espinal relacionada con toxina ambiental, esclerosis múltiple, autismo, trastornos por déficit de atención, narcolepsia y trastornos del sueño.

[0027] El VEGF se puede seleccionar entre el grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D y la actividad puede ser de proliferación o supervivencia. El VEGF-A podría ser VEGF-A₁₆₅ o VEGF-A₁₂₁. El PDGF se puede seleccionar entre el grupo que consiste en PDGF-B, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-C, PDGF-D, PDGF-CC, PDGF-DD, PDGF-BC, PDGF-AC, PDGF-AD y PDGF-BD, y la actividad puede ser de proliferación, diferenciación o supervivencia. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones puede ser PDGF-A o PDGF-AA y la actividad puede ser de diferenciación o de supervivencia. El PDGF, VEGF o una de sus combinaciones podría ser un dímero que consta de dos subunidades, en el que cada subunidad se selecciona entre el grupo que consiste en PDGF A, PDGF B,

PDGF C, PDGF D, VEGF A, VEGF B, VEGF C y VEGF D. Una combinación para uso tal como se describe en la presente memoria descriptiva puede ser un dímero. El dímero puede ser cualquier homodímero o heterodímero con los siguientes miembros: PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, VEGFA, VEGFB, VEGFC o VEGFD. Debido a que existe un total de ocho posibilidades para el primer miembro del dímero y de ocho posibilidades para el segundo miembro del dímero, es posible y se contemplan un total de 64 (8X8) combinaciones (por ejemplo, PDGF AA, PDGF AB, VEGF AA, VEGF AB, PDGFA / VEGFB, etc.).

[0028] Esta memoria describe cómo modular un receptor del PDGF, un receptor del VEGF, o una de sus combinaciones, en un neurocitoblasto o un hemocitoblasto neural, que comprende exponer la célula que expresa el receptor reactivo exógeno, el anticuerpo o la affibody, en la que la exposición induce al neurocitoblasto o al hemocitoblasto neural a proliferar o diferenciarse. El receptor del VEGF puede ser Flt-1, Flk-1 o Flt-4. El receptor de PDGF puede ser el receptor PDGF- α o el receptor PDGF- β . El reactivo se selecciona entre el grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGFAB, PDGF-CC, PDGF-DD, PDGF-BC, PDGF-AC, PDGF-AD y PDGF-BD. El anticuerpo podría ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. El neurocitoblasto o hemocitoblasto neural se puede derivar de cerebro fetal, cerebro adulto, cultivo de células neurales o una neuroesfera. El neurocitoblasto o el hemocitoblasto neural se puede derivan de tejido encerrado por la materia dura, nervios periféricos o ganglios.

[0029] Esta memoria describe cómo cribar un fármaco y/o descubrir un fármaco utilizando un mamífero no humano, que comprende (a) administrar un agonista de PDGF o VEGF al mamífero no humano; y (b) comparar el efecto de la administración del agonista de PDGF o VEGF al mamífero de la etapa (a) con un mamífero no humano de referencial al que no se haya administrado el agonista de PDGF o VEGF. El agonista se puede seleccionar entre el grupo que consiste en un péptido, molécula pequeña, receptor soluble y agonista del receptor en el que la exposición induce que un neurocitoblasto o un hemocitoblasto neural prolifere o se diferencie. El receptor soluble puede ser un receptor del VEGF, receptor del PDGF o una de sus combinaciones. Se puede seleccionar el receptor del VEGF a partir del grupo que consiste en Flt-1, Flk-1 y Flt-4. El receptor del PDGF puede ser un receptor del PDGF- α , un receptor PDGF- β o una de sus combinaciones.

[0030] Esta memoria describe cómo reducir los síntomas de un trastorno del sistema nervioso central en un mamífero que necesita de dicho tratamiento que comprende administrar PDGF, VEGF o un agonista de PDGF o VEGF al mamífero. El procedimiento puede comprender administrar un potenciador de la permeabilidad antes durante o después de la administración de PDGF, VEGF o un agonista de PDGF o VEGF. El potenciador de la permeabilidad de la pared del ventrículo o el PDGF, VEGF o un agonista de PDGF o VEGF se puede premezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El procedimiento puede comprender la administración de uno o más agentes seleccionados entre el grupo que consiste en citoblastos mitógenos, factores de supervivencia, agentes preventivos del linaje glial, agentes antiapoptóticos, medicaciones antiestrés, neuroprotectores, agentes antipirógenos y una combinación de los mismos.

[0031] La memoria describe cómo inducir *in situ* la proliferación o la diferenciación de un neurocitoblasto o hemocitoblasto normal localizado en el tejido neural de un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de PDGF o VEGF al tejido neural para inducir la proliferación o la diferenciación de la célula. La administración puede ser sistémica o local. La administración de PDGF, VEGF o del agonista de PDGF o VEGF puede aliviar los síntomas de enfermedades o trastornos del sistema nervioso.

[0032] Esta memoria describe cómo acelerar el crecimiento de neurocitoblastos o hemocitoblastos neurales en un tejido diana deseado en un sujeto, que comprende administrar intramuscularmente al sujeto un vector que contiene un gen PDGF o VEGF en una cantidad terapéuticamente eficaz. El vector de expresión puede ser un vector de expresión no vírico encapsulado en un liposoma.

[0033] Esta memoria describe cómo potenciar la neurogénesis en un paciente que padece de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central, mediante la infusión ventricular de PDGF, VEGF o de un agonista del receptor del PDGF o del VEGF.

[0034] Esta memoria describe cómo aumentar el número de neuronas dopaminérgicas en un paciente que padece de enfermedad de Parkinson que comprende las etapas de:

(a) infundir al paciente con PDGF en un ventrículo lateral del cerebro, (b) vigilar al paciente para determinar si existe proliferación y diferenciación de NSC y NPC; y (c) repetir la etapa (a) hasta que se consiga el efecto deseado.

[0035] Esta memoria describe cómo producir una población de células enriquecidas en neurocitoblastos humanos o hemocitoblastos neurales humanos que pueden iniciar neuroesferas, que comprende: (a) poner en contacto una población que contiene neurocitoblastos o hemocitoblastos neurales con un reactivo que reconoce un determinante de un receptor del VEGF o del PDGF; y (b) seleccionar las células en las que existe contacto entre el reactivo y el determinante sobre la superficie de las células de la etapa (a) para producir una población muy enriquecida en neurocitoblastos del sistema nervioso central. El reactivo puede ser un reactivo seleccionado entre el grupo que consiste en un receptor soluble, una molécula pequeñas, un péptido, un anticuerpo y una proteína affibody la

población que contiene neurocitoblastos o hemocitoblastos neurales se puede obtener a partir de cualquier población de células que proporcionan un aumento del tejido neural. El tejido neural podría ser de cerebro fetal o de cerebro adulto.

5 **[0036]** Esta memoria describe cómo activar un receptor del VEGF o del PDGF en un neurocitoblasto o hemocitoblasto neural, que comprende exponer un neurocitoblasto o hemocitoblasto neural que expresa un receptor reactivo exógeno, anticuerpo, o affibody, en el que la exposición induce al neurocitoblasto o hemocitoblasto neural a proliferar o diferenciarse. El neurocitoblasto o el hemocitoblasto neural pueden derivarse de cerebro fetal, cerebro adulto, cultivo de células neurales o una neuroesfera.

10 **[0037]** Esta memoria describe un cultivo celular *in vitro* que comprende una población de células enriquecida con células que expresan receptores en el que los receptores se seleccionan entre el grupo que consiste en receptores de Flt-1, Flk-1, Flt-4, PDGF- α y PDGF- β .

15 **[0038]** Esta memoria describe cómo tratar las enfermedades o trastornos del sistema nervioso central que comprenden tratar la población de neurocitoblastos o los hemocitoblastos neurales descritas en la presente memoria descriptiva en un mamífero que las necesita.

20 **[0039]** Esta memoria describe un mamífero no humano injertado con los neurocitoblastos humanos o hemocitoblastos neurales descritos en la presente memoria descriptiva El mamífero no humano se puede seleccionar entre el grupo que consiste en una rata, ratón, conejo, caballo, oveja, cerdo y cobaya.

25 **[0040]** Esta memoria describe cómo reducir un síntoma de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central en un sujeto, que comprende las etapas de administrar en la médula espinal del sujeto una composición que comprenda una población de neuronas primarias aisladas obtenidas a partir de un feto, y PDGF, VEGF, un agonista de PDGF o VEGF o una de sus combinaciones de tal manera que se reduzca el síntoma.

30 **[0041]** Esta memoria describe una célula hospedadora transformada o transfectada con una molécula seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 y 4. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Se puede seleccionar la célula hospedadora entre el grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula bacteriana, una levadura. Se puede utilizar el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Diagnostics) para transfectar la célula hospedadora.

35 **[0042]** Esta memoria describe la administración y la expresión génica en una célula diana en un mamífero, que comprende la etapa de introducir un vector vírico en la célula diana, en la que el vector vírico tiene al menos un sitio de inserción que contiene un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 y 4, estando el ácido nucleico génico unido de manera operable a un promotor capaz de expresarse en un hospedador. El vector vírico puede ser un vector vírico no lítico.

40 **[0043]** Esta memoria describe la administración y la expresión génica en una célula diana de un mamífero, que comprende las etapas de (a) proporcionar un fragmento de ácido nucleico aislado de la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3 y 4; (c) seleccionar un vector vírico con al menos un sitio de inserción para la inserción del fragmento de ácido nucleico aislado unido de manera operable a un promotor capaz de la expresión en células dianas; (d) insertar el fragmento de ácido nucleico aislado en el sitio de inserción, y (e) introducir el vector en la célula diana en la que se expresa el gen a niveles detectables. Se puede seleccionar el virus entre el grupo que consiste en retrovirus, adenovirus, iridovirus, coronavirus, togavirus, calicivirus y picornavirus. El virus puede ser una cepa que se ha modificado o seleccionado genéticamente para ser no virulenta en un hospedador.

50 **[0044]** Esta memoria describe cómo aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno del sistema nervioso central en un paciente, que comprende las etapas de. (a) proporcionar una población de neurocitoblastos o hemocitoblastos neurales; (b) suspender los neurocitoblastos o los hemocitoblastos neurales en una solución que comprenda una mezcla de un factor de crecimiento dimérico en la que cada mitad del dímero se selecciona entre el grupo que consiste en PDGF A, PDGF B, PDGF C, PDGF D, VEGF A, VEGF B, VEGF C, y VEGF D, para generar una suspensión celular; (c) administrar la suspensión celular en un sitio de inyección en el sistema nervioso central del paciente para aliviar el síntoma. El procedimiento puede comprender además la etapa de inyectar en el sitio de inyección el factor de crecimiento durante un periodo de tiempo antes de la etapa de administrar la suspensión celular. El procedimiento puede comprender además la etapa de inyectar en el sitio de inyección dicho factor de crecimiento después de la mencionada etapa de administración.

60 **[0045]** Se mostraran los aspectos adicionales, características, realizaciones y ventajas de la invención, en la descripción que sigue, o se pueden aprender mediante la práctica o el uso de la invención. Los objetos y ventajas se pueden realizar y alcanzar por medio de las características y las combinaciones particularmente apuntadas a lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada son solo a modo de ejemplo y a modo de explicación y no se contemplan como restrictivas de la invención tal como se reivindica.

Breve descripción de las figuras

[0046]

- 5 La FIG. 1 representa gráficamente el efecto de los PDGF sobre la proliferación de neuroesferas de ratón cultivadas no adherentes
- 10 La FIG. 2 muestra el efecto de los PDGF sobre la proliferación de células NSC / hemocitoblastos de ratón cultivadas adherentes.
- La FIG. 3 son las transferencias Western que muestran el efecto de PDGF-AA en neuroesferas cultivadas. La regulación por defecto de GFAP (izquierda); la regulación por exceso de la Tubulina β -III (derecha).
- 15 La FIG. 4 representa gráficamente el efecto de PDGF-AA en células NCC / hemocitoblastos neurales (NPC) de ratón cultivadas. Panel superior: células NSC de ratón adulto tratadas con PDGF-AA durante 6 días alternos a partir de unas células indiferenciadas (panel de la izquierda) para un fenotipo neuronal (panel de la derecha) aumentando el marcador neuronal específico Tubulina β -III. Panel inferior. En contraste con lo anterior, en células NSC de ratón adulto tratados con PDGF-AA durante 6 días disminuye significativamente la expresión específica del marcador
- 20 específico glial GFAP indicando que el componente astrogial se redujo en presencia de PDGF-AA.
- La FIG. 5 muestra el efecto de PDGF-AA y PDGF-BB sobre la diferenciación neuronal de citoblastos de ratón adulto. En comparación con el control (panel A), la estimulación con PDGF-AA (panel B) y PDGF-BB (panel C) aumenta significativamente el número de células positivas para la Tubulina β -III en el cultivo.
- 25 La Fig. 6 es una transferencia Western que muestra el efecto de PDGF-AA y PDGF-BB sobre la diferenciación neuronal de citoblastos de ratón adulto. En comparación con el control (A), la estimulación con PDGF-AA (B) y PDGF-BB (C) aumentó significativamente los niveles de la proteína Tubulina β -III. Se normalizaron las cargas de las muestras.
- 30 La FIG. 7 representa el efecto de PDGF-BB sobre el número de células positivas para BrdU en el giro dentado.
- La FIG. 8 muestra el efecto de PDGF-BB sobre las células positivas para BrdU en el cuerpo estriado.
- 35 La FIG. 9 representa gráficamente una neurona grande en el ratón lesionado con MPTP que recibe PDGF. Esta célula nerviosa positiva para la tirosina hidrolasa (marrón) con un nucléolo violeta en el núcleo colocado centralmente sin tinción marrón tenía un volumen estimado de $10.900 \mu\text{m}^3$. Se visualizó la anti-tirosina hidrolasa con un procedimiento avidina-biotina-peroxidasa-DAB y se empleó violeta de cresilo como contratinción. Barra = $10 \mu\text{m}$.
- 40 La FIG. 10 representa una neurona pequeña positiva para la tirosina hidrolasa en los ratones lesionados con PDGF tratados con PDGF. La célula tenía un volumen estimado de $170 \mu\text{m}^3$, por ejemplo, similar a una célula de la glía pequeña, pero demostró un claro fenotipo bipolar neuronal con dendritas largas que se extendían durante más de $100 \mu\text{m}$ en la sección con un grosor de $40 \mu\text{m}$.
- 45 La FIG. 11 muestra una etiqueta de timidina ^3H (puntos negros) sobre una neurona de la sustancia negra (tinción de Nissl) en un ratón lesionado con MPTP tratado con PDGF. Barra = $10 \mu\text{m}$.
- La FIG. 12 muestra que los genes PDGFR-A y PDGFR-B se expresaron en neurocitoblastos humanos cultivados.
- 50 La FIG. 13 muestra las células etiquetadas con BrdU teñidas inmunohistoquímicamente en el cuerpo estriado a las 5 semanas de la infusión de PDGF. (A) control con PBS, (B) tratadas con PDGF.
- La FIG. 14 representa el número de células etiquetadas con BrdU en el cuerpo estriado a 12 días y 5 semanas después de la infusión de PDGF o BDNF. * $p < 0,05$, en comparación con los controles infundidos con PBS. Promedios $\pm$ SEM.
- 55 La FIG. 15 representa gráficamente el número de células etiquetadas por duplicado con BrdU / NeuN en el cuerpo

estriado a las 5 semanas después de infusión de PDGF o BDNF. Señalar que debido a la heterogeneidad de la varianza con los grupos, los datos se transformaron logarítmicamente. * $p < 0,05$ en comparación con los controles infundidos con PBS. Promedios $\pm$ SEM.

5 La FIG. 16 muestra el número de células etiquetadas con BrdU en la sustancia negra a los 12 días y 5 semanas después tras la infusión de PDGF o BDNF. * $p < 0,05$ en comparación con los controles infundidos con PBS. Promedios $\pm$ SEM.

10 La FIG. 17 representa gráficamente la neurogénesis en el hipocampo que está caracterizada por agrupaciones proliferativas de células a lo largo de la frontera entre la capa de células granulosas (g) y la región del hilo (h). Estas células comienzan a migrar a la capa de células granulosas aproximadamente 1 semana después de su última división celular y se pueden etiquetar simultáneamente con marcadores para las células granulares (*por ejemplo*, NeuN y Calbindina).

15 La FIG. 18 representa las células positivas para Flk-1 en el giro dentado. Con frecuencia, las células positivas para Flk-1 están asociadas con agrupaciones o células proliferativas. Estas agrupaciones contienen células endoteliales así como NSC / NPC. (A) Inmunofluorescencia múltiple con BrdU, VEGF y Flk-1. Señala la localización simultánea de Flk-1 y BrdU. (B) Se asociaron las células positivas para BrdU con vasos sanguíneos tal como se muestra con la tinción RECA (antígeno celular endotelial de rata).

20 La FIG. 19 muestra la localización de células inmunoreactivas a Flk-1 en la pared del ventrículo. La capa endimaria de la pared del ventrículo muestra inmunoreactividad intensa para Flk-1. Debido a que se pueden generar neurocitoblastos a partir de las células endimarias de la pared del ventrículo, Flk-1 podría funcionar como un marcador de citoblastos y tiene quizá una función en el reclutamiento de los citoblastos.

25 La FIG. 20 representa la infusión intracerebroventricular de VEGF. Se infundió VEGF mediante minibombas osmóticas durante 7 días en el ventrículo lateral de ratas adultas. Se observó un aumento en el etiquetado con BrdU en la capa de células granulosas del giro dentado 4 semanas después de la infusión de VEGF en el ventrículo lateral.

30 La FIG. 21 muestra los niveles de ARNm de VEGF. Se cultivaron neuroesferas en un medio definido en presencia de EGF y FGF. Utilizando la RT-PCR, se examinó el ARNm de estas células para la expresión de 4 isoformas diferentes de VEGF. La expresión de GAPDH sirvió como control de calidad del ARNm.

35 La FIG. 22 muestra los niveles de ARNm de Flk-1. *Izquierda*. Neurocitoblastos procedentes de la pared del ventrículo lateral (LV) y el hipocampo (HC) de roedor adulto se pueden hacer crecer como neuroesferas utilizando medio definido y los factores de crecimiento FGF-2 y EGF. *Derecha*. A partir de esferas en condiciones de crecimiento, se aisló ARNm y se llevó a cabo la RT-PCR de Flk-1. Se utilizó la actina como un control de la cantidad de ARNm.

40 La FIG. 23 muestra la liberación de la proteína VEGF. Se utilizó el ELISA competitivo para la cuantificación de la secreción de VEGF sobre NSC adultos procedentes de la pared del ventrículo lateral de rata. Como control positivo, se utilizaron la línea de células endoteliales HMEC-1 y las células epiteliales del pigmento retinal primario (RPE).

45 La FIG. 24 representa gráficamente la proliferación de NSC dependiente de VEGF. Se hicieron crecer cultivos de neuroesferas en medio libre de suero que contenía EGF / FGF-2. Se añadió VEGF a este medio en diferentes concentraciones durante 7 días y se contó el número total de NSC.

50 La FIG. 25 muestra que el efecto de VEGF se moduló mediante el receptor Flk-1. Se estimularon los cultivos de NSC durante 7 días con diferentes concentraciones de VEGF-A₁₆₅ (triángulos) y VEGF-A₁₂₁ (cuadrados). VEGF-A₁₆₅ se une a todos los receptores del VEGF mientras que VEGF-A₁₂₁ se une preferentemente al receptor Flk-1.

55 La FIG. 26 muestra el linaje potencial de los cultivos de neurocitoblastos de rata derivados clonalmente. Se cultivaron clones individuales derivados de ventrículo lateral de rata en una matriz de poliornitina / laminina diferenciados en medio NB / B27 suplementado con FCS al 1 % durante 7 días y se inmunotifieron para la presencia de (a) neuronas con tubulina β -III, (b) astrocitos con GFAP u (c) oligodendrocitos con GalC (barra = 40 μ m).

La FIG. 27 es una Curva Dosis-respuesta para VEGF en neurocitoblastos de rata procedentes de la pared del ventrículo lateral. Se llevó a cabo la curva dosis-respuesta sobre neurocitoblastos derivados clonalmente. Se puede

observar una actividad máxima de crecimiento comenzando a 50 ng / ml.

FIG. 28 (A). En medio basal, VEGF (50 ng / ml) estimula la expansión de los cultivos de neurocitoblastos aproximadamente 5 veces. Los inhibidores PADQ y SU1498 del receptor del VEGF son ambos capaces de bloquear la respuesta del VEGF a las concentraciones específicas para el receptor flk-1 del VEGF. Recuentos de células totales a los 7 días después del tratamiento. (B) en condiciones de crecimiento (que incluyen EGF y FGF-2), VEGF estimula la expansión de los cultivos de neurocitoblastos aproximadamente 2 veces. Los inhibidores PADQ y SU1498 de la tirosina cinasa del receptor del VEGF son ambos capaces de bloquear la respuesta del VEGF. Recuentos de células totales a los 7 días después del tratamiento en el medio de crecimiento.

La FIG. 29 muestra la producción de VEGF y la liberación en el medio de cultivo celular. Se cultivaron las células en medio libre de suero y se recogió el medio a los 2 días (2d) u 8 días (8d) en el medio: HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana, huRPE: células epiteliales del pigmento retinal.

La FIG. 30 representa los NSC en condiciones de crecimiento (con EGF y FGF-2), ambos inhibidores PADQ y SU1498 que bloqueen el receptor de la tirosina cinasa del receptor del VEGF son capaces de reducir significativamente el crecimiento de los cultivos de neurocitoblastos. Se utilizó DMSO para disolver los inhibidores y no tuvo efecto sobre la tasa de crecimiento. Recuentos de células totales a los 7 días después del tratamiento.

La FIG. 31 muestra que la incorporación de BrdU aumenta con VEGF y se reduce con el bloqueo del receptor del VEGF. Se trataron neurocitoblastos con 50 ng / ml de VEGF, PADQ 100 nM o SU1498 700 nM durante 7 días. Se añadió BrdU (10 µM) al medio de cultivo 24 horas después de que se cosecharan y lisaran las células. Se extrajo el ADN y se determinó el contenido de BrdU utilizando un ELISA anti-BrdU. Se presentan los datos como cambios porcentuales en la densidad óptica en comparación con el control (Medio de crecimiento).

La FIG. 32 muestra que la fragmentación del ADN aumentó con VEGF y se redujo con el bloqueo del receptor del VEGF. Se trataron cultivos de neurocitoblastos con 50 ng / ml del VEGF, PADQ 100 nM, o SU1498 700 nM durante 7 días. Se añadió BrdU (10 µM) al medio de cultivo 24 h antes de que se cosecharan y lisaran las células. Se extrajo el ADN y se determinó el contenido de BrdU utilizando un ELISA anti-BrdU. Se presentan los datos como cambios porcentuales en la densidad óptica en comparación con el control (Medio de crecimiento).

La FIG. 33 representa que se estimuló la generación *in vitro* de esferas mediante la infusión del VEGF intraventricular. Después de 7 días de infusión intraventricular tanto del fluido cerebroespinal artificial (CSF) como de VEGF, se aislaron las células a partir de la pared del ventrículo lateral, se sembraron a 10000 células / pocillo en medio de crecimiento (Neurobasal + B27 + EGF + FGF-2 + heparina) y se hicieron crecer en cultivo durante 3 semanas. La eficacia para generar esferas a partir de la pared del ventrículo lateral aumentó sustancialmente mediante infusión *in vivo* previa de VEGF. Se concluyó a partir de este hallazgo que VEGF estimula los neurocitoblastos histoespecíficos de la pared del ventrículo lateral *in vivo* conduciendo a un crecimiento facilitado de neurocitoblastos *in vitro*.

La FIG. 34 muestra que los genes VEGF y FLT-4 se expresan en neurocitoblastos humanos cultivados.

La FIG. 35 muestra que los genes FLT-1 y FLK-1 se expresan en neurocitoblastos humanos cultivados

Descripción detallada de la invención

[0047] Se ha descubierto que algunos reactivos son capaces de modular la diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de los neurocitoblastos / hemocitoblastos *in vitro* e *in vivo*. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "modular" se refiere a tener un afección que altere de tal manera la diferenciación, migración, proliferación y supervivencia de la actividad de los neurocitoblastos (NSC) o los hemocitoblastos neurales (NPC). Debido a que los citoblastos histoespecíficos indiferenciados pueden proliferar en los cultivos durante un año o más, la invención descrita en esta divulgación proporciona un suministro casi ilimitado de precursores neurales.

[0048] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término neurocitoblastos (NSC) se puede identificar por su capacidad para experimentar proliferación celular continua, para regenerar copias exactas de ellos mismos (autorrenovación), para generar un gran número de progenie celular regional, y para elaborar nuevas células en respuesta a la lesión o a la enfermedad. Los términos "hemocitoblastos neurales" o "células precursoras neurales" (NPC) significan células que pueden generar una progenie compuesta por células neuronales (tales como precursores neurales o neuronas maduras) o células gliales (tales como precursores gliales, astrocitos maduros, u oligodendrocitos maduros). Normalmente, las células expresan alguno de los marcadores fenotípicos que son característicos del linaje neural. Normalmente, no producen progenie de otras capas germinales embrionarias cuando

se cultivan ellas mismas *in vitro* a no ser que se desdiferencien o reprogramen de alguna manera.

[0049] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “reactivo” se refiere a cualquier sustancia que es química y biológicamente capaz de activar un receptor, incluyendo péptidos, moléculas pequeñas, anticuerpos (o sus fragmentos), affibodies y cualquier molécula que dimeriza o multimeriza los receptores o sustituye la necesidad de activación de los dominios extracelulares. En una realización, el reactivo es una molécula pequeña.

[0050] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “anticuerpo”, tal como se usa en esta divulgación, se refiere a anticuerpo policlonal y monoclonal. El ámbito del término abarca deliberadamente no solo las moléculas de inmunoglobulina intactas (tales como construcciones Fv monocatenarias, diacuerpos y construcciones de fusión), tal como se pueden preparar mediante las técnicas conocidas en la materia, y retener una especificidad de unión por el anticuerpo deseado. El término “affibody” (Patente de los Estados Unidos N° 5.831.012) se refiere a una proteína con afinidad muy específica que se puede diseñar para unirse a cualquier molécula diana deseada. Esta imitación de anticuerpo se puede fabricar para tener las propiedades deseadas (especificidad y afinidad), siendo a la vez también muy robusto para soportar un amplio intervalo de condiciones analíticas, que incluyen un pH y temperatura elevados. Las propiedades específicas de la unión que se pueden diseñar mediante ingeniería genética en cada proteína de captura permiten tener una especificidad muy alta y la afinidad deseada por una proteína diana correspondiente. Una proteína diana específica se unirá de esta manera solo a su proteína de captura correspondiente. El tamaño pequeño (sólo 58 aminoácidos), una elevada solubilidad, facilidad para diseñarse mediante ingeniería genética adicionalmente en construcciones multifuncionales, plegado excelente y ausencia de cisteínas, así como una estructura estable que se puede producir en grandes cantidades utilizando sistemas de expresión bacteriana de bajo coste, convierten los affibodies en moléculas de captura superiores a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tales como Fab o los fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en una variedad de aplicaciones para las ciencias de la vida.

[0051] Los reactivos descritos en la presente memoria descriptiva incluyen los miembros de la familia del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y los miembros de la familia del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). El reactivo puede ser VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFD, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-B, PDGF-AA, PDGF-BB o PDGF-AB.

[0052] Esta memoria describe la modulación *in vivo* de la actividad de PDGF y VEGF y la administración terapéutica de PDGF y VEGF y el cribado del fármaco. PDGF, VEGF o sus agonistas, se pueden administrar al tejido neural. El tejido neural puede ser de cerebro fetal o adulto. La población que contiene neuronas o células derivadas del tejido neural se puede obtener a partir de un cultivo de células neurales o neuroesfera.

[0053] Los receptores descritos en la presente memoria descriptiva incluyen los miembros de los receptores de VEGF y los miembros de los receptores de PDGF. Dichos receptores pueden incluir: Flit- 1, Flk-1, Flt-4, PDGF- α , PDGF- β y el receptor de VEGF.

Receptores de PDGF y sus ligandos

[0054] PDGF, una citocina autocrina, está implicado en el desarrollo del SNC, así como en el mantenimiento del SNC en un adulto. Los mecanismos estimulados por PDGF incluyen la diferenciación y la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. *In vitro*, se ha demostrado que PDGF respalda la diferenciación y potencia los citoblastos histoespecíficos hacia un destino neuronal. Johe y col., 1996, Genes Dev 10, 3129 – 3140; Williams y col., 1997, Neuron 18, 553 – 562.

[0055] PDGF es también un potente mitógeno para las células mesenquimales, gliales, y endoteliales capilares. Como tal, actúa como una fuente quimioattractora de fibroblastos y células musculares lisas, así como de monocitos y neutrófilos. La actividad mitógena del PDGF localizado da como resultado la proliferación de estas células en el sitio de la lesión, contribuyendo al proceso de reparación de la herida.

[0056] El PDGF natural purificado, una glucoproteína de aproximadamente 30.000 daltons, está compuesto por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Se han identificado dos formas de estas cadenas, designadas A y B. La proteína natural se produce como el homodímero AA o BB o el heterodímero AB, o como una de sus mezclas. Se ha identificado una secuencia de aminoácidos parcial para la cadena PDGF-A (Johnsson y col. (1984) EMBO J. 3: 921 – 928) y se han descrito los ADNc que codifican dos formas precursoras de la cadena de PDGF-A (Patentes de los Estados Unidos N° 5.219.759). La cadena A madura consta de un polipéptido de 104 aminoácidos que se deriva mediante el procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de 211 aminoácidos. Se ha descrito también la cadena de ADNc que codifica la cadena de PDGF-B (Nature (1985) 316: 748 – 750). La cadena B madura consta de un polipéptido de 109 aminoácidos que se deriva mediante el procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de 241 aminoácidos. Las cadenas A y B maduras de PDGF muestran una identidad de la secuencia del 51 %, conservándose los ocho restos de cisteína en cada una de las cadenas (Johnsson y col., (1984) EMBO J. 3: 921 – 928).

