



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 610**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07120461 .4**

96 Fecha de presentación : **12.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1930439**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54

Título: **Factores neurotróficos.**

30

Prioridad: **12.03.2001 US 804615**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.10.2011**

73

Titular/es: **Biogen Idec MA Inc.**  
**14 Cambridge Center**  
**Cambridge, Massachusetts 02142, US**  
**NSGENE A/S**

72

Inventor/es: **Sah, Dinah Wen Yee;**  
**Johansen, Teit E. y**  
**Rossomando, Anthony**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 366 610 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

Factores neurotróficos

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a polipéptidos de factores neurotróficos, a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de factores neurotróficos, y a anticuerpos que se unen específicamente a los factores neurotróficos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los factores neurotróficos son proteínas naturales que promueven la supervivencia, mantienen la diferenciación fenotípica, previenen la degeneración y potencian la actividad de las células y tejidos neuronales. Los factores neurotróficos se aíslan de tejido neural y de tejido no neural que está innervado por el sistema nervioso, y se han clasificado en grupos relacionados funcional y estructuralmente, también denominados familias, superfamilias o subfamilias. Entre las superfamilias de factores neurotróficos están las superfamilias del factor de crecimiento de fibroblastos, neurotrofina y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Las especies individuales de los factores neurotróficos se distinguen por su estructura física, su interacción con sus receptores compuestos, y sus efectos en diferentes tipos de células nerviosas. Están clasificados dentro de la superfamilia de TGF- $\beta$  (Massague, y col., 1994, *Trends in Cell Biology*, 4:172-178) los ligandos de factores neurotróficos derivados de líneas celulares gliales ("GDNF"; documento WO 93/06116, incorporado en el presente documento por referencia), que incluye GDNF, persefina ("PSP"; Milbrandt y col., 1998, *Neuron* 20:245-253, incorporado en el presente documento por referencia) y neurturina ("NTN"; documento WO 97/08196, incorporado en el presente documento por referencia). Los ligandos de la subfamilia de GDNF tienen en común su capacidad para inducir la señalización a través del receptor de la tirosina quinasa RET. Estos tres ligandos de la subfamilia de GDNF difieren en sus afinidades relativas por una familia de receptores neurotróficos, los receptores GFR $\alpha$ .

Debido a los efectos de los factores neurotróficos en tejidos neuronales, sigue siendo necesario identificar y caracterizar factores neurotróficos adicionales para el diagnóstico y tratamiento de trastornos del sistema nervioso.

30 **RESUMEN DE LA INVENCION**

Esta invención se refiere a un nuevo factor neurotrófico llamado en el presente documento "neublastina" o "NBN". La Neublastina se clasifica dentro de la subfamilia de GDNF porque comparte regiones de homología con otros ligandos GDNF (véase las Tablas 3 y 4, más adelante) y debido a su capacidad para interactuar con RET (véase, p. ej., Airaksinen y col., *Mol. Cell. Neuroscience*, 13, pp. 313-325 (1999)), la Neublastina es un factor neurotrófico nuevo y único. A diferencia de los ligandos GDNF, la Neublastina presenta una alta afinidad por el complejo receptor GFR $\alpha$ 3-RET y tiene subregiones únicas en su secuencia de aminoácidos.

40 En la invención se incluyen los ácidos nucleicos de NBN y los polipéptidos que estos codifican. Los polipéptidos de NBN son biológicamente activos como dímeros, y como monómeros tienen poca o ninguna actividad. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de Neublastina truncado, en el que el extremo amino del polipéptido de Neublastina truncado carece de uno o más aminoácidos amino-terminales de un polipéptido de Neublastina maduro. Preferiblemente, el polipéptido de Neublastina truncado, cuando dimeriza, se une a un polipéptido RET. Preferiblemente, el polipéptido de Neublastina truncado activo induce la dimerización del polipéptido RET.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido de Neublastina truncado incluye 7 restos de cisteína en las posiciones correspondientes a las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109 y 111 del polipéptido de Neublastina de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA), que corresponde, por ejemplo, a las posiciones 43, 70, 74, 107, 108, 136, 138 de la SEQ ID N°:9. El SEQ ID N°:9 se numera de forma que los restos de -80 a -1 corresponden a la sección prepro del polipéptido de NBN traducido, y los restos 1-140 corresponden a los 140 aminoácidos de NBN140 madura. Este esquema de numeración se presenta sólo por conveniencia, y no debe sacarse ninguna deducción de ella en relación a una cualquiera o más formas de NBN prepro, pro, madura o truncada descritas en el presente documento.

55 También está dentro de la invención un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Neublastina truncado. La secuencia de aminoácidos del polipéptido de Neublastina truncado tiene menos de 113 aminoácidos de longitud e incluye una secuencia de aminoácidos al menos 70% homóloga con los aminoácidos 28-140 de la SEQ ID N°: 9.

60 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Neublastina truncado es al menos 80% homóloga con los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N° 9. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Neublastina truncado es al menos 90% homóloga con los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N° 9. Incluso más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Neublastina truncado es al menos 95% homóloga con los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N° 9. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Neublastina es al menos 99% homóloga con los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N° 9. En las

realizaciones más preferidas, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado comprende los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N° 9. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado consiste esencialmente en 99 aminoácidos de la SEQ ID N° 48.

5 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado es al menos 80% homóloga con los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N° 9. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina es al menos 90% homóloga con los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N° 9. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina es al menos 95% homóloga con los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N° 9. En las realizaciones más preferidas, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado comprende los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N° 9. En otra realización, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina es al menos 99% homóloga con los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N° 9. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado consiste esencialmente en los 102 aminoácidos de la SEQ ID N° 45.

15 En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado es idéntico, o al menos 80%, 90%, 95% o 99% homóloga con los aminoácidos 29-140 de la SEQ ID N°: 9, y consta esencialmente de 112 aminoácidos. En realizaciones alternativas, la identidad o porcentaje de homología mencionados antes es con respecto a los aminoácidos 30-140 de la SEQ ID N°: 9, 31-140 de la SEQ ID N°: 9, 32-140 de la SEQ ID N°: 9, 33-140 de la SEQ ID N°: 9, 34-140 de la SEQ ID N°: 9, 35-140 de la SEQ ID N°: 9, 36-140 de la SEQ ID N°: 9, 37-140 de la SEQ ID N°: 9, 38-140 de la SEQ ID N°: 9, 40-140 de la SEQ ID N°: 9 o 41-140 de la SEQ ID N°:9. En estas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del polipéptido de neublastina truncado consiste esencialmente en 111, 110, 109, 108, 107, 106, 105, 104, 103, 101 o 100 aminoácidos, respectivamente. En realizaciones específicas, el polipéptido de neublastina truncado es el polipéptido de uno cualquiera de las SEQ ID N°: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 ó 48.

25 El polipéptido de neublastina truncado se puede obtener proporcionando un polipéptido de neublastina maduro tal como NBN113, y poniendo en contacto el polipéptido de neublastina maduro con al menos una proteasa en condiciones suficientes para producir el polipéptido de neublastina truncado. Preferiblemente, el polipéptido de neublastina truncado se produce como un producto de digestión del polipéptido de neublastina por exoproteasa poniendo en contacto el polipéptido de neublastina maduro con al menos una exoproteasa. Una proteasa preferida es una cualquiera de aminopeptidasa, Endo Lys C y tripsina. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye poner además en contacto el producto de digestión del polipéptido de neublastina por la exonucleasa con una dipeptidil peptidasa.

30 En una realización, el polipéptido de neublastina truncado es un polipéptido glicosilado. En una realización alternativa, el polipéptido de neublastina truncado no está glicosilado.

También está dentro de la invención un ácido nucleico que incluye un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de neublastina truncado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico hibrida específicamente en condiciones de hibridación en solución muy restrictivas, con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina variante.

40 El ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado se puede usar introduciendo el ácido nucleico en una célula y haciendo que sea expresado el polipéptido codificado por el ácido nucleico en una célula. Si se desea, el procedimiento puede incluir la etapa de administrar el ácido nucleico a un animal y hacer que el polipéptido sea expresado en el animal.

45 El ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado se puede proporcionar como un vector, p. ej., un vector de expresión. El vector se puede usar para expresar el polipéptido de neublastina truncado codificado.

50 La invención también incluye una célula transformada con un ácido nucleico que codifica un polipéptido que incluye un polipéptido de neublastina truncado. La célula puede ser, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto y una célula bacteriana. Una célula de mamífero preferida es una célula de ovario de hámster chino, o una célula derivada del sistema nervioso central de mamífero.

55 En un aspecto adicional, la invención incluye un procedimiento para hacer un polipéptido de neublastina truncado, expresando un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado. Preferiblemente, el procedimiento incluye la etapa de cultivar una célula que comprende el ácido nucleico en un medio de cultivo que permite la producción del polipéptido de neublastina truncado. El procedimiento también puede incluir la etapa de recuperar el polipéptido del medio de cultivo. La invención también proporciona un polipéptido de neublastina truncado (p. ej., una proteína purificada) obtenida por el procedimiento.

60 La invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye un polipéptido de neublastina truncado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También está dentro de la invención una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado y un vehículo farmacéuticamente

aceptable.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para administrar el polipéptido de neublastina truncado suministrando el polipéptido a una célula aislada o in vivo a un mamífero (tal como un ser humano). Preferiblemente, la administración in vivo comprende la administración sistémica. El mamífero puede padecer una

5 afección tal como, p. ej., daño neuronal isquémico, lesión cerebral traumática, neuropatía periférica, dolor neuropático, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, y deterioro de la memoria. En algunas realizaciones, el mamífero padece un trastorno neuronal de sistema nervioso periférico, la médula o la médula espinal.

10 La invención también proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad neurodegenerativa o trastorno en un mamífero, administrando al mamífero de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado.

La invención también proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno neurodegenerativos en un animal, administrando al animal el polipéptido de neublastina truncado. En otro aspecto, la invención presenta un

15 procedimiento para tratar una neuropatía periférica en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de neublastina truncado al mamífero. La neuropatía periférica puede ser, p. ej., una o más de neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por virus, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. En algunas realizaciones, el polipéptido

20 de neublastina truncado se suministra directamente al sistema nervioso central. En otras realizaciones, el polipéptido de neublastina truncado se suministra preferiblemente sistémicamente por inyección subcutánea, intramuscular, administración intravenosa o infusión intravenosa.

También está dentro de la invención un procedimiento para tratar el dolor neuropático en un mamífero, que

25 comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de neublastina truncado al mamífero. En algunas realizaciones, dolor neuropático asociado con daño de nervios inducido por toxinas, daño de nervios inducido por patógenos, daño de nervios inducido por inflamación, o neurodegeneración.

En otro aspecto, la invención presenta un procedimiento para tratar una neuropatía periférica en un mamífero

30 administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de neublastina truncado al mamífero. La neuropatía periférica preferiblemente es una o más de neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por virus, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el

35 polipéptido de neublastina truncado se suministra directamente en el sistema nervioso central. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica el polipéptido de neublastina truncado se suministra de forma sistémica por inyección subcutánea, administración intravenosa o infusión intravenosa.

La invención también proporciona un kit que incluye, en uno o más envases, una sustancia seleccionada del grupo

40 que consiste en un polipéptido de neublastina truncado y un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado.

Un "polipéptido de neublastina", tal como se usa en el presente documento, es un polipéptido que tiene actividad

45 neurotrófica (p. ej., como se describe en los ejemplos 6, 7, 8 y 9) e incluye los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 70% con los polipéptidos de "neublastina" humanos expuestos en los AA<sub>95</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>1</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>97</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4 ("pro"), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>80</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 ("tipo salvaje" preproNBN), AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 (proNBN), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 5 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 6 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 7 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 10 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 11 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA), y los polipéptidos

50 truncados de las variantes de las SEQ ID N°: 35-48 y derivados de los mismos. Además, la invención contempla aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" murinos expuestos en los AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16 o con los polipéptidos de neublastina de rata expuestos en los AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 34.

55 Preferiblemente, la secuencia C-terminal de los polipéptidos de neublastina identificados antes tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los AA<sub>72</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>107</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9), más preferiblemente AA<sub>41</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>76</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9), o la secuencia de aminoácidos expuesta en los AA<sub>191</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16 ó 34.