[0057] Las tres isoformas de PDGF, PDGF-AA, PDGF-AB, y PDGF-BB, interactúan diferencialmente con

receptores estructuralmente relacionados designados como receptores PDGF α y β . Cada uno de estos receptores tiene una región extracelular que caracteriza cinco dominios de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana lipófilo y una parte intracelular con un dominio tirosina cinasa que contiene una secuencia de aminoácidos insertada de forma característica. La actividad tirosina cinasa de estos receptores es esencial para la transmisión de la señal mitógena en la célula.

[0058] Las tres formas diméricas de PDGF presentan diferentes afinidades de unión por los dos productos génicos del receptor de PDGF conocidos, α y β . El receptor β reconoce la cadena PDGF-B y se dimeriza en presencia de PDGF-BB. El receptor α reconoce las cadenas B y A de PDGF y se puede dimerizar en PDGF-BB, PDGF-AA, y PDGF-AB (véase, por ejemplo, Abboud y col. (1994) J. Cell. Phys. 158: 140 – 150). La región con el resto de aminoácidos de PDGF-BB que está implicada en la unión o la activación del receptor se ha limitado a los restos Ile²⁵-Phe³⁷ (Giese y col. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 5496 – 5501).

[0059] De forma más reciente, se ha identificado un miembro adicional de la familia PDGF / VEGF de factores de crecimiento, que se denomina PDGF-C. PDGF-C tiene una estructura de dos dominios no reconocida anteriormente en esta familia de factores de crecimiento, un dominio de la proteína Uegf identificada originalmente a partir de los genes Clr / Cls en erizo de mar embrionario / proteína 1 morfogenética ósea (CUB) en el extremo N, y un dominio de homología PDGF / VEGF (P / VHD) en el extremo C. La estructura del P / VHD en PDGF-C muestra una identidad de la secuencia global baja con los otros dominios de homología PDGF / VEGF, aunque se encuentran presentes los ocho restos de cisteína invariantes implicados en la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares. La separación entre las cisteínas en la región central más conservada de este dominio es diferente de la del resto de dominios PDGF / VEGF, con una inserción de tres restos de aminoácidos. A pesar del hecho de que la inserción se produce cerca de la región del bucle 2 que se ha propuesto que está implicada en la unión del receptor, se ha demostrado que este dominio de dímeros PDGF-CC se une a PDGFR-alfa con una afinidad casi idéntica a la de los homodímeros de las cadenas de PDGF-A o B. además, están presentes en este dominio cuatro restos cisteína. Se encontró que los dímeros PDGF-CC de longitud completa y truncados no se unían a VEGFR-1, 2 o 3, a PDGFR-beta.

[0060] PDGF-C requiere la eliminación proteolítica del dominio CUB del extremo N para la unión y activación del receptor. Esto indica que es probable que los dominios CUB bloqueen estéricamente la unión del receptor a los epítomos del dímero sin procesar. Las proteínas procesadas proteolíticamente *in vitro* e *in vivo* están desprovistas de porciones en los extremos N correspondientes a más de 14 – 16 kDa tal como se determinó a partir del análisis de SDS-PAGE que es consistente con una pérdida de 110 aminoácidos de la longitud del dominio CUB y una porción de longitud variable de la región bisagra entre los dominios CUB y nucleares

[0061] PDGF-C no se procesa proteolíticamente durante la secreción en las células COS transfectadas, indicando que la eliminación proteolítica del dominio CUB se produce extracelularmente, y no durante la secreción. Esto está en contraste con PDGF-A y B (Stman y col., J. Cell. Biol., 1992 118 509 – 519) que parece que se procesan intracelularmente por las endoproteasas de tipo furina (Nakayama y col., Biochem J., 1997 327 625 – 635).

[0062] Los estudios de localización *in situ* demuestran la expresión de PDGF-C en determinadas estructuras epiteliales, y de PDGFR-alfa en el mesénquima adyacente, indicando el potencial de la señalización paracrina en el embrión en desarrollo. La expresión de PDGF-C parece particularmente abundante en los sitios en los que se encuentra en curso la morfogénesis ductal, indicando un papel del factor en la remodelación del tejido conectivo en estos sitios. El modelo de expresión es distinto del de PDGF-A o PDGF-B, indicando que los tres factores de crecimiento tienen diferentes papeles a pesar de sus actividades similares de unión y señalización de PDGFR-alfa. Esto se ilustra mediante el riñón embrionario de ratón, en el que PDGF-C se expresa en las estructuras tubulares más maduras, y PDGF-B en las células endoteliales vasculares. PDGFR-alfa se expresa en el mesénquima de la corteza renal, adyacente a los sitios de expresión de PDGF-C, indicando que este mesénquima puede estar dirigido específicamente por PDGF-C. de hecho, los embriones de ratón PDGFR-alfa- / - muestra una extensa pérdida del mesénquima cortical adyacente a los sitios de expresión de PDGF-C, que no se observa en ratones PDGF-A- / - o en ratones PDGF-A / B- / -, indicando que PDGF-C tiene un papel esencial en el desarrollo del mesénquima del riñón. Los análisis Northern muestra el ARNm de PDGF-C en una variedad de tejidos humanos, que incluyen corazón, hígado, riñón, páncreas y ovario.

[0063] Otra proteína de la familia PDGF es PDGF-D. Las previsiones estructurales basadas en la secuencia de PDGF-D y su homología respecto a otros factores de crecimiento sugieren que el polipéptido puede formar homomultímeros o heteromultímeros. Los heteromultímeros de PDGF-D pueden comprender un polipéptido de otro miembro de la familia de proteínas PDGF / VEGF, incluyendo VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF-D / PDGF-C, P1GF (Maglione y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9267 – 9271, 1991), PDGF-A (Murray y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.899.919; Heldin y col., Patente de los Estados Unidos N° 5.219.759), o PDGF-B (Chiu y col., Cell 37: 123 – 129, 1984; Johnsson y col., EMBO J. 3: 921 – 928, 1984).

[0064] La cadena del polipéptido PDGF-D comprende un dominio del factor de crecimiento, un dominio CUB, y un interdominio de unión a los dominios CUB y de los factores de crecimiento. El dominio del factor de crecimiento se caracteriza por una disposición de los restos de cisteína y las cadenas beta que es característica de la estructura

“nudo de cistina” de la familia PDGF. El dominio CUB muestra la homología de la secuencia con los dominios CUB en las neuropilinas (Takagi y col., *Neuron* 7: 295 – 307, 1991; Soker y col., *Cell* 92: 735 – 745, 1998), proteína i morfogenética de hueso humano (Wozney y col., *Science* 242: 1528 – 1534, 1988), proteína de plasma seminal de porcino y proteína ácida de fluido seminal de bovino (Romero y col., *Nat. Struct. Biol.* 4: 783 – 788, 1997), y proteína similar a toxoide de *X. laevis* (Lin y col., *Dev. Growth Differ.* 39: 43 – 51, 1997).

[0065] La unión de PDGF a sus receptores inicia numerosas respuestas biológicas que incluyen la proliferación, quimiotaxis, diferenciación y supervivencia. El proceso de transducción de la señal implica la dimerización del receptor y la activación de la actividad intrínseca del receptor de la cinasa, que conduce a la autofosforilación en hasta nueve sitios. Posteriormente, dependiendo del contexto de la célula, la cascada de transmisión de la señal se diferencia para implicar muchas rutas diferentes, la mayor parte de las cuales finaliza con un acontecimiento de regulación de la transcripción (para las referencias, véase Valenzuela y col.; 1997, *Brain Res. Rev* 24, 77 – 89). Los receptores de PDGF se expresan en estructuras relevantes para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Véase, Valenzuela y col., 1997, *Brain Res. Rev* 24, 77 – 89.

[0066] PDGF y sus receptores participan en diversos procesos fisiológicos tales como el desarrollo embrionario y la cicatrización de heridas. Se cree que una actividad muy anómala de PDGF juega un papel central en la etiología de determinadas situaciones patofisiológicas adversas, tales como la aterosclerosis y la restenosis, así como en otras enfermedades no malignas tales como fibrosis pulmonar, nefritis glomerular, y artritis reumatoide. Además, la cadena PDGF B se adquirió como el oncogén sis mediante transformación intensa del virus del sarcoma de simios. La expresión de un factor de crecimiento de tipo PDGF en células infectadas con el virus del sarcoma de simios o transfectadas con el oncogén sis conduce a su transformación debido a la persistente estimulación autocrina de los receptores de PDGF residentes. Además, determinados tumores humanos poseen receptores de PDGF y expresan los genes de PDGF, lo que sugiere que la estimulación autocrina del crecimiento mediante los receptores de PDGF contribuye al fenotipo maligno de estos tumores.

[0067] Se representan a continuación las secuencias de ácido nucleico de PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D humanos:

PDGF-A (nº de acceso al GenBank NM_002607)

ACGCGCGCCCTGCGGAGCCCGCCCAACTCCGGCGAGCCGGGCTGCGCCTACTCCTCCTCCTCCTCCTCCCGGCGG
CGGCTGCGGCGGAGGCGCCGACTCGGCCCTTGCGCCCGCCCTCAGGCCCGCGCGGGCGGCGCAGCGAGGCCCCCGG
CGGCGGGTGGTGGCTGCCAGGCGGCTCGGCCGCGGGCGCTGCCCGGCCCGCGGAGCGGAGGGCGGAGCGCGGCG
CCGGAGCCGAGGGCGCGCCGCGGAGGGGGTGTGGGCCCGCGCTGTGCCCGGCCGGGCGGCGGCTGCAAGAGGAGG
CCGGAGGCGAGCGCGGGGCCGGCGGTGGGCGCGCAGGGCGGCTCGCAGCTCGCAGCCGGGGCCGGGCCAGGCGTT
CAGGCAGGTGATCGGTGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCCAGACTCCCTCCGGAGTTCTTCTTGGGGCTGATG
TCCGCAAAATATGCAGAAATTACCGGCCGGGTTCGCTCCTGAAGCCAGCGCGGGGAGCGAGCGCGGCGGCGGCCAGCA
CCGGGAACGCACCGAGGAAGAAGCCAGCCCCCGCCCTCCGCCCTTCCGTCCCCACCCCCCTACCCGGCGGCCCA
GGAGGCTCCCGGCTGCGGCGCGCACTCCCTGTTTCTCCTCCTCCTGGCTGGCGCTGCCTGCCTCTCCGCACTCA
CTGCTCGCCGGGCGCCGTCCGCCAGCTCCGTGCTCCCCCGGCCACCCCTCCTCCGGGCCGCGCTCCCTAAGGGATG
GTACTGAATTTGCGCGCCACAGGAGACCGGCTGGAGCGCCCCCGCGCCTCGCTCTCCTCCGAGCAGCCAGC
GCCCTCGGAGCCGATGAGGACCTTGGCTTGGCTGCTCCTCCTCGGCTGCGGATACCTCGCCATGTTCTGGCCGA
GGAAGCGAGATCCCCCGCGAGGTGATCGAGAGGCTGGCCCCGAGTCAGATCCACAGCATCCGGGACCTCCAGCG
ACTCCTGGAGATAGACTCCGTAGGGAGTGAGGATTCTTTGGACACCAGCCTGAGAGCTCACGGGGTCCACGCCAC
TAAGCATGTGCCCGAGAAGCGGCCCTGCCATTTCGGAGGAAGAGAAGCATCGAGGAAGCTGTCCCGCTGTCTG
CAAGACCAGGACGGTCATTTACGAGATTCTTCGGAGTCAGGTTCAGCCCCACGTCCGCCAACTTCTTGATCTGGCC
CCCGTGCGTGGAGGTGAAACGCTGCACCGGCTGCTGCAACACGAGCAGTGTCAAGTGCCAGCCCTCCCGCTCCA
CCACCGCAGCGTCAAGGTGGCCAAGGTGGAATACGTCAGGAAGAAGCCAAAATTTAAAGAAGTCCAGGTGAGGTT
AGAGGAGCATTTGGAGTGCCTTCGCGACCACAAGCCTGAATCCGGATTATCGGGAAGAGGACACGGGAAGGCC
TAGGGAGTCAGGTAATAAACGGAAGAAAGGTTAAACCCACCTAAGATGTGAGGTGAGGATGAGCCGACG
CCTTTCCTGGGACATGGATGTACATGGCGTGTTCATTCTCCTGAACCTACTATGTACGGTGCTTTATTGCCAGTGT
GCGGTCTTTGTTCTCCTCCGTGAAAAACTGTGTCCGAGAACACTCGGGAGAACAAAGAGACAGTGCACATTTGTT
TAATGTGACATCAAAGCAAGTATTGTAGCACTCGGTGAAGCAGTAAGAAGCTTCTTGTCAAAAAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAAAAACAAACCACAAATGACAAAAACAAACGGACTCACAAAATATCTAAACTCGATGAGA
TGGAGGGTCGCCCCGTGGGATGGAAGTGCAGAGGTCTCAGCAGACTGGATTTCTGTCCGGGTGGTCACAGGTGCT
TTTTTGGCGAGGATGCAGAGCCTGCTTTGGGAACGACTCCAGAGGGGTGCTGTTGGGCTCTGCAGGGCCCCGAGG
AAGCAGGAATGCTTTGGAACCTGCCACGCGAACTTTAGAAACCAACCTCTCGCTGTAGTATTTAAGCCCATAC
AGAAACCTTCTGAGAGCCTTAAAGTGGTTTFTTTTFTTTGTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTACACCATAAAGTGATTATTAAGCTTCCTTTTACTCTTTGGCTAGCTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTAATTATCTCTTGGATGACATTTACACCGATAACACACAGGCTGCTGTAAGTGTGAGACA

GTGCGACGGTATTTTTCCTAGCAAGATGCAAACTAATGAGATGTATTAATAATAAACATGGTATACCTACCTATGC
ATCATTTCCTAAATGTTTCTGGCTTTGTGTTTCTCCCTTACCCTGCTTTTATTGTAAATTTAAGCCATTTTGAAA
GAACATATGCGTCAACCAATCGTACGCCGTCCCTGCGGCACCTGCCCCAGAGCCCGTTTGTGGCTGAGTGACAACT
TGTTCGCCGAGTGCACACCTAGAATGCTGTGTTCCACGCGGCACGTGAGATGCATTGCCGCTTCTGTCTGTGT
TGTGTGGTGTGCCCTGGTGCCGTGGTGGCGGTCACTCCCTCTGCTGCCAGTGTTTGGACAGAACCCAAATTCTTTA
TTTTTGGTAAGATATTTGTGCTTTACCTGTATTAAACAGAAATGTGTGTGTGTGGTTTGTTTTTTGTAAAGGTGAA
GTTTGTATGTTTACCTAATATTACCTGTTTTGTATACCTGAGAGCCTGCTATGTTCTTCTTTGTTGATCCAAAA
TTAAAAAATAATACCACCAAC (SEQ ID NO:1)

ggtggcaactttctctcctgcggccgggagcggcctgectgectccctgcgcacccgcagcctccccgctgect
 ccttagggctccccctccggccgcagcggccatTTTTTcattccctagatagagatactttgcgcgcacacacata
 catacgcgcgcaaaaaggaaaaaagccccccctccagcctcgctgcaaaagagaaaaccggagcag
 ccgcagctcgcagctcgcagctcgcagcccgagcccgagaggacgcccagagcggcgagcaggcggcgagacg
 gaccgaeggactcgcgcgcgctccacctgtcgccggggccagccgagcgcgcagcgggcacgcgcgcgcgcg
 agcagcctgcccgcgcgcgcgggcccgcgcgcagggcgacacgctcccgccccctaccggcccgggcgaggag
 tttgcacctctcctgcccgggtgctcgagctgcccgttgcaaaagccaaactttggaaaaagtttttgggggagac
 ttgggcttgagggtgcccagctccgcgctttccgattttgggggccccttccagaaaatgttgcaaaaaagctaag
 ccggcgggcgagaggaaaacgcctgtagccggcgagtgaaagacgaaccatcgactgcccgtgttccctttcctcttg
 gaggttgaggtccccgggcccacacggctagacgectcggtgggttcgcgcgcagcggcccgggcgctgg
 atgctgcactcgggctcgggatccgcccaggtagccggcctcggaaccaggtcctgcgcgcaggtcctccccctgc
 cccccagcgagcggagccggggccggggcgggcgccggggccatgcgggtgagccgcgcgctgcagaggcctga
 ggcctgatcgcgcgcgacctgagccgagcccacccccctccccagccccccacccctggccgcggggcgggcgcg
 ctcgatctacgctcgggggccccgcggggccggggccggagtgggcatgaatcgctgctgggcgctcttctctgt
 ctctctgctgctacctgcgtctgggtcagcgcgcgagggggacccccattcccaggagctttatgagatgctgagtg
 accactcgatccgctcctttgatgatctccaacgcctgctgcacggagaccccgagaggaagatggggccgagt
 tggacattgaacatgacccgctccactctggaggcgagctggagagcttggtcgtggaagaaggagcctgggtt
 cctgacattgctgagccggccatgatcgccgagtgcaagacgcgcacccaggtgttcgagatctcccggcgc
 tcatagaccgcaccaacgccaacttccgtggtggtggccgcccctgtgtggaggtgcagcgtgctccggctgctgca
 acaaccgcaacgtgcagtgccgccccacccaggtgcagctgcgacctgtccaggtgagaaagatcgagattgtgc
 ggaagaagccaatctttaagaaggccacgggtgacgctggaagaccacctggcatgcaagtgtgagacagtggcag
 ctgcacggcctgtgacccgaagcccggggggttcccaggagcagcgcagccaaaacgccccaaactcgggtgacca
 ttccgagcgtgogagtcgcgcggcccccccaagggaagcaccggaaattcaagcacacgcagatgacaagacggcac
 tgaaggagacccttgagcctaggggcatcgccaggagagtggtggtgggcagggttatttaatatggtatttgcgtg
 tattgcccccatggggctccttgagtgataatattgtttccctcgctccgtctgtctcgatgctgattcggaagg
 ccaatggtgcttccccacccctccagctgtccgtccaccttccatcagcgggtctcctccagcggcctccgg
 tcttgcccagcagctcaagaagaaaaagaaggactgaactccatcgccatcttcttcccttaactccaagaact
 tgggataagagtggtgagagagactgatggggtcgctctttgggggaaacgggttccctccccctgcacctggcctg
 ggccacacctgagcgtgtgagctgtcctgaggagccctgaggacctctcagcatagcctgctgatccctgaac
 ccttgccagctctgaggggaggcacctccaggcaggccaggctgectcggaactccatgggttaagaccacagacg
 ggcacacagactggagaaaaacccctcccacgggtgcccacacacagtcacctcgctcctcctgggtgctctgtgca
 cagtggctctcttttgcgttttgcgttttgaagacgtggactcctcttgggtgggtgtggccagcacaccaagtggctg
 ggtgcccctcaggtgggttagagatggagtgtgctgttgaggtgggtgtagatgggtgacctgggtatccccctgcc
 tctgcccaccccttccctccatactccactctgattcacctcttccctctggttcccttccatctctctacctcca
 cctgcattttccctctgtcctggcccttcagctctgctccaccaaggggctcttgaaccccttatttaaggcccca
 gatgaccccgactcactcctctctagggcagaagactagaggccagggcagcaaggagacctgctcatcatattcca
 accagccacgactgccatgtaagggtgtgacgggtgtgtagtgcacaaggacattgtagtcaggggagcactgtt
 cacatcatagataaagctgatttgtatatatttattatgacaatttctggcagatgtaggtaaagaggaaaaggatc
 cttttccctaattcacacaaaagactccttgtggactggctgtgcccctgatgcagcctgtggctggagtgggcaaa
 taggaggggagactgtggtaggggcaggaggcaacactgctgtccacatgacctccatttcccaaagtccctctgc
 tccagcaactgcccttccaggtgggtgtgggacacctggggagaagggttccaaggagggtgcagccctcttgc
 cgcacccctccctgcttgacacttccccatctttgatccttctgagctccacctctgggtggctcctcctaggaa
 accagctcgtgggtgggaatgggggagagaagggaagatccccaagacccctgggggtgggtatctgagctcc
 cactccttcccaactactgcacttcccccttccgccttccaaaacctgcttccctcagtttgtaagtcgg
 tgattatatttttgggggctttccctttatttttttaaatgtaaaatttatttatattccgtattttaaagtgt
 (SEQ ID NO:2)

PDGF-C (n° de acceso al GenBank AF260738)

ggcacaggagattatgtggaactaccctcgcatctctctgtgcagagcaggctcggcgcttccacccagtgca
gccttcccctggcgggtggtgaaagagactcgggagtcgctgcttccaaagtgcccgccgtgagtgagctctcacc
ccagtcagccaaatgagcctcttcgggcttctctgtgacatctgccctggcggccagagacaggggactcag
gcggaatccaacctgagtagtaaatccagttttccagcaacaaggaacagaacggagtagaagatcctcagcat
gagagaattattactgtgtctactaatggaagtattcacagcccaagggttctctcatacttatccaagaaatac
gtcttggtatggagattagtagcagtagaggaaaatgtatggatacaacttacgtttgatgaaagatttgggctt
gaagaccagaagatgacatatgcaagtatgattttgtagaagttgaggaaccagtgatggaactatattaggg
cgctgggtgtgggttctgggtactgtaccaggaaaaacagatttctaaaggaaatcaaattaggataagatttgtatct
gatgaatattttccttctgaaccagggttctgcatccactacaacattgtcatgccacaattcacagaagctgtg
agtcccttcagtgctaccccccttcagctttgccactggacctgcttaataatgctataactgccttttagtaccttg
gaagaccttattcgatatcttgaaccagagagatggcagttggacttagaagatctatataggccaacttggcaa
cttcttggcaagggttttgtttttggaagaaaatccagagtggtggatctgaaccttctaacagaggaggttaaga
ttatacagctgcacacctcgtaacttctcagtggtccataagggaagaactaaagagaaccgataccattttctgg
ccaggttgtctcctgggttaaaccgtgtggtgggaactgtgcctgttgtctccacaattgcaatgaatgtcaatgt
gtcccaagcaaagttactaaaaaataaccacgaggtccttcagttgagaccaaaagaccggtgtcaggggattgcac
aaatcactcaccgacgtggccctggagcaccatgaggagtgtagctgtgtgtgcagagggagcacaggaggatag
cgcctcaccaccagcagctcttgcccagagctgtgcagtgtagtggtgattctattagagaacgtatgcgtta
tctccatccttaatctcagttgtttgtctcaaggaccttctcatcttcaggatttacagtgcatcttgaaagagga
gacatcaaacagaattaggagttgtgcaacagctcttttgagaggaggcctaagggacaggagaaaagggtcttca
atcgtggaaagaaaataaatgttgtattaaatagatcaccagctagtcttcagagttaccatgtacgtattccac
tagctgggttctgtatttcagttctttcgatacggcttagggtaatgtcagtcaggaaaaaaactgtgcaagtg
agcacctgattctcgttgcccttgcttactctaaagctccatgctcctgggctctaaactcgtataaaactctggattt
tttttttttttttttgcctcatattcacatatgtaaacccagaacattctcatgtactacaaacctgggtttttaaaaa
ggaactatgttgctatgaattaaacttgtgtcgtgctgataggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaa (SEQ ID NO:3)

PDGF-D (n° de acceso al GenBank AF336376)

cgctcggaagttcagcatgcaggaagtttggggagagctcggcgattagcacagcgaccggggcagcgaggg
cgagcgcaggcgccgagagcgcaggggcgccggcgctcggtcccgggagcagaacccggctttttcttggagcga
cgctgtctctagtgcgtgatcccaatgcaccggctcatctttgtctacactctaatctgcgcaaaccttttgcag
ctgtcgggacacttctgcaaccccgagagcgcatccatcaaagctttgcgcaacgccaacctcaggcgagatga
gagcaatcacctcacagacttgtaccgaagagatgagaccatccaggtgaaaggaaacggctacgtgcagagtcc
tagattcccgaacagctaccccaggaacctgctcctgacatggcggttccactctcaggagaatacacggataca
gctagtgtttgacaatcagtttggattagaggaagcagaaaaatgatatactgttaggtatgattttgtggaagt tga
agatataatccgaaccagtagcattattagaggacgatgggtgtggacacaaggaagt tccccaaggataaaatc
aagaacgaaccaaattaaaatcacattcaagtcggatgactacttttgtggctaaacctggattcaagattttatta
ttctttgtcgggaagattttccaacccgcagcagcttcagagaccaactgggaatctgtcacaaagctctatttcagg
ggatccctataactctccatcagtaacggatcccactctgatttgcggatgctctggacaaaaaattgcagaatt
tgatacagtggaagatctgtctcaagtactccaatccagagctatggcgaagaagatcttgagaatatgtatactgga
caccctcggtatcgagcgaggtcataccatgaccgggaagtcaaaagttgacctggataggctcaatgatgatgc
caagcggttacagttgcactccaggaattactcgggtcaatataagagaagagctgaagttggccaatgtgggtctt
ctttccacgttgctcctcgtgcagcgctgtggaggaaattgtggctgtggaaactgtcaactggagggtcctgcac
atgcaattcagggaaaaaccgtgaaaaagtatcatgaggtattacagtttgagcctggccacatcaagaggaggggg
tagagctaagaccatggctctagttagacatccagttggatcaccatgaacgatgcgattgtatctgcagctcaag
accacctcgataagagaatgtgacacatccttacattaagcctgaaagaacctttagtttaaggagggtgagataa
gagacctttttctaccgcaaccaaacttactactagcctgcaatgcaatgaacacaagtggttgcctgagctctc
agccttgctttgttaatgccatggcaagtagaaaggtatatcatcaacttctataacctaaagaatataggattgca
tttaataatagtgttttgaggttatatatgcacaaacacacacagaaatatattcatgtctatgtgtatatagatc
aatgttttttttgggtatatataaccaggtacaccagagcttacatatgtttgagtttagactcttaaaatccttt
gccaaaataagggtatgggtcaaatatatgaaacatgtctttagaaaaatttaggagataaaatttatttttaaat
gaaacacaaaaacaattttgaatcttgcctctcttaagaaagcatcttgtatatataaaatcaaaagatgagggtt
tcttacatatacatcttagttgattataaaaaaggaaaaaggtttccagagaaaaaggccaataacctaaagcattt
ttccatgagaagcactgcatacttacctatgttgagctgttaataacctgtctccaaaacctatccataataat
aagtgcctttagaattaaactcattgtgttttttgcatttttgcctgaggctccttattcatttaaacacctatct
caaaaactttagaattagaaggttttttattatagctctacaaaagacaatgtataagctgtaacagaattttgaatt
gtttttctttgcaaaaacctccacaaaagcaaatcctttcaagaatggcatgggcattctgtatgaacctttcc

agatgggtgttcagtgaagatgtgggttagttgagaacttaaaaagtgaacattgaaacatcgacgtaactggaaa
ccg (SEQ ID NO:4)

[0068] Las secuencias de aminoácidos de PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D humanos se representan a continuación:

PDGF-A (nº de acceso al GenBank NM_002607)

MRTLACILLGCGYLAHVLAEEAEI PREVIERLARSQIHSIRDLQRLLEIDSVGSEDSLDTSRAHGVHATKHVP
EKRPLPIRRKRSIEEAVPAVCKTRTVIYEI PRSQVDPTSANFLIWPPCVEVKRCTGCCNTSSVKCQPSRVHHRSV
KVAKVEYVRKKPKLKEVQVRLEEHLEACATTSLNPDYREEDTGRPRESGKKRKRRLKPT (SEQ ID NO:5)

PDGF-B (nº de acceso al GenBank NM_002608)

MNRCWALFLSLCCYLRLVSAEGDPIPEELYEMLSDHSIRSFDDLQRLHGDGPGEEDGAEL
DLNMTRSHSGGELESLARGRRSLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFESRRLIDRTNANFLV
WPPCVEVQRCSCCNRNVQCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKC
ETVAAARPVTRSPGSGEQRAKTPQTRVTIIRTVRVRPPKGGKHKFKHHDKTALKETLG
A (SEQ ID NO:6)

PDGF-C (nº de acceso al GenBank AF260738)

MSLFGLLLLTALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHSPRFPHTYPRNTVLVW
RLVAVEENVWIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPSDGTILGRWCGSGTVPGKQISKGNQIRIRFVSDEYF
PSEPGFCIHYNIVMPQFTEAVSPSVLPSPALPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGK
AFVFGKRKSRVDLNLLEEVRLYSCTPRNFSVSIREEELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNEQCQCVPSK
VTKKYHEVLQRLPKTGVRGLHKS LTDVALEHHEECDCVCRGSTGG (SEQ ID NO:7)

PDGF-D (nº de acceso al GenBank AF336376)

MHRLIFVYTLICANFCSCRDTSATPQSASIKALRNANLRRDESNHLTDLYRRDETIQVKGNGYVQSPRFPNSYPR
NLLLTWRLHSQENTRIQLVFDNQFGLLEAENDICRYDFVEVEDISETSTIIRGRWCGHKEVPPRIKSRNTQIKIT
FKSDDYFVAKPGFKIYYSLEDFQAAASETNWESVTSSISGVSYNPSVTDPTLIADALDKKIAEFDTVEDLLK
YFNPESWQEDLENMYLDTPRYRGRSYHDRKSKVDLRLNDDAKRYSCTPRNYSVNIREELKLANVVFPRCLLVQ
RCGGNCGCGTVNWRSCCTNSGKTVKKYHEVLQFEPGHIKRRGRAKTMALVDIQLDHHERCDCICSSRPPR (SEQ
ID NO:8)

Receptores de VEGF y sus ligandos

[0069] El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio existente (angiogénesis) está estrechamente controlado en los adultos sanos mediante los efectos contrapuestos de los reguladores positivos y negativos. En determinadas condiciones patológicas, que incluyen las retinopatías proliferativas, artritis reumatoide, psoriasis y cáncer, prevalecen los reguladores positivos y la angiogénesis contribuye a la progresión de la enfermedad (revisado en Folkman (1995) Nature Medicine 1: 27 – 31). En el cáncer, la noción de que la angiogénesis representa la etapa limitante de la velocidad del crecimiento tumoral y la metástasis (Folkman (1971) New Engl. J. Med. 285: 1182 – 1186) se ve apoyada ahora por una considerable evidencia experimental (revisado en Aznavoorian y col. (1993) Cancer 71: 1368 – 1383; Fidler y Ellis (1994) Cell 79: 185 – 188; Folkman (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82: 4 – 6).