60 También se prefiere que el polipéptido de neublastina retenga los 7 restos de Cys conservados que son característicos de la familia de GDNF de la superfamilia de TGF-beta. Los 7 restos de cisteína conservados se localizan en las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109 y 111 del polipéptido de neublastina de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA). Estas corresponden, por ejemplo, a las posiciones 43, 70, 74, 107, 108, 136 y 138 de la SEQ ID N°: 9, o,

65 por ejemplo, a las posiciones 127, 154, 158, 191, 192, 220 y 222 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

Preferiblemente, el polipéptido de neublastina tiene una secuencia de aminoácidos que con una homología mayor de 85%, más preferiblemente con una homología mayor de 90%, más preferiblemente con una homología mayor que 95%, lo más preferiblemente con una homología mayor que 99%, con las secuencias anteriores (AA<sub>95</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>1</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>97</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>80</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 ("tipo salvaje" prepro), AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 (pro), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 5 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 6 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 7 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 10 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 11 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA), y AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16 ó 34, y de las SEQ ID N°: 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 y 48 (NBN112 truncada a NBN99, respectivamente).

Un "ácido nucleico de neublastina", tal como se usa en el presente documento, es un polinucleótido que codifica un polipéptido de neublastina. Por consiguiente, un ácido nucleico de neublastina aislado es una molécula de polinucleótido que tiene un marco de lectura abierto de codones de nucleótidos que, si se expusiera a los componentes adecuados necesarios para la traducción, codificaría o codifica un polipéptido de neublastina. Los ácidos nucleicos de neublastina de la invención pueden ser ARN o ADN, p. ej., ADN genómico, o ADN que es complementario de y/o se ha transcrito de un ARNm de neublastina ("ADNc"). Por lo tanto, un ácido nucleico de neublastina de la invención incluye además moléculas de polinucleótido que hibridan con especificidad, en condiciones de hibridación de restricción alta, con un polinucleótido que codifican un polipéptido de neublastina. Esta invención también se refiere a cebadores de ácido nucleico que son útiles para identificar, aislar y amplificar polinucleótidos que codifican polipéptidos de neublastina, o fragmentos de los mismos. En determinadas realizaciones de la invención, algunos de estos cebadores son sondas específicas de neublastina útiles para hibridar con un ácido nucleico de neublastina, pero no con ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia de GDNF. Por "específico", "especificidad" o "específicamente", se entiende la capacidad para hibridar con ácido nucleico de neublastina e incapacidad para hibridar con ácidos nucleicos que no son de neublastina, incluyendo una incapacidad para hibridar con ácidos nucleicos que codifican solamente los otros ligandos GDNF (p. ej., GDNF, persefina y neurturina).

En otra realización, un ácido nucleico de neublastina de la invención es uno que se identifica como complementario de un polinucleótido que codifica un polipéptido de neublastina, o bien tener una secuencia de ácido nucleico complementaria o por demostrar que hibrida con especificidad en condiciones de hibridación muy restrictivas con un polinucleótido que codifica la neublastina. Los ácidos nucleicos de neublastina particulares incluyen, sin limitación, las secuencias de ácidos nucleicos mostradas en el presente documento y designadas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 29 e SEQ ID N°: 30, así como los cebadores de SEQ ID N°: 17-28, 31 y 32. Un ácido nucleico de neublastina de la invención incluye además una subregión única, o fragmento, de un ácido nucleico de neublastina, que incluye sin limitación los fragmentos de ácidos nucleicos mostrados en la fig. 8.

Los ácidos nucleicos de neublastina de la invención se pueden usar para expresar un polipéptido de neublastina, p. ej., expresando un polipéptido de neublastina in vivo, o administrando un ácido nucleico de neublastina a un animal para la expresión in vivo. Los ácidos nucleicos de neublastina pueden incluirse dentro de un vector de ácido nucleico, p. ej., un vector de expresión o un vector de clonación. Un ácido nucleico de neublastina se puede, pero no es necesario, mantener, reproducir, transferir o expresar como parte de un vector de ácido nucleico. Se puede introducir y/o mantener dentro de la célula un vector de expresión recombinante que contiene una secuencia de polipéptido de neublastina. Las células que hospedan un vector de neublastina pueden ser procariontas. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico de neublastina en una célula eucariota, p. ej., una célula eucariota que contiene los mecanismos adecuados para el procesamiento postraduccional de un polipéptido en una proteína madura y/o los mecanismos adecuados para segregar un polipéptido en el entorno extracelular de la célula.

La invención presenta además por un factor neurotrófico neublastina, "neublastina". La neublastina puede estar en forma de un polipéptido o puede ser un multímero de dos o más polipéptidos de neublastina, p. ej., un dímero de neublastina. Los polipéptidos de neublastina se asocian como multímeros por asociaciones estructurales intermoleculares que conocen los expertos en la materia, incluyendo sin limitación, interacción cisteína-cisteína, enlaces disulfuro e interacciones no covalentes. Los polipéptidos de neublastina particulares incluyen, sin limitación, una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento y designada SEQ ID N°: 2; SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 16; SEQ ID N°: 34 e SEQ ID N°: 35-48. Preferiblemente, los polipéptidos de neublastina de la presente invención, cuando dimerizan se unen a RET. Más preferiblemente, los presentes polipéptidos de neublastina, cuando dimerizan inducen la dimerización de RET. La dimerización de RET en la superficie de una célula conduce a la autofosforilación del dímero de RET y finalmente a la activación de RET mediante cascada de señalización intracelular.

Un polipéptido de neublastina de la invención es útil para tratar un defecto en una neurona, incluyendo sin limitación, neuronas lesionadas y neuronas traumatizadas. Los nervios periféricos que experimentan traumatismo incluyen, pero no se limitan a nervios de la médula o de la médula espinal. Los polipéptidos de neublastina son útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, p. ej., daño neuronal isquémico cerebral; neuropatía, p. ej.,

neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Los polipéptidos de neublastina se contemplan además para usar en el tratamiento de la memoria deteriorada, p. ej., deterioro de la memoria asociado con demencia.

5 Son ejemplos adicionales de afecciones o enfermedades los trastornos del sistema nervioso periférico, la médula o la médula espinal, así como neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas, dolor neuropático asociado con el daño de nervios inducido por toxinas, daño de nervios inducido por patógenos, daño de nervios inducido por inflamación o neurodegeneración. Los ejemplos adicionales de neuropatías periféricas incluyen neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas.

15 Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controla la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 es una imagen fotográfica de dos transferencias northern con sondas de ADNc de neublastina marcadas con <sup>32</sup>P, que compara los niveles de expresión relativos del gen de neublastina en diferentes tipos de tejidos humanos de adulto (panel A) y en diferentes regiones del cerebro humano de adulto (panel B).

30 La fig. 2 es una imagen fotográfica de una transferencia northern con sonda de ADNc de neublastina marcada con <sup>32</sup>P, que compara la cantidad de ADNc de neublastina expresado en una línea celular no transfectada, HiB5, con la cantidad de ADNc de neublastina expresado en una línea celular transfectada con ADNc de neublastina, y con una línea celular transfectada con ADNc de GDNF.

35 La fig. 3 es una imagen fotográfica de dos transferencias western que comparan los grados con los que se expresa la proteína de neublastina en células HiB5 no transfectadas (calle 1) con respecto a una línea celular HiB5 transfectada establemente con ADNc de neublastina (calle 2) con sonda del anticuerpo Ab-2 específico de neublastina (transferencia izquierda; panel A) o del anticuerpo Ab-1 específico de neublastina (transferencia de la derecha, Panel B).

40 La fig. 4 es una ilustración gráfica del efecto de la neublastina en la supervivencia de neuronas mesencefálicas ventrales, dopaminérgicas, embrionarias de rata cultivadas y la actividad de ChAT en las neuronas motoras de nervios craneales colinérgicos en medio sin suero. En particular, la Fig. 4A es una ilustración de la curva de respuesta a la dosis para GDNF recombinante en la actividad de ChAT (dpm/hora). La figura 4B es una ilustración de la actividad de ChAT (dpm/hora) usando medio condicionado diluido de células que producen neublastina o células que producen GDNF. La fig. 4C es una ilustración del número de células inmunorreactivas para la tirosina hidroxilasa por pocillo.

45 La fig. 5 es una ilustración del efecto de la neublastina segregada de células HiB5pUbi1zNBN22 en la función y supervivencia de cultivos de láminas de neuronas mesencefálicas ventrales, dopaminérgicas, embrionarias de cerdo cocultivadas con células HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o células HiB5 (control). La fig. 5A y fig. 5B ilustran la dopamina liberada al medio en DIV12 (dopamina (pmol/l) - días 12) y DIV21 (dopamina (pmol/ml) - día 21), respectivamente. La fig. 5C es una ilustración del número de células inmunorreactivas para la tirosina hidroxilasa por cultivo (células TH-ir por cultivo) en DIV21.

55 La fig. 6 es una ilustración del efecto in vivo de la neublastina producida por lentivirus en neuronas nigrales dopaminérgicas.

La fig. 7 es un diagrama esquemático de la estructura genómica del gen de neublastina, que incluye cebadores de ácido nucleico que se pueden usar para identificar el gen de neublastina de longitud completa, y su orientación espacial respecto a la secuencia genómica que codifica la neublastina (es decir, el gen).

60 La fig. 8 es una ilustración de los cebadores específicos de neublastina usados para identificar el clon de ADNc que codifica el polipéptido de neublastina humana que hibrida con ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de neublastina, pero no hibridan con ácidos nucleicos que codifican los otros miembros conocidos de la familia de GDNF (es decir, GDNF, persefina y neurturina).

65

La fig. 9 ilustra la actividad neurotrófica en cultivos de células de ganglios de la raíz dorsal de rata disociadas de diferentes estados de desarrollo, de un polipéptido descrito en la presente invención comparado con los obtenidos con factores neurotróficos conocidos (0 experimento de control (en ausencia de factores); 1 en presencia de GDNF; 5 2 en presencia de neurturina; 3 en presencia de la neublastina de la invención; E12, día embrionario 12; E16, día embrionario 16; P0, día del nacimiento; P7, día 7 después del nacimiento; y P15, día 15 después del nacimiento).

La fig. 10 ilustra la producción de neublastina de líneas celulares CHO.

10 La fig. 11 ilustra una comparación de la unión de neublastina y GDNF a los receptores  $GFR\alpha-1$  y  $GFR\alpha3$ .

La fig. 12 es una imagen fotográfica de una transferencia western que ilustra la unión del anticuerpo antipeptido R30 y anticuerpo antipeptido R31 a la neublastina.

15 La fig. 13 es una imagen de un gel que muestra la extracción de neublastina por unión por afinidad a RETL3-Ig.

La fig. 14 es un mapa de plásmido de pET19b-Neublastina, junto con la secuencia del gen sintético para la neublastina.

20 La fig. 15 es un mapa de plásmido de pMJB164-HisNeublastina, junto con la secuencia del gen sintético para la His-neublastina.

La fig. 16 ilustra una comparación de una forma de 102 aminoácidos de la neublastina truncada (NBN) y una forma de 113 aminoácidos de la neublastina en un ensayo de activación celular de RET.

25 La fig. 17 ilustra una comparación de diferentes formas de neublastina o muteínas de neublastina en un ensayo de activación celular de RET.

30 La fig. 18 ilustra una comparación de diferentes formas madura (113 aa) y truncada (106 aa, 104 aa o 99 aa) de la neublastina o muteínas R14K de neublastina en un ensayo celular ELISA KIRA.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 Los solicitantes han identificado un ácido nucleico que codifica un nuevo factor neurotrófico que en el presente documento se denomina "neublastina" o "NBN". La neublastina es un miembro de la subclase de factores neurotróficos derivados de líneas celulares gliales (GDNF) de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) de los factores neurotróficos. Los polipéptidos de NBN son biológicamente activos como dímeros, y tienen poca o no tienen actividad neurotrófica como monómeros. Por lo tanto, la referencia en el presente documento a cualquier polipéptido de neublastina de la invención se entiende que designa la forma homodimérica de la neublastina designada, salvo que se especifique lo contrario.