[0070] Se han descrito hasta la fecha numerosos factores de crecimiento angiogénico, entre los cuales, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) parece jugar un papel clave como regulador positivo de la angiogénesis fisiológica y patológica (revisado en Brown y col. (1996) Control of Angiogenesis (Goldberg y Rosen, eds.) Birkhauser, Basel, en prensa; Thomas (1996) J. Biol. Chem. 271: 603 – 606). VEGF es un homodímero unido a disulfuro secretado que estimula selectivamente que las células endoteliales proliferen, migren, y produzcan enzimas degradadoras de la matriz (Conn y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1323 – 1327); Ferrara y Henzel (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851 – 858); Gospodarowicz y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 7311 – 7315); Pepper y col. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 902 – 906; Umemori y col. (1992) J. Cell. Physiol. 153: 557 – 562), todos los cuales son procesos necesarios para la formación de nuevos vasos. Además de ser el

único mitógeno específico de célula endotelial conocido, VEGF es único entre los factores angiogénicos por su capacidad de inducir un aumento transitorio en la permeabilidad de los vasos sanguíneos a las macromoléculas (de ahí su nombre original y alternativo, factor de permeabilidad vascular, VPF) (Dvorak y col. (1979) J. Immunol. 122: 166 – 174; Senger y col. (1983) Science 219: 983 – 985; Senger y col. (1986) Cancer Res. 46: 5629 – 5632). Un aumento de la permeabilidad vascular y la deposición resultante de las proteínas en plasma en el espacio extravascular ayuda en la formación de nuevos vasos proporcionando una matriz provisional para la migración de células endoteliales (Dvorak y col. (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029 – 1039). La hiperpermeabilidad es a su vez un rasgo característico de los nuevos vasos, incluyendo más asociaciones con tumores (Dvorak y col. (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029 – 1039). Además, se conoce también que la angiogénesis compensatoria inducida por hipoxia del tejido está mediada por VEGF (Levy y col. (1996) J. Biol. Chem. 274: 2746 – 2753); Shweiki y col. (1992) Nature 359: 843 – 845).

[0071] VEGF se produce en cuatro formas (VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206) como resultado del corte y empalme alternativo del gen VEGF (Houck y col. (1991) Mol. Endocrin. 5: 1806 – 1814; Tischer y col. (1991) J. Biol. Chem. 266: 11947 – 11954). Las dos formas más pequeñas son difundibles mientras que las dos formas más grandes siguen estando predominantemente localizadas en la membrana celular como consecuencia de su elevada afinidad por la heparina. VEGF-165 se une también a la heparina y es la forma más abundante. VEGF-121, la única forma que no se une a la heparina, parece tener una afinidad inferior por los receptores (Gitay-Goren y col. (1996) J. Biol. Chem. 271: 5519 – 5523) así como una potencia mitogénica inferior (Keyt y col. (1996) J. Biol. Chem. 271: 7788 – 7795). VEGF₁₆₅ es la proteína más predominante, pero las transcripciones de VEGF₁₂₁ pueden ser más abundantes. VEGF₂₀₆ se expresa raramente y se ha detectado solo en hígado fetal. Recientemente, se han descrito también otras variantes de corte y empalme de 145 y 183 aa. Las variantes de corte y empalme de 165, 189 y 206 aa tienen dominios de unión a la heparina, que ayudan a anclarlos en la matriz extracelular y están implicados en la unión al sulfato de heparina y en la presentación de los receptores del VEGF. Esta unión es un factor clave para la potencia del VEGF (es decir, las formas de unión a la heparina son más activas). Se han clonado algunos otros miembros de la familia del VEGF, que incluyen VEGF-B, C, y D. El factor de crecimiento de la placenta (P1GF) está también estrechamente relacionado con VEGF-A. VEGF-A, B, C, D, y D, y P1GF están todos lejanamente relacionados con los factores A y B de crecimiento derivados de plaquetas.

[0072] La mayoría de tipos de células, pero usualmente no las propias células endoteliales, secretan VEGF. Actualmente, se han identificado tres receptores de la tirosina cinasa de elevada afinidad por VEGF, de los cuales, el receptor del VEGF (VEGF)-Flk-1 / KDR (VEGFR-2) se expresa exclusivamente en células endoteliales vasculares. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se descubrió originalmente como un factor de crecimiento específico del endotelio. Los efectos biológicos del VEGF están mediados por dos receptores de la tirosina cinasa (Flt-1 y Flk-1 / KDR) cuya expresión está muy restringida para células de origen endotelial (de Vries y col. (1992) Science 255: 989 – 991; Millauer y col. (1993) Cell 72: 835 – 846; Terman y col. (1991) Oncogene 6: 519 – 524). Mientras que se requiere la expresión de ambos receptores funcionales para la unión de elevada afinidad, la señalización quimiotáctica y mitogénica en las células endoteliales parece producirse principalmente a través del receptor KDR (Park y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 25646 – 25654; Seetharam y col. (1995) Oncogene 10: 135 – 147; Waltenberger y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 26988 – 26995). Se ha demostrado recientemente la importancia de VEGF y de los receptores de VEGF en el desarrollo de los vasos sanguíneos en ratones que carecían de un único alelo para el gen VEGF (Carmeliet y col. (1996) Nature 380: 435 – 439; Ferrara y col. (1996) Nature 380: 439 – 442) o ambos alelos de los genes Flt-1 (Fong y col. (1995) 376: 66 – 70) o Flk-1 (Shalaby y col. (1995) Nature 376: 62 – 66). En cada caso, se han observado distintas anomalías en la formación de vasos, que dan como resultado una letalidad embrionaria.

[0073] VEGF se produce y secreta en cantidades variables en virtualmente todos los tumores (Brown y col. (1997) Regulation of Angiogenesis (Goldberg y Rosen, Eds.) Birkhauser, Basel, pp.233 – 269). Se ha obtenido recientemente una evidencia directa de que VEGF y sus receptores contribuyen al crecimiento del tumor a través de una demostración de que el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos en ratones lampiños podría ser inhibido por anticuerpos que neutralizan el VEGF (Millauer y col. (1996) Cancer Res. 56: 1615 – 1620; Millauer y col. (1994) Nature 367: 576 – 579), por inhibidores de bajo peso molecular de la actividad de la tirosina cinasa Flk-1 (Strawn y col. (1996) Cancer Res. 56: 3540 – 3545) o por la expresión de la secuencia de sentido contrario del ARNm del VEGF (Saleh y col. (1996) Cancer Res. 56: 393 – 401). De forma importante, se ha encontrado también que los antagonistas del VEGF podrían reducir también drásticamente la incidencia de la metástasis tumoral (Claffey y col. (1996) Cancer Res. 56: 172 – 181).

[0074] Además de su uso como agentes anticancerosos, los inhibidores del VEGF pueden ser útiles en una amplia variedad de enfermedades proliferativas caracterizadas por una angiogénesis excesiva, que incluyen psoriasis, trastornos oculares, enfermedades vasculares debidas al colágeno y artritis reumatoide. Aunque se sabe que la mayor parte de tipos tumorales producen VEGF, hasta hace poco nadie había podido demostrar que expresaban los receptores de VEGF funcionales.

[0075] Aunque el papel predominante de este factor de crecimiento en la formación de nuevos vasos sanguíneos es incuestionable, recientes observaciones indican que VEGF tiene también efectos directos sobre las neuronas y las células gliales, y estimula su crecimiento, supervivencia y crecimiento axonal. Debido a estos efectos

pleiotrópicos, se ha implicado ahora a VEGF en algunos trastornos neurológicos en el bebé pretérmino (leucomalacia) y el adulto (ictus, neurodegeneración, trauma cerebral y espinal, neuropatía isquémica y diabética, regeneración de los nervios). No se sabe si el efecto de VEGF en estos trastornos se refiere a su actividad angiogénica o al efecto neurotrófico directo.

[0076] Se sabe que VEGF está implicado en la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario así como en una variedad de dolencias patológicas. Aunque VEGF estimula principalmente las células endoteliales, puede actuar también sobre otros tipos de células. A su vez, se ha implicado recientemente a VEGF, Flt-1 y Flk-1 en el ictus, isquemia de la médula espinal y en la neuropatía isquémica y diabética.

[0077] La secuencia de ácido nucleico del VEGF-165 humano (nº de acceso al GenBank AF486837) se representa a continuación:

```
ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCCTTGCTGCTCTACCTCCACCAT
GCCAAGTGSTCCCAGGCTGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGAAGTG
GTGAAGTTCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCCTGGTGGAC
ATCTTCCAGGAGTACCCTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCCCTG
ATGCGATGCGGGGGCTGCTGCAATGACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCCACTGAGGAGTCC
AACATCACCATGCAGATTATGCGGATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATG
AGCTTCCTACAGCACAAACAATGTGAATGCAGACCAAAGAAAGATAGAGCAAGACAAGAA
AATCCCTGTGGGCCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAGCATTGTGTTGTACAAGATCCGCAGACG
TGTAATGTTCTTGCAGAAACACAGACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCTTGAGTTAAAC
GAACCTACTTGCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGA
```

[0078] La secuencia de aminoácidos del VEGF-165 (nº de acceso al GenBank AF486837) se representa a continuación:

```
MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKP
SCVPLMRGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGHIGEMSFLOHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERR
KHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR {SEQ ID NO:3}
```

[0079] Esta memoria demuestra el papel funcional del VEGF para los neurocitoblastos *in vitro* e *in vivo*. Los datos indican una localización y función específicas del receptor Flk-1 del VEGF en las regiones del cerebro con actividad de neurocitoblastos. El receptor Flk-1 del VEGF se expresa no solo en los vasos sanguíneos sino también en la zona endimaria de la pared del ventrículo, una región que se cree actualmente que es un posible origen de los neurocitoblastos: VEGF ejerce una fuerte influencia sobre la actividad de los neurocitoblastos aumentando la generación de nuevas neuronas en el hipocampo y el bulbo olfatorio, cuando se aplica directamente al cerebro del roedor adulto. Los cultivos de neurocitoblastos expresan VEGF así como su receptor Flk-1, sugiriendo un papel autocrino del VEGF en los neurocitoblastos cultivados. Utilizando medio de cultivo definido, esto demuestra que VEGF potencia la expansión de neurocitoblastos *in vitro*.

[0080] Esta memoria describe cómo activar un receptor en un neurocitoblasto, que comprende exponer un neurocitoblasto que expresa un receptor a un reactivo exógeno, que induce que el neurocitoblasto proliferare, se diferencie o migre.

[0081] Se pueden utilizar citoblastos de diversos tipos. Se pueden obtener neurocitoblastos y células progenitoras procedentes cualquier mamífero, así como de tejido fetal o adulto El mamífero puede ser un ser humano. Se pueden derivar NSC / NPC a partir de tejido del sistema nervioso central seleccionado entre el grupo que consiste en el hipocampo, la pared del ventrículo, la neocorteza, el cerebelo, el parénquima septal y estriatal, el prosencéfalo basal, rombencéfalo, mesencéfalo, diencefalo, septum y médula espinal. Se pueden derivar los NSC / NPC a partir de la pared del ventrículo.

[0082] Ni las familias de PDGF ni las de VEGF están limitadas a las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos dadas a conocer. Se pueden recuperar otras secuencias del GenBank que incluyen, por ejemplo, los números de acceso del GenBank: NM002607, NM033023, M12783, AF486837, AF024710, AK098750, AF022375, NM_003376, M27281, M32977, AY047581, AF430806, X62568, AF091352, AF214570, AB021221, AJ010438, S85192, BC019867, BC011177, AK056914 y AF062645.

Producción de reactivos

[0083] Los reactivos para el tratamiento de pacientes se producen, purifican y formulan de forma recombinante de acuerdo con procedimientos bien conocidos.

[0084] Los reactivos y restos individuales o sus análogos y derivados, se pueden sintetizar químicamente. Son comunes en la técnica una variedad de procedimientos de síntesis de proteínas, que incluyen la síntesis utilizando un sintetizador de péptidos. Véase, por ejemplo, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodansky, Ed. Springer-Verlag, 1988; Merrifield, Science 232: 241 – 247 (1986); Barany, y col., Intl. J. Peptide Protein Res. 30: 705 – 739 (1987); Kent, Ann. Rev. Biochem 57: 957 – 989 (1988), y Kaiser, y col., Science 243: 187 – 198 (1989). Los péptidos se purifican de tal manera que se encuentren exentos de precursores químicos u otros compuestos químicos que utilizan técnicas normalizadas de purificación de péptidos. El lenguaje “sustancialmente exento de precursores químicos u otros compuestos químicos” incluye preparaciones de péptidos en las que el péptido se separa de los precursores químicos o de otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis del péptido. El lenguaje “sustancialmente exento de precursores químicos o de otros compuestos químicos” puede incluir preparaciones de péptidos que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso en seco) de precursores químicos o de compuestos químicos no peptídicos, de forma más preferible menos de aproximadamente un 20 % de precursores químicos o de compuestos químicos no peptídicos, aún de forma más preferible menos de aproximadamente un 10 % de precursores químicos o de compuestos químicos no peptídicos, y lo más preferible menos de aproximadamente un 5 % de precursores químicos o de compuestos químicos no peptídicos.

[0085] La síntesis química de péptidos facilita la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales, incluyendo D-aminoácidos y otras moléculas orgánicas pequeñas. La sustitución de uno o más L-aminoácidos en un péptido con las correspondientes isoformas de D-aminoácidos se puede utilizar para aumentar la resistencia de los péptidos a la hidrólisis enzimática, y para potenciar una o más propiedades de los péptidos biológicamente activos, es decir, unión al receptor, potencia o duración de acción funcional. Véanse, *por ejemplo*, Doherty, y col., 1993. J. Med. Chem. 36: 2585 – 2594; Kirby, y col., 1993, J. Med. Chem. 36: 3802 – 3808; Morita, y col., 1994, FEBS Lett. 353: 84 – 88; Wang, y col., 1993 Int. J. Pept. Protein Res. 42: 392 – 399; Fauchere y Thiunieu, 1992. Adv. Drug Res. 23: 127 – 159.

[0086] La introducción de enlaces cruzados covalentes en una secuencia peptídica puede constreñir conformacional y topográficamente el esqueleto del péptido. Se puede usar esta estrategia para desarrollar análogos peptídicos de reactivos con potencia, selectividad y estabilidad aumentadas. Se ha utilizado numerosos procedimientos diferentes de forma satisfactoria para introducir restricciones conformacionales en las secuencias de péptidos con el fin de mejorar su potencia, selectividad al receptor y semivida biológica. Estos incluyen el uso de (i) C α -metilaminoácidos (véanse, por ejemplo, Rose, y col., Adv. Protein Chem. 37: 1 – 109 (1985); Prasad y Balaram, CRC Crit. Rev. Biochem., 16: 307 – 348 (1984)); (ii) N α -metilaminoácidos (véase, por ejemplo, Aubry, y col., Intl. J. Pept. Protein Res., 18: 195 – 202 (1981); Manavalan y Momany, Biopolymers, 19: 1943 – 1973 (1980)); y (iii) aminoácidos α,β -insaturados (véanse, *por ejemplo*, Bach y Gierasch, Biopolymers, 25: 5175 – S192 (1986); Singh, y col., Biopolymers, 26: 819 – 829 (1987)). Estos y otros muchos análogos de aminoácidos están comercialmente disponibles, o se pueden preparar fácilmente. Adicionalmente, se puede utilizar la sustitución del ácido del extremo C con una amida para potenciar la solubilidad y el aclaramiento de un péptido.

[0087] Alternativamente, se puede obtener un reactivo mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica para la expresión y la purificación de la expresión del péptido recombinante. Se puede generar una molécula de ADN que codifique el reactivo de proteína. La secuencia de ADN se conoce o se puede deducir a partir de la secuencia de la proteína basándose en la utilización del codón conocido. Véanse, *por ejemplo*, Old y Primrose, Principles of Gene Manipulation 3ª ed., Blackwell Scientific Publications, 1985; Wada y col., Nucleic Acids Res. 20: 2111 – 2118 (1992). Preferiblemente, la molécula de ADN incluye una secuencia adicional, *por ejemplo*, los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción que facilitan su clonación en un vector de clonación adecuado, tal como un plásmido. Los ácidos nucleicos pueden ser ADN, ARN, o una de sus combinaciones. Los ácidos nucleicos que codifican el reactivo se pueden obtener mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (*por ejemplo*, mediante la amplificación de la PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables en los extremos 3' y 5' de la secuencia y/o mediante la clonación de una biblioteca de ADNc o genoteca utilizando una secuencia de oligonucleótidos específica de una secuencia génica dada, o similar). Se pueden generar también ácidos nucleicos mediante síntesis química.

[0088] Se puede utilizar cualquiera de las metodologías conocidas en la técnica relevante con respecto a la inserción de fragmentos de ácido nucleico en un vector para construir vectores de expresión que contengan un gen quimérico comprendido por las señales de control de la transcripción / de la traducción adecuadas y por las secuencias de codificación del reactivo. Las secuencias del promotor / potenciador en los vectores de expresión pueden utilizar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos, u hongos, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0089] Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, el péptido se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insectos, células de hongos o de mamíferos (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Los expertos en la técnica conocen otras células hospedadoras adecuadas. Un ácido nucleico que codifica un reactivo se puede expresar en células de mamíferos utilizando un vector de expresión de mamíferos. Los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman y col. (1987) EMBO J 6: 187 – 195). Además, se pueden utilizar también animales transgénicos que contienen ácidos nucleicos que codifican PDGF para expresar

los péptidos de la invención.

[0090] Se pueden utilizar las células hospedadoras para producir (es decir, expresar en exceso) un péptido en cultivo. De acuerdo con esto, esta memoria describe procedimientos para producir el péptido utilizando las células hospedadoras de la invención. El procedimiento puede comprender cultivar la célula hospedadora (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica el péptido) en un medio adecuado de tal manera que se produzca el péptido. El procedimiento implica además aislar el péptido del medio o de la célula hospedadora. Ausubel y col., (Eds). In: Current Protocols in Molecular Biology. J. Wiley and Sons, Nueva York, NY. 1998.

[0091] Un péptido recombinante “aislado” o “purificado” o una de sus porciones biológicamente activas está sustancialmente exento de material celular u otras proteínas contaminantes procedentes de la célula o de la fuente de tejido a partir de la cual se deriva el péptido de interés. El lenguaje “sustancialmente exento de material celular” incluye las preparaciones en las que el péptido se separa de los componentes celulares de las células a partir de las cuales se aísla o se produce de forma recombinante. El lenguaje “sustancialmente exento de material celular” puede incluir las preparaciones del péptido que tienen menos de aproximadamente 30 % (en peso en seco) de un péptido diferente del deseado (denominado también en la presente memoria descriptiva “proteína contaminante”), de forma más preferible menos de aproximadamente 20 % de proteína contaminante, aún de forma más preferible menos de aproximadamente 10 % de proteína contaminante, y lo más preferible menos de aproximadamente 5 % de proteína contaminante. Cuando el péptido o una de sus porciones biológicamente activas se produce de forma recombinante, está también de forma preferible sustancialmente exento de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, de forma más preferible menos de aproximadamente un 10 %, y lo más preferible menos de aproximadamente un 5 % del volumen de la preparación del péptido.

[0092] La memoria describe variantes de un reactivo que funcionan tanto como agonistas (miméticos) o como antagonistas. Se pueden generar variantes de un reactivo mediante mutagénesis, *por ejemplo*, mutaciones puntuales discretas. Un agonista de un reactivo puede retener sustancialmente las mismas actividades biológicas o un subconjunto de las actividades de la forma del reactivo que se produce naturalmente. Un antagonista del reactivo puede inhibir una o más de las actividades de la forma del reactivo que se produce naturalmente mediante, *por ejemplo*, unión competitiva con el receptor. De esta manera, pueden estimularse efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante con una función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de actividades biológicas de la forma que se produce naturalmente del reactivo tiene menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma del reactivo que se produce naturalmente.

[0093] El análogo, variante o derivado del reactivo puede ser funcionalmente activo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término “funcionalmente activo” se refiere a las especies que presentan uno o más atributos funcionales conocidos de un reactivo de longitud completa. “Variante” se refiere a un reactivo que difiere del reactivo que se produce naturalmente, pero que retiene sus propiedades esenciales. Generalmente, las variantes son muy similares de forma global, y en muchas regiones, idénticas al reactivo que se produce naturalmente.

[0094] Las variantes del reactivo que funcionan tanto como agonistas (miméticos) o como antagonistas se pueden identificar cribando bibliotecas combinatorias de mutantes del reactivo para la actividad agonista o antagonista del péptido. Se puede generar una biblioteca variegada de variantes mediante mutagénesis combinatoria al nivel del ácido nucleico y se encuentra codificada por una genoteca variegada. Se puede producir una biblioteca variegada de variantes mediante, *por ejemplo*, ligadura enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en las secuencias génicas de tal manera que se pueda expresar un conjunto degenerado de secuencias potenciales como péptidos individuales, o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (*por ejemplo*, para la expresión en fago) que contienen el conjunto de secuencias del anterior. Existen una variedad de procedimientos que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de la secuencia del oligonucleótido degenerado. Se puede llevar a cabo la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador automático de ADN, y a continuación ligarse el gen sintético en un vector de expresión adecuado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias potenciales. Se conocen en la técnica los procedimientos para sintetizar oligonucleótidos degenerado (véanse, *por ejemplo*, Narang (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura y col. (1984) Annu Rev Biochem 53: 323; Itakura y col. (1984) Science 198: 1056; Ike y col. (1983) Nucl. Acids Res. 11: 477.

[0095] Se pueden producir derivados y análogos del reactivo o restos individuales mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. *Por ejemplo*, se pueden modificar las secuencias polipeptídicas mediante cualquiera de numerosos procedimientos conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Sambrook, y col., 1990. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., (Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY). Las modificaciones incluyen: glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores / bloqueantes conocidos, enlace con una molécula de anticuerpo u otro reactivo celular, y similares. Se puede utilizar cualquiera de las numerosas metodologías de modificación química conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄, acetilación, formilación, oxidación, reducción, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, etc.

[0096] Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o diferentes de longitud completa, si dicho derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado, tal como se describe a *continuación*. Los derivados o análogos del reactivo incluyen, pero no se limitan a, moléculas que comprenden regiones que son sustancialmente homólogas en diversas realizaciones, de al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o preferiblemente 95 % de identidad de aminoácidos cuando: (i) se comparan con una secuencia d aminoácidos de tamaño idéntico; (ii) en comparación con una secuencia alineada en la que la alineación se lleva a cabo mediante un programa informático de homología conocido en la técnica (por ejemplo, software Wisconsin GCG) o (iii) el ácido nucleico codificante es capaz de hibridarse con una secuencia que codifica los péptidos anteriormente mencionados en condiciones de restricción (preferido), de moderada restricción, o sin restricción. Véase, *por ejemplo*, Ausubel, y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York, NY, 1993.

[0097] Se pueden producir derivados del reactivo por alteración de sus secuencias mediante sustituciones, adiciones o deleciones que dan como resultado moléculas funcionalmente equivalentes. Se pueden sustituir uno o más restos en el reactivo por otro aminoácido de una polaridad y carga neta similares, dando como resultado de esta manera una alteración silenciosa. Se pueden seleccionar los sustitutos conservativos de un aminoácido en la secuencia a partir de otros miembros del tipo al cual pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

[0098] Se puede administrar el reactivo localmente en cualquiera de los loci implicados en la patología del trastorno del SNC, es *decir*, cualquiera de los loci deficientes en células neurales como una causa de la enfermedad. Por ejemplo, se puede administrar el reactivo localmente al ventrículo del cerebro, la sustancia negra, el cuerpo estriado, locus coeruleus, núcleo basal de Meynert, núcleo pedunculo pontino, corteza cerebral, y médula espinal.

[0099] Se pueden inducir los neurocitoblastos y su progenie para proliferar y diferenciarse *in vivo* administrando al hospedador un reactivo, solo o en combinación con otros agentes, o administrando una composición farmacéutica que contiene el reactivo que inducirá la proliferación y la diferenciación de las células. Las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier sustancia que bloquee la influencia inhibidora y/o estimule los neurocitoblastos y la progenie de citoblastos a proliferar y en última instancia a diferenciarse. Dicha manipulación y modificación *in vivo* de estas células permite que se sustituya de forma endógena la pérdida de células, debida a lesión o enfermedad, obviando de esta manera la necesidad de trasplante de células extrañas en un paciente.

Anticuerpos

[0100] La memoria describe anticuerpos que se pueden usar como reactivos. El término "anticuerpo" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a (inmunorreacciona con) un antígeno. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenario, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$ y una biblioteca de expresión de F_{ab} . En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de seres humanos se refieren a cualquiera de los tipos IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí en la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinados tipos tienen también subtipos, tales como IgG₁, IgG₂, y otros. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. La referencia a los anticuerpos en la presente memoria descriptiva incluye una referencia de todos los mencionados tipos, subtipos y tipos de especies de anticuerpos humanos.

[0101] Se puede usar una proteína aislada prevista para servir como un antígeno, o una de sus porciones o fragmentos, como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unan inmunoespecíficamente al antígeno, utilizando las técnicas normalizadas para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. La proteína de longitud completa o los fragmentos peptídicos antígenicos del antígeno se pueden usar como inmunógenos. Uno o varios fragmentos peptídicos antígenicos del antígeno se pueden usar como inmunógenos. Un fragmento peptídico antígeno comprende al menos 6 restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de longitud completa y abarca uno de sus epítomos de tal manera que un anticuerpo mejorado frente al péptido forma un complejo inmunoespecífico con la proteína de longitud completa o con cualquier fragmento que contenga el epítomo. Preferiblemente, el péptido antígeno comprende al menos 10 restos de aminoácidos, o al menos 15 restos de aminoácidos, o al menos 20 restos d aminoácidos, o al menos 30 restos de aminoácidos. Los epítomos preferidos abarcados por el péptido antígeno son regiones de la proteína que se localizan en su superficie, usualmente, estas son regiones hidrófilas.

[0102] Al menos un epítomo abarcado por el péptido antígeno puede ser una región del PDGF, VEGF o de un receptor de PDGF o VEGF que se localiza sobre la superficie de la proteína, *por ejemplo*, una región hidrófila. Un análisis de la hidrofobicidad de las secuencias de la proteína humana indicará qué regiones del polipéptido son particularmente hidrófilas y, por tanto, que es probable que codifiquen restos superficiales útiles para dirigir la producción de anticuerpos. Como medio para dirigir la producción de anticuerpos, se pueden generar diagramas de hidropatía que muestren regiones de hidrofiliidad e hidrofobicidad mediante cualquier procedimiento bien conocido

en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos de Kyte Doolittle o de Hopp Woods, ya sea con o bien sin transformación de Fourier. Véanse, *por ejemplo*, Hopp y Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824 – 3828; Kyte y Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105 – 142, cada uno de ellos incorporado a la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad. Se proporcionan también en la presente memoria descriptiva anticuerpos que son

[0103] El término “epítipo” incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas secundarias de azúcares y que tienen usualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un ligando de o polipéptido receptor de PDGF o VEGF o uno de sus fragmentos comprende al menos un epítipo antigénico. Un anticuerpo dirigido contra PDGF o VEGF se dice que se une específicamente al antígeno cuando la constante del equilibrio de unión (K_D) es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$, más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$, y lo más preferible $\leq 100 \text{ pM}$ a aproximadamente 1 pM , tal como se midió mediante ensayos tales como los ensayos de unión del radioligando o ensayos conocidos por los expertos en la técnica.

[0104] Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos contra una proteína, o contra sus derivados, fragmentos, análogos homólogos u ortólogos (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporado en la presente memoria descriptiva por referencia). Se describen a continuación algunos de estos anticuerpos.

Anticuerpos policlonales

[0105] Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diversos animales hospedadores adecuados (*por ejemplo*, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) mediante una o más inyecciones con la proteína natural, una de sus variantes sintéticas, o un derivado de las anteriores. Una preparación inmunogénica adecuada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica que se produce naturalmente, un polipéptido sintetizado químicamente que representa la proteína inmunogénica, o una proteína inmunogénica expresadas de forma recombinante. Además, la proteína se puede conjugar con una segunda proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de la tripsina de soja. La preparación puede incluir además un adyuvante. Diversos adyuvantes utilizados para aumentar la respuesta inmunológica incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (*por ejemplo*, hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (*por ejemplo*, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, dinitrofenol, etc.), adyuvantes utilizables en seres humanos tales como el Bacilo de Calmette-Guerin y Corynebacterium parvum, o agentes inmunoestimuladores similares. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintética).

[0106] Se pueden aislar moléculas de anticuerpo policlonal dirigidas contra la proteína inmunogénica procedente del mamífero (*por ejemplo*, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad, utilizando la proteína A o la proteína G, que proporciona principalmente la fracción IgG del inmunosuero. Posteriormente, o de forma alternativa, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o uno de sus epítipos, se puede inmovilizar sobre una columna para purificar el anticuerpo inmuno-específico mediante cromatografía de afinidad. La purificación de inmunoglobulinas se describe, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, Vol. 14, N° 8 (17 de abril, 2000), pp. 25 – 28).

Anticuerpos monoclonales

[0107] El término “anticuerpo monoclonal” (MAb) o “composición de anticuerpo monoclonal”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie molecular de la molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de la cadena ligera y un único producto génico de la cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. De esta manera los MAb contienen un sitio de unión a antígeno capaz de inmunorreactar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una única afinidad de unión por este.

[0108] Se pueden preparar anticuerpos monoclonales utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedador, se inmuniza normalmente con un agente de inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

[0109] El agente de inmunización incluirá normalmente el antígeno de la proteína, uno de sus fragmentos o una de

sus proteínas de fusión. Generalmente, se usa cualquiera de los linfocitos de sangre periférica si se desean células de origen humano, o se usan esplenocitos o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación se fusionan los linfocitos con una línea celular immortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59 – 103). Las líneas de células immortalizadas son células de mamíferos usualmente transformadas, particularmente, células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Se pueden cultivar células de hibridoma en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células sin fusionar immortalizadas. Por ejemplo, si las células parenterales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

[0110] Las líneas de células immortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un nivel de expresión elevada estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas de células immortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma de murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano se han descrito también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51 – 63).

[0111] El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede a continuación evaluarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos mediante las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Se conocen en la materia dichas técnicas y ensayos. Puede determinarse, por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980). En las aplicaciones terapéuticas de los anticuerpos monoclonales es un objetivo especialmente importante identificar los anticuerpos que tienen un elevado grado de especificidad y una elevada afinidad de unión por el antígeno diana.

[0112] Tras identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se subclonaron mediante procedimientos de dilución limitante y mediante procedimientos normalizados de crecimiento (Goding, 1986). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden hacer crecer *in vivo* como ascites en un mamífero.

[0113] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo o fluido de ascites mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0114] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales que codifican el ADN se pueden aislar fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (utilizando, por ejemplo, sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma de tal manera que no se produzca de otra forma la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN se puede modificar también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanas en lugar de la secuencia homóloga de murino (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812 – 13 (1994)) o mediante unión covalente de la secuencia de codificación de la inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina. Dicho polipéptido no de inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Anticuerpos humanizados

[0115] Los anticuerpos dirigidos contra antígenos de proteínas pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Estos anticuerpos son adecuados para la administración a seres humanos sin que el ser humano suscite una respuesta inmune contra la inmunoglobulina administrada. Las formas humanizadas de los anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F (ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que están comprendidas principalmente por la secuencia de una inmunoglobulina humana y que contienen la secuencia mínima derivada de

una inmunoglobulina no humana. La humanización se puede llevar a cabo siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321: 522 – 525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323 – 327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534 – 1536 (1988)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Véase también la Patente de los Estados Unidos N° 5.225.539). En algunos ejemplos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR o las secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también óptimamente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones y col., 1986; Riechmann y col., 1988; y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593 – 596 (1992)).

15 Anticuerpos humanos

[0116] Los anticuerpos completamente humanos se refieren esencialmente a moléculas de anticuerpo en las que la secuencia completa de la cadena ligera y de la cadena pesada, incluyendo las CDR, proceden de genes humanos. Dichos anticuerpos se denominan en la presente memoria descriptiva “anticuerpos humanos”, o “anticuerpos completamente humanos”. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de los linfocitos B (véase Kozbor, y col., 1983 Immunol Today 4: 72) y la técnica del hibridoma del VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, y col., 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 – 96). Se pueden producir anticuerpos monoclonales humanos utilizando hibridomas humanos (véase Cote, y col., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026 – 2030) o transformando los linfocitos B con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, y col., 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 – 96).

[0117] Además, se pueden producir también anticuerpos humanos utilizando técnicas adicionales, incluyendo las bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)). De forma similar, se pueden preparar anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de la inmunoglobulina endógena se ha inactivado parcial o completamente. Tras el estímulo, se observó producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho con la observada en seres humanos en cualquier caso, incluyendo la reordenación de los genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta solución se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en Marks y col. (Bio / Technology 10, 779 – 783 (1992)); Lonberg y col. (Nature 368 856 – 859 (1994)); Morrison (Nature 368, 812 – 13 (1994)); Fishwild y col. (Nature Biotechnology 14, 845 – 51 (1996)); Neuberger (Nature Biotechnology 14, 826 (1996)); y Lonberg y Huszar (Intern. Rev. Immunol. 13 65 – 93 (1995)).

[0118] Pueden producirse adicionalmente anticuerpos humanos utilizando animales humanos no transgénicos que estén modificados de tal manera que produzcan anticuerpos completamente humanos en lugar de anticuerpos endógenos del animal en respuesta al estímulo por un antígeno. (Véase la publicación PCT WO 94/02602). Se incapacitan los genes endógenos que codifican las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina en el hospedador no humano, y los loci activos que codifican las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se insertan en el genoma del hospedador. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, utilizando cromosomas artificiales de levaduras que contienen los segmentos necesarios de ADN humano. Un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas se obtiene a continuación como progenie mediante cruce de animales transgénicos intermedios que contienen menos que el conjunto completo de las modificaciones. La realización preferida de dicho animal no humano es un ratón, y se denomina Xenomouse™, tal como se da a conocer en las publicaciones PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce linfocitos B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas. Se pueden obtener anticuerpos directamente a partir del animal tras la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de anticuerpo policlonal, o alternativamente a partir de linfocitos B inmortalizados derivados a partir del animal, tales como hibridomas productores de anticuerpos policlonales. Adicionalmente, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones variables humanas se pueden recuperar y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o se pueden modificar adicionalmente para obtener análogos de los anticuerpos tales como, por ejemplo, moléculas de Fv monocatenarias.

[0119] En la Patente de los Estados Unidos N° 5.939.598 se da a conocer un ejemplo de un procedimiento para producir hospedadores no humanos, ejemplificado como un ratón que carece de la expresión de una cadena pesada de inmunoglobulina endógena. Se puede obtener mediante un procedimiento que incluye eliminar los genes del segmento J procedentes de al menos un locus de la cadena pesada endógena en un embriocitoblasto para evitar la reordenación del locus y para evitar la formación de un transcrito de un locus de una cadena pesada de inmunoglobulina reordenada, efectuándose la delección mediante un vector de direccionamiento que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y producir a partir del embriocitoblasto un ratón transgénico cuyas células somáticas y germinales contengan el gen que codifica el marcador seleccionable.

[0120] En la Patente de los Estados Unidos N° 5.916.771 se da a conocer un procedimiento para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano. Este incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada en una célula hospedadora de mamífero en cultivo, introducir un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena ligera en otra célula hospedadora de mamífero, y fusionar las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la cadena pesada y la cadena ligera.

[0121] En una mejora adicional de este procedimiento, se dan a conocer en la publicación PCT WO 99/53049, un procedimiento para identificar un epítipo clínicamente relevante sobre un inmunógeno, y un procedimiento correlativo para seleccionar un anticuerpo que se una inmunoespecíficamente al epítipo relevante con elevada afinidad.

Fragmentos F_{ab} y anticuerpos monocatenarios

[0122] Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para una proteína antigénica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.946.778) Además, se pueden adaptar procedimientos para la construcción de bibliotecas de expresión de F_{ab} (véase, *por ejemplo*, Huse, y col., 1989 Science 246: 1275 – 1281) para permitir la rápida y eficaz identificación de fragmentos F_{ab} monoclonales con la especificidad deseada por una proteína o sus derivados, fragmentos, análogos u homólogos. Se pueden producir fragmentos de anticuerpos que contengan los idiotipos de un antígeno de proteína mediante las técnicas conocidas en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a. (i) un fragmento $F_{(ab')_2}$ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento F_{ab} generado mediante reducción de los puentes disulfuro de un fragmento $F_{(ab')_2}$, (iii) un fragmento F_{ab} generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F_v .

Anticuerpos biespecíficos

[0123] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente anticuerpos humanos o humanizados que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por una proteína antigénica tal como se describe en la presente memoria descriptiva. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y, de forma ventajosa, es una proteína o receptor o subunidad del receptor superficial celular.

Se conocen en la técnica los procedimientos para la preparación de anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión simultánea de dos parejas de la cadena pesada / la cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 – 539 (1983)). Debido al acortamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta la purificación de la molécula correcta se lleva a cabo normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655 – 3659 (1991).

[0124] Se pueden fusionar los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno). La fusión preferible es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Para los detalles adicionales de generación de los anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

[0125] De acuerdo con otra solución descrita en el documento WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfase preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas secundarias de aminoácidos pequeños procedentes de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con cadenas secundarias más grandes (*por ejemplo*, tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la (s) cadena (s) lateral (es) grande (s) sobre la interfase de la segunda molécula de anticuerpo para sustituir cadenas secundarias de aminoácidos grandes con unas más pequeñas (*por ejemplo*, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados tales como los homodímeros.

[0126] Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos $F_{(ab')_2}$ biespecíficos). Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Se pueden preparar, por ejemplo, anticuerpos

biespecíficos utilizando el enlace químico Brennan y col., Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F (ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante del ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles contiguos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

[0127] Adicionalmente, se pueden recuperar fragmentos Fab' directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med. 175: 217 – 225 (1992) describen la producción de una molécula F (ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de estimular la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumores de mama humanos.

[0128] Se han descrito también diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol. 148 (5): 1547 – 1553 (1992). Los péptidos en cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros del anticuerpo. Se puede utilizar también este procedimiento para la producción de homodímeros del anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 – 6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. De acuerdo con esto, se fuerza a los dominios V_H y V_L de un fragmento a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando por tanto dos sitios de unión a antígeno. Se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv monocatenarios (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol. 152: 5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

[0129] Los anticuerpos específicos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno de la proteína de la invención. Alternativamente, se puede combinar un grupo dirigido contra el antígeno de una molécula de inmunoglobulina con un grupo que se une a una molécula estimuladora sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o los receptores Fc de IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrar los mecanismos celulares de defensa para las células que expresan un antígeno particular. Se pueden utilizar también anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a las células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos poseen un grupo de unión a antígeno y un grupo que se une a un agente citotóxico o a un radionucleido quelante, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno de la proteína descrito en la presente memoria descriptiva y se une adicionalmente al factor tisular (FT).

Inmunoliposomas

[0130] Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria descriptiva se pueden formular también como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y en la Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.485.045 y 4.544.545. Se dan a conocer liposomas con tiempo de circulación aumentado en la Patente de los Estados Unidos N^o 5.013.556.

[0131] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definido para dar como resultado liposomas con el diámetro deseado. Se pueden conjugar fragmentos Fab' de un anticuerpo con los liposomas tal como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem., 257: 286 – 288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro.

Anticuerpos terapéuticos

[0132] Se pueden utilizar anticuerpos, incluyendo anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados y completamente humanos, como agentes terapéuticos, tal como se describe en la memoria descriptiva. Se emplearán generalmente dichos agentes para tratar o evitar una enfermedad o patología, específicamente una enfermedad neurológica, en un sujeto. Se administra una preparación de anticuerpo, preferiblemente una que tenga elevada

especificidad y elevada afinidad por su antígeno diana, al sujeto, y tendrá generalmente un efecto debido a su unión con la diana. Dicho efecto puede ser de uno o dos tipos, dependiendo de la naturaleza específica de la interacción entre la molécula de anticuerpo dada y el antígeno diana en cuestión. En el primer ejemplo, la administración del anticuerpo puede impedir o inhibir la unión de la diana con el ligando de PDGF o VEGF endógeno al cual se une naturalmente. En este caso, el anticuerpo se une a la diana y enmascara un sitio de unión del ligando que se produce naturalmente, en el que el ligando sirve como una molécula efectora. De esta manera, el receptor media una ruta de transducción de la señal de la cual el ligando es responsable.

[0133] Alternativamente, el efecto puede ser uno en el que el anticuerpo estimule un resultado fisiológico en virtud de la unión a un sitio de unión al efector en la molécula diana. En este caso, la diana, un receptor de PDGF o VEGF que tiene un ligando endógeno que necesita ser modulado, se une al anticuerpo como un ligando sustituto del receptor, iniciando un acontecimiento de transducción por el receptor de la señal basada en el receptor.

[0134] Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo se refiere generalmente a la cantidad necesaria para conseguir un objetivo terapéutico. Tal como se ha señalado anteriormente, esto puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno diana que, en determinados casos, interfiere con el funcionamiento de la diana, y en otros casos, promueve una respuesta fisiológica. La cantidad requerida que se va a administrar dependerá además de la afinidad de unión del anticuerpo por su antígeno específico y de la velocidad a la cual se agota el anticuerpo administrado a partir del volumen libre del sujeto al cual se administra.

Enfermedades y trastornos

[0135] Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por niveles alterados (relativos a un sujeto que no padece la enfermedad o el trastorno) o la actividad biológica se pueden tratar con agentes terapéuticos que antagonizan (es decir, reducen o inhiben) o que activan la actividad de PDGF o VEGF. Se pueden administrar agentes terapéuticos que antagonicen la actividad de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a: (i) un péptido, análogo, derivados, fragmentos o sus homólogos anteriormente mencionados; (ii) anticuerpos de un péptido anteriormente mencionado; (iii) ácidos nucleicos que codifican un péptido anteriormente mencionado; (iv) administración de un ácido nucleico de sentido contrario y ácidos nucleicos que son "disfuncionales" (es decir, debido a una inserción heteróloga en las secuencias de codificación de las secuencias que codifican un péptido anteriormente mencionado) que se utilizan como una función endógena "inactivada" de un péptido anteriormente mencionado mediante recombinación homóloga (véase, por ejemplo, Capecchi, 1989. Science 244: 1288 – 1292); o (v) moduladores (es decir, inhibidores, agonistas y antagonistas, que incluyen miméticos peptídicos adicionales de la invención o anticuerpos que alteran la interacción entre un péptido anteriormente mencionado y su ligando).

[0136] Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por niveles alterados (relativos a un sujeto que no padece la enfermedad o trastorno) o la actividad biológica se pueden tratar con agentes terapéuticos que aumentan la actividad (es decir, que sean agonistas). Se pueden administrar agentes terapéuticos que regulen por exceso la actividad de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, un péptido, análogo, derivados, fragmentos o sus homólogos anteriormente mencionados; o un agonista que aumente la biodisponibilidad.

[0137] Se pueden detectar niveles aumentados o disminuidos cuantificando los péptidos y/o el ARN, obteniendo una muestra de tejido del paciente (por ejemplo, de la biopsia de un tejido), y ensayando este *in vitro* para determinar los niveles de ARN o de péptido, la estructura y/o actividad de los péptidos expresados (o de los ARNm de los péptidos anteriormente mencionados). Los procedimientos que son bien conocidos en la técnica incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos (por ejemplo, mediante análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación seguida por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de los ARNm (por ejemplo, ensayos de transferencia Northern, inmunotransferencias, hibridación *in situ*, y similares).

Procedimientos terapéuticos

[0138] Esta memoria describe cómo modular la expresión o la actividad de PDGF y VEGF con fines terapéuticos. La modulación descrita en la presente memoria descriptiva implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de la actividad de la proteína PDGF y/o VEGF asociado con la célula. Un agente que modula esta actividad de la proteína puede ser un agente tal como se describe en la presente memoria descriptiva, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando análogo de un receptor de PDGF o VEGF que se produce naturalmente, un péptido, un peptidomimético de PDGF o VEGF, u otra molécula pequeña. El agente puede estimular la actividad de la ruta de señalización de PDGF o VEGF. Los ejemplos de dichos agentes estimuladores incluyen la proteína PDGF y VEGF activa y una molécula de ácido nucleico que codifica PDGF o VEGF que se ha introducido en la célula. El agente puede inhibir la señalización de PDGF o VEGF. Los ejemplos de dichos agentes inhibidores incluyen moléculas y anticuerpos de ácido nucleico de sentido contrario. Estos procedimientos moduladores se pueden llevar a cabo *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la memoria describe cómo tratar un individuo que

padece una enfermedad o trastorno, específicamente un trastorno neurológico. El procedimiento puede implicar administrar un reactivo (*por ejemplo*, un reactivo identificado mediante un ensayo de cribado descrito en la presente memoria descriptiva), o una combinación de reactivos que modulen (*por ejemplo*, regulen por exceso, o regulen por defecto) la expresión o la actividad de PEDG y VEGF. El procedimiento puede implicar administrar una proteína o molécula de ácido nucleico de PDGF y VEGF como tratamiento para modular la proliferación, diferenciación o supervivencia de los NSC / NPC.

[0139] La estimulación de la actividad de PDGF o VEGF es deseable en situaciones en las que PDGF y/o VEGF están anormalmente regulados por defecto y/o en las que es probable que un aumento en la actividad de PDGF o VEGF tenga un efecto beneficioso. Un ejemplo de dicha situación es el caso en que un sujeto tiene un trastorno caracterizado por una proliferación y/o diferenciación celular anómala (*por ejemplo*, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer). Tal como se muestra en el Ejemplo 5, PDGF-BB puede contrarrestar la pérdida neuronal inducida por MPTP similar a la observada en la enfermedad de Parkinson.

Determinación del efecto biológico del agente terapéutico

[0140] La memoria describe los ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados llevados a cabo para determinar el efecto de un agente terapéutico específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado.

[0141] Se pueden llevar a cabo ensayos *in vitro* con citoblastos representativos o células diferenciadas recientemente implicadas en el trastorno del paciente, para determinar si un agente terapéutico dado ejerce el efecto deseado sobre el (los) tipo (s) de célula (s). Los compuestos para uso en el tratamiento se pueden ensayar en sistemas de modelos animales adecuados que incluyen, pero no se limitan a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, y similares, antes de ensayarlos en sujetos humanos. De forma similar, para el ensayo *in vivo*, se pueden usar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

Composiciones farmacéuticas

[0142] Esta memoria describe cómo estimular las células del sistema nervioso central para producir progenie que pueda sustituir las neuronas dañadas o desaparecidas en el sistema nervioso central exponiendo a un paciente, que padece una enfermedad o trastorno neurológico, a un reactivo (*por ejemplo*, PDGF, VEGF) en una formulación adecuada mediante una ruta adecuada de administración, que modula la actividad de NSC o de NPC *in vivo*. Una "enfermedad o trastorno neurológico" es una enfermedad o trastorno que da lugar a la perturbación en la estructura o la función del sistema nervioso central que resulta de una anomalía del desarrollo, enfermedad, lesión o toxina. Los ejemplos de enfermedades o trastornos neurológicos incluyen trastornos neurodegenerativos (asociados, *por ejemplo* con la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, Síndrome de Shy-Drager, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de cuerpos de Lewy, o esclerosis lateral amiotrófica), trastornos isquémicos (*por ejemplo*, infarto cerebral o de médula espinal e isquemia, ictus), traumas (causados, *por ejemplo* por lesión física o cirugía, y lesiones por compresión; trastornos afectivos (*por ejemplo*, estrés, depresión y depresión postraumática), trastornos neuropsiquiátricos (*por ejemplo*, esquizofrenia, esclerosis múltiple o epilepsia), y trastornos del aprendizaje y de la memoria.

[0143] Esta memoria describe cómo tratar una enfermedad o trastorno neurológico que comprende administrar un reactivo que module la actividad de los neurocitoblastos o de los hemocitoblastos neurales *in vivo* a un mamífero. El término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, vacas, caballos, perros, ovejas y gatos. En una realización, el mamífero es un ser humano.

[0144] Esta memoria describe una cura regeneradora para enfermedades neurodegenerativas estimulando células endimarias y células de la zona subventricular para que proliferen, migren y se diferencien para dar el fenotipo neural deseado haciendo diana en los loci en los que las células están dañadas o desaparecidas. La estimulación *in vivo* de citoblastos endimarios se lleva a cabo administrando localmente un reactivo a las células en una formulación adecuada. Aumentando la neurogénesis, se pueden sustituir las neuronas dañadas o desaparecidas a fin de aumentar la función cerebral en los estados de enfermedad.

[0145] Se proporciona una composición farmacéutica útil como agente terapéutico para el tratamiento de los trastornos del sistema nervioso central. *Por ejemplo*, la composición incluye un reactivo, que se puede administrar solo o en combinación la administración simultánea sistémica o local de uno o más agentes adicionales. Dichos agentes incluyen conservantes, factores que aumentan la permeabilidad de la pared del ventrículo, citoblastos mitógenos, factores de supervivencia, agentes preventivos del linaje glial, agentes antiapoptóticos, medicaciones antiestrés, neuroprotectores, y antipirógenos. La composición farmacéutica trata preferentemente las enfermedades del SNC estimulando células (*por ejemplo*, células endimarias y células de la zona subventricular) a proliferar, migrar y diferenciarse en el fenotipo neural deseado, haciendo diana en los loci en los que las células están dañadas o desaparecidas.

[0146] Se describe también en la presente memoria descriptiva cómo tratar un sujeto que padece una enfermedad

o trastorno del SNC. Esto comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene un reactivo (1) solo en un intervalo de dosificación de 0,5 ng / kg / día a 500 ng / kg / día, (2) en combinación con un factor que aumenta la permeabilidad de la pared del ventrículo, o (3) en combinación con un agente administrado simultáneamente en forma local o sistémica.

[0147] Se formula una composición farmacéutica para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen la parenteral, *por ejemplo*, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (*por ejemplo*, mediante inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componente: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringuillas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o de plástico.

[0148] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida que se pueda usar correctamente con una jeringa. Debe ser estable en la condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede conseguir la prevención de la acción de los microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0149] Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un péptido quimérico) en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización a través de filtro. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son secado a vacío y criocongelación que da como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una de sus disoluciones filtrada en estéril.

[0150] Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para los fines de la administración terapéutica, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en la forma de comprimidos, comprimidos gruesos, o cápsulas. Las composiciones orales se pueden preparar también utilizando un vehículo fluido para uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se hacen gárgaras y se expectora o se traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o los materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, comprimidos gruesos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un agente deslizante tal como dióxido de sílice coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta piperita, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

[0151] Para la administración mediante inhalación, los compuestos se administran en la forma de un pulverizador en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

[0152] La administración sistémica puede ser también por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera que se va a permear. Se conocen generalmente e la técnica dichos penetrantes, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. Se puede llevar a cabo la administración transmucosal mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, o cremas tal como

se conoce generalmente en la técnica.

[0153] Los compuestos se pueden preparar también en la forma de supositorios (*por ejemplo*, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

[0154] Se pueden preparar los compuestos activos con vehículos que protegerán el compuesto frente a una rápida eliminación del cuerpo, dicha formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatible, tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales se pueden obtener también comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Se pueden utilizar también suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales de antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Se pueden preparar estos de acuerdo con los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, *por ejemplo*, tal como se describe en la Patente de los estados Unidos N° 4.522.811.

[0155] Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria descritas en la presente memoria descriptiva se dictan mediante y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se va a conseguir, y de las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

[0156] Las moléculas de ácido nucleico que codifican un agente proteínico se pueden insertar en vectores y utilizarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto mediante, *por ejemplo*, inyección intravenosa, administración local (véase la Patente de los Estados Unidos N° 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase, *por ejemplo*, Chen y col. (1994) PNAS 91: 3054 – 3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que está sumergido el vehículo de administración génica. Alternativamente, cuando se puede producir intacto el vector de administración génica a partir de células recombinantes, *por ejemplo*, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

[0157] La composición farmacéutica se puede incluir en un recipiente, envase o dispensador junto con las instrucciones de administración.

[0158] El reactivo se puede administrar en una composición que comprenda al menos un 90 % de reactivo puro. El reactivo pueden ser, *por ejemplo*, heterodímeros u homodímeros de PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o de un receptor de PDGF o VEGF, o de cualquiera de sus combinaciones.

[0159] El reactivo se puede formular en un medio que proporcione estabilidad máxima y los menores efectos secundarios relacionados con la formulación. Además del reactivo, la composición de la invención incluirá normalmente uno o más portadores de proteínas, un tampón, una sal isotónica y un estabilizante.

[0160] En algunos ejemplos, se puede administrar el reactivo mediante un procedimiento quirúrgico, implantando un catéter acoplado a un dispositivo de bombeo. El dispositivo de bombeo se puede implantar también o colocarse extracorpóreamente. La administración del reactivo puede realizarse en pulsos intermitentes o en forma de infusión continua. Se conocen en la técnica los dispositivos para la inyección en áreas discretas del cerebro (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos N°s 6.042.579; 5.832.932; y 4.692.147).

[0161] Los reactivos que contienen las composiciones se pueden administrar de cualquier forma convencional para la administración de una proteína. Se puede administrar un reactivo de cualquier manera conocida en la técnica en la que este puede tanto atravesar como rodear la barrera hematoencefálica. Los procedimientos para permitir que los factores pasen a través de la barrera hematoencefálica incluyen minimizar el tamaño del factor, proporcionando los factores hidrofóbicos que pasan más fácilmente a su través, conjugando el reactivo de proteína u otro agente a una molécula portadora que tenga un coeficiente de permeabilidad sustancial a través de la barrera hematoencefálica (véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos 5.670.477).

[0162] Los reactivos, derivados, y agentes administrados simultáneamente se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones comprenden normalmente el agente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se pretende que

“vehículo farmacéuticamente aceptable” incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Se pueden incorporar también a las composiciones compuestos activos suplementarios. Se pueden realizar modificaciones para que los agentes afecten a la solubilidad o al aclaramiento del péptido. Las moléculas peptídicas pueden sintetizarse también como D-aminoácidos para aumentar la resistencia a la degradación enzimática. En algunos casos, la composición puede administrarse simultáneamente con uno o más agentes solubilizantes, conservantes, y agentes potenciadores de la permeación.

[0163] Por ejemplo, la composición puede incluir un conservante o un vehículo tal como proteínas, carbohidratos, y compuestos para aumentar la densidad de la composición farmacéutica. La composición puede incluir también sales isotónicas y agentes de control redox.

[0164] La composición puede incluir el reactivo y uno o más agentes que aumentan la permeabilidad de la pared del ventrículo, es decir, “potenciadores de la permeabilidad de la pared del ventrículo”. Dicha composición puede ayudar a que una composición inyectada penetre de manera más profunda en la pared del ventrículo. Los ejemplos de potenciadores de la permeabilidad de la pared del ventrículo adecuados incluyen, por ejemplo, liposomas, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), IL-s, TNF α , polioxietilenoéteres polioxietilenados de ácidos grasos, monooleato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monolaurato de polioxietileno, monolaurato de polioxietilensorbitán, ácido fusídico y sus derivados, EDTA, EDTA disódico, ácido cólico y los derivados, ácido desoxicólico, ácido glicocólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, colato de sodio, glicolato de sodio, glicocolato, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicodesoxicolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, ácido quenodesoxicólico, ácido urosdesoxicólico, saponinas, ácido glicirrónico, glicirrida de amonio, decametonio, bromuro de decametonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, y dimetil- β -ciclodextrina u otras ciclodextrinas.

Cribado del fármaco

[0165] La memoria describe cómo utilizar los receptores o los complejos de receptor / reactivo para analizar o purificar determinadas poblaciones de citoblastos o de histocitoblastos utilizando, por ejemplo, anticuerpos frente a los receptores o complejos de receptor / reactivo.

[0166] La memoria describe el cribado de reactivos que afectan los citoblastos y las células progenitoras. En algunas aplicaciones, se utilizan células neurales (indiferenciadas o diferenciadas) para cribar factores que promuevan la maduración en las células neurales, o promuevan la proliferación y el mantenimiento de dichas células en cultivos a largo plazo. Por ejemplo, los reactivos candidatos se prueban añadiéndolos a células en cultivo a dosificaciones variables, y a continuación determinando cualquier cambio que se haya producido, de acuerdo con los criterios deseables para el cultivo y uso adicional de células. Se pueden analizar las características físicas de las células observando el crecimiento celular y de las neuritas con microscopio. Se puede analizar la inducción de la expresión en el aumento de los niveles de proliferación, diferenciación y migración con cualquier técnica conocida en la materia que pueda identificar la proliferación y la diferenciación. Dichas técnicas incluyen la RT-PCR, la hibridación in situ, y ELISA.

[0167] En un aspecto, se examinaron receptores / reactivos novedosos en células indiferenciadas utilizando las técnicas de la RT-PCR. En particular, se identificaron los genes que estaban regulados por exceso en estas neuroesferas indiferenciadas. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “regulación por exceso” se refiere a un proceso que aumenta las interacciones reactivo / receptor debido a un aumento en el número de receptores disponibles. La presencia de estos genes sugiere un papel potencial en la mediación de las rutas de transducción de la señal en lo que respecta a la regulación de la función de NSC / NSP. Además, conociendo los niveles de expresión de los receptores o de los diversos reactivos, es posible diagnosticar la enfermedad o determinar el papel de los citoblastos y los histocitoblastos en la enfermedad. Analizando las variaciones genéticas o la secuencia de aminoácidos incluida en estos genes o productos génicos, es posible diagnosticar o prever el desarrollo de determinadas enfermedades. Dicho análisis proporcionará la información necesaria para determinar la utilidad de la utilización de los tratamientos basados en citoblastos o células progenitoras para la enfermedad.