40 El ADNc que codifica la neublastina se identificó originalmente como sigue. Usando el algoritmo TBLASTN 1.4.11 (Atschul y col., *Nucl. Acids Res.*, 25, pp. 3389-3402 (1997)) y la persefina humana como consulta (GenBank nº de acceso AF040962), inicialmente se identificó un fragmento de 290 pb en la base de datos High-Throughput Genomic Sequence (HTGS) de dos cromosomas artificiales bacterianos humanos (BAC) con los accesos en GenBank AC005038 y AC005051. AC005038 consiste en aproximadamente 190.000 pb de 5 cóntigos de secuencias desordenadas, y AC005051 consiste en aproximadamente 132.000 pb de 12 cóntigos de secuencias desordenadas. El fragmento de 290 pb identificado en los dos clones BAC demostró tener regiones que eran homólogas, pero no idénticas, con una región de codificación del ADNc del factor neurotrófico, la persefina humana.

45 A partir de esta secuencia de 290 pb se sintetizaron dos cebadores de PCR específicos de neublastina (cebador de la cadena superior (SEQ ID N°: 17) y cebador de la cadena inferior (SEQ ID N°: 18)). Se llevó a cabo el cribado de la biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano. El cribado inicial comprendía el cribado basado en PCR en 96 pocillos con dos cebadores de PCR (SEQ ID N°: 17 y 18) de una "Placa principal" de la biblioteca de ADNc de 500.000 clones de ADNc que contenía aproximadamente 5.000 clones/pocillo. Se llevó a cabo un segundo cribado basado en PCR en una "Subplaca" de la biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano que contenía solución madre en glicerol de *E. coli* con aproximadamente 5.000 clones/pocillo.

50 Se identificó un fragmento de 102 pb (SEQ ID N°: 13) en los cribados basados en PCR tanto de la placa principal como de la subplaca. Se seleccionó un clon de ADNc positivo (que tenía un fragmento de 102 pb), se puso en dos placas que contenían LB/antibiótico, y se hicieron crecer toda la noche. De estas placas, se seleccionaron un total de 96 colonias bacterianas y se pusieron individualmente en los pocillos de una nueva placa de PCR de 96 pocillos que contenía tanto los cebadores de la PCR (SEQ ID N° 17 y 18) como los reactivos necesarios para la amplificación por PCR. Después se llevó a cabo la amplificación por PCR y se analizaron las 96 reacciones de PCR individuales mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Después se identificó la colonia positiva con el clon que contenía el

fragmento de 102 pb. El ADN del plásmido se obtuvo de la colonia positiva que contenía el fragmento de 102 pb y se secuenció. El posterior análisis de secuenciación puso de manifiesto la presencia de un ADNc de longitud completa de 861 pb (SEQ ID N°: 8). El marco de lectura abierto (ORF) de 663 pb, también denominado la región codificante (CDS), identificada en la SEQ ID N°: 8, codifica el pre-pro-polipéptido (denominado "pre-pro-neublastina") y se muestra en la SEQ ID N°: 9. De acuerdo con la SEQ ID N°: 9, se identificaron tres variantes de polipéptidos de neublastina. Estas variantes incluyen:

(i) el polipéptido de 140 AA denominado en el presente documento NBN140, que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 10;

(ii) el polipéptido de 116 AA denominado en el presente documento NBN116, que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 11;

(iii) el polipéptido de 113 AA denominado en el presente documento NBN113, que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 12.

Otras variantes de la neublastina incluyen las formas de NBN truncadas. Los ejemplos de estas incluyen:

(iv) la secuencia de polipéptido de 112 AA designada en el presente documento como NBN112, que tiene los 112 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 29-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 35) o los aminoácidos 113-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(v) la secuencia de polipéptido de 111 AA designada en el presente documento como NBN111, que tiene los 111 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 30-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 36) o los aminoácidos 114-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(vi) la secuencia de polipéptido de 110 AA designada en el presente documento como NBN110, que tiene los 110 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 31-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 37) o los aminoácidos 115-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(vii) la secuencia de polipéptido de 109 AA designada en el presente documento como NBN109, que tiene los 109 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 32-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 38) o los aminoácidos 116-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(viii) la secuencia de polipéptido de 108 AA designada en el presente documento como NBN108, que tiene los 108 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 33-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 39) o los aminoácidos 117-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(ix) la secuencia de polipéptido de 107 AA designada en el presente documento como NBN107, que tiene los 107 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 34-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 40) o los aminoácidos 118-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(x) la secuencia de polipéptido de 106 AA designada en el presente documento alternativamente como NBN106 o N-7, que tiene los 106 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 35-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 41) o los aminoácidos 119-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xi) la secuencia de polipéptido de 105 AA designada en el presente documento como NBN105, que tiene los 105 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 36-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 42) o los aminoácidos 120-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xii) la secuencia de polipéptido de 104 AA designada en el presente documento alternativamente como NBN104 o N-9, que tiene los 104 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 37-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 43) o los aminoácidos 121-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xiii) la secuencia de polipéptido de 103 AA designada en el presente documento como NBN103, que tiene los 103 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 38-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 44) o los aminoácidos 122-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xiv) la secuencia de polipéptido de 102 AA designada en el presente documento como NBN102, que tiene los 102 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 45) o los aminoácidos 123-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xv) la secuencia de polipéptido de 101 AA designada en el presente documento como NBN101, que tiene los 101 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 40-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 46) o los aminoácidos 124-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xvi) la secuencia de polipéptido de 100 AA designada en el presente documento como NBN100, que tiene los 100 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 41-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 47) o los aminoácidos 125-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

(xvii) la secuencia de polipéptido de 99 AA designada en el presente documento alternativamente como NBN99 o N-14, que tiene los 99 aminoácidos carboxi-terminales de un polipéptido de neublastina, p. ej., los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N°: 9 (SEQ ID N°: 48) o los aminoácidos 126-224 de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

Los polipéptidos de neublastina descritos en el presente documento se pueden proporcionar en cualquier forma bioactiva que incluye la forma de pre-pro-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas glicosiladas, proteínas no glicosiladas, proteínas fosforiladas, proteínas no fosforiladas, formas truncadas, o cualquier otra proteína modificada postraduccionalmente. Se supone que una neublastina bioactiva está en la forma dimerizada para cada variante de la NBN, cuando se requiere la formación de dímero para la actividad. Se observa poca o no se observa actividad neurotrófica en un polipéptido de NBN monómero. Un polipéptido de neublastina bioactivo incluye un polipéptido dimerizado, que en presencia de un cofactor (tal como GFR $\alpha$ 3 o RET), se une a GFR $\alpha$ 3 o a un complejo de GFR $\alpha$ 3 y RET, induce la dimerización de RET y autofosforila RET. Se entiende que las formas truncadas de la neublastina descritas en el presente documento (p. ej. las formas de 112AA, 111AA, 110AA, 109AA, 108AA, 107AA, 106AA, 105AA, 104AA, 103AA, 102AA, 101AA, 100AA o 99AA, mostradas en las SEQ ID N°: 35-48, respectivamente), así como todos los demás polipéptidos de NBN descritos antes, son dímeros, y que cada dímero tiene actividad neurotrófica.

La secuencia de ADNc entera que contiene ADN 5' no traducido de 782 pb, ADN codificante de 663 pb y 3' no traducido de 447 (en total 1992 pb), se ha enviado a GenBank con el número de acceso AF 120274.

La secuencia genómica que codifica la neublastina se identificó como sigue:

Con el objetivo de clonar la secuencia genómica que codifica la neublastina, se preparó un grupo adicional de cebadores. En particular, la pareja de cebadores n° 1 comprendía (cadena homossentido mostrada como en la SEQ ID N°: 23 y antisentido mostrada como la SEQ ID N°: 24) y la pareja de cebadores n° 2 comprendía (cadena homossentido mostrada como la SEQ ID N°: 25 y antisentido mostrada como la SEQ ID N°: 26).

Usando la pareja de cebadores n° 2, se amplificó un segmento de ADN de 887 pb por PCR a partir de una preparación de ADN genómico humano, y se clonó en el vector pCRII (Invitrogen) y se transformó en *E. coli*. El plásmido resultante se secuenció y se predijo una secuencia de ADNc putativo de 861 pb (que codifica una proteína denominada neublastina en el presente documento) (expuesta como la SEQ ID N°: 3). De forma similar, usando la pareja de cebadores n° 1, se obtuvo un fragmento de ADN de 870 pb por PCR de ADN genómico humano. En este fragmento se encontró una región adicional de 42 pb en el extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF), en comparación a la secuencia de 887 pb. La estructura genómica del gen de la neublastina se predijo por comparación con las secuencias de ácidos nucleicos de otros factores neurotróficos, mediante cartografía de los límites exón-intrón. Este análisis demostraba que el gen de neublastina tiene al menos dos exones separados por un intrón de 70 pb.

Esta secuencia también se usó para cribar la secuencia EST de neublastina en GenBank. Se identificaron tres con los accesos en GenBank AA844072, AA931637 y AA533512, que indicaba que los ácidos nucleicos de neublastina se transcriben a ARNm.

La comparación de la secuencia de ADNc entero obtenida (AF 120274) y la secuencia genómica presente en GenBank con los accesos AC005038 y AC005051 puso de manifiesto que el gen de neublastina consiste en al menos cinco exones (que incluyen tres codificantes) separados por cuatro intrones (véase, p. ej., la fig. 7). Juntos los exones tienen una secuencia de aminoácidos prevista de un polipéptido de neublastina de longitud completa. Debe indicarse también que se encontró que el fragmento de 887 pb contenía la región codificante completa de la pro-neublastina. El ADNc previsto (SEQ ID N°: 3) contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la pro-neublastina (181 restos de aminoácidos) que mostraba homología con las tres proteínas humanas conocidas (persefina, neurturina y GDNF). Véase la Tabla 3 en los ejemplos.

### **Ácidos nucleicos de la neublastina de la invención**

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos capaces de expresar los polipéptidos de la invención. Los polinucleótidos de la invención incluyen secuencias de ADN, ADNc y ARN, así como secuencias antisentido, e incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos y modificados deliberadamente. Los polinucleótidos de la invención también incluyen secuencias que son degeneradas como resultado del código genético, pero que codifican para la expresión de un polipéptido de neublastina.

Como se define en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a una forma polímera de nucleótidos de

al menos 10 bases de longitud, preferiblemente al menos 15 bases de longitud. Por "polinucleótido aislado" se entiende un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del cual se obtiene. Por lo tanto, el término incluye ADN recombinante que se incorpora en un vector de expresión, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procarionta o eucarionta, o que existe como una molécula separada, p. ej., un ADNc, independiente de otras secuencias.

Los polinucleótidos de la invención también incluyen variantes alélicas y "polinucleótidos mutados" que tienen una secuencia de nucleótidos que difiere de las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento en una o más posiciones de nucleótidos.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención tiene una secuencia de ácido nucleico (ADN) capaz de hibridar con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 3, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15, su cadena complementaria, o una subsecuencia de las mismas en condiciones de restricción al menos media, media/alta o alta, como se describe con más detalle a continuación.

En otra realización preferida, el polinucleótido aislado de la invención tiene una secuencia de ácido nucleico (ADN) que es al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, lo más preferiblemente al menos 99% homóloga con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N° 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 3, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15.

En su realización más preferida, el polinucleótido tiene la secuencia de ADN presentada como SEQ ID N°: 1, la secuencia de ADN presentada como SEQ ID N°: 3, la secuencia de ADN presentada como SEQ ID N°: 8, o la secuencia de ADN presentada como SEQ ID N°: 15.

Esta invención también proporciona cebadores y secuencias de ADN nuevos para identificar, aislar y amplificar polinucleótidos de neublastina que codifican la expresión de polipéptidos de neublastina o fragmentos de los mismos. Dichos cebadores incluyen los polinucleótidos expuestos en las SEQ ID N°: 17-28 y 31-32. Además, esta invención proporciona secuencias de ADN de neublastina generadas a partir de estos cebadores, que incluyen las expuestas en las SEQ ID N°: 13 y 14. Además, esta invención proporciona secuencias de ADN de las regiones 3' o 5' no traducidas ("UTR") en el ADN genómico que flanquea los exones de neublastina; dichas secuencias son útiles para identificar, aislar y amplificar polinucleótidos de neublastina que codifican la expresión de polipéptidos de neublastina o fragmentos de los mismos.

Las secuencias 3' UTR de esta invención incluyen las secuencias expuestas en:

nucleótidos 721 - 865 de la SEQ ID N°: 1,

nucleótidos 718 - 861 de la SEQ ID N°: 3,

nucleótidos 718 - 861 de la SEQ ID N°: 8,

nucleótidos 1647-2136 de la SEQ ID N°: 15, y

secuencias contiguas de entre 10-25 nucleótidos derivadas (es decir, que caen dentro de) de las secuencias anteriores (que son útiles, p. ej., como cebadores).

Las secuencias 5' UTR de esta invención incluyen las secuencias expuestas en:

nucleótidos 1-10 de la SEQ ID N°: 1,

nucleótidos 1 - 57 de la SEQ ID N°: 8,

nucleótidos 1-974 de la SEQ ID N°: 15, y

secuencias contiguas de entre 10-25 nucleótidos derivadas (es decir, que caen dentro de) de las secuencias anteriores (que son útiles, p. ej., como cebadores).

Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener preferiblemente por procedimientos de clonación, p. ej., como se describe en: "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons, Inc.). En una realización preferida, el polinucleótido se clona de, o se produce a partir del ADN genómico humano o una biblioteca de ADNc del cerebro humano.

**Homología de las secuencias de ADN**

La homología de la secuencia de ADN a la que se ha hecho referencia antes se puede determinar como el grado de identidad entre dos secuencias que indica una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La homología se puede determinar adecuadamente mediante programas de ordenador conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Needleman, S.B. and Wunsch CD., *Journal of Molecular Biology* 1970 48,443-453). Usando GAP con los siguientes parámetros para la comparación de secuencias de ADN: penalización de 5,0 por la creación de hueco y penalización de 0,3 por la extensión de hueco, la región codificante de las secuencias de ADN análogas a las que se ha hecho referencia antes, presentan un grado de identidad preferiblemente de al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, lo más preferiblemente al menos 99%, con la parte de CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID N° 1, o la parte de CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID N° 3, o la parte de CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID N° 8, la parte de CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID N° 15.

La expresión "identidad de secuencia" se refiere al grado en el que son idénticas dos secuencias de polinucleótidos en una base de nucleótido a nucleótido a lo largo de una región particular de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una región de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentran bases de ácidos nucleicos idénticas (p. ej., A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100, para dar el porcentaje de la identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial", tal como se usa en el presente documento, indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 85 por ciento de identidad y a menudo 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia comparado con una secuencia de referencia a lo largo de una región de comparación. Los procedimientos para determinar la identidad de secuencia son bien conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Needleman y Wunsch *J. Mol. Biol.* 1970 48,443-453.

**Protocolo de hibridación**

La polinucleótidos de la invención son aquellos que tienen una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°:3, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15, o sus cadenas complementarias, o una subsecuencia de las mismas en condiciones de restricción al menos media, media/alta o alta, como se describe con más detalle a continuación.

Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación entre una sonda de nucleótidos y una secuencia de ADN o ARN homóloga, implica la inmersión previa del filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridar en 5X SSC (cloruro sódico/citrato sódico; véase, Sambrook y col.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY 1989) durante 10 minutos, y prehibridación del filtro en una solución de 5X SSC, 5X solución de Denhardt (véase, Sambrook y col.; citado antes), SDS al 0,5% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado por ultrasonidos 100 µg/ml (véase, Sambrook y col.; citado antes), seguido de hibridación en la misma solución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda con cebador aleatorio (Feinberg A.P. & Vogelstein B; *Anal. Biochem.* 1983 132 6-13), marcada con <sup>32</sup>P-dCTP (actividad específica > 1 x 10<sup>9</sup> cpm/µg) durante 12 horas a aproximadamente 45°C. Después el filtro se lava dos veces durante 30 minutos en 0,1X SSC, SDS al 0,5% a una temperatura de al menos 60°C (condiciones de restricción media), preferiblemente al menos 65°C (condiciones de restricción media/alta), más preferiblemente de al menos 70°C (condiciones de restricción alta) e incluso más preferiblemente de al menos 75°C (condiciones de restricción muy alta). Las moléculas con las que hibrida la sonda de oligonucleótido en estas condiciones se pueden detectar usando una película de rayos X.

**Polinucleótidos clonados**

El polinucleótido aislado de la invención puede ser en particular un polinucleótido clonado. Tal como se define en el presente documento, la expresión "polinucleótido clonado" se refiere a un polinucleótido o secuencia de ADN clonados de acuerdo con los procedimientos de clonación estándar actualmente usadas en ingeniería genética para cambiar de sitio un segmento de ADN, que puede ser en particular ADNc, es decir, derivado enzimáticamente de ARN, de su localización natural a un sitio diferente donde será reproducido. El polinucleótido clonado de la invención puede codificar cualquiera de los polinucleótidos de NBN descritos en el presente documento, incluyendo, pero sin limitar, los polinucleótidos mostrados en las SEQ ID N°: 2, 4-7, 9-12, 16, 34 y 35-48.

La clonación se puede realizar por cualquier vía adecuada y puede implicar técnicas tales como la tecnología de la transcriptasa inversa, tecnología de la PCR, y similares, así como la escisión y aislamiento del segmento de ADN

deseado.

El polinucleótido clonado de la invención se puede denominar alternativamente "construcción de ADN" o "secuencia de ADN aislada", y puede ser en particular un ADN complementario (ADNc).

### **Fuentes biológicas**

5

El polinucleótido aislado de la invención se puede obtener de cualquier fuente adecuada.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención se clona de, o se produce a partir de una biblioteca de ADNc, p. ej., de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal o adulto, en particular del cerebro anterior, el metencéfalo, la corteza, el cuerpo estriado, la amígdala, el cerebelo, el núcleo caudado, el cuerpo caloso, el hipocampo, el núcleo talámico, el núcleo subtalámico, el núcleo olfativo, el putamen, la sustancia negra, los ganglios de la raíz dorsal, el ganglio del trigémino, la arteria mesentérica superior o el tálamo; de la médula espinal; del corazón, la placenta; del pulmón; del hígado; del músculo esquelético; del riñón; del hígado; del páncreas; de los intestinos; del ojo; de la retina; de la pulpa dentaria; del folículo del pelo; de la próstata; de la pituitaria; o de la tráquea.

15

Las bibliotecas de ADNc comerciales de una variedad de tejidos, tanto humanos como no humanos, están disponibles, por ejemplo en Stratagene y Clontech. El polinucleótido aislado de la invención se puede obtener por procedimientos estándar, p. ej., los descritos en los ejemplos de trabajo.

### **Polipéptidos de neublastina de la invención**

Como se ha indicado antes, un "polipéptido de neublastina", como se usa en el presente documento, es un polipéptido que tiene actividad neurotrófica (p. ej., como se describe en los ejemplos 6, 7, 8 y 9) e incluye los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" expuestos en los AA<sub>95</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>1</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>97</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>80</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 ("tipo salvaje" prepro), AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 (pro), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 5 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 6 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 7 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 10 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 11 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16 (prepro murino), AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 34 (prepro de rata), forma truncada de NBN112 a NBN99 (SEQ ID N°: 35-48, respectivamente), y variantes y derivados de cada uno de los anteriores.

Preferiblemente, la secuencia C-terminal de los polipéptidos de neublastina identificados antes tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los AA<sub>72</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>107</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9), más preferiblemente AA<sub>41</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>76</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9).

Además, se prefiere que el polipéptido de neublastina retenga los 7 restos de Cys conservados que son característicos de la familia de GDNF y de la superfamilia de TGF-beta.

Preferiblemente, el polipéptido de neublastina tiene una secuencia de aminoácidos con una homología mayor que 85%, más preferiblemente homología mayor que 90%, más preferiblemente homología mayor que 95%, lo más preferiblemente homología mayor que 99%, con las secuencias anteriores (es decir, AA<sub>95</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>1</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, AA<sub>97</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 4, AA<sub>80</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 ("tipo salvaje" prepro), AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9 (pro), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 5 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 6 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 7 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 10 (maduro 140AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>116</sub> de la SEQ ID N°: 11 (maduro 116AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>113</sub> de la SEQ ID N°: 12 (maduro 113AA), AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16 (prepro murino), AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 34 (prepro de rata), polipéptidos de neublastina truncados NBN112 a NBN99 (SEQ ID N°: 35-48, respectivamente), y preferiblemente cualquiera de los polipéptidos anteriores con una secuencia C-terminal de los polipéptidos de neublastina identificados antes tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los AA<sub>72</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>107</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9), más preferiblemente AA<sub>41</sub>-AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2 (es decir, AA<sub>76</sub>-AA<sub>140</sub> de la SEQ ID N°: 9) o AA<sub>191</sub>-AA<sub>224</sub> de las SEQ ID N°: 16 ó 34.

Además, esta invención contempla aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 70% con los polipéptidos de "neublastina" murinos expuestos en los AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 16, o polipéptidos de neublastina de rata expuestos en los AA<sub>1</sub>-AA<sub>224</sub> de la SEQ ID N°: 34.

Entre los polipéptidos preferidos de la invención, una realización representa la pre-pro-secuencia (como se expone en las SEQ ID N°: 2, 4, 9, 16 y 34, respectivamente), la pro-secuencia (como se expone en los AA<sub>75</sub>- AA<sub>105</sub> de la SEQ ID N°: 2, o AA<sub>41</sub>-AA<sub>140</sub> de las SEQ ID N°: 4 y 9, respectivamente), la secuencia madura (como se expone en las SEQ ID N°: 5, 6, 7, 10, 11 ó 12, preferiblemente SEQ ID N°: 10, 11, 12), y más preferiblemente las secuencias truncadas (SEQ ID N°: 35-48) de la neublastina.

60

Los polipéptidos de la invención incluyen variantes de polipéptidos. En el contexto de esta invención, la expresión “variante de polipéptido” significa un polipéptido (o proteína) que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de las secuencias presentadas en las SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 34 o SEQ ID N°S: 35-48, en uno o más posiciones de aminoácidos. Dichas variantes de polipéptidos incluyen los polipéptidos modificados descritos antes, así como sustituciones conservativas, variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos.

Como se define en el presente documento, la expresión “sustituciones conservativas” indica la sustitución de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Por ejemplo, se esperaría que las sustituciones conservativas de aminoácidos tuvieran poco o no tuvieran efecto en la actividad biológica, en particular si representan menos del 10% del número total de restos en el polipéptido o proteína. Preferiblemente, las sustituciones conservativas de aminoácidos representan cambios en menos del 5% de polipéptido o proteína, más preferiblemente menos de 2% del polipéptido o proteína (p. ej., cuando se calcula de acuerdo con NBN113, las sustituciones conservativas más preferidas representarán menos de 3 sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje). En una realización particularmente preferida, hay una sola sustitución de aminoácido en la secuencia, en la que tanto el aminoácido sustituido como el de sustitución no son cíclicos.

Otros ejemplos de sustituciones particularmente conservativas incluyen las sustituciones de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina, y similares.

La expresión sustitución conservativa también incluye el uso de un resto de aminoácido sustituido en lugar de un resto de aminoácido original no sustituido con la condición de que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

Por consiguiente, la expresión “variante de sustitución conservativa” se refiere a un polipéptido de neublastina que difiere de un polipéptido de neublastina de tipo salvaje o de referencia por la presencia de al menos una sustitución de aminoácido conservativa.

Las modificaciones de una secuencia primaria de aminoácidos de neublastina pueden dar como resultado proteínas que tienen actividad sustancialmente equivalente comparadas con el polipéptido homólogo sin modificar, y por lo tanto se pueden considerar análogos funcionales de las proteínas originales. Dichas modificaciones puede ser deliberadas, p. ej., por mutagénesis de sitio dirigida, o pueden ocurrir de forma espontánea, e incluye variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies, y polimorfismos. De acuerdo con la invención, también se contemplan dichos análogos funcionales.

Además, las modificaciones de la secuencia primaria de aminoácidos pueden dar como resultado proteínas que no retienen la actividad biológica de la proteína original, incluyendo las formas negativas dominantes, etc. Una proteína negativa dominante puede interferir con la proteína salvaje mediante la unión a o la retirada de otra forma de agentes de regulación, tal como componentes secuencia arriba o secuencia abajo, que normalmente interactúan funcionalmente con el polipéptido. De acuerdo con la invención, también se contemplan dichas formas negativas dominantes.

Un “péptido señal” es una secuencia de péptido que dirige un polipéptido recién sintetizado al que está unido el péptido señal al retículo endoplásmico (ER) para el posterior proceso postraduccional y distribución.