[0168] En otro aspecto, se llevó a cabo la hibridación in situ en secciones de cerebro de ratón adulto para determinar cuáles células en el cerebro adulto expresan estas rutas de señalización. Estos datos son de utilidad en la determinación de las opciones de tratamiento de diversas enfermedades neurológicas.

[0169] En otro aspecto más, se llevó a cabo la PCR cuantitativa sobre ARN preparado a partir de neuroesferas no diferenciadas o diferenciadas. En algunas realizaciones, determinadas combinaciones de receptor-reactivo desvelan en las neuroesferas no diferenciadas expresiones muy superiores en comparación con las neuroesferas que se han inducido a diferenciarse, mientras que en otras realizaciones, otras combinaciones de receptor-reactivo desvelan lo opuesto. Las neuroesferas no diferenciadas (que son células en proliferación rápida con la capacidad de diferenciarse en neuronas y células gliales, que expresan niveles mayores de estas combinaciones de receptor-

reactivo) están implicadas en las rutas de proliferación y diferenciación de los NSC / NPC. Para determinadas rutas de señalización, los datos indicativos de una mayor expresión en neuroesferas diferenciadas sugieren un papel para esta combinación de receptor-reactivo en las células que inician o que continúan una ruta de diferenciación.

[0170] Para determinar el efecto de un reactivo potencial sobre células neurales, se puede obtener un cultivo de NSC / NPC derivado de histocitoblastos procedentes de tejido neural normal o, de forma alternativa, a partir de un hospedador que padece una enfermedad o trastorno del SNC. La elección del cultivo dependerá del agente particular que se está ensayando y de los efectos que se desean conseguir. Una vez que se han obtenido las células del tejido donante deseado, proliferan *in vitro* en presencia de un reactivo inductor de la proliferación.

[0171] Se puede cribar la capacidad de diversos agentes biológicos para aumentar, disminuir o modificar de alguna otra forma el número y la naturaleza de la progenie de citoblastos proliferada en presencia del factor de proliferación sobre células que han proliferado mediante los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, es posible cribar los reactivos para que aumenten o disminuyan la capacidad de proliferación de los NSC / NPC, lo que sería útil para generar grandes números de células para fines de trasplante. En estos estudios se plaquean las células precursoras en presencia del reactivo en cuestión y se evalúan para determinar el grado de proliferación y supervivencia o se pueden determinar las células progenitoras y su progenie. Es posible cribar células neurales que se hayan inducido ya para diferenciarlas antes del cribado. Es posible determinar los efectos del reactivo sobre el proceso de diferenciación aplicándolo a las células precursoras antes de la diferenciación. Generalmente, el reactivo se solubilizará y añadirá al medio de cultivo a concentraciones variables para determinar el efecto del agente en cada dosis. El medio de cultivo se puede rellenar con el reactivo cada par de días en cantidades de tal manera que se mantenga la concentración del reactivo algo constante.

[0172] Se observaron cambios en la proliferación mediante un aumento o disminución en el número de neuroesferas que forman y/o un aumento o disminución en el tamaño de las neuroesferas, que es un reflejo de la tasa de proliferación y está determinado por el número de células precursoras por neuroesfera.

[0173] Utilizando estos procedimientos de cribado, es posible cribar los efectos secundarios del potencial fármaco sobre las células del SNC prenatales y posnatales ensayando los efectos de los agentes biológicos sobre la proliferación de citoblastos y células progenitoras y sobre la diferenciación de células progenitoras o la supervivencia y función de las células del SNC diferenciadas.

[0174] Otras aplicaciones de cribado descritas en la presente memoria descriptiva se refieren al ensayo de compuestos farmacéuticos para su efecto sobre el tejido neural. Se puede llevar a cabo el cribado ya sea porque el compuesto se ha diseñado para tener un efecto farmacológico sobre las células neurales, o bien debido a que un compuesto se diseña para tener efectos que de cualquier manera puedan tener efectos secundarios no previstos sobre el sistema nervioso. El cribado se puede llevar a cabo utilizando células precursoras neurales o células diferenciadas terminalmente tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

[0175] Se puede evaluar el efecto de la función celular utilizando cualquier ensayo normalizado para observar el fenotipo o la actividad de las células neurales, tales como la unión al receptor, la proliferación, diferenciación, supervivencia tanto en el cultivo celular como en un modelo adecuado.

Usos terapéuticos

[0176] El hecho de que los neurocitoblastos estén localizados en los tejidos que revisten los ventrículos de los cerebros maduros ofrece algunas ventajas para la modificación y manipulación de estas células *in vivo* y el tratamiento último de diversas enfermedades, trastornos, y lesiones neurológicas que afectan diferentes regiones del SNC. Se puede hacer a medida una terapia para estas enfermedades de acuerdo con esto de tal manera que los citoblastos que rodean los ventrículos próximos a la región afectada podrían manipularse o modificarse *in vivo* utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva. El sistema ventricular se encuentra próximo a todas las regiones del cerebro y de esta manera permite un acceso más fácil a las áreas afectadas. Con el fin de modificar los citoblastos *in vivo* exponiéndolos a una composición que comprenda un reactivo, es relativamente fácil implantar un dispositivo que administre la composición al ventrículo y de esta manera, a los neurocitoblastos. Se puede usar, por ejemplo, una cánula conectada a una bomba osmótica para administrar la composición. De forma alternativa, se puede inyectar la composición directamente en los ventrículos. La progenie de neurocitoblastos puede migrar hasta regiones que hayan sido dañadas como resultado de lesión o enfermedad. Además, la estrecha proximidad de los ventrículos con muchas regiones del cerebro permitiría la difusión de un agente neurológico secretado por los citoblastos o su progenie.

[0177] Se puede administrar un reactivo localmente, tal como se ha descrito anteriormente, en combinación con un agente administrado local o sistémicamente. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, uno o más citoblastos mitógenos, factores de supervivencia, agentes preventivos del linaje glial, agentes antiapoptóticos, medicaciones contra el estrés, neuroprotectores y antipirógenos, o cualquiera de sus combinaciones.

[0178] El agente es para la administración sistémica antes, durante, o después de la administración del reactivo. El

agente localmente administrado se puede administrar antes, durante o después de la administración del reactivo.

[0179] Por ejemplo, cuando el reactivo es PDGF, los citoblastos mitógenos, por ejemplo, EGF, FGF, VEGF, IGF-1, e insulina pueden administrarse simultáneamente de forma local antes, durante y/o después de una infusión de PDGDF. Adicionalmente, factores de supervivencia, tales como GDNF, CNTF, BDNF, NT-4, NGF, y eritropoyetina se pueden administrar simultáneamente de forma local antes, durante y/o después de la infusión de PDGF.

[0180] Para el tratamiento de la enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, y otros trastornos neurológicos que afectan principalmente al prosencéfalo, se administra un reactivo solo o con un agente o agentes adicionales a los ventrículos del prosencéfalo para afectar la modificación o la manipulación *in vivo* de los citoblastos. Por ejemplo, la enfermedad de Parkinson es el resultado de bajos niveles de dopamina en el cerebro, particularmente en el cuerpo estriado. Es por tanto ventajoso inducir a los citoblastos quiescentes del propio paciente a empezar a dividirse *in vivo* y a inducir la progenie de estas células a diferenciarse en células dopaminérgicas en la región afectada del cuerpo estriado, aumentando de esta manera localmente los niveles de dopamina.

[0181] Normalmente, los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas están localizados en la sustancia negra y en las regiones adyacentes del mesencéfalo, con los axones proyectándose en dirección al cuerpo estriado. Los procedimientos y composiciones descritas en la presente memoria descriptiva proporcionan una alternativa al uso de fármacos y al uso controvertido de grandes cantidades de tejido embrionario para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Se pueden generar células dopaminérgicas en el cuerpo estriado mediante la administración de una composición que comprende un reactivo descrito en la presente memoria descriptiva para el ventrículo lateral

[0182] Para el tratamiento de la EM y otros trastornos desmielinantes o hipomielinantes, y para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica u otras enfermedades de las neuronas motoras, se administra un reactivo descrito en la presente memoria descriptiva, solo o con un agente o agentes adicionales, en el canal central.

[0183] Además, para tratar el tejido del SNC que rodea inmediatamente un ventrículo, se puede administrar un reactivo descrito en la presente memoria descriptiva, solo o con un agente o agentes adicionales en la cisterna lumbar para la circulación a través del SNC.

[0184] Se pueden administrar también de forma simultánea neuroprotectores, de forma sistémica o local antes, durante y/o después de la infusión de un reactivo tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los neuroprotectores incluyen antioxidantes (agentes con actividad reductora, etc.), moduladores del canal de Ca, moduladores del canal de Na, moduladores del receptor del glutamato, antagonistas del receptor de la serotonina, fosfolípidos, ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, estrógenos, y moduladores selectivos de los receptores del estrógeno (SERMS), progestinas, hormona tiroidea, y compuestos que imitan la hormona tiroidea, ciclosporina A y los derivados, talidomida y los derivados, metilxantinas, inhibidores de la MAO; bloqueantes de la captación de la serotonina, noradrenalina y dopamina; agonistas de la dopamina, L-DOPA, nicotina y los derivados, y moduladores de la sintasa NO.

[0185] Determinados reactivos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser pirógenos tras la inyección IV (en ratas, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2000 278: R1275 – 81). De esta manera, agentes antipirógenos del tipo de los inhibidores de cox2, indometacina, derivados del ácido salicílico y otros compuestos antiinflamatorios / antipirógenos generales se pueden administrar de forma sistémica o local antes, durante y/o después de la administración del reactivo descrito en la presente memoria descriptiva.

[0186] Se pueden administrar agentes antiapoptóticos que incluyen los inhibidores de la caspasa y agentes útiles para la modulación de sentido contrario de enzimas y factores apoptóticos antes, durante o después de la administración del reactivo descrito en la presente memoria descriptiva.

[0187] Los síndromes de estrés disminuyen la neurogénesis, por tanto, puede ser deseable tratar a un sujeto con medicaciones contra el estrés tales como, *por ejemplo*, anti-glucocorticoides (*por ejemplo*, RU486) y beta bloqueantes, administrados sistémica o localmente antes, durante y/o después de la infusión del reactivo descrito en la presente memoria descriptiva.

[0188] Se conocen los procedimientos para preparar las formas de dosificación del reactivo, o serán evidentes para los expertos en la técnica.

[0189] La cantidad de reactivo que se va a administrar dependerá del tamaño y la dolencia exactos del paciente, pero estará entre 0,5 ng / kg / día a 500 ng / kg / día en un volumen de 0,001 a 10 ml.

[0190] La duración del tratamiento y el periodo de tiempo de administración del reactivo variarán también de acuerdo con el tamaño y la dolencia del paciente, la gravedad de la enfermedad y la composición específica y el procedimiento que se está usando.

[0191] Se evaluó la efectividad de cada uno de los procedimientos anteriores para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno del SNC mediante cualquier prueba normalizada conocida para evaluar la enfermedad.

5 **Ejemplos**

Ejemplo 1: El efecto de los PDGF sobre la proliferación de neuroesferas de ratón cultivadas no adherentes.

Cultivos de neuroesferas

[0192] La pared lateral anterior del ventrículo lateral de ratones de 5 – 6 semanas de edad se disoció enzimáticamente en 0,8 mg / ml de hialuronidasa y 0,5 mg / ml de tripsina en DMEM que contenía 4,5 mg / ml de glucosa y 80 unidades / ml de ADNasa a 37° C durante 20 min. Las células se trituraron suavemente y se mezclaron con tres volúmenes de medio Neurosphere (DMEM / F12, suplemento de B27, HEPES 125 mM pH 7,4) que contenía 20 ng / ml de EGF (a no ser que se indique otra cosa), 100 unidades / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomycin. Tras pasar a través de un filtro de 70 µm, las células se aglomeraron a 160 x g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó posteriormente y las células se volvieron a suspender en medio Neurosphere suplementado como anteriormente, se plaquearon en placas de cultivo y se incubaron a 37° C. Las neuroesferas estuvieron listas para dividirse aproximadamente 7 días después del plaqueo.

[0193] Para dividir las neuroesferas, se recogieron las células mediante centrifugación a 160 x g durante 5 min. El sobrenadante acondicionado (medio acondicionado) se eliminó y se guardó. Las neuroesferas se volvieron a suspender en 0,5 ml de Tripsina / EDTA en HBSS (1x), se incubaron a 37° c durante 2 min y se trituraron suavemente para ayudar a la disociación. Tras una incubación adicional de 3 min a 37° C y posterior trituración, se añadieron 3 volúmenes de medio Neurosphere enfriado con hielo sin medio de EGF para detener la actividad adicional de la tripsina. Las células se aglomeraron a 220 x g durante 4 min, y se volvieron a suspender en una mezcla 1: 1 de medio Neurosphere reciente y medio acondicionado: Se suplementó el EGF hasta 20 ng / ml y el cultivo se plaqueó y se incubó a 37° C.

Ensayos con neuroesferas

[0194] Los NSC, cultivados tal como se ha descrito anteriormente, se sembraron a partir del pase 2 en DMEM / F12 suplementado con B27 en una placa de 96 pocillos en forma de células individualizadas (10000 células / pocillo), a las cuales se añadieron agentes a las concentraciones indicadas (1 nM – 0,0005 nM). Cuando las células se hicieron crecer en forma de cultivo adherente, se sembraron en medio + B27 suplementado con suero de ternera fetal al 1 %, después de 6 horas, cuando las células se habían adherido, el medio se cambió a medio exento de suero y se añadieron los agentes en las mismas concentraciones que las indicadas. Los PDGF utilizados en los experimentos *in vitro* fueron PDGF-AA recombinante humano y PDGF-BB recombinante humano.

Ensayo de ATP intracelular

[0195] Se había demostrado anteriormente que los niveles de ATP intracelular estaban correlacionados con el número de células (Crouch, Kozlowski y col. 1993). Después de 3 días de tratamiento, se midió el ATP intracelular utilizando el kit ATP SL (Biothema) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

[0196] En los medios de crecimiento suplementados con B27, PDGF-BB tuvo un efecto proliferativo dependiente de la concentración. El efecto de PDGF-AA fue más débil en comparación con BB, y cuando se añade junto con PDGF-AA no altera el efecto proliferativo de PDGF-BB (FIG. 1). Considerando el modelo de unión, PDGF-AA se une solo a los receptores diméricos de PDGF $\alpha\alpha$ mientras que PDGF -BB se une a las tres posibles combinaciones ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ o $\beta\beta$), por tanto, estos resultados indicaron que el efecto proliferativo fue debido a la unión a los receptores $\beta\beta$ (o $\alpha\beta$). Se obtuvieron también resultados similares si las células se hicieron crecer como un cultivo adherente más diferenciado (posiblemente de células progenitoras) en poli-D-lisina (FIG. 2)

Ejemplos 2: Efectos de PDGF-AA sobre GFAP y Tubulina β -III en neurocitoblastos / hemocitoblastos neurales cultivado procedentes de ratón

[0197] Los NSC cultivados tal como se ha descrito anteriormente se sembraron a partir del pase 2 en DMEM / F12 suplementado con B27 en una placa de 24 pocillos (poli-D-lisina revestida) en forma de células individualizadas (70.000 células / pocillo), a las cuales se añadió PDGF-AA a la concentración de 1 nM. A continuación, las células se diferenciaron durante 5 días cambiando el medio más / menos PDGF-AA cada 48 horas. En el día 6 se recuperaron las células y se llevaron a cabo las transferencias Western tal como se ha descrito en otra parte (Patrone C y col (1999) Proc Natl Acad Sci USA. 96 (19): 10905 – 10). Se utilizaron un anticuerpo marcador neuronal frente a la Tubulina β -III, 1: 5000 (BioSite), o un anticuerpo marcador glial frente a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) 1: 5000, (DAKO) para medir los destinos fenotípicos.

[0198] En determinadas condiciones, en los cultivos adherentes de neurocitoblastos adultos tratados con PDGF-AA durante 6 días se produjo una regulación por defecto de GFAP en comparación con el tratamiento con EGF (panel izquierdo). Los promedios del valor inicial contienen EGF mientras que los promedios de las células tratadas con PDGF contienen EGF y PDGF. En contraste, se observó un aumento significativo del marcador de la Tubulina β -III específico neuronal (panel derecho) como una respuesta al tratamiento con PDGF-AA en comparación con el tratamiento con EGF. Este resultado implica a PDGF-AA en la diferenciación de los neurocitoblastos en neuronas. Las cargas de muestras se normalizaron para la proteína y el contenido de ADN.

[0199] En otro conjunto de experimentos, se estudiaron los efectos de PDGF-AA con procedimientos inmunocitoquímicos en neurocitoblastos fijados de forma adherente. En estos experimentos, se observó un resultado similar para el estudio con la transferencia Western, por ejemplo, una regulación por exceso de la Tubulina β -III y una regulación por defecto de GFAP (FIG. 3). En otros experimentos con PDGF-AA, analizados mediante inmunocitoquímica, se demostró que el factor producía un cambio general desde un fenotipo de citoblasto a un fenotipo progenitor en los cultivos que contenían los marcadores, GFAP y de la Tubulina β -III. Sin embargo, en ninguno de los ejemplos se produjo solapamiento entre los marcadores, lo que sugiere que PDGF-AA promueve la diferenciación de los linajes glial y neural mediante rutas distintas (FIG. 4). En experimentos concurrentes, se estudió también el efecto de PDGF-BB. Se obtuvieron con BB efectos similares a los observados con AA (no se muestran los datos).

Ejemplo 3: Efecto de PDGF-AA y PDGF-BB sobre la diferenciación neural (Tubulina III) de neurocitoblastos de ratón.

Diferenciación

[0200] Se disociaron neuroesferas de ratón adulto con tripsina (Gibco) en células individualizadas y se transfirieron a placas de poli-D-lisina (BD) en el medio de cultivo anterior, sin factores de crecimiento, suplementado con suero de ternera fetal al 1 % (Gibco). Se incubaron las células durante la noche para adherirse a la placa. El medio se cambió a medio de cultivo sin factores de crecimiento, suplementado con PDGF-AA o PDGF-BB 1 nM (ambos de R&D Systems). Se añadió medio con la nueva sustancia en días alternos. Se incubaron las células durante un total de 7 días.

Inmunohistoquímica

[0201] Se lavaron las células dos veces con PBS (Gibco) y se fijaron durante 15 min a temperatura ambiente con formaldehído al 4 % (Sigma) y se permeabilizaron durante 20 min a temperatura ambiente en Triton X-100 al 0,1 % (Sigma) en PBS. Tras la fijación y la permeabilización, se etiquetaron las células con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra Tubulina β -III (1: 500 Promega). Se visualizó el anticuerpo primario con Texas-Red dirigido contra Ig de ratón (1: 100 Vector Laboratories). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS con Triton X-100 al 0,1 %.

Análisis de expresión de la proteína con la transferencia Western

[0202] Se lavaron las células dos veces con PBS (Gibco) y se lisaron con 200 μ l de tampón de lisis / pocillo. El tampón de lisis contenía Triton X-100 al 0,1 %, EDTA 1 mM y 1 comprimido de un cóctel inhibidor de la proteasa (Roche). Las muestras se hicieron avanzar sobre un gel Bis-Tris al 4-12 % (Novex) en condiciones reductoras con tampón MOPS (Novex) y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa ECL de Hybond (Amersham Biotech). Se bloquearon en ECL-Block al 5 % (Amersham Biotech) en PBS + Tween 20 al 0,1 % (Sigma). Se etiquetaron las membranas con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra Tubulina β -III (1: 5000 Promega). Se detectó el anticuerpo primario utilizando un anticuerpo secundario dirigido contra HRP de ratón (1: 10000 Amersham Biotech) y ECL Plus + Kit de detección de transferencia Western (Amersham Biotech). Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS con Triton X-100 al 0,1 %, ECL Block al 1 %. A continuación la señal se capturó sobre una película ECL Hyper (Amersham Biotech).

[0203] Tal como se midió cualitativa (FIG. 5) y cuantitativamente (FIG. 6), PDGF-AA y PDGF-BB estimularon la diferenciación neuronal de los neurocitoblastos / hemocitoblastos neurales de ratón.

Ejemplo 4. Acción neurogénica *in vivo* de BB en ratas sanas después de infusión ICV

[0204] Ratas macho (régimen de 12 horas de luminosidad / oscuridad; con alimentación y bebida a voluntad; 5 animales por jaula normalizada) se infundieron (minibombas Alzet) en el ventrículo lateral izquierdo con PDGF-BB recombinante humano durante 7 días a una dosis diaria de 36 ng / día (8 animales / grupo). Se utilizó BDNF recombinante humano (factor neurotrófico derivado de cerebro) como un control positivo (Pencea V y col., J. Neurosci 1 de septiembre (2001), 21 (17): 6706 – 17). Se incluyó también bromodesoxiuridina (BrdU) en el vehículo de la infusión (fluido cerebroespinal artificial) para permitir la medida de la proliferación mediante la cuantificación de la incorporación de BrdU en el ADN. Se sacrificaron los animales a los 7 (proliferación) o 28 días (neurogénesis) después del inicio del tratamiento y se diseccionaron los cerebros y se prepararon para el seccionamiento y la

inmunohistoquímica (Pencea V y col., J. Neurosci 1 de septiembre (2001), 21 (17): 6706 – 17).

[0205] Se midió la proliferación mediante la incorporación de BrdU y la tinción de la diaminobencidina (DAB) de los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (FIG. 7) Se realizó un recuento de células en un microscopio de contraste de fases. Se evaluó el fenotipo neural mediante la tinción del marcador neuronal NeuN por inmunocitoquímica utilizando una lectura de fluorescencia. Se etiquetaron los anticuerpos secundarios con FITC o Alexa Fluor586. En los análisis de doble tinción diseñados para medir la neurogénesis, se cuantificaron BrdU y NeuN mediante fluorescencia y se llevó a cabo el recuento de las células en un microscopio confocal. Para detalles experimentales adicionales, véase Pencea V y col., J. Neurosci 1 de septiembre (2001), 21 (17): 6706 – 17. Se analizaron numerosas regiones del cerebro.

Grupo del día 7 (proliferación)

[0206]

Tabla 1: Aumento de la proliferación de PDGF-BB de la pared del ventrículo en comparación con los animales tratados con el vehículo.

Los valores promedio de dos secciones, de $m^3 \times 600$ micrómetros contados a lo largo de la pared del ventrículo lateral fueron los siguientes (promedio $\pm$ sem):	
<u>Condición</u>	<u>Recuento de células:</u>
Vehículo	134 $\pm$ 10
PDGF-BB	216 $\pm$ 25 ($p < 0,05$ para el vehículo, ANOVA)
Compuesto de referencia (BDNF)	177 $\pm$ 15 ($p < 0,05$ para el vehículo, ANOVA)
En el giro dentado del hipocampo y el bulbo olfatorio no se observó ningún efecto significativo registrado sobre la proliferación del marcador BrdU por cualquier compuesto. Se registraron tendencias no significativas hacia más células positivas para BrdU (proliferación) (Tabla 1).	

Grupo del día 28 (neurogénesis)

[0207] En los análisis con la etiqueta BrdU, en el giro dentado, CA1 y la sustancia blanca no se observó ningún efecto significativo de PDGF o BDNF, más bien, hubo una tendencia (no significativa) de disminución de las células positivas para BrdU en comparación con los animales tratados con el vehículo (no se muestra).

[0208] Los análisis con etiqueta doble desvelaron que la relación de células positivas para NeuN a células positivas para BrdU fue similar (sin diferencias significativas) en los tres grupo en todas las áreas investigadas (giro dentado, CA1, sustancia blanca, zona subventricular, cuerpo estriado) (no se muestra).

[0209] En la zona subventricular hubo un ligero efecto de BDNF en el aumento del número de células en proliferación. PDGF no tuvo dicho efecto estadísticamente significativo (no se muestra).

[0210] En el cuerpo estriado hubo un aumento significativo en las células positivas para BrdU después de la infusión de PDGF-BB y BDNF en comparación con los animales tratados con el vehículo (Tabla 2, FIG. 8) Los resultados desvelaron que el vehículo y los grupos de factores muestran la misma relación de células con etiqueta doble, se concluyó que la infusión de PDGF-BB (y BDNF) aumentó significativamente la neurogénesis en el cuerpo estriado en comparación con los animales tratados con el vehículo.

Tabla 2: Efecto de PDGF-BB sobre las células positivas para BrdU en el cuerpo estriado.

Se contaron las células en cuadrados de $300 \times 300 \mu m$	
Vehículo	10,6 $\pm$ 4,2
PDGF-BB	40 $\pm$ 6,8 ($p < 0,01$ para el vehículo, ANOVA)
BDNF	39,8 $\pm$ 7,3 ($p < 0,01$ para el vehículo, ANOVA)
En el cuerpo estriado hubo un gradiente de células etiquetadas con BrdU desde el ventrículo a la corteza lo que indica que las células pueden originarse a partir de la zona subventricular. En la región CA1 / sustancia blanca no se observó dicho gradiente.	

Ejemplo 5: PDGF-BB contrarresta la pérdida neuronal inducida por MPTP en la pars compacta de la sustancia negra.

Animales

[0211] Ratones C57B1 / 6 machos de diez semanas de edad (25 g, B&K Universal, Estocolmo, Suecia).

Administración del fármaco

[0212] Se administró PDGF-BB (Sigma) directamente en el ventrículo lateral derecho del cerebro utilizando bombas osmóticas (Alza 1003D, administración de 1,0 µl / h durante tres días) y kits de infusión en cerebro. Se preparó la disolución del fármaco de la siguiente forma: se disolvieron 10 µg de PDGF-BB en 10 µl de HAc 1 M, después de lo cual se ajustó el pH a 7,4 añadiendo 10 µl de NaOH. Se añadió un tampón (100 ml de PBS 0,01 M que contenían 5 mg / ml de BSA y Hepes 20 mM) hasta un volumen final de 4.000 µl. Se conectó cada minibomba a una aguja de infusión en cerebro, que se colocó estereotáxicamente en el ventrículo lateral derecho del cerebro del ratón en ratones anestesiados profundamente (60 mg / kg de hidrato de cloral intraperitoneal). Se colocó la bomba subcutáneamente en el cuello. La tasa de administración de PDGF-BB fue de 0,1 µg / h / kg de peso corporal. Se proporcionó ³H-timidina (6,7 Ci / ml, NEN) durante tres días mediante otra bomba Alzet que se colocó intraperitonealmente.

[0213] Una hora después, se insertaron las bombas, se proporcionó por vía subcutánea la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (Clorhidrato de MPTP, Sigma) (40 mg / kg).

[0214] Dos meses después, se anestesiaron los animales con hidrato de cloral (60 mg / kg ip) y se sacrificaron mediante infusión intracardial de fijador (paraformaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) que contenía ácido pícrico al 0,4 %. Tras la disección, la fijación posterior con el mismo fijador continuó durante 1,5 h seguida por crioprotección. Tras la disección del mesencéfalo, se separaron los dos lados del cerebro con una cuchilla a lo largo de la línea media ventro-dorsal y se fijó posteriormente el tejido en la misma disolución y se crioprotegió en sacarosa. Se prepararon secciones para el criostato de la siguiente forma. La mitad del cerebro escogida de forma aleatoria se cortó en secciones de 40 µm de grosor a través de la extensión rostro-caudal completa de la pars compacta de la sustancia negra. Se tomó una sección escogida de forma aleatoria de cada 6ª sección para llevar a cabo la inmunohistoquímica de flotación libre utilizando un anticuerpo dirigido contra la tirosina hidroxilasa (diluido 1: 400, Pel-Freez) con el fin de identificar las neuronas dopaminérgicas en el tejido. Para visualizar el anticuerpo, se utilizó el kit de la avidina-biotina peroxidasa (Vector) con DAB al 0,03 % como cromógeno, añadiendo H₂O₂ al 0,01 %. Se empleó violeta de cresilo para identificar los nucléolos, la sustancia de Nissl y las células de la glía (Chan y col., 1997; Walters y col., 1999). Se seccionó la otra mitad del cerebro en secciones de un grosor de 10 µm sobre portas de vidrio y se escogieron aleatoriamente series de cada sección 6ª que se tiñeron inmunohistoquímicamente para la tirosina hidroxilasa en neuronas dopaminérgicas tal como se ha descrito anteriormente. Para detectar la incorporación del nucleótido ³H-timidina en las células del cerebro, los portas muestreados se sumergieron en emulsión de traza de ionización nuclear NTB2 (Kodak) y se almacenaron en cajas opacas a -20° C durante cuatro semanas. La etiqueta negra granular se desarrolló en D-19 (Kodak, diluida 1: 2 con agua destilada a 16 – 18° C).

Análisis

[0215] Se estimó el número total de neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia negra con un fraccionador óptico utilizando un objetivo 100X de inmersión en aceite para detectar la unidad de muestreo neuronal, el nucléolo (Janson y Moller, 1993) (el coeficiente de error de cada estimación fue < 0,09). Se estimó el volumen de las neuronas con el rotor en secciones verticales (Janson y Moller, 1993). Se mostró la proliferación de nuevas neuronas como puntos negros sobre células en las que se incorporó el nucleótido radioactivo.

La infusión de PDGF hace que proliferen las neuronas nigrales

[0216] PDGF-BB contrarrestó completamente la pérdida de células nerviosas positivas para la tirosina hidroxilasa inducida por MPTP tras una lesión de MPTP. Se lesionaron los ratones con MPTP y se trataron con PDGF. Las neuronas de la sustancia negra se tiñeron con tinción de Nissl y a continuación se contaron. Se infundió también a los animales timidina tritiada a fin de permitir la medida de la proliferación. Tras el análisis de numerosas células en la sustancia negra en los ratones lesionados con MPTP tras la infusión de PDGF, no solo se dobló el número de células en la estructura sino que las células fueron también positivas para la proliferación. Por ejemplo, las células neurales de la sustancia negra habían incorporado también la timidina tritiada en sus núcleos tal como se muestra observando los granos autorradiográficos negros sobre los núcleos de las células teñidas con tinción de Nissl. En la Tabla 3 se resumen los resultados cuantitativos.