Un “péptido señal heterólogo”, tal como se usa en el presente documento en el contexto de la neublastina, significa un péptido señal que no es el péptido señal de la neublastina humana, sino normalmente el péptido señal de alguna proteína de mamífero distinta de la neublastina.

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia de ADN de neublastina humana (ADNc o ADN genómico) o las secuencias que difieren del ADN de neublastina humana debido a cambios de codones silenciosos o a cambios de codones que producen sustituciones conservativas de aminoácidos, se pueden usar para modificar genéticamente células humanas cultivadas de modo que sobreexpresen y segreguen la enzima.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos quiméricos o polipéptidos de fusión escindibles en los que otro polipéptido está fusionado al extremo N o extremo C del polipéptido o un fragmento del mismo. Se puede producir un polipéptido quimérico por fusión de una secuencia de ácido nucleico (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de ácido nucleico (o parte de la misma) de la presente invención.

Las técnicas para producir polipéptidos quiméricos son técnicas estándar. Dichas técnicas normalmente requieren la unión de secuencias de una forma que estén ambas en el mismo marco de lectura, y la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del mismo o los mismos promotores y terminador.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen formas truncadas del polipéptido de neublastina. En dichas moléculas truncadas, se han eliminado uno o más aminoácidos del extremo N o el extremo C, preferiblemente del extremo N. Los polipéptidos de neublastina truncados incluyen los polipéptidos humanos designados en el presente documento como NBN112 (SEQ ID N°: 35), NBN111 (SEQ ID N°: 36), NBN110 (SEQ ID N°: 37), NBN109 (SEQ ID N°: 38), NBN108 (SEQ ID N°: 39), NBN107 (SEQ ID N°: 40), NBN106 (SEQ ID N°: 41), NBN105 (SEQ ID N°: 42), NBN104 (SEQ ID N°: 43), NBN103 (SEQ ID N°: 44), NBN102 (SEQ ID N°: 45), NBN101 (SEQ ID N°: 46), NBN100 (SEQ ID N°: 47) y NBN99 (SEQ ID N°: 48), y los homólogos correspondientes de estos polipéptidos de neublastina humana truncados, que incluyen pero no se limitan a neublastina de rata y de ratón.

Por ejemplo, la invención incluye un polipéptido de neublastina truncado cuyo extremo amino carece de uno o más aminoácidos amino-terminales de un polipéptido de neublastina. Es decir, el polipéptido de neublastina truncado contiene el dominio de siete cisteínas de la neublastina. En algunas realizaciones, el polipéptido de neublastina truncado incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 70% de homología con los aminoácidos 12-113 de la SEQ ID N°: 12, es decir, NBN102 (SEQ ID N°: 45). Preferiblemente, el polipéptido de neublastina truncado es al menos 85% homólogo con los aminoácidos 12-113 de la SEQ ID N°: 12. Más preferiblemente, el polipéptido de neublastina truncado es al menos 95% homólogo con los aminoácidos 12-113 de la SEQ ID N°: 12. Lo más preferiblemente, el polipéptido de neublastina truncado es al menos 99% homólogo con los aminoácidos 12-113 de la SEQ ID N°: 12. Otros ejemplos similares de neublastina truncada incluyen, por ejemplo, los polipéptidos que incluyen los aminoácidos 42-140 de la SEQ ID N°: 9, aminoácidos 113-224 de la SEQ ID N°: 16, aminoácidos 113-224 de la SEQ ID N°: 34. Los ejemplos específicos adicionales incluyen, pero no se limitan a NBN99 (SEQ ID N°: 48), NBN100 (SEQ ID N°: 47), NBN101 (SEQ ID N°: 46), NBN102 (SEQ ID N°: 45), NBN103 (SEQ ID N°: 44), NBN104 (SEQ ID N°: 43), NBN105 (SEQ ID N°: 42), NBN106 (SEQ ID N°: 41), NBN107 (SEQ ID N°: 40), NBN108 (SEQ ID N°: 39), NBN109 (SEQ ID N°: 38), NBN110 (SEQ ID N°: 37), NBN111 (SEQ ID N°: 36) y NBN112 (SEQ ID N°: 35) humanos, descritos antes, u homólogos o derivados de los mismos. Los polipéptidos de NBN truncados pueden ser sintéticos, expresados a partir construcciones de ADN clonadas, o resultar de la escisión enzimática de polipéptidos de NBN maduros.

En realizaciones preferidas, el polipéptido de neublastina truncado incluye al menos los 85 aminoácidos carboxi terminales de un polipéptido de neublastina. En realizaciones preferidas, incluye al menos los 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 o 112 aminoácidos carboxi terminales de un polipéptido de neublastina.

En realizaciones preferidas, el polipéptido de neublastina truncado se une a un polipéptido RET, preferiblemente cuando el polipéptido RET se expresa en la superficie de una célula de mamífero, tal como una neurona.

La neublastina truncada se puede preparar usando la expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neublastina truncado usando procedimientos conocidos en la técnica y secuencias que se proporcionan en el presente documento.

Alternativamente, el polipéptido de neublastina truncado se puede obtener proporcionando un polipéptido de neublastina maduro, tal como NBN113 de SEQ ID N°: 12, y poniendo en contacto el polipéptido de neublastina maduro con al menos una proteasa en condiciones suficientes para producir el polipéptido de neublastina truncado. Preferiblemente, al menos una proteasa es una exoproteasa, y el contacto del polipéptido de neublastina da como resultado la formación de un producto de digestión del polipéptido de neublastina por la exopeptidasa que puede ser digerido más con una dipeptidil peptidasa. En realizaciones alternativas, la proteasa es la aminopeptidasa, Endo Lys C o tripsina.

### **Homología de secuencias de aminoácidos**

El grado con el que un polipéptido candidato comparte homología con un polipéptido de neublastina de la invención se determina como el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos. Un nivel alto de identidad de secuencia indica una probabilidad de que la primera secuencia derive de la segunda secuencia.

La identidad se determina mediante análisis por ordenador, tal como, sin limitaciones, el programa de alineamiento de ordenador ClustalX (Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, & Higgins DG: "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools"; *Nucleic Acids Res.* 1997,25 (24): 4876-82), y los parámetros por defecto sugeridos en el mismo. Usando este programa, la parte madura de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN análoga de la invención presenta un grado de identidad de al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, lo más preferiblemente al menos 99% con la secuencia de aminoácidos presentada en el presente documento como SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 4; SEQ ID N°: 5; SEQ ID N°: 6; SEQ ID N°: 7; SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 34, SEQ ID N°: 35, SEQ ID N°: 36, SEQ ID N°: 37, SEQ ID N°: 38, ID NO: 39; SEQ ID N°: 40; SEQ ID N°: 41; SEQ ID N°: 42, SEQ ID N°: 43, SEQ ID N°: 44; SEQ ID N°: 45; SEQ ID N°: 46; SEQ ID N°: 47 o SEQ ID N°: 48.

De acuerdo con la determinación de la homología, se ha confirmado que el polipéptido de neublastina de la invención, que pertenece a la superfamilia de TGF- $\beta$ , está relacionado con la subfamilia de GDNF, pero representa un miembro diferente de esta subfamilia.

## 5 Polipéptidos bioactivos

El polipéptido de la invención se puede proporcionar de cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas glicosiladas, proteínas no glicosiladas, proteínas fosforiladas, proteínas no fosforiladas, formas truncadas, o cualquier otra proteína modificada postraduccionalmente. Un polipéptido de neublastina bioactivo incluye un polipéptido que cuando dimeriza, solo o en presencia de un cofactor (tal como GFR $\alpha$ 3 o RET), se une a RET, induce la dimerización de RET y autofosforilación de RET.

El polipéptido de la invención puede ser en particular un polipéptido N-glicosilado, cuyo polipéptido preferiblemente está glicosilado en los restos N indicados en las listas de secuencias.

En una realización preferida, el polipéptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 9, que tiene un resto de asparagina glicosilado en la posición 122; la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 10, que tiene un resto de asparagina glicosilado en la posición 122; la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 11, que tiene un resto de asparagina glicosilado en la posición 98; o la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID N°: 12, que tiene un resto de asparagina glicosilado en la posición 95.

Esta invención también contempla proteínas de fusión de neublastina, tales como fusiones con Ig, como se describe, por ejemplo en la patente de Estados Unidos 5.434.131, incorporada en el presente documento por referencia, o fusiones con albúmina del suero.

En una realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID N°: 2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 2.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 4.

En una tercera realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 5.

En una cuarta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 6.

En una quinta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 7.

El polipéptido de neublastina de la invención incluye variantes alélicas, p. ej., las secuencias de aminoácidos de los polipéptido de las SEQ ID N°: 5-7, en las que el primero aa X designa Asn o Thr, y el segundo aa X designa Ala o Pro.

En una sexta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 9, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 9.

- 5 En una séptima realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 10.
- 10 En una octava realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 11, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 11.
- 15 En una novena realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 12.
- 20 En una décima realización la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con la secuencia presentada en la SEQ ID N°: 16, que es una pre-pro-neublastina de origen murino.
- 25 En otras realizaciones, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de las SEQ ID N°: 35-48, o una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga con una cualquiera de las secuencias presentadas en las SEQ ID N°: 35-48.
- 30 En otra realización, el polipéptido de la invención mantiene la huella dactilar de la subfamilia de GDNF, es decir, los restos de aminoácidos subrayados en la tabla 3, mostrada en los ejemplos.
- 35 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar en condiciones muy restrictivas con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 1, su cadena complementaria o un subfragmento de la misma. En una realización preferida, el polipéptido de la invención es codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 1. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención es codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 1.
- 40 En otra realización más, la invención proporciona un polipéptido nuevo codificado por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar en condiciones muy restrictivas con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 3, su cadena complementaria o un subfragmento de la misma. En una realización preferida, el polipéptido de la invención es codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 3. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención es codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 3.
- 45 En una realización más preferida, el polipéptido de la invención incluye la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Neublastina maduro. Incluso más preferiblemente, la invención incluye la secuencia de aminoácidos de una forma truncada del polipéptido de Neublastina que incluye los 7 restos de cisteína conservados presentes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de Neublastina.
- 50 En otra realización más, la invención proporciona un polipéptido nuevo codificado por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar en condiciones muy restrictivas con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8, su cadena complementaria o un subfragmento de la misma. En una realización preferida, el polipéptido de la invención es codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención es codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 8.
- 55 En otra realización más, la invención proporciona un polipéptido nuevo codificado por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar en condiciones muy restrictivas con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15, su cadena complementaria o un subfragmento de la misma. En una realización preferida, el polipéptido de la invención es codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención es codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID N°: 15.
- 60
- 65

**Origen biológico**

El polipéptido de la invención se puede aislar de células de mamífero, preferiblemente de una célula humana o una célula de origen murino.

5 En una realización más preferida, el polipéptido de la invención se puede aislar de tejido cardíaco humano, de músculo esquelético humano, de páncreas humano, o de tejido cerebral humano, en particular del núcleo caudado o del tálamo, o se puede obtener del ADN de origen mamífero, como se discute con más detalle más adelante.

**Actividad neurotrófica**

10 Los polipéptidos de neublastina, incluyendo los polipéptidos de neublastina truncados de la invención, son útiles para moderar el metabolismo, crecimiento, diferenciación o supervivencia de un nervio o célula neuronal. En particular, los polipéptidos de neublastina se usan para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad de un animal vivo, p. ej., un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad son sensibles a la actividad de agentes neurotróficos. Dichos tratamiento y procedimiento se describen con más detalles más adelante.

**Anticuerpos**

20 Los polipéptidos de neublastina o fragmentos de polipéptido de la invención se usan para producir anticuerpos específicos de neublastina. Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo específico de neublastina" es un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, que es inmunorreactivo frente a un polipéptido de neublastina o fragmento de polipéptido, o que se une con especificidad a un epítipo de un polipéptido de neublastina.

25 La preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales es conocida en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener en particular como describen, p. ej., Green y col.: "Production of Polyclonal Antisera" en *Immunochemical Protocols* (Manson, Ed.); Humana Press, 1992, páginas 1-5; Coligan y col.: "Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters" en *Current Protocols in Immunology*. 1992, Sección 2.4.1, y Ed Harlow y David Lane (Eds.) en "Antibodies; A laboratory manual" Cold Spring Harbor Lab. Press 1988. Estos protocolos se incorporan en el presente documento por referencia. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener en particular como describen, p. ej., Kohler y Milstein, *Nature*, 1975,256: 495; Coligan y col., en *Current Protocols in Immunology*. 1992, Secciones 2.5.1 - 2.6.7; y Harlow y col., en *Antibodies: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor, Pub.*, 1988, página 726; cuyos protocolos se incorporan en el presente documento por referencia.

30 Brevemente, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando, p. ej. en un ratón, una composición que comprende un antígeno, verificando la presencia de producción de anticuerpos sacando una muestra de suero, sacando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen los anticuerpos contra el antígeno, y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

35 Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar de cultivos de hibridoma mediante una variedad de técnicas bien establecidas, incluyendo la cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa, cromatografía por exclusión de tamaños, y cromatografía de intercambio iónico, véase, p. ej. Coligan y col. en *Current Protocols in Immunology*. 1992, Secciones 2.7.1 - 2.7.12, y Secciones 2.9.1 - 2.9.3; y Barnes y col: "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" en *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 1992, Vol. 10, páginas 79-104. Los anticuerpos policlonales o monoclonales opcionalmente se pueden purificar más, p. ej. por unión a y elución de una matriz a la cual está unido el polipéptido contra el cual se produjeron los anticuerpos.

45 Los anticuerpos que se unen al polipéptido de neublastina de la invención se pueden preparar usando un polipéptido intacto o fragmentos que contienen péptidos pequeños de interés como el antígeno de inmunización. El polipéptido usado para inmunizar un animal se puede obtener por técnicas de ADN recombinante o por síntesis química, y opcionalmente se puede conjugar con una proteína transportadora. Las proteínas transportadoras usadas habitualmente que están químicamente acopladas al péptido incluyen la hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina, albúmina de suero bovino (BSA) y toxoide de tétanos. El péptido acoplado después se puede usar para inmunizar el animal, que puede ser en particular un ratón, una rata, un hámster o un conejo.

50 En una realización, los anticuerpos se producen usando los siguientes péptidos: Péptido 1: CRPTRYEAVSFMDVNST (aminoácidos 108-124 de la SEQ ID N°: 9); o Péptido 2:ALRPPGSRPVSQPC (aminoácidos 93-107 de la SEQ ID N°: 9). Se describen procedimientos para producir anticuerpos usando estos polipéptidos en el ejemplo 10.

También se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra los siguientes péptidos:

**PéptidoR27: GPGSRARAAGARGC (aminoácidos 30-43 del ID SEC N°: 9)**

**PéptidoR28: LGHRSEDELVRFRFC (aminoácidos 57-70 del ID SEC N°: 9)**

**PéptidoR29: CRRARSPHDLSL (aminoácidos 74-85 del ID SEC N°: 9)**

**PéptidoR30: LRPPPGSRPVSQPC (aminoácidos 94-107 del ID SEC N°: 9); y**

**PéptidoR31: STWRTVDRLSATAC (aminoácidos 123-136 del ID SEC N°: 9).**

De este grupo, sólo los péptidos R30 y R31, relativamente cerca del extremo C, reconocían la proteína desnaturizada en condiciones reductoras en una transferencia Western.

También se obtuvieron péptidos derivados de neublastina adicionales de la proteína NBN, como se detalla más adelante, que son bucles expuestos en la superficie previstos de acuerdo con la estructura de GDNF conocida (Eigenbrot and Gerber, *Nat. Struct. Biol.*, 4, pp. 435-438 (1997)), y por lo tanto son útiles para la generación de anticuerpos:

**Región 1: CRLRSQLVVPRALGLGHRSEDELVRFRFC (AA43-70 del ID SEC N°: 9)**

**Región 2: CRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC (AA74-107 del ID SEC N°: 9)**

**Región 3: CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAC (AA108-136 del ID SEC N°: 9)**

En otro aspecto de la invención, se pueden usar anticuerpos que se unen específicamente a la neublastina o a péptidos derivados de neublastina, para detectar la presencia de dichos factores neurotróficos de neublastina en diferentes medios, y en particular para el diagnóstico de afecciones o enfermedades asociadas con moléculas de neublastina de la invención. En la técnica se conocen una variedad de protocolos para dicha detección, incluyendo ELISA, RIA y FACS.

Los anticuerpos de esta invención también se pueden usar para bloquear el efecto del factor neurotrófico de neublastina, y en particular pueden ser anticuerpos neutralizantes.

#### **Procedimientos para preparar los polipéptidos de la invención**

Se cultiva una célula que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de neublastina de la invención en condiciones que permiten la producción del polipéptido, seguido de recuperación del polipéptido del medio de cultivo, como se detalla más adelante. Cuando las células se van a modificar genéticamente para el propósito de producir un polipéptido de neublastina, las células se pueden modificar por procedimientos convencionales o por activación de genes.

De acuerdo con procedimientos convencionales, se puede introducir una molécula de ADN que contiene una secuencia de ADNc o ADN genómico de neublastina en una construcción de expresión y transfectarla en células por procedimientos estándar que incluyen, pero no se limitan a transfección mediada por liposomas, polibreno o DEAE-dextrano, electroporación, precipitación por fosfato de calcio, microinyección, o microproyectiles de alta velocidad ("biolística"). Alternativamente, se podría usar un sistema que libere ADN mediante vector vírico. Los virus que se sabe que son útiles para la transferencia de genes incluyen adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, herpesvirus, virus de la parotitis, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus vaccinia tal como virus de la viruela del canario, así como la infección por baculovirus de células de insecto, en particular células de insecto SfP9.

Alternativamente, las células se pueden modificar usando un procedimiento de activación de gen ("GA"), tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.733.761 y 5.750.376, todas incorporadas en el presente documento por referencia.

Por consiguiente, la expresión "modificado genéticamente", tal como se usa en el presente documento en referencia a las células, se entiende que abarca células que expresan un producto génico particular después de introducir una molécula de ADN que codifican el producto génico y/o los elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia codificante para el producto génico. La molécula de ADN se puede introducir mediante la técnica de gen dirigido, que permite la incorporación de la molécula de ADN en un sitio genómico particular.

#### **Vectores de expresión recombinantes**

En otro aspecto la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el polinucleótido de la

invención. El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión eucariota adecuado. Los vectores de expresión recombinantes preferidos son el vector que contiene el promotor de la ubiquitina pTEJ-8 (*FEBS Lett.* 1990 267 289-294), y derivados del mismo, p. ej. pUbi1Z. Un vector de expresión eucariota disponible en el comercio preferido es p. ej. el vector que contiene el promotor de virus pcDNA-3 (disponible en Invitrogen). Otro vector de expresión preferido usa los promotores temprano de SV40 y tardío principal de adenovirus (derivados de plásmido pAD2beta; Norton y Coffin, *Mol. Cell. Biol.* 5: 281 (1985)).

Esta invención también proporciona vectores de expresión procariotas y genes sintéticos (Syngenes) con optimización de codones para la expresión procariota. Los genes sintéticos se construyeron con menor contenido de GC y codones bacterianos preferidos (p. ej., *E. coli*). El gen sintético se ha clonado en dos vectores pET19b y pMJB164, un derivado de pET19b. La construcción con pET19b se muestra en la figura 14. En esta construcción, la secuencia que codifica el dominio de NBN113 de la neublastina se fusiona directamente con una metionina de iniciación. La construcción con pMJB164 se muestra en la figura 15.

### 15 **Producción de células**

En otro aspecto más la invención proporciona una producción de células genéticamente manipuladas para que comprendan la secuencia de polinucleótido aislada de la invención, y/o un vector de expresión recombinante de la invención. La célula de la invención se puede manipular genéticamente en particular para expresar, sobreexpresar o coexpresar de forma transitoria o estable el polipéptido de la invención. En la técnica se conocen procedimientos para generar la expresión transitoria y estable.

El polinucleótido de la invención se puede insertar en un vector de expresión, p. ej. un plásmido, virus u otro vehículo de expresión, y se puede unir de forma operativa a secuencias de control de la expresión mediante ligado de una forma que se logre la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, codones de inicio, señales de corte y empalme para intrones, y codones de parada, todos mantenidos en el marco de lectura correcto del polinucleótido de la invención para así permitir la traducción adecuada del ARNm. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líderes y secuencias de la pareja de fusión.

El promotor puede ser en particular un promotor constitutivo o inducible. Cuando se clonan en sistemas bacterianos, se pueden usar los promotores inducibles tales como pL de bacteriófago  $\lambda$ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac). Cuando se clona en sistemas de mamíferos, se pueden usar los promotores derivados del genoma de células de mamífero, p. ej., el promotor de la ubiquitina, el promotor TK o el promotor de metalotioneina, o de virus de mamíferos, p. ej., la repetición terminal larga de retrovirus, el promotor tardío de adenovirus o el promotor de 7,5 K del virus vaccinia. También se pueden usar los promotores obtenidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar la transcripción del polinucleótido de la invención.

Los vectores de expresión adecuados típicamente comprenden un origen de expresión, un promotor así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas, e incluyen vectores tales como el vector de expresión basado en T7 para la expresión en bacterias (Rosenberg y col; *Gene* 1987 56 125), los vectores de expresión pTEJ-8, pUbi1Z, pcDNA-3 y pMSXND para la expresión en células de mamíferos (Lee y Nathans, *J. Biol. Chem.* 1988 263 3521), vectores derivados de baculovirus para la expresión en células de insectos, y el vector de expresión de oocito PTLN (Lorenz C., Pusch M. & Jentsch T.J.: "Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties"; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 93 13362-13366).

En una realización preferida, la célula de la invención es una célula eucariota, p. ej., una célula de mamífero, p.ej., una célula humana, un oocito o una célula de levadura. La célula de la invención puede ser, sin limitación, una célula de riñón embrionario humano (HEK), p. ej., una célula HEK 293, una célula BHK21, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula de oocito de *Xenopus laevis* (XLO). En una realización, la célula de la invención es una célula fúngica, p. ej., una célula fúngica de filamentosos. En otra realización más, la célula es una célula de insecto, más preferiblemente la célula Sf9. Son células de mamífero adicionales las líneas celulares PC12, HiB5, RN33b, células progenitoras neurales humanas, y otras células derivadas de células humanas, en especial células neurales.

Los ejemplos de células primarias o secundarias incluyen fibroblastos, células epiteliales que incluyen células epiteliales mamarias e intestinales, células endoteliales, elementos formados de la sangre incluyendo linfocitos y células de la médula ósea, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, células musculares, células neurales o precursores de estos tipos de células. Los ejemplos de líneas celulares inmortalizadas humanas en el presente procedimiento incluyen, pero no se limitan a células de melanoma de Bowes (Nº de acceso en ATCC CRL 9607), células Daudi (Nº de acceso en ATCC CCL 213), células HeLa y células derivadas de HeLa (Nº de acceso en ATCC CCL 2, CCL 2.1, y CCL 2.2), células HL-60 (Nº de acceso en ATCC CCL 240), células HT-1080 (Nº de acceso en ATCC CCL 121), células Jurkat (Nº de acceso en ATCC TIB 152), células de carcinoma KB (Nº de acceso en ATCC CCL 17), células de leucemia K-562 (Nº de acceso en ATCC CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (Nº de acceso en ATCC BTH 22), células MOLT-4 (Nº de acceso en ATCC 1582), células Namalwa (Nº de acceso en ATCC

CRL 1432), células Raji (Nº de acceso en ATCC CCL 86), células RPMI8226 (Nº de acceso en ATCC CCL 155), células U-937 (Nº de acceso en ATCC CRL 1593), células 2R4 de sublínea WI-38VA13 (Nº de acceso en ATCC CLL 75.1), y células de carcinoma de ovario 2780AD (Van der Blick y col, *Cancer Res.* 48: 5927-5932, 1988), así como células de heterohibridoma producidas por fusión de células humanas y células de otra especie. También se pueden usar cepas secundarias de fibroblastos humanos, tales como WI-38 (Nº de acceso en ATCC CCL 75) y MRC-5 (Nº de acceso en ATCC CCL 171).

Cuando la célula de la invención es una célula eucariota, la incorporación del polinucleótido heterólogo de la invención se puede llevar a cabo en particular por infección (usando un vector vírico), por transfección (usando un vector plasmídico), usando precipitación por fosfato de calcio, microinyección, electroporación, lipofección u otros procedimientos fisicoquímicos conocidos en la técnica.