Tabla 3: Número total de neuronas positivas para la tirosina hidroxilasa en las pars compacta de la sustancia negra bilateral en animales lesionados con MPTP tratados con PDGF-BB intraventricularmente.

Solución salina (n=6)	11.900 ± 100
PDGF-BB (n=3)	12.300 ± 300
MPTP + solución salina (n=6)	5.500 ± 700*
MPTP + PDGF-BB (n=3)	10.000 ± 200
Promedio ± S.E.M., número de animales en cada grupo dentro del paréntesis). Se llevó a cabo el análisis estadístico con ANOVA seguido por el test post-hoc de Scheffe. * = P < 0,001, diferentes de todos los otros grupos de animales. Para los detalles sobre los animales y el tratamiento, véase el texto.	

- 5 **[0217]** En el grupo de PDGF-BB + MPTP, el tamaño de las neuronas dopaminérgicas nigrales varió sustancialmente. Mientras que se encontró que algunas neuronas eran mayores que el tamaño normal de las neuronas dopaminérgicas (FIG. 9), otras fueron a su vez anormalmente pequeñas (FIG. 10). El primero puede representar la estimulación del crecimiento neuronal en neuronas que sobreviven a la lesión, mientras que el último, neuronas bipolares pequeñas positivas a la tirosina hidroxilasa, puede ser el resultado de un proceso en el que nuevas células nerviosas se reclutan para la población neuronal nigral de las células progenitoras. Se sugirió que la estimulación de la proliferación de los NSC / NPC así como el aumento de la migración en la sustancia negra y la diferenciación en un fenotipo dopaminérgico era el mecanismo para el aumento del número de células en los animales lesionados tratados con PDGF-BB. Se indicó la implicación del aumento de la proliferación en el aumento del número de células mediante el hallazgo de una etiqueta negra granular que representa la ³H-timidina sobre las células nerviosas nigrales (FIG. 11).

Ejemplo 6: los genes PDGFR-A y PDGFR-B se expresan en neurocitoblastos humanos cultivados.

Cultivos de citoblastos humanos (HSC)

- 20 **[0218]** Se tomó una biopsia procedente de la pared lateral anterior del ventrículo lateral a partir de un paciente humano adulto y se disoció enzimáticamente en PDD (Papaína 2,5 U / ml; Dispasa 1 U / ml; ADNasa I 250 U / ml) en DMEM que contenía 4,5 mg / ml de glucosa y 37° C durante 20 min. las células se trituraron suavemente y se mezclaron con tres volúmenes de Medio de Plaqueo de Citoblastos Humanos (HSCPM) (DMEM / F12; FBS al 10 %),
25 se aglomeraron las células a 250 x g durante 5 min. Se eliminó posteriormente el sobrenadante y se volvieron a suspender las células en HSCPM, se plaquearon sobre placas de cultivo revestidas con fibronectina y se incubaron a 37° C en CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se inició la expansión del cultivo mediante el cambio de medios a medios de cultivo HSC (DMEM / F12; BIT 9500; 20 ng / ml de EGF; 20 ng / ml de FGF2). Se dividieron los HSC utilizando tripsina y EDTA en condiciones normalizadas. Se añadió posteriormente FBS para inhibir la reacción y se recogieron las células mediante centrifugación a 250 x g durante 5 min. Se volvieron a plaquear los HSC en los medios de cultivo para los HSC

RT-PCR

- 35 **[0219]** Se diseñaron las siguientes parejas de cebadores para identificar específicamente la presencia de la expresión de los genes *pdgfr-a*, y *pdgfr-b* en cultivos de HSC. Se proporcionan a continuación los tamaños estimados de las bandas de cada pareja de cebadores:

		Tamaño de la banda (pares de bases)
PDGFR-A	aaccgtgtataagtcaggggaaacg (SEQ ID NO: 9)	355
	cgcacacctacaacaaaatgtttg (SEQ ID NO: 10)	
	Aaccgtgtataagtcaggggaaacg SEQ ID NO: 11)	507
	Tggccactgtctcttcttagca (SEQ ID NO: 12)	
PDGFR-B	gtctctgtgaacgcagtcagactg (SEQ ID NO: 13)	338
	Gcaaattgtagtgtgccacacct (SEQ ID NO: 14)	
	Gtctctgtgaacgcagtcagactg (SEQ ID NO: 15)	382
	Aggcctcgaacactacctgcagtg (SEQ ID NO: 16)	

- 40 Se prepararon los HSC y se cultivaron tal como se ha indicado anteriormente. Se aisló el ARN total utilizando el Mini Kit RNeasy de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trató con ADNasa utilizando Ambion Dnase I de acuerdo con el protocolo. Se utilizó el Kit de la RT-PCR en Una Etapa de Life Technology para detectar la presencia del ARNm de *pdgfr-a* y *pdgfr-b*. De manera breve, se utilizaron 50 ng del ARN total en cada reacción, con una temperatura de hibridación de 54° C. para asegurar además que la contaminación genómica del ARN total
45 no proporciona un aumento de resultados falsos positivos, se desarrolló una reacción idéntica en la que la mezcla de

RT-polimerasa taq se sustituyó por la polimerasa taq sola en paralelo con la RT-PCR experimental. Las reacciones se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1,5 % que contenía bromuro de etidio y se visualizaron las bandas bajo luz UV.

[0220] Se llevó a cabo la RT-PCR sobre el ARN total preparado a partir de HSC cultivados utilizando parejas de cebadores específicos para los genes anteriores (FIG. 12). Las bandas indicadas con una flecha blanca corresponden a las bandas del tamaño deseado (PDGFR-A [banda 1 355 pb; banda 2 507 pb], PDGFR-B [banda 3 338 pb; banda 4 382 pb]), verificando que representan el producto correcto. Un experimento control en paralelo sin utilizar ninguna transcriptasa inversa, solo la polimerasa taq, descartó bandas positivas falsas debidas a contaminación genómica.

Ejemplo 7: Efectos del PDGF-BB infundido i.c.v. en ratas lesionadas con 6-OHDA.

[0221] Se utilizó BDNF, que se ha demostrado anteriormente que aumenta la neurogénesis en el cerebro intacto normal (Pencea y col., 2001), como un compuesto de referencia. PDGF y BDNF aumentaron el número de células formadas recientemente en la sustancia negra y el cuerpo estriado a las 12 semanas después del tratamiento, tal como se detectó con la tinción de la BrdU. A las 5 semanas después del tratamiento, el fenotipado neuronal de las células etiquetadas con BrdU con NeuN en el cuerpo estriado desveló un aumento significativo en las neuronas regeneradas recientemente.

Animales y procedimientos quirúrgicos

[0222] Se llevaron a cabo la manipulación de animales y procedimientos quirúrgicos de acuerdo con los comités éticos y normativos mostrados por Jordbruksverket y la Universidad de Lund. Ratas Sprague-Dawley adultas hembras (B&K Universal AB) que pesaban 220 – 250 g, se alojaron en parejas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h con acceso libre al alimento y al agua. Para lesionar la sustancia negra, se fijaron las ratas en un marco estereotáxico y se inyectó 6-OHDA (3 mg en solución salina de ascorbato al 0,02 %, Sigma) a una tasa de 1 µl / min en 2 depósitos de 2 y 2,5 µl en el haz ascendente derecho del prosencéfalo mesostriatal en las siguientes coordenadas: 4,4 mm desde caudal al bregma, 1,2 mm desde lateral a línea media, 7,8 mm por debajo del duramen, 4,0 mm desde el caudal, 0,8 mm desde el lateral, 8,0 mm por debajo del duramen, respectivamente (Paxinos y Watson, 1998). Tres semanas después de las inyecciones de 6-OHDA, se evaluó la totalidad de la lesión con el test de rotación inducida por anfetamina. Se inyectó D-metilanfetamina (2,5 mg, i.p.) 5 min antes de colocar la rata en un rotómetro de embudo automatizado que midió el número de rotaciones durante 90 minutos. Las ratas que presentaron 5 vueltas contralaterales netas (con respecto al hemisferio lesionado) por min avanzaron a la siguiente fase del estudio para tener minibombas osmóticas implantadas.

[0223] Antes del implante, se precargó una minibomba osmótica modelo 2002 de Alzet (200 µl; caudal. 0,5 µl / h, 12 µl / día) con 200 µl de disolución del compuesto (véase a continuación) y se colocó en una disolución de NaCl (0,9 %) calentada en un baño de agua (37° C) 36 horas antes del implante. Se anestesiaron las ratas con halotano en una mezcla de óxido nítrico / oxígeno (70: 30) y se mantuvieron con halotano al 2 – 3 %. Para el implante, se colocaron las ratas en un marco estereotáxico y se colocó la cánula del kit II de infusión en cerebro de Alzet en el ventrículo lateral derecho (coordenadas: AP = -0,3 mm posterior al bregma, L = 11,5 desde el lateral a la sutura sagital, 4,5 desde el duramen; Paxinos y Watson, 1998), y se aseguró al cráneo con tornillos y cemento dental. A continuación se colocó la minibomba subcutáneamente en la región medioescapular. Se trató el cuero cabelludo con gel de lidocaína antes de suturar. Doce días después de la inserción, se anestesiaron las ratas brevemente con halotano a fin de retirar la bomba. Las bombas retiradas contenían el volumen de disolución restante y se registraron los pesos.

Factores de crecimiento y diseño experimental

[0224] Se investigaron los efectos de los PDGF-BB y BDNF infundidos tras las lesiones con 6-OHDA en 2 puntos temporales diferentes: a los 12 días o 5 semanas después de la inserción de la minibomba. Las ratas que recibieron PDGF-BB humano (nº de pedido 220-BB-050, 50 µg, R&D Systems) tuvieron cada una 36 ng / d de PDGF disuelto en PBS 0,1 M (3 µg / ml). Las ratas que recibieron BDNF recombinante humano (nº de pedido 248-BD-025; 25 µg, R&D Systems) tuvieron cada una 12 ng / d de BDNF disuelto en PBS 0,1 M (1 µg / ml). Se administró simultáneamente BrdU con la disolución del compuesto en las minibombas disolviendo esta en el medio PBS 0,1 M. Las ratas del control recibieron solo infusiones de BrdU / PBS.

Procesamiento del tejido e inmunohistoquímica

[0225] Se obtuvo tejido del cerebro anestesiando la rata y perfundiéndola transcardialmente con solución salina al 0,9 % seguido por paraformaldehído al 4 % (PFA). Se almacenó el PFA de los cerebros durante 2 horas, a continuación se transfirió a PBS con sacarosa al 20 % y se seccionó coronalmente en un microtomo deslizante con láminas de un espesor de 30 µm. se almacenaron las secciones de flotación libre en solución anticongelante de Walter a 4° C hasta la tinción.

[0226] Para detectar las células positivas para BrdU generadas recientemente, se incubaron secciones durante 30 min en HCl 2 M a 37° C para desnaturalizar el ADN, y se incubaron posteriormente en suero de bloqueo (suero normal de caballo al 5 % en PBS 0,1 M que contenía Triton X-100 al 0,25 % durante 1 h). Tras el bloqueo, se produjo la incubación de anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra BrdU (Harlan Sera Lab, Reino Unido) en disolución de bloqueo al 2 % a una dilución de 1: 100 a 4° C durante 36 horas. A continuación se incubaron las secciones con anticuerpo de biotina-caballo dirigido contra Ig de ratón (1: 200) (Vector, CA) en disolución de bloqueo durante 2 horas y se visualizó con el kit DAB-NiCl Vectastain Elite. El procedimiento para el doble etiquetado de BrdU con NeuN o TH fue similar, excepto por que se incubó un anticuerpo monoclonal de rata dirigido contra BrdU (1: 100; Sigma, Suecia) tanto con un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra NeuN (1: 100; Chemicon, EE.UU.) como con un anticuerpo monoclonal dirigido contra TH (1: 1000; Peelfreeze) en la disolución de bloqueo al 2 % adecuada en la oscuridad durante 36 a 48 horas. Para la visualización inmunofluorescente, se incubaron las secciones en anticuerpos secundarios: anticuerpo de burro conjugado con Cy3 dirigido contra Ig de rata (1: 200; Jackson ImmunoResearch, PA) para la BrdU; un anticuerpo de caballo biotinilado dirigido contra Ig de ratón (1: 200; BA2001, Vector, CA) para NeuN; y un anticuerpo de cabra conjugado con FITC dirigido contra Ig de rata (1: 200;) para TH. Tras 2 horas de incubación a temperatura ambiente, se necesitó una incubación adicional de 2 h con anticuerpo secundario de cabra conjugado con Alex Fluor 488 dirigido contra Ig de ratón (1: 200; Molecular Probes, Países Bajos) para NeuN. Todas las secciones se montaron sobre portas de vidrio y cubres deslizantes con medio de montaje Prolong Antifade (Molecular Probes).

Análisis cuantitativos

[0227] Se llevaron a cabo todos los análisis por un observador ciego para las condiciones de tratamiento. En la sustancia negra, se determinó el número de células etiquetadas con BrdU con microscopio de epifluorescencia convencional u óptico con un objetivo de 40x. Se contaron todas las células bilateralmente a partir de 5 a 7 secciones coronales por rata, localizadas entre 4,8 a 6,0 mm posteriores al bregma. Todos los recuentos se combinaron juntos para cada rata y se notificaron como número promedio de células por sustancia negra lesionada.

[0228] En el cuerpo estriado, se determinó el número de células etiquetadas con BrdU utilizando un número estereológico de células y las estimaciones de volumen. Se analizaron tres secciones, tomadas a partir de 10 series en paralelo de secciones coronales con un grosor de 30 µm localizadas entre 1,6 mm desde anterior a 0,2 mm desde posterior al bregma, de cada rata. Se empleó un procedimiento fraccionador óptico modificado (Gundersen&Jensen1987), con un objetivo de 40 x ajustado en un microscopio BH-2 de Olympus, un motor de avance gradual en X-Y-Z controlado por un ordenador, una cámara de video en color CCD-IRIS, y un software CAST-GRID (Olympus, Dinamarca). Para el muestreo sistemático, se ajustaron el área del marco y el intervalo de recuento para permitir que se muestrearan al menos 200 células por cada región de interés. El diseccionador óptico se configuró para muestrear todas la células por debajo de los primeros 2 µm de la superficie de la sección.

[0229] Para los grupos con tiempo de retardo más largo (5 semanas), se evaluó la localización simultánea de células positivas para BrdU con TH en la sustancia negra, y NeuN en el cuerpo estriado, utilizando un microscopio óptico confocal de barrido (microscopio DM IRE3 de Leica, Leica Confocal Software Versión 2.77). se analizaron cincuenta células procedentes del hemisferio lesionado por cada rata, procedentes de las mismas regiones en las que se llevaron a cabo los recuentos de células positivas para BrdU.

[0230] Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante ANOVA, con el conjunto alfa a 0,05.

Células recientemente generadas en el cuerpo estriado

[0231] Se observaron números sustanciales de células etiquetadas con BrdU en el cuerpo estriado denervado con 6-OHDA (27 veces mayor que el hemisferio no lesionado). El tratamiento con PDGF y BDNF elevó significativamente el número de células etiquetadas con BrdU en el cuerpo estriado denervado en comparación con la infusión de PBS (FIG. 13), sin diferencias entre los dos factores de crecimiento (FIG. 14). Estos aumentos significativos en el número de células se observaron principalmente a los 12 días después de la infusión, de tal manera que únicamente las ratas tratadas con BDNF presentaron significativos aumentos a las 5 semanas. En la semana 5, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la proporción de neuronas generadas recientemente, de tal forma que el 15,3 % de ratas tratadas con PBS, el 16,6 % de ratas tratadas con BDNF, y el 20,9 % de ratas tratadas con PDGF tenían células positivas para BrdU en el cuerpo estriado etiquetadas simultáneamente con NeuN. De forma importante, cuando se estimaron las células doblemente etiquetadas con BrdU / NeuN, se encontró que el tratamiento con

PDGF y BDNF había generado significativamente más neuronas (FIG. 15).

Células generadas recientemente en la sustancia negra

[0232] Se observaron números sustanciales de células etiquetadas con BrdU en la sustancia negra lesionada y sin lesionar; sin embargo, el hemisferio lesionado tuvo significativamente más células (30 % sobre el lado sin lesionar). A pesar de que las infusiones de los factores de crecimiento se realizan en el ventrículo lateral (en una distancia de 5 mm desde la sustancia negra), el tratamiento con PDGF y BDNF elevó significativamente el número de células etiquetadas con BrdU en la sustancia negra lesionada en comparación con el tratamiento con PBS, sin diferencias entre los dos factores de crecimiento (FIG. 16). Estos significativos aumentos en el número de células se observaron únicamente a los 12 días después de la infusión, y no a las 5 semanas.

[0233] Globalmente, se encontró que la administración de PDGF a un cerebro dañado puede inducir que las células formadas recientemente migren y se diferencien en neuronas en el cuerpo estriado denervado, y potencialmente también en la sustancia negra dañada. Estos prometedores resultados apoyan el uso terapéutico de PDGF para restaurar la pérdida de neuronas en la enfermedad de Parkinson.

Ejemplo 8: Localización del receptor Flk-1 de VEGF en la pared del ventrículo del cerebro adulto.

[0234] La FIG. 17 representa gráficamente la neurogénesis en el hipocampo, que está caracterizada por agrupaciones proliferativas de células a lo largo del límite entre la capa celular granulosa (g) y la región del hilo (h). Estas células comienzan a migrar en la capa de células granulosas aproximadamente 1 semana después de su última división celular y se pueden etiquetar simultáneamente con marcadores de células granulosas (*por ejemplo*, NeuN y Calbindina). El receptor Flk-1 de VEGF se expresa mucho en el giro dentado lateral y en la pared del ventrículo (FIGS. 18 y 19, respectivamente). La inmunotinción sugirió la localización en la capa endimaria (FIGS. 18 y 19). Las células endimarias expresan también Notch-1, que juega un importante papel en la determinación del destino neural de las células ectodérmicas (Johansson y col., 1999). Las células endimarias individuales aisladas pueden formar neurocitoblastos (neuroesferas) en cultivo (Johansson y col., 1999).

Ejemplo 9: Estimulación de la neurogénesis en adultos mediante la infusión de VEGF.

[0235] En un primer experimento se había demostrado que la producción neuronal en el hipocampo de adulto se estimulaba mediante la infusión de VEGF en el ventrículo lateral. Aquí, las células en proliferación se etiquetaron con BrdU durante 7 días de infusión continua de BDGF. Durante cuatro semanas más, cuando las células recién nacidas se habían diferenciado en células granulosas, se observó un marcado aumento de células etiquetadas con BrdU en el giro dentado (FIG. 20). Se puede inferir a partir de este resultado que VEGF es un potente activador de la neurogénesis en el cerebro adulto.

Ejemplo 10: Expresión de VEGF y Flk-1 en cultivos de neurocitoblastos.

[0236] Con el fin de analizar las consecuencias funcionales de la estimulación de VEGF en el cultivo, es importante saber si Flk-1 se expresa en cultivos de neurocitoblastos. Utilizando la RT-PCR, los inventores fueron capaces recientemente de demostrar que los cultivos de neurocitoblastos (neuroesferas) procedentes de la pared del ventrículo y del hipocampo expresan el ARNm del VEGF (FIG. 21) y el ARNm del Flk-1 (FIG. 22). Además, se detectó la liberación del VEGF mediante el ensayo ELISA (FIG. 23). Este resultado demuestra que VEGF tiene una función autocrina en los cultivos de neurocitoblastos. En la FIG. 21, se describió, utilizando la RT-PCR, que las isoformas del VEGF se expresan mediante neuroesferas cuando se cultivan en presencia de EGF y FGF. Se utilizó GAPDH como control de calidad del ARNm.

Ejemplo 11: VEGF en cultivos de neurocitoblastos.

[0237] Se prepararon neurocitoblastos de acuerdo con el protocolo adjunto. Se hicieron crecer las células en medio exento de suero, se subclonaron y se utilizaron entre el pase 6 y el 10. Si no se mencionó de otra forma, los experimentos consistieron en tripletes para análisis y se repitieron de forma independiente al menos 3 veces.

Medio basal: Medio Neurobasal (NB, Gibco BRL) y suplemento B27 (Gibco BRL).

Medio de crecimiento: NB, suplemento B27 + 20 ng / ml de FGF-2 (R&D Systems) + 20 ng / ml de EGF (R&D Systems) + 2 µg / ml de heparina (Sigma, Alemania).

Se plaquearon las células en medio de crecimiento a 10.000 células / ml y después de 2 días se cambiaron a la condición experimental. Se mantuvieron las células bajo la condición experimental durante 7 días.

Se utilizó **VEGF** (VEGF164 recombinante de ratón) a 50 ng / ml.

Inhibidor PADQ del receptor de VEGF (4-[(4-Cloro-2-fluoro)fenilamino-6,7-dimetoxiquinazolina, Calbiochem): Un

potente inhibidor de la actividad tirosina cinasa del receptor del VEGF (Flt-1 y Flk-1). CI_{50} = 2,0 mM y 0,1 mM para Flt-1 y Flk-1, respectivamente.

Se utilizó el inhibidor de VEGFR a 100 nM (CI_{50} para flk-1)

Inhibidor SU1498 del receptor de VEGF - (E)-3- (3,5-Diisopropil-4-hidroxifenil)-2-[(3-fenil-n-propil)amino-carbonil] acrilonitrilo (Calbiochem): Un potente y selectivo inhibidor de la cinasa Flk-1 del receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (CI_{50} = 700 nM)

SU1498 tuvo solo un débil efecto inhibidor sobre las cinasas del receptor de PDGF (CI_{50} > 50 mM) y el receptor de EGF (CI_{50} > 100 mM) y HER2 (CI_{50} > 100 mM).

Se utilizó SU1498 a 700 nM (CI_{50} para Flk-1)

Procedimientos de cultivo celular

Cultivos celulares primarios para el crecimiento de esferas de neurocitoblastos a partir de la pared del ventrículo lateral de adulto

[0238] Ratas Fischer-344 hembra adultas (3-4 meses, Charles River, Alemania) se sacrificaron mediante dislocación cervical, se retiraron los cerebros de cada rata y se almacenaron a 4° C en DPBS (PAN, Alemania) con 4,5 g / l de glucosa (Merck, Alemania) (DPBS / glu). Se retiraron las meninges y los vasos sanguíneos que sobresalían. Se retiró asépticamente la zona endimaria que incluía la zona subependimaria / subventricular de la pared lateral del ventrículo lateral. El tejido diseccionado se transfirió al DPBS / glu reciente, se lavó una vez, se transfirió a una placa petri y se disoció mecánicamente en una suspensión de células individuales. La suspensión celular se lavó en DPBS / glu con el fin de eliminar la sangre en exceso mediante enjuagado y se volvió a suspender en disolución de PPD que contenía papaína al 0,01 % (Worthington Biochemicals, Inglaterra), dispasa II al 0,1 % (Boehringer, Alemania), ADNasa I al 0,01 % (Worthington Biochemicals, Inglaterra) y $MgSO_4$ 12,4 mM en HBSS (PAN, Alemania) sin Mg^{++} / Ca^{++} (PAA, Alemania) y se digirió durante 30 a 40 min a temperatura ambiente. La disolución de células se trituró cada 10 min. Las células disociadas se recogieron y se volvieron a suspender en medio DMEM / F12 exento de suero que contenía L-glutamina 2 mM y 0,1 g / l de penicilina / estreptomina y se lavaron tres veces con una precisa trituración con una punta azul. Finalmente, la suspensión de células individuales se volvió a suspender en medio Neurobasal (Gibco BRL, Alemania) suplementado con B27 (Gibco BRL, Alemania) (NB / B27), L-glutamina 2 mM (PAN, Alemania), 0,1 g / l de penicilina / estreptomina (PAN, Alemania), 2 µg / ml de heparina (Sigma, Alemania), 20 ng / ml de bFGF-2 (R&D Systems, Alemania) y 20 ng / ml de EGF (R&D Systems, Alemania). Se contaron las células vivas mediante el ensayo de exclusión con azul tripán en un hemocitómetro. Se sembraron las células en matraces de cultivo T-25 y se mantuvieron los cultivos a 37° C en una estufa incubadora con un 95 % de aire, 5 % de CO_2 . Las células individuales comenzaron a formar esferas en los 5 a 7 días del cultivo de la suspensión y continuaron creciendo en masa y número durante las siguientes semanas. Se cambiaron los medios cada 7 días.

Pase de células

[0239] El medio de cultivo que contenía las neuroesferas en flotación se recogió en un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugó a 800 rpm. El aglomerado se volvió a suspender en 200 µl de Accutase (Innovative Cell Technologies Inc., EE.UU., distribuido por PAA, Alemania) y se trituró aproximadamente 10 veces utilizando una pipeta. A continuación, se incubó la suspensión celular a 37° C durante 10 min. Las esferas disociadas se trituraron de nuevo y se volvieron a suspender en 800 µl de medio NB / B27. Se contó una alícuota mediante el ensayo de exclusión del azul tripán en un hemocitómetro para determinar la cantidad de células vivas y muertas. Se plaquearon 1×10^5 células en matraces de cultivo T75 durante un pase a largo plazo (10 ml de medio de cultivo por matraz) en medio NB / B27. Las células obtenidas después del tratamiento con Accutase de las neuroesferas primarias proliferaron y dieron como resultado neuroesferas secundarias. Las neuroesferas secundarias se pasaron 7 a 9 días después del plaqueo de las células de las neuroesferas primarias. De forma similar a los cultivos primarios y a las neuroesferas primarias, las células individuales obtenidas después de la disociación de las neuroesferas secundarias proliferaron y dieron como resultado neuroesferas terciarias.

Ensayo de proliferación

[0240] Se utilizaron diversos medios y suplementos para estudiar las condiciones más óptimas para los cultivos de neurocitoblastos. El medio Neurobasal (Gibco BRL, Alemania) o el medio DMEM / F12 (1: 1) (PAN, Alemania) se suplementaron tanto con B27 (Gibco BRL, Alemania), N2 (Gibco BRL, Alemania), como con BIT9500 (StemCell Technologies Inc., Canadá). Se añadieron lipoproteínas humanas de baja densidad (LDL, Sigma, Alemania) a los medios que contenían BIT9500 hasta una concentración final de 40 µg / µl de acuerdo con el fabricante. Todos los medios contenían L-glutamina 2 mM, 0,1 µ / l de penicilina / estreptomina, 2 µg / ml de heparina (Sigma, Alemania), 20 ng / ml de bGFG (R&D Systems, Alemania), y 20 ng / ml de EGF (R&D Systems, Alemania). En el día 7 se contaron las neuroesferas en crecimiento, se disociaron mediante Accutase y se contaron las células vivas mediante

el ensayo de exclusión con azul tripán en un hemocitómetro.

ELISA BrdU

- 5 [0241] Se plaquearon neurocitoblastos a 10000 células / ml y se cultivaron durante 7 días, durante los cuales se añadieron VEGF, PADQ o SU 1498 en días alternos. 24 horas antes del aislamiento del ADN las células se sometieron a pulso con BrdU 5 μ M. Se recuperaron las células y se volvieron a suspender en 200 μ l de PBS. Después del tratamiento con 4 μ l de ARNasa (100 mg / ml, Roche), se aisló el ADN utilizando el KIT DNeasy (Qiagen). Tras determinar la concentración, se trató el ADN con NaOH 0,25 M durante 30 min, seguido de HCl 0,25 M y tamponamiento con KH_2PO_4 0,2 M (pH 7). Se transfirió el ADN a placas de 96 pocillos (DNA Binding Plates, Costar) en una serie de concentraciones que comenzaba a 2 ng / μ l y se incubaron durante la noche en presencia de Na_2HPO_4 50 mM. Tras lavar en PBS, se bloqueó la unión no específica en los pocillos con BSA / PBS al 3 % durante 30 min. Con lavados intermitentes en PBS, se incubó un anticuerpo de ratón dirigido contra BrdU (Roche-Boehringer, 1: 500) durante 1 h, seguido por la incubación con anticuerpo de burro dirigido contra POD de ratón (Jackson, 1: 1000) durante 1 h. Tras enjuagar con PBS se aplicó reactivo OPD de desarrollo durante 1 h y se determinó la densidad óptica a 450 nm.

Cultivos derivados clonalmente

- 20 [0242] Se analizó el efecto *in vitro* del VEGF utilizando neurocitoblastos aislados procedentes de la pared del ventrículo lateral del cerebro de rata adulta. Se derivaron los datos *in vitro* notificados anteriormente sobre VEGF de cultivos primarios. Se ha repetido ahora el análisis y se extendió utilizando neurocitoblastos derivados clonalmente, excluyendo de esta manera la posibilidad de que VEGF actúe sobre células no derivadas de citoblastos que podrían estar presentes en la preparación de células primarias. Estos citoblastos derivados clonalmente son histocitoblastos y producen los tres tipos principales de células del cerebro: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Figura 26).

Estimulación de VEGF en cultivos de neurocitoblastos

- 30 [0243] VEGF tiene un efecto estimulador dependiente de la dosis sobre la proliferación de neurocitoblastos procedentes del cerebro de rata adulta (FIG. 24). Debido a que VEGF puede actuar mediante diversos receptores, se compararon dos isoformas de VEGF, que tenían diferentes afinidades por el receptor. VEGF-A₁₆₅ puede unirse a flk-1, flt-1 y neuropilina-1, mientras que VEGF-A₁₂ puede unirse únicamente al receptor Flk-1. Ambas isoformas mostraron una significativa estimulación de los cultivos de neurocitoblastos, sugiriendo que el efecto de potenciación de la proliferación del VEGF en cultivos de neurocitoblastos está mediado principalmente por la señalización de Flk-1 (FIG. 25).