En una realización más preferida, la secuencia de polinucleótido aislada de la invención, y/o un vector de expresión recombinante de la invención se transfieren en una célula huésped de mamífero, una célula progenitora neural, una célula astrocito, una célula T, una célula de tallo hematopoyético, una célula que no se divide, o una célula endotelial cerebral, que comprende al menos una molécula de ADN capaz de mediar la inmortalización y/o transformación celulares.

La activación de un gen endógeno en una célula huésped se puede llevar a cabo introduciendo elementos reguladores, en particular introduciendo un promotor capaz de realizar la transcripción de un gen endógeno que codifica el polipéptido de neublastina de la invención.

### **Composiciones farmacéuticas**

En otro aspecto la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de la invención.

Para usar en terapia, el polipéptido de la invención se puede administrar de cualquier forma conveniente. En una realización preferida, el polipéptido de la invención se incorpora en una composición farmacéutica junto con uno o más adyuvantes, excipientes, vehículos y/o diluyentes, y la composición farmacéutica la puede preparar el experto en la materia usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender el polipéptido de la invención, o anticuerpos del mismo. La composición se puede administrar sola o combinada con uno o más agentes, fármacos u hormonas distintos.

La composición farmacéutica de esta invención se puede administrar por cualquier vía adecuada, incluyendo, pero sin limitar a la vía oral, intravenosa, intramuscular, interarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, arterial, tópica, sublingual o aplicación rectal, bucal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, transmucosa o por inhalación.

Los procedimientos de suministro intrapulmonar, aparatos y preparación de fármacos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.785.049, 5.780.019, y 5.775.320, todas incorporadas en el presente documento por referencia. La administración puede ser por inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o se pueden hacer más continuas por administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que es externo (p. ej., una bolsa IV) o interno (p. ej., un implante biodegradable, un órgano bioartificial, o una colonia de células de producción de neublastina implantadas). Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.407.957, 5.798.113, y 5.800.828, todas incorporadas en el presente documento por referencia. Los procedimientos y aparatos de suministro intrapulmonar se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.654.007, 5.780.014, y 5.814.607, todas incorporadas en el presente documento por referencia.

En particular, la administración de una neublastina de acuerdo con esta invención se puede lograr usando cualquier medio de suministro adecuado, incluyendo:

(a) bomba (véase p. ej. *Annals of Pharmacotherapy*, 27: 912 (1993); *Cancer*, 41: 1270 (1993); *Cancer Research*. 44: 1698 (1984), incorporados en el presente documento por referencia),

(b) microencapsulación (véase, p. ej., las patentes de Estados Unidos 4.352.883; 4.353.888 y 5.084.350, incorporadas en el presente documento por referencia),

(c) implantes polímeros de liberación continua (véase, p. ej., Sabel, patente de Estados Unidos 4.883.666, incorporada en el presente documento por referencia),

(d) macroencapsulación (véase, p. ej., patentes de Estados Unidos 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y solicitudes de patentes PCT publicadas WO92/19195, WO 95/05452, todas incorporadas en el presente documento

por referencia);

(e) injertos de células desnudas o sin encapsular en el SNC (véase, p. ej., patentes de Estados Unidos 5.082.670 y 5.618.531, todas incorporadas en el presente documento por referencia); o

(f) inyección, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular o en otro sitio adecuado;

(g) administración oral, en cápsula, líquido, comprimido, píldora, o formulación de liberación prolongada.

En una realización de la invención, se suministra un polipéptido de neublastina directamente en el SNC, preferiblemente en los ventrículos cerebrales, parénquima cerebral, el espacio intratecal u otra localización del SNC adecuado, más preferiblemente intratecal.

En otra realización preferida, el presente polipéptido de neublastina se da por suministro sistémico por inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión intravenosa.

Otros sistemas de suministro parenteral útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministro con bomba, suministro de célula encapsulada, suministro liposómico, inyección suministrada con aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación y parche transdérmico.

Se pueden encontrar más detalles sobre las técnicas para la formulación y administración en la última edición de *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, PA).

El principio activo se puede administrar en una o varias dosis al día. Las dosis contempladas como adecuadas actualmente son entre 0,5 ng de neublastina/kg de peso corporal a aproximadamente 50 µg/kg por administración y de aproximadamente 1,0 ng/kg a aproximadamente 100 µg/kg diarios. Cuando se suministran directamente al SNC, la composición farmacéutica de neublastina debe proporcionar una concentración local del factor neurotrófico de aproximadamente 5 ng/ml de líquido cefalorraquídeo ("LCR") a 25 ng/ml de LCR.

La dosis administrada debe ajustarse, por supuesto, con cuidado a la edad, peso y afección del individuo que se está tratando, así como la vía de administración, la forma de dosificación y el régimen, y el resultado deseado, y la dosificación exacta debe determinarla, por supuesto, el médico.

En otras realizaciones, el polipéptido de neublastina de la invención se puede administrar por suministro genético, usando líneas de células y vectores como se describe más adelante en los procedimientos de tratamiento. Para generar dichas líneas celulares terapéuticas, el polinucleótido de la invención se puede insertar en un vector de expresión, p. ej. un plásmido, virus u otro vehículo de expresión, y unir de forma operativa a las secuencias del control de la expresión mediante ligado en una forma que la expresión de la secuencia de codificación se logre en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, codones de inicio, señales de corte y empalme para intrones, y codones de parada, todas mantenidas en el marco de lectura correcto del polinucleótido de la invención, para permitir así la traducción adecuada del ARNm. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líderes y secuencias de parejas de fusión.

El promotor puede ser en particular un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos pueden ser sintéticos, víricos o derivados de genoma de células de mamífero, p. ej., el promotor de la ubiquitina humana. En una realización preferida la línea celular terapéutica será una línea celular neural inmortalizada humana que expresa el polipéptido de la invención. Para el implante, se contempla el implante entre aproximadamente  $10^5$  y  $10^{10}$  células, más preferiblemente  $10^6$  a aproximadamente  $10^8$  células.

### **Procedimientos de tratamiento**

La presente invención, que se refiere a polinucleótidos y proteínas, polipéptidos, fragmentos de péptidos o derivados producidos a partir de los mismos, así como a anticuerpos dirigidos contra dichas proteínas, péptidos o derivados, se puede usar para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad de un cuerpo animal vivo, incluyendo un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad es sensible a la actividad de agentes neurotróficos.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden usar directamente, p. ej., mediante composiciones farmacéuticas inyectadas, implantadas o ingeridas para tratar un proceso patológico sensible a los polipéptidos de neublastina.

El polinucleótido de la invención, incluyendo las secuencias complementarias del mismo, se puede usar para la expresión del factor neurotrófico de la invención. Esto se puede lograr mediante líneas celulares que expresan dichas proteínas, péptidos o derivados de la invención, o mediante vectores víricos que codifican dichas proteínas,

péptidos o derivados de la invención, o mediante células huésped que expresan dichas proteínas, péptidos o derivados. Estas células, vectores y composiciones se pueden administrar en las zonas objetivo de tratamiento para afectar a un proceso patológico o trastorno sensible a los polipéptidos de neublastina.

- 5 Se pueden obtener vectores de expresión adecuados de lentivirus, retrovirus, adenovirus, herpesvirus o virus vaccinia, o de diferentes plásmidos producidos con bacterias para usar para suministrar in vivo las secuencias de nucleótidos a un organismo entero o un órgano, tejido o población celular objetivos. Otros procedimientos incluyen, pero no se limitan, transfección con liposomas, electroporación, transfección con péptidos transportadores que contienen señales nucleares u otras señales de localización, y suministro de genes por sistemas de liberación lenta.
- 10 En otro aspecto más de la invención, las secuencias de nucleótidos "antisentido" complementarias de los genes de neublastina o partes de los mismos, se pueden usar para inhibir o potenciar la expresión de la neublastina.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento para tratar o aliviar un trastorno o enfermedad de un cuerpo animal vivo, incluyendo un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad es sensible a la actividad de los agentes neurotróficos.

Este trastorno o enfermedad puede ser en particular daño del sistema nervioso producido por traumatismo, cirugía, isquemia, infección, reperfusión, enfermedad metabólica, deficiencia nutricional, tumor maligno o un agente tóxico, o un proceso genético o idiopático.

El daño puede haberse producido, en particular, en neuronas sensoriales o células de ganglios retinales, incluyendo neuronas en los ganglios de la raíz dorsal o en cualquiera de los siguientes tejidos: los ganglios geniculados, petrosos y nodosos; el complejo del vestíbulo del oído del nervio craneal VIII<sup>o</sup>; el polo ventrolateral del lóbulo maxilomandibular del ganglio del trigémino; y el núcleo del trigémino mesencefálico.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, el trastorno o enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa que implica neuronas lesionadas o traumatizadas, tales como lesiones traumáticas de nervios periféricos, la médula, y/o la médula espinal, daño neuronal isquémico cerebral, neuropatía y en especial neuropatía periférica, traumatismo o lesión de nervio periférico, accidente cerebrovascular isquémico, lesión cerebral aguda, lesión de la médula espinal aguda, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, exposición a neurotoxinas, enfermedades metabólicas tales como diabetes o disfunciones renales y lesión causada por agentes infecciosos, enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, síndromes de Parkinson-Plus, parálisis supranuclear progresiva (síndrome de Steele-Richardson-Olszewski), atrofia olivopontocerebelar (OPCA), síndrome de Shy-Drager (atrofia de múltiples sistemas), complejo parkinsonismo-demencia de Guam, esclerosis lateral amiotrófica, o cualquier otra enfermedad congénita o neurodegenerativa, y deterioro de la memoria conectado a la demencia.

En una realización preferida, se considera el tratamiento de neuronas del sistema sensorial y/o autonómico. En otra realización preferida, se contempla el tratamiento de enfermedades de neuronas motoras tales como la esclerosis lateral amiotrófica ("ELA") y atrofia muscular espinal. En otra realización preferida más, se contempla el uso de moléculas de neublastina de esta invención para potenciar la recuperación de nervios después de lesión traumática. En una realización, se contempla el uso de un canal de guía de nervios con una matriz que contiene polipéptidos de neublastina. Dichos canales de guía de nervios se describen, p. ej., en la patente de Estados Unidos n<sup>o</sup> 5.834.029, incorporada en el presente documento por referencia.

En una realización preferida, los polipéptidos y ácidos nucleicos de esta invención (y las composiciones farmacéuticas que los contienen) se usan en el tratamiento de neuropatías periféricas. Entre las neuropatías periféricas contempladas para el tratamiento con moléculas de esta invención están las neuropatías inducidas por traumatismo, p. ej., las causadas por lesión física o estado patológico, daño físico del cerebro, daño físico de la médula espinal, accidente cerebrovascular asociado con daño cerebral y trastornos neurológicos relacionados con neurodegeneración.

El tratamiento también contempla neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las causadas por suministro de agentes quimioterapéuticos, p. ej., taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por patógenos (p. ej., inducidas por virus), neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. Véase p. ej. las patentes de EE.UU. 5.496.804 y 5.916.555, todas incorporadas en el presente documento por referencia.

También se contempla el tratamiento de mononeuropatías, mononeuropatías múltiples y polineuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes, usando los nucleótidos y polipéptidos de neublastina de esta invención.

En otra realización preferida, los polipéptidos y ácidos nucleicos de esta invención (y composiciones farmacéuticas que los contienen) se usan en el tratamiento de diferentes trastornos en los ojos, incluyendo la pérdida de fotorreceptores en la retina en pacientes aquejados de degeneración macular, retinitis pigmentosa, glaucoma y enfermedades similares.

La presente invención proporciona además un procedimiento para prevenir los cambios degenerativos conectados con las enfermedades y trastornos anteriores, mediante implante en el cerebro de mamíferos de vectores o células humanas capaces de producir una forma biológicamente activa de la neublastina o un precursor de la neublastina, es decir, una molécula que se puede convertir fácilmente en una forma biológicamente activa de la neublastina en el cuerpo, o adicionalmente se pueden encapsular, p. ej. en membranas semipermeables, células que segregan neublastina.

Se pueden hacer crecer células adecuadas in vitro, incluyendo células diseñadas para producir neublastina, para usar en el trasplante o injerto en el cerebro de mamífero, incluyendo de ser humano.