Efectos del VEGF sobre la expansión de neurocitoblastos

- 40 [0244] Cuando se añadió VEGF al medio de crecimiento que ya contenía EGF y FGF-2 como mitógenos, se observó un aumento de 2,5 veces en el número de células después de 7 días. La DE50 está en el intervalo de 10 ng / ml y se alcanzó la estimulación máxima a 50 ng / ml / FIG. 27). VEGF es por tanto un potente cofactor para la expansión de los cultivos de neurocitoblastos.

- 45 [0245] Cuando se añadió VEGF al medio basal, se detectó un aumento de 5 veces en el número de células después de 7 días (FIG. 28, panel izquierdo). Dos inhibidores de la tirosina cinasa del receptor del VEGF fueron eficaces en el bloqueo del efecto del VEGF a su concentración DE50 respectiva para Flk-1 (FIG. 28, panel izquierdo). Estos compuestos se utilizaron a la concentración a la cual bloquean específicamente el receptor Flk-1 del VEGF. En condiciones de crecimiento (Medio basal + EGF + FGF-2 + heparina), los antagonistas del receptor del VEGF fueron también capaces de bloquear el efecto del VEGF aplicado de forma exógena (FIG. 28, panel derecho).

Expresión y liberación del VEGF endógeno

- 55 [0246] Se había demostrado anteriormente que Flk-1 se expresaba en cultivos de neurocitoblastos. Cuando se determina la expresión y la liberación del VEGF en el medio de cultivo de cultivos de neurocitoblastos derivados clonalmente (Figura 29) se ha encontrado que los neurocitoblastos de ratas son una prometedora fuente de VEGF en comparación con otros tipos de células, que se sabe que expresan VEGF. Las células HUVEC necesitan aproximadamente 8 días para producir la misma cantidad de VEGF y las células epiteliales del pigmento retinoide humano produjeron bastante menos.

- 60 [0247] Debido a que Flk-1 está presente y VEGF se libera espontáneamente en el medio por los neurocitoblastos, se ha ensayado si VEGF y su receptor Flak- juegan un papel endógeno en la expansión de cultivos de neurocitoblastos. Cuando se añadieron inhibidores del receptor VEGF al medio de crecimiento que contenía EGF y FGF-2 recombinantes, pero no VEGF recombinante, se observó una tasa de crecimiento reducido del 30 % (FIG. 30). Estos datos sugieren que EGF y FGF-2 ejercen su capacidad para expandir los cultivos de neurocitoblastos en parte mediante la producción y liberación del VEGF.

Mecanismo de acción del VEGF *in vivo*

[0248] A fin de determinar si el aumento en la expansión de los cultivos de neurocitoblastos con VEGF es debida a un aumento de la proliferación o a una reducción de la muerte celular, se analizaron neurocitoblastos mediante un ELISA de proliferación (véanse los detalles experimentales) y un ELISA de apoptosis (ELISA para la detección de la muerte celular, Roche Applied Sciences) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Las células que crecían en presencia de VEGF incorporaron más BrdU y, en presencia de los bloqueantes del receptor del VEGF, menos BrdU (FIG. 31), sugiriendo que VEGF estimula la proliferación *in vitro*.

[0249] Sin embargo, utilizando un ELISA de apoptosis, se detectó también una actividad antiapoptótica, debido a que VEGF redujo la cantidad de roturas de la hebra de ADN, un hito de la muerte celular apoptótica, mientras que el bloqueante de VEGFR aumentó las roturas de la hebra (FIG. 32).

[0250] VEGF puede ejercer un efecto proliferativo y promotor de la supervivencia. FGF-2 había demostrado anteriormente promover la supervivencia neuronal a una concentración más baja (0,5 – 1 ng / ml) y promover la proliferación de neurocitoblastos y células progenitoras a una concentración mayor (10 – 20 ng / ml, véase Ray y col., 1993 90: 3602 – 3606). VEGF podría actuar de una manera dependiente de la dosis similar.

Eficacia aumentada para generar cultivos de neurocitoblastos tras la infusión de VEGF

[0251] Se infundió VEGF en el ventrículo lateral de ratas adultas. Tras aislar y sembrar células procedentes de la pared del ventrículo lateral con el fin de establecer cultivos de neurocitoblastos, el número de esferas que se formó después de algunas semanas aumentó significativamente en cultivos procedentes de animales tratados con VEGF en comparación con los controles de aCSF (FIG. 33)

[0252] Globalmente, los resultados demostraron que VEGF y el receptor Flk-1 de VEGF se expresaron *in vivo* con una estrecha relación espacial en los sitios de la neurogénesis. VEGF y el receptor Flk-1 de VEGF se expresaron *in vitro* en cultivos de neurocitoblastos derivados clonalmente. VEGF aumentó la generación de nuevas neuronas *in vivo* y la expansión de neurocitoblastos *in vitro*. El bloqueo de la ruta de señalización del receptor del VEGF endógeno disminuyó la capacidad de expansión de los cultivos de neurocitoblastos. La proliferación, así como la supervivencia celular se promovieron mediante VEGF y se redujeron tras el bloqueo de la señalización del receptor del VEGF. Se concluyó, por tanto, que el VEGF producido de forma endógena actúa de manera auto o paracrina para promover el crecimiento / supervivencia de neurocitoblastos y células progenitoras *in vitro* y la generación de neuronas *in vivo*.

Ejemplo 11: Expresión en neurocitoblastos.**Cultivos de citoblastos humanos (HSC)**

[0253] Se tomó una biopsia procedente de la pared lateral anterior del ventrículo lateral de un paciente humano adulto y se disoció enzimáticamente en papaína, dispasa y ADNasa I en DMEM que contenía 4,5 mg / ml de glucosa y 37° C durante 20 min. Las células se trituraron suavemente y se mezclaron con tres volúmenes de medio de plaqueo de citoblastos humanos (HSCPM) (DMEM / F12; FBS al 10 %). Se aglomeraron las células a 250 x g durante 5 min. El sobrenadante se eliminó posteriormente y las células se volvieron a suspender en HSCPM, se plaquearon en placas de cultivo revestidas con fibronectina y se incubaron a 37° C en CO₂ al 5 %. Al día siguiente se inició la expansión del cultivo mediante el cambio de los medios a los medios de cultivo para HSC (DMEM / F12; BIT 9500; 20 ng / ml de EGF; 20 ng / ml de FGF2). Los HSC se dividieron utilizando tripsina y EDTA en condiciones normalizadas. Se añadió posteriormente FBS para inhibir la reacción y se recogieron las células mediante centrifugación a 250 x g durante 5 min. Se volvieron a plaquear los HSC en medio de cultivo HSC.

RT-PCR

[0254] Las siguientes parejas de cebadores se diseñaron para identificar específicamente la presencia de la expresión de los genes *vegf*, *flt-1*, *flt-4*, y *flk-1* en cultivos HSC. Se proporcionan a continuación los tamaños de bandas estimados para cada pareja de cebador:

		Tamaño de la banda (pares de bases)
VEGF	ttgggtgcattggagccttg (SEQ ID NO: 17)	327
	tggccttggtgaggttgatc (SEQ ID NO: 18)	
	ttgggtgcattggagccttg (SEQ ID NO: 19)	434
	tgaagcaagccacagggat (SEQ ID NO: 20)	
FLT-1	agatgtccaataagcacaccacgc (SEQ ID NO: 21)	347
	ttcaagcacctgctgttttcga (SEQ ID NO: 22)	

	agatgtccaaataagcacaccacgc (SEQ ID NO: 23)	470
	ccacgagtcaaatacgagcagatt (SEQ ID NO: 24)	
FLT-4	catccagctgttgcccagga (SEQ ID NO: 25)	378
	ttcacgggcagcttcaccag (SEQ ID NO: 26)	
FLK-1	atgatgtggttctgagtcctgtca (SEQ ID NO: 27)	409
	gggggtgggtaaccaaggtactt (SEQ ID NO: 28)	
	atgatgtggttctgagtcctgtca (SEQ ID NO: 29)	476
	catgccccgcttaattgtgtg (SEQ ID NO: 30)	

[0255] Se prepararon citoblastos humanos y se cultivaron tal como se ha indicado anteriormente. Se aisló el ARN total utilizando el Mini Kit RNeasy de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se trató con ADNasa utilizando DNasa I de Ambion y de acuerdo con el protocolo. Se utilizó el Kit de la RT-PCR en una etapa de Life Technology para detectar la presencia del ARNm de *vegf*, *flt-1*, *flt-4* y *flk-1*. De forma breve, se utilizaron 100 ng del ARN total en cada reacción, con una temperatura de hibridación de 54° C. Para asegurar adicionalmente que la contaminación genómica del ARN total no proporciona un aumento de los resultados falsos positivos, se llevó a cabo una reacción idéntica en la que la mezcla de la polimerasa RT-polimerasa taq se sustituyó solo por polimerasa taq y se analizó en paralelo con la RT-PCR. Las reacciones se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1,5 % que contenía bromuro de etidio y se visualizaron las bandas bajo luz UV.

Los genes VEGF y FLT-4 se expresan en neurocitoblastos humanos cultivados

[0256] Se llevó a cabo la RT-PCR sobre ARN total preparado a partir de HSC cultivados usando parejas de cebadores específicos de los genes anteriores. Las bandas indicadas con una flecha blanca corresponden a las bandas del tamaño deseado (VEGF [banda 1, 372 pb; banda 2, 434 pb], FLT-4 [banda 3, 378 pb]), verificando que representan el producto correcto (FIG. 34). Un experimento control en paralelo sin utilizar ninguna transcriptasa inversa, únicamente polimerasa taq, desarrolló bandas de falsos positivos debidas a contaminación genómica (no se muestran los datos).

Los genes FLT-1 y FLK-1 se expresan en neurocitoblastos humanos controlados

[0257] Se llevó a cabo la RT-PCR sobre ARN total preparado a partir de HSC cultivados utilizando parejas de cebadores específico para los genes anteriores. Las bandas indicadas con una flecha corresponden a las bandas del tamaño deseado (FLT-1 [banda 2, 470 pb], FLK-1 [banda 4, 476 pb]), verificando que representan el producto correcto (FIG. 35).

[0258] Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de dilucidar utilizando solamente experimentación rutinaria muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas concretamente en la presente memoria descriptiva. Se pretende que dichos equivalentes se encuentren abarcados por el alcance de las siguientes reivindicaciones:

REIVINDICACIONES

1. PDGF-BB humano para uso en el tratamiento mediante infusión intraventricular de la enfermedad de Parkinson o los trastornos parkinsonianos en un paciente.
5
2. PDGF-BB humano para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en una cantidad de 0,1 ng / kg / día a 1 µg / kg / día.
3. PDGF-BB humano para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en una cantidad de 0,5 ng / kg / día a 500 ng / kg / día.
10
4. PDGF-BB humano para uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicho medicamento induce la diferenciación, migración, proliferación, o supervivencia de los neurocitoblastos o de los hemocitoblastos neurales en dicho paciente.
15

FIG. 1

Efecto sobre las esferas

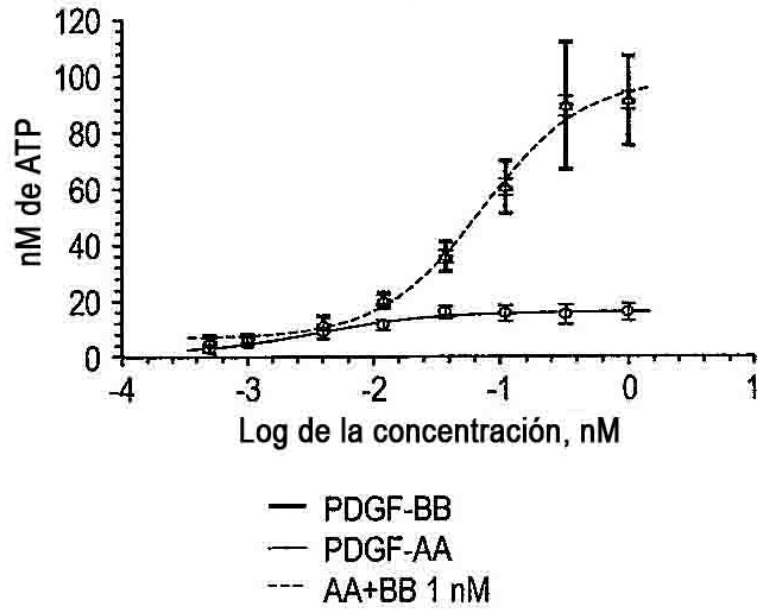


FIG. 2

Efecto en las células adherentes

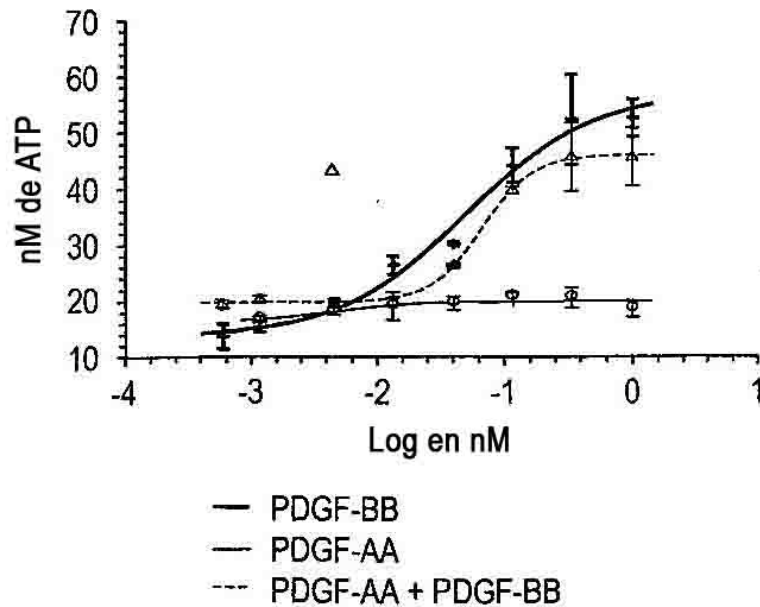


FIG. 3A

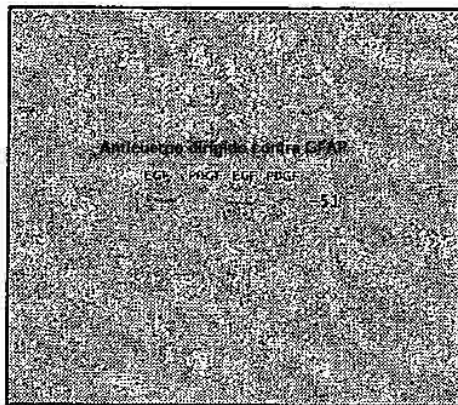


FIG. 3B

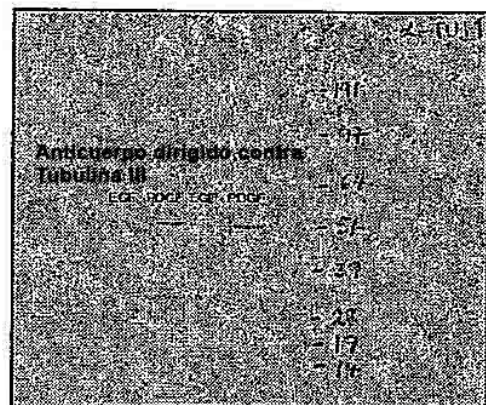


FIG. 4A

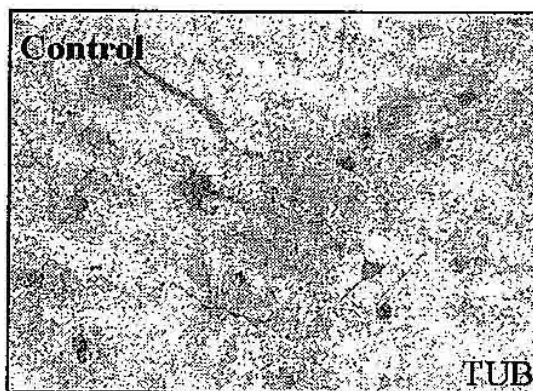


FIG. 4B

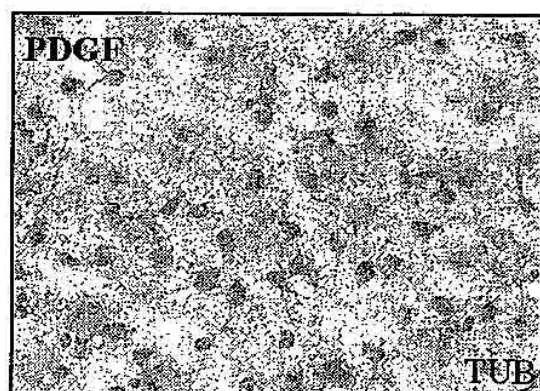


FIG. 4C

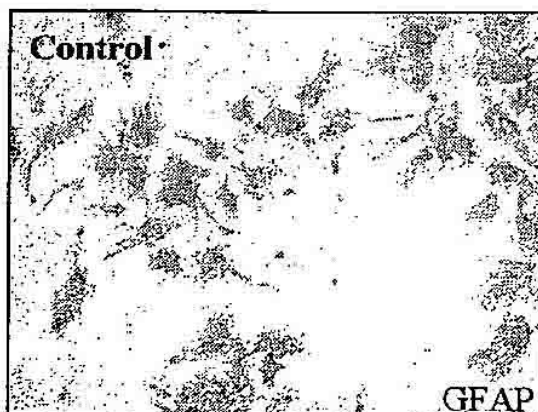


FIG. 4D

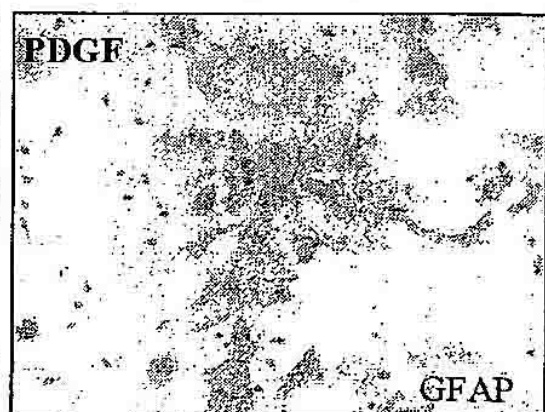


FIG. 5A



FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 6

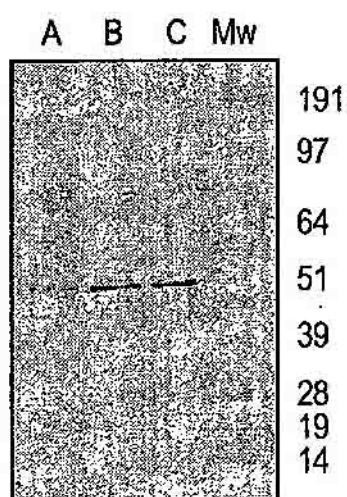


FIG. 7

Células positivas para BrdU en el giro dentado (promedio +/- sem)

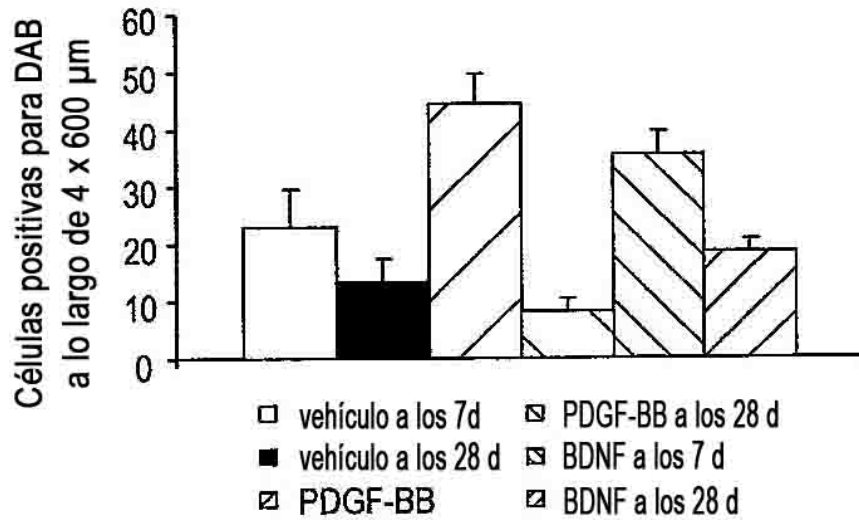


FIG. 8

Células positivas para BrdU en el cuerpo estriado, a los 28 días

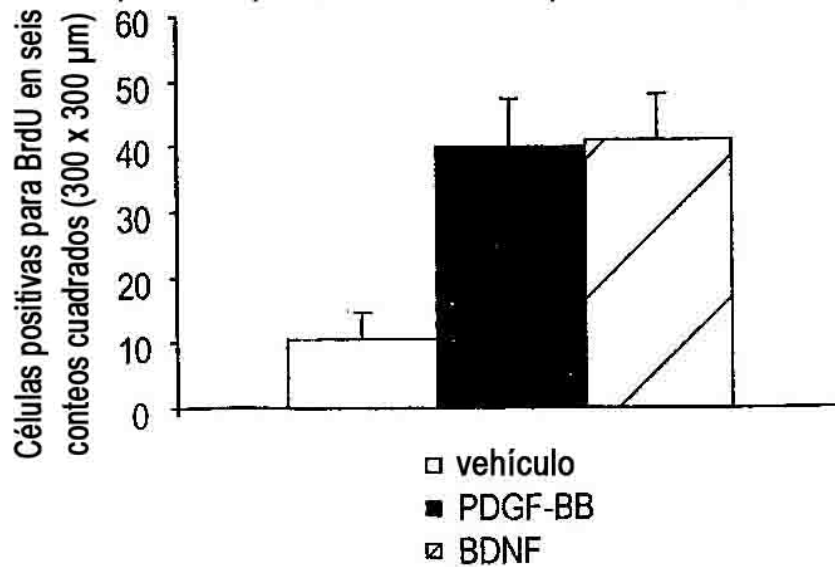


FIG. 9

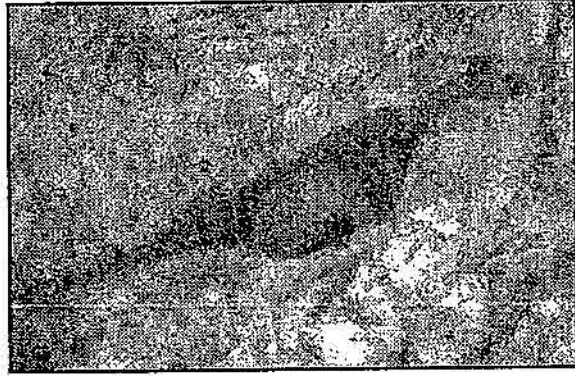


FIG. 10



FIG. 11

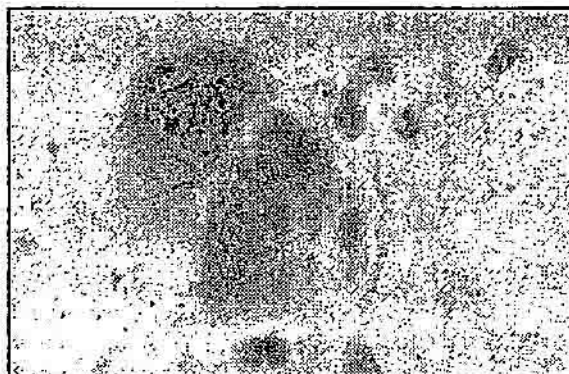


FIG. 12

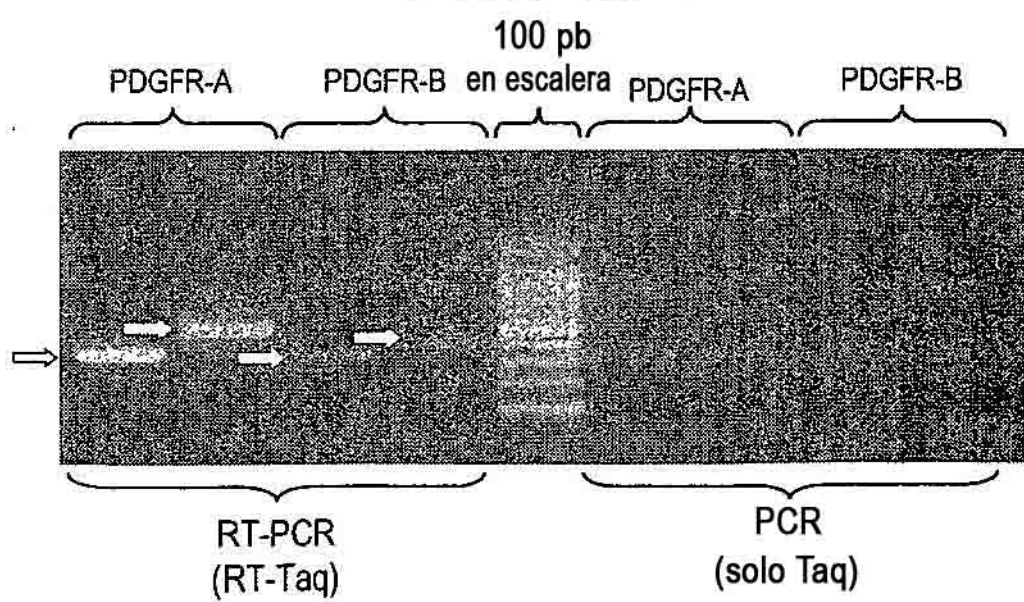


FIG. 13A

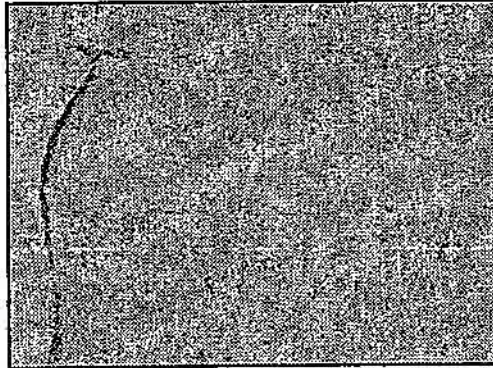


FIG. 13B

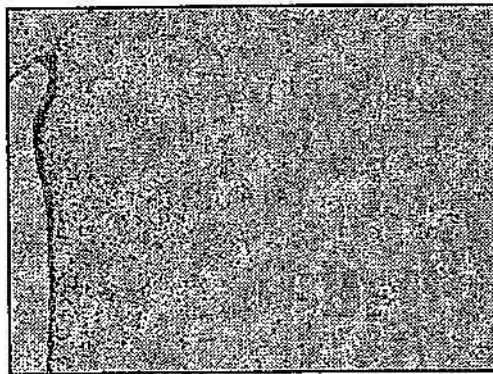


FIG. 14

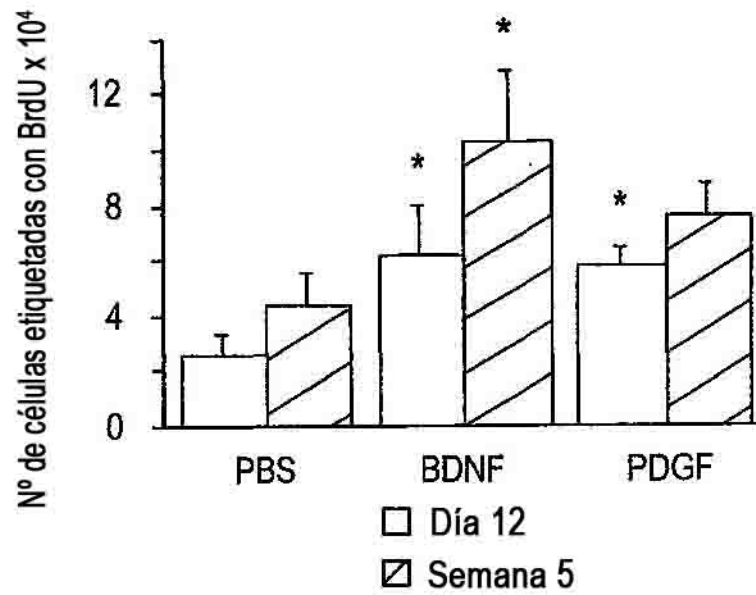


FIG. 15

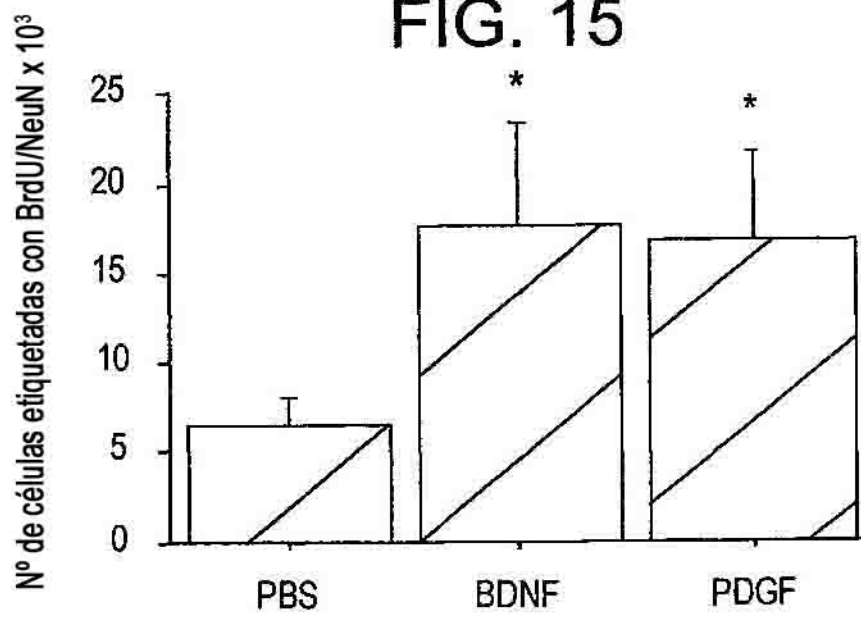


FIG. 16

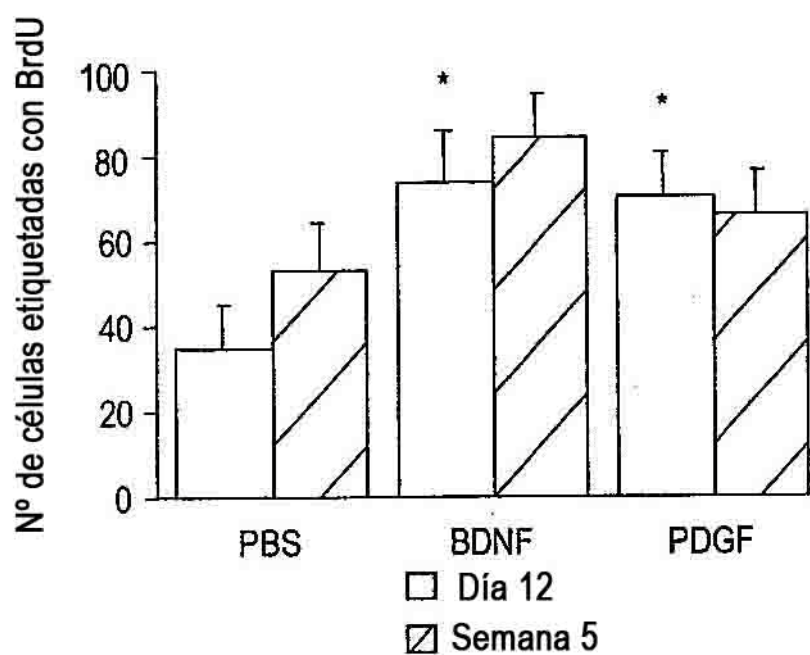


FIG. 17

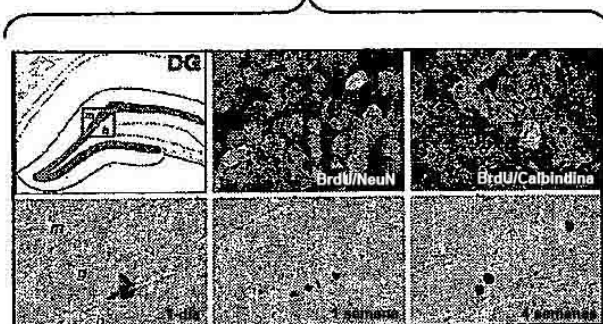


FIG. 18A

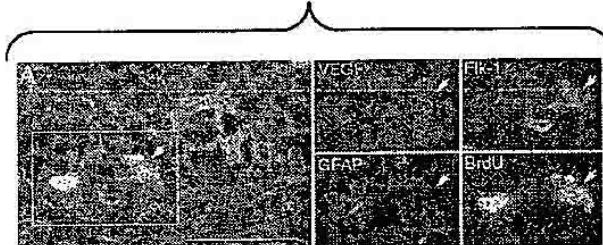


FIG. 18B

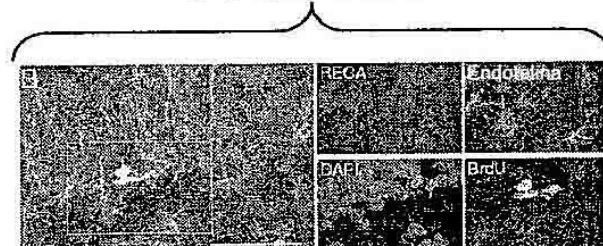


FIG. 19

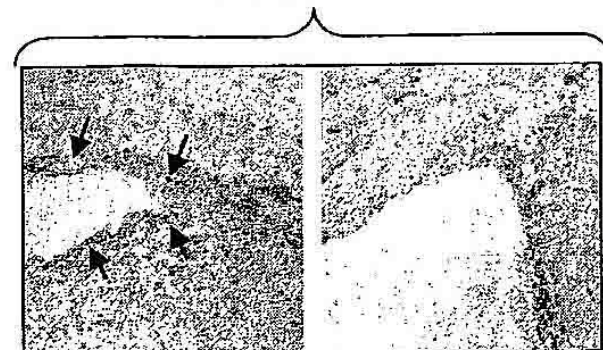


FIG. 20

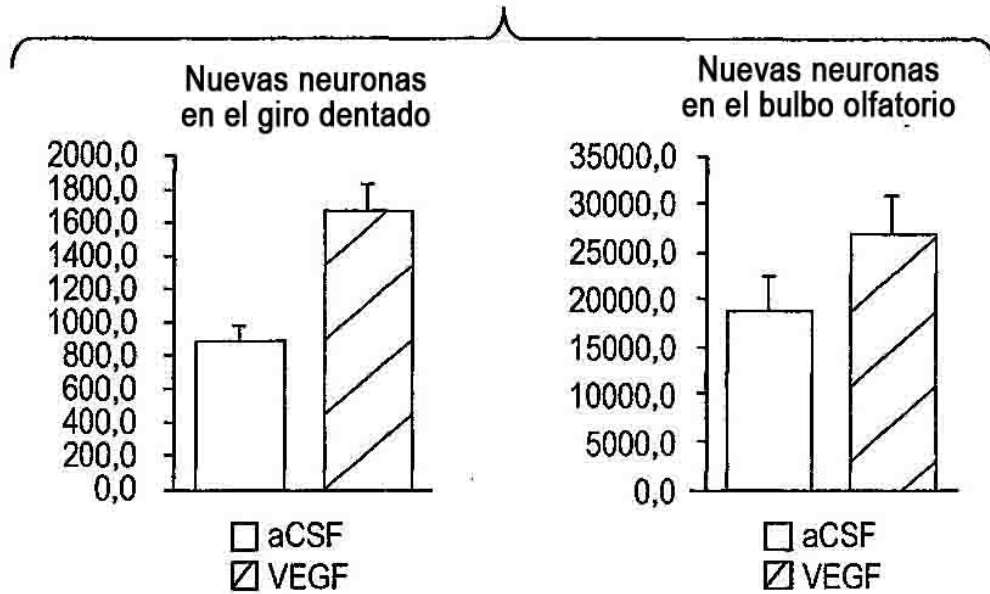


FIG. 21

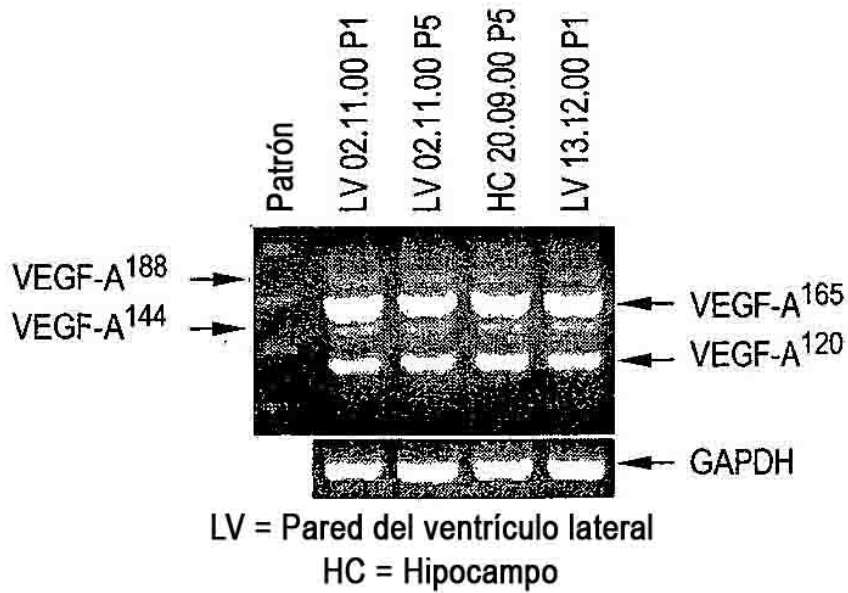


FIG. 22

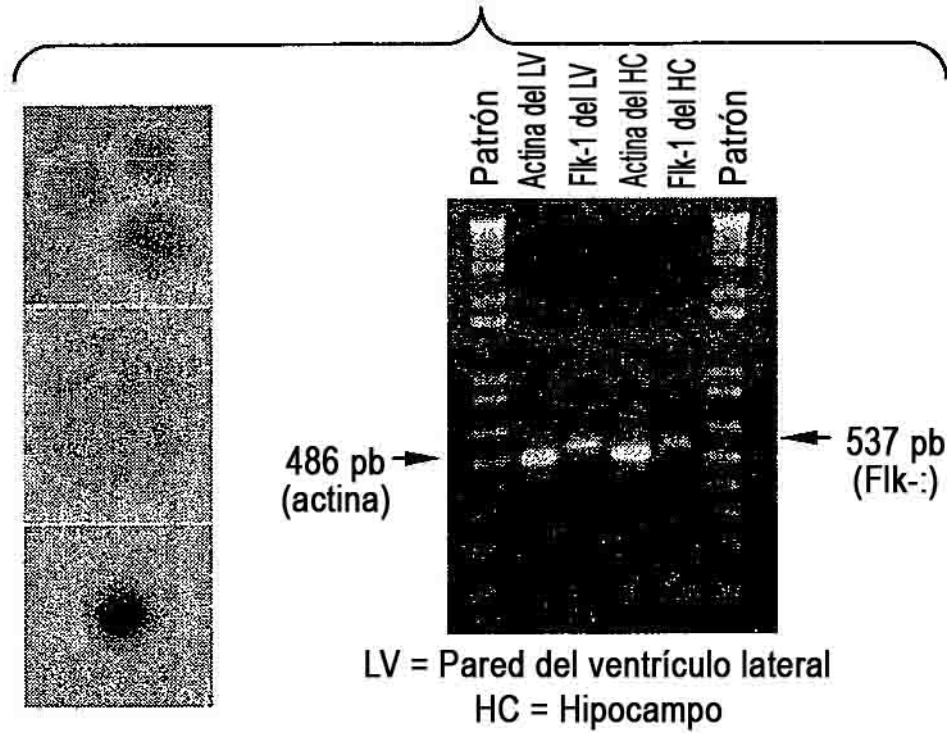


FIG. 23

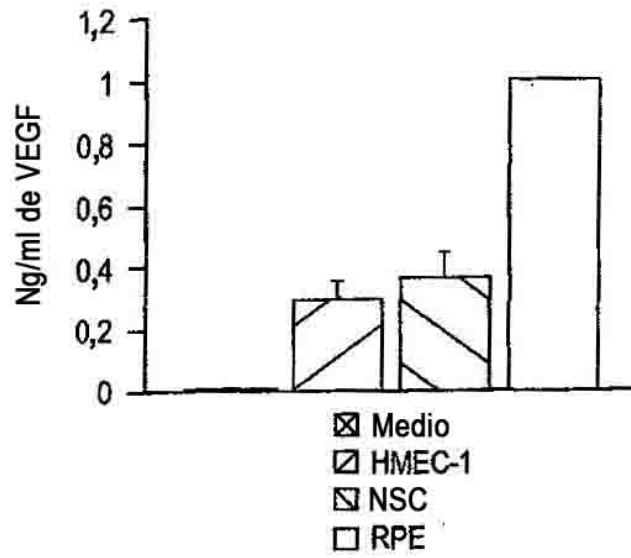


FIG. 24

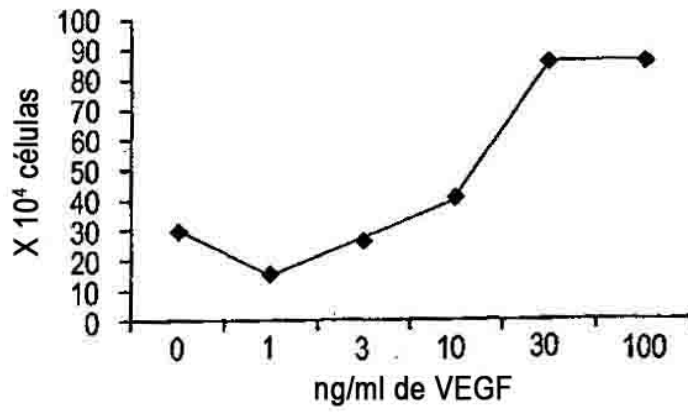


FIG. 25

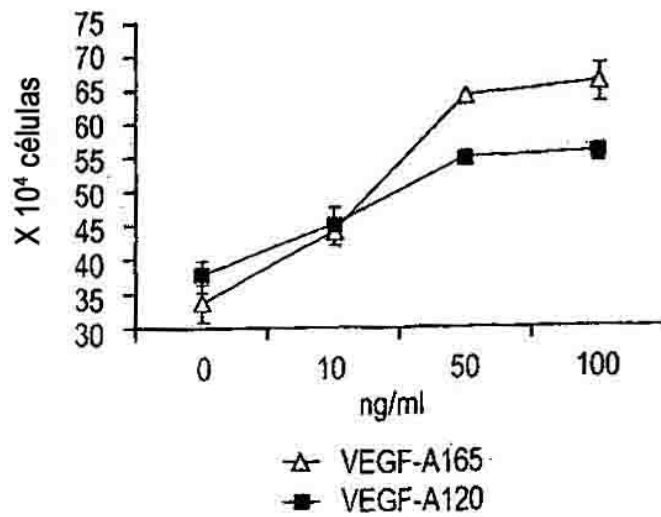


FIG. 26A

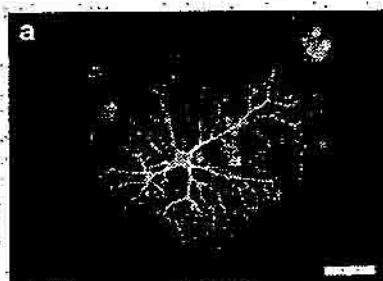


FIG. 26B

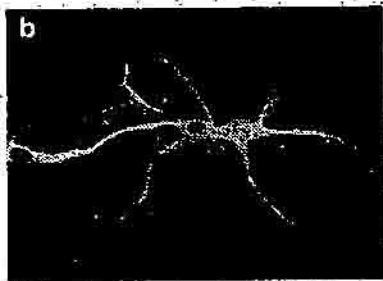


FIG. 26C

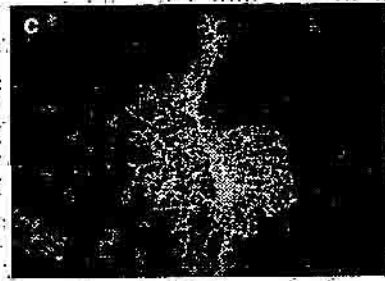


FIG. 27

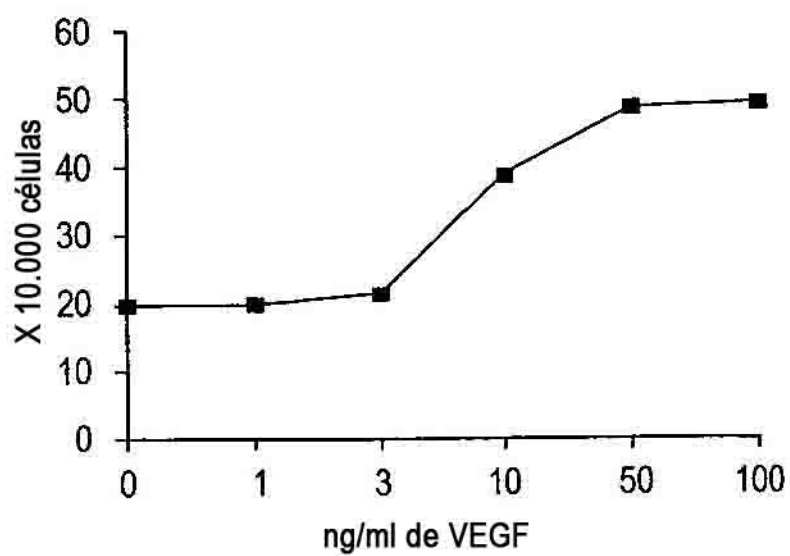


FIG. 28A

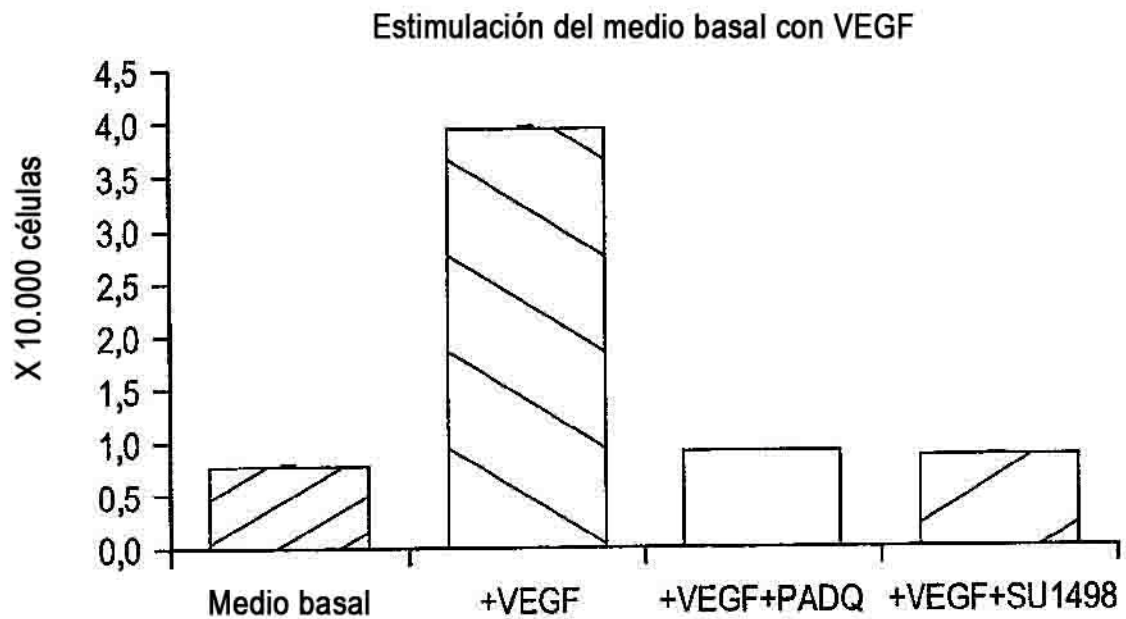


FIG. 28B

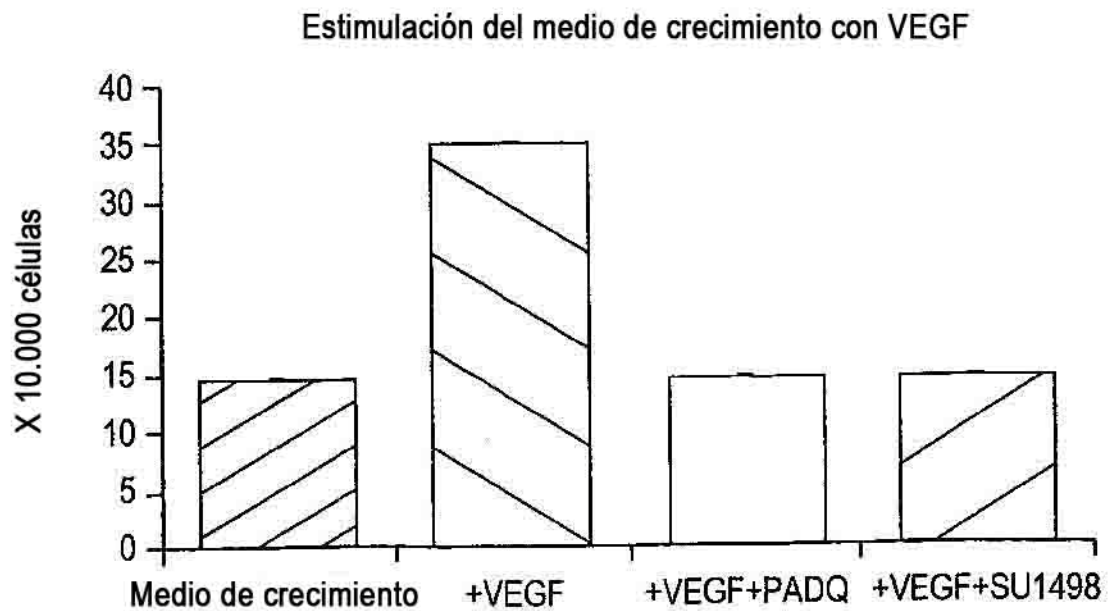


FIG. 29

Elisa de VEGF

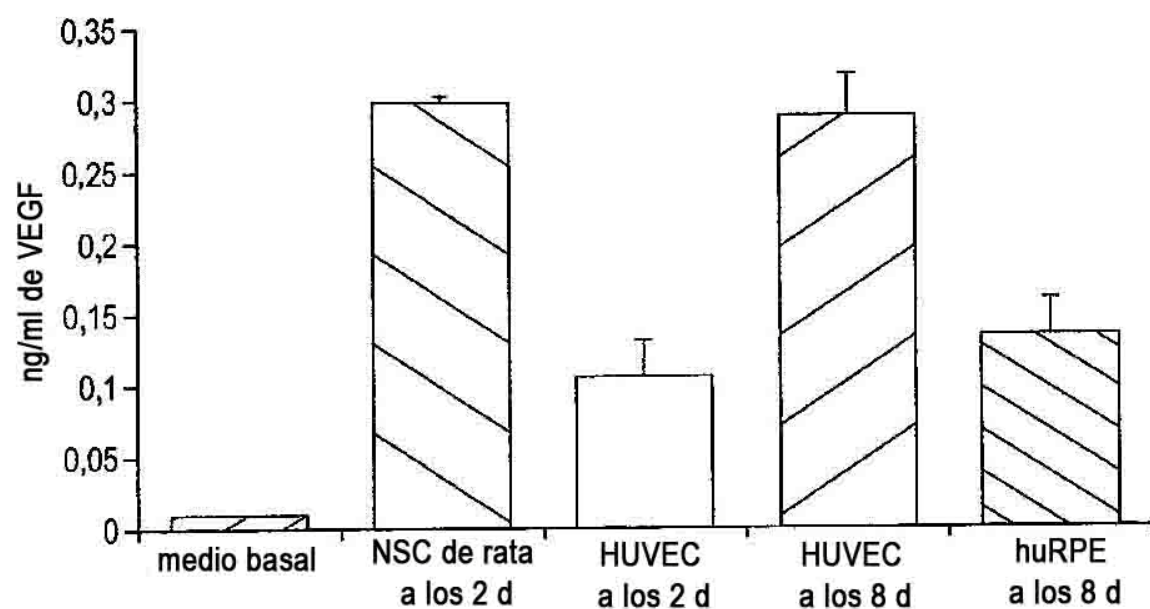


FIG. 30

Bloqueo del medio de crecimiento con VEGFR

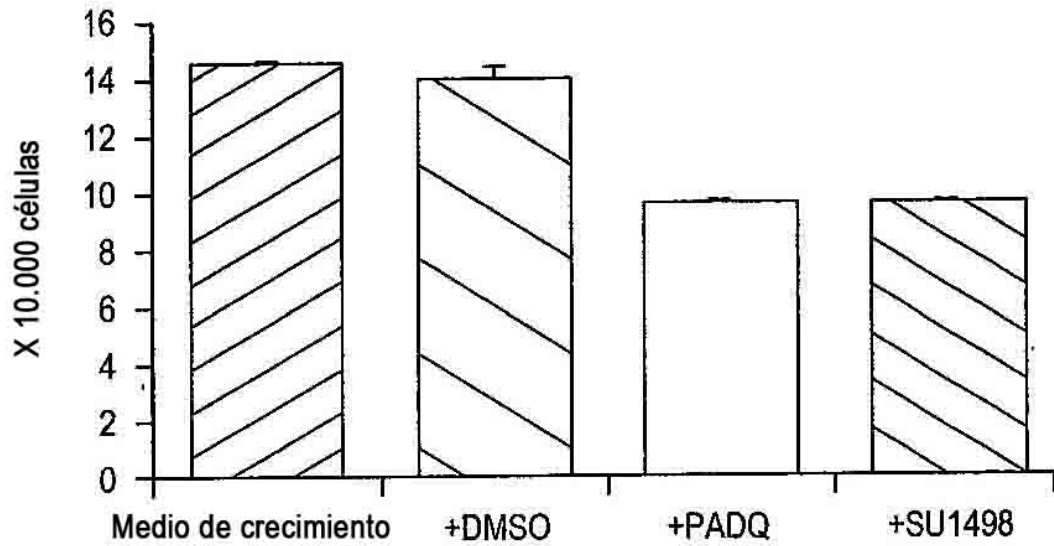


FIG. 31

ELISA de proliferación

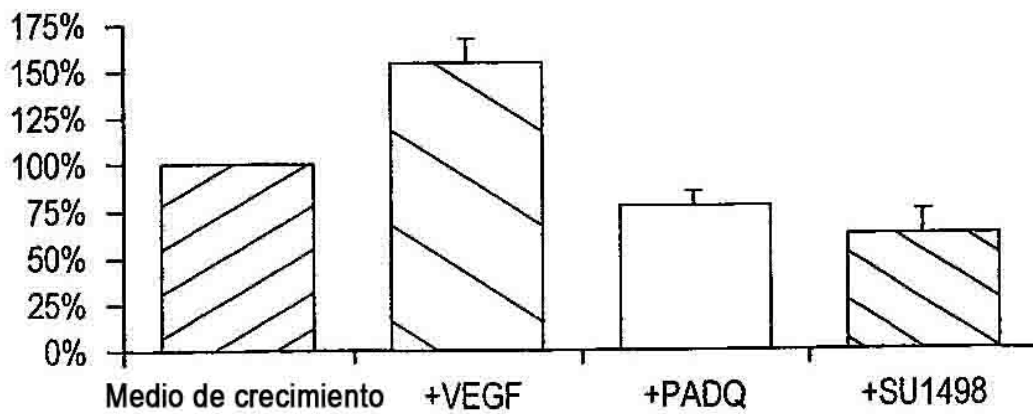


FIG. 32

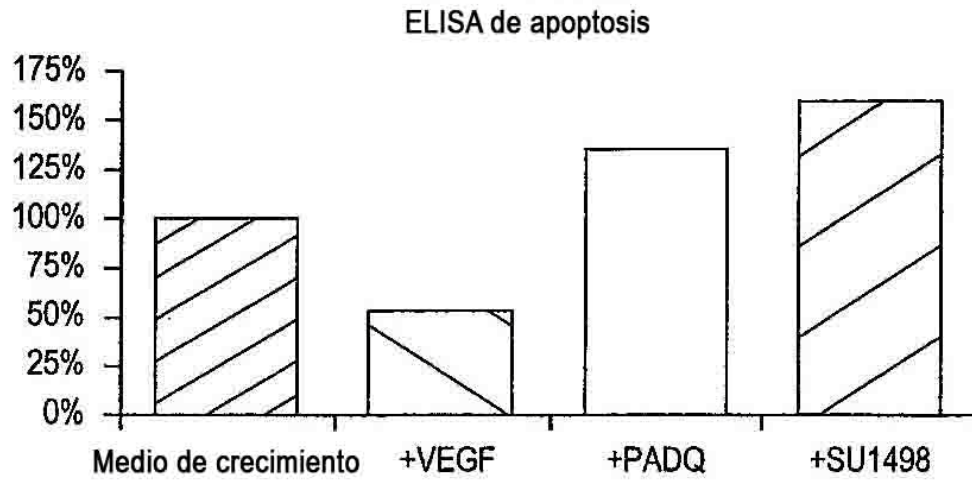


FIG. 33

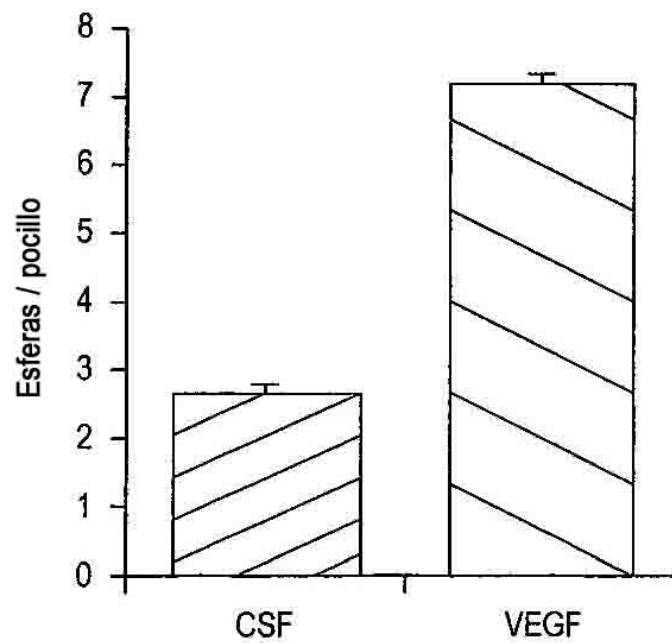


FIG. 34

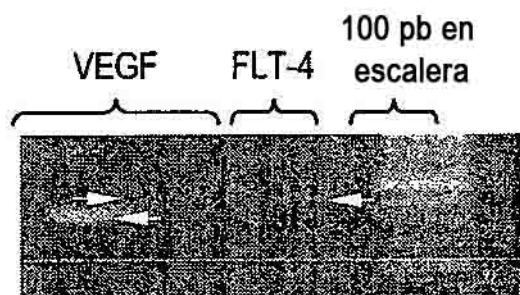


FIG. 35