En una realización preferida, el gen que codifica el polipéptido de la invención se transfecta en una línea celular adecuada, p. ej., en una línea de células de tallo neural de rata inmortalizadas como HiB5 y RN33b, o en una línea de células progenitoras neurales inmortalizadas humanas, y la línea celular resultante se implanta en el cerebro de un cuerpo vivo, incluyendo un ser humano, para segregar el polipéptido terapéutico de la invención en el SNC, p. ej., usando vectores de expresión descritos en la solicitud de patente internacional WO 98/32869.

### **Procedimientos de diagnóstico y cribado**

Se puede usar un ácido nucleico de neublastina para determinar si un individuo tiene predisposición a desarrollar una enfermedad neurológica que resulta de un defecto en el gen de neublastina, p.ej. un defecto en un alelo de la neublastina, que se ha adquirido, p. ej., por herencia genética, por desarrollo embrionario anómalo, o por daño del ADN adquirido. El análisis puede ser, p. ej., por detección de una delección(es) o una mutación(es) puntual(es) en el gen de neublastina, o por detección de la herencia de dicha predisposición de dichos defectos genéticos con polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) específicos, por detección de la presencia o ausencia de un gen de neublastina normal por hibridación de una muestra de ácido nucleico del paciente con una sonda(s) de ácido nucleico específica para el gen de neublastina, y determinación de la capacidad de la sonda para hibridar con el ácido nucleico.

En particular, se puede usar un ácido nucleico de neublastina como una sonda de hibridación. Dichos ensayos de hibridación se pueden usar para detectar, pronosticar, diagnosticar o hacer el seguimiento de diferentes afecciones, trastornos o estados patológicos asociados con los niveles aberrantes de ARNm que codifica la proteína de neublastina. Se puede construir un ácido nucleico de neublastina como un "marcador" para los procesos fisiológicos dependientes del factor neurotrófico neublastina. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a procesos fisiológicos "normales" (p. ej., función neuronal) y procesos patológicos (p. ej., enfermedad neurodegenerativa). La caracterización de una subpoblación(es) de pacientes particulares con niveles aberrantes (es decir, elevados o deficientes) de la proteína neublastina y/o el ARNm que codifica la neublastina, puede conducir a nuevas clasificaciones de enfermedades. Por "niveles aberrantes", como se define en el presente documento, se entiende un nivel mayor o menor respecto al de una muestra de control o individuo que no tiene el trastorno determinado por medios cuantitativos o cualitativos.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos de neublastina de esta invención también se pueden usar para cribar e identificar análogos de neublastina, incluyendo moléculas pequeñas miméticas de neublastina. En una realización contemplada, la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto candidato que induce un efecto biológico mediado por neublastina, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar una célula de ensayo que cuando se pone en contacto con neublastina es inducida para expresar un producto detectable, exponer la célula al compuesto candidato, y detectar el producto detectable. La expresión del producto detectable indica la capacidad del compuesto candidato para inducir el efecto biológico mediado por neublastina.

Además, los ácidos nucleicos y polipéptidos de neublastina de esta invención se puede usar en un chip de ADN o chips de proteínas, o en programas de ordenador para identificar nuevas secuencias de genes relacionadas y proteínas codificadas por las mismas, incluyendo variantes alélicas y polimorfismos de un solo nucleótido ("SNP"). Dichos procedimientos se describen, p. ej., en las patentes de Estados Unidos nº 5.795.716; 5.754.524; 5.733.729; 5.800.992; 5.445.934; 5.525.464.

### **EJEMPLOS**

#### **Ejemplo 1: Procedimientos para aislar ácidos nucleicos de neublastina**

##### **Procedimiento 1: Cribado rápido de ADNc de cerebro fetal humano del gen de neublastina**

Se identificó un fragmento de 290 pb en dos secuencias genómicas de alta capacidad (HTGS) enviadas a GenBank (nº de acceso AC005038 y AC005051) por su homología con la persefina humana. A partir de la secuencia de ácido nucleico del fragmento de 290 pb, se sintetizaron dos cebadores específicos de neublastina. El cebador de la cadena superior ("NBNint.sense") tenía la secuencia 5'-CCT GGC CAG CCT ACT GGG-3' (SEQ ID Nº: 17). El cebador de la

cadena inferior (“NBNint.antisense”) tenía la secuencia 5'-AAG GAG ACC GCT TCG TAG CG-3' (SEQ ID N°: 18). Con estos cebadores, se llevaron a cabo reacciones de PCR en 96 pocillos.

5 Una placa principal de 96 pocillos, que contenía ADN plasmídico de 500.000 clones de ADNc, se cargó con aproximadamente 5000 clones por pocillo. Se utilizó una subplaca de 96 pocillos con solución madre de *E. coli* DH10B en glicerol, que contenía 50 clones por pocillo.

10 Se identificó un ácido nucleico de neublastina mediante tres rondas de amplificación usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”); la amplificación aumenta el número de copias del ácido nucleico en la muestra.

**Cribado de la placa principal:** Usando la técnica de cribado de PCR en 96 pocillos describa antes, se cribó una placa principal de ADNc de cerebro fetal humano con los cebadores específicos de genes para aislar el ADNc de neublastina humana.

15 Se obtuvieron 30 ng de ADNc de cerebro fetal humano (6 ng/μl; Origene Technologies) del correspondiente pocillo de la placa principal y se pusieron en un volumen total de 25 μl que contenían los siguientes reactivos: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de genes mencionados (es decir, NBNint.sense y NBNint.antisense), 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido).

25 Las reacciones de los ciclos térmicos de la PCR se llevaron a cabo usando el siguiente procedimiento y condiciones. El ADN se desnaturizó inicialmente a 94°C durante 3 minutos, y después le siguieron 35 ciclos de desnaturización a 94°C durante 1 minuto cada uno, reasociación a 55°C durante 1 minuto, una primera extensión a 72°C durante 90 segundos; y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se analizaron los productos de 96 reacciones de PCR individuales por electroforesis en gel usando un gel de agarosa al 2% que contenía la tinción de bromuro de etidio. Se encontró que el producto de la PCR positivo, de 102 pb, visto en un pocillo, correspondía a una única subplaca de 96 pocillos.

30 El fragmento de ácido nucleico de 102 pb tenía la siguiente secuencia (SEQ ID N°: 13):

5' - CCTGGCCAGCCTACTGGGCGCCGGGGCCCTGCGACCGCCCCGGGCTCCCGGCCCGTCAG  
CCAGCCCTGCTGCCGACCCACGCGCTACGAAGCGGTCTCCTT - 3'

35 **Cribado de la subplaca:** La subplaca de 96 pocillos de cerebro fetal humano se cribó por amplificación mediada por PCR, poniendo 1 μl de la solución madre de glicerol del correspondiente pocillo de la subplaca en un volumen total de 25 μl que contenía: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de genes; 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido).

40 Se usaron las mismas condiciones de ciclos térmicos de la PCR descritos para el cribado de la placa principal. Se analizaron 96 reacciones de PCR individuales en un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio, y se identificó un pocillo positivo que dio un fragmento de la PCR de 102 pb.

45 **PCR de la colonia:** Se diluyó 1 ml de la solución madre en glicerol del pocillo positivo de la subplaca 1:100 en caldo de Luria (LB). Después se pusieron 1 ml y 10 ml de la dilución mencionada en dos placas de agar separadas que contenían caldo de Luria (“LB”) y carbenicilina 100 μg/ml. Las placas de LB después se incubaron toda la noche a 30°C. De estas placas se recogieron 96 colonias en una nueva placa de PCR de 96 pocillos que contenía: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de genes, 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido), en un volumen final de 25 μl.

55 Se usaron las mismas condiciones de ciclos térmicos de la PCR descritas para el cribado de la placa principal. Después se analizaron las 96 reacciones de la PCR individuales en un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio. Posteriormente se identificó una colonia positiva que contenía el fragmento de 102 pb.

60 La secuenciación del plásmido de ADN preparado de esta colonia positiva puso de manifiesto un ADNc de longitud entera de 861 pb (SEQ ID N°: 8). El ADNc codificaba una pre-pro-neublastina (SEQ ID N°: 9). La secuenciación automática del ADN se llevó a cabo usando el kit de secuenciación BigDye® terminator cycle (PE Applied Biosystems, EE.UU.). Los geles de secuenciación se hicieron correr en el ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, EE.UU.).

**Procedimiento 2: Clonación de ADNc de neublastina de cerebro humano:**

Se puede llevar a cabo un procedimiento adicional de amplificación del ADNc de neublastina de longitud entera o fragmento de ADNc mediante RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) y los cebadores específicos de neublastina NBNint.sense y NBNint.antisense descritos antes, combinados con cebadores específicos del vector o específicos del adaptador, por ejemplo usando el kit de amplificación de ADNc de Marathon (Clontech Laboratories, EE.UU., N° de cat. K1802-1).

Se puede usar ADNc Marathon-Ready de cerebro humano (Clontech Laboratories, EE.UU., n° de catálogo 7400-1) para amplificar el ADNc de neublastina de longitud entera. Los cebadores útiles para la amplificación incluyen un cebador de la cadena superior de neublastina 5'-ATGGAACCTGGACTTGG-3' (SEQ ID N°: 19) ("NBNNext.sense"), y un cebador de la cadena inferior de neublastina 5'-TCCATCACCCACCGGC-3' (SEQ ID N°: 20) ("NBNNext.antisense"), combinados con el cebador adaptador AP1 incluido en el ADNc Marathon-Ready. También se usó un cebador alternativo de la cadena superior 5'-CTAGGAGCCCATGCC-3' (SEQ ID N°: 28). También se puede usar un cebador alternativo de la cadena inferior 5'-GAGCGAGCCCTCAGCC-3' (SEQ ID N°: 33). Igualmente también se pueden usar los cebadores alternativos de la cadena superior de SEQ ID N°: 24 y 26.

**Procedimiento 3: Clonación de ADNc de neublastina de cerebro humano:**

Otro procedimiento de clonación del ADNc de neublastina es mediante cribado de bibliotecas de cerebro fetal o adulto humano con una o más sondas de neublastina descritas en el presente documento (e ilustradas en la figura 1). Estas bibliotecas incluyen: cerebro humano  $\lambda$ gt11 (Clontech Laboratories, EE.UU., n° de cat. HL3002b); o cerebro fetal humano  $\lambda$ gt11 (Clontech Laboratories, EE.UU., n° de cat. HL3002b).

**Procedimiento 4: Cribado rápido de ADNc fetal de ratón del gen de neublastina**

Se llevó a cabo un procedimiento de cribado rápido del gen de neublastina de la siguiente forma. Una placa principal de 96 pocillos, que contenía ADN plasmídico de 500.000 clones de ADNc, se cargó con aproximadamente 5000 clones por pocillo. Se usó una subplaca de 96 pocillos con solución madre de *E. coli* en glicerol que contenía 50 clones por pocillo. Se llevaron a cabo 3 rondas de amplificación mediada por PCR con el fin de identificar un gen de interés (es decir, de neublastina).

**Cribado de la placa principal:** Una placa principal de ADNc fetal de ratón se cribó mediante PCR en 96 pocillos usando cebadores específicos de gen para aislar el ADNc de neublastina de ratón. Se sintetizaron los dos cebadores siguientes:

(1) cebador C2 de neublastina (NBNint.sense): 5'-GGCCACCGCTCCGACGAG-3' (SEQ ID N°: 21); y (2) cebador C2as de neublastina (NBNint.antisense): 5'-GGCGGTCCACGGTCTCCAG-3' (SEQ ID N°: 22). Usando estos dos cebadores específicos de gen se identificó un producto de la PCR positivo de 220 pb. El ácido nucleico de 220 pb tenía la siguiente secuencia (SEQ ID N°: 14):

```
5' - GGCCACCGCTCCGACGAGCTGATACGTTTCCGCTTCTGCAGCGGCTCGTGC
CGCCGAGCACGCTCCCAGCACGATCTCAGTCTGGCCAGCCTACTGGGCGCTGG
GGCCCTACGGTCGCCTCCCGGGTCCCGGCCGATCAGCCAGCCCTGCTGCCGGC
CCACTCGCTATGAGGCCGTCTCCTTCATGGACGTGAACAGCACCTGGAGAACC
GTGGACCGCC - 3'
```

Después se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en 96 pocillos de la siguiente forma. Se obtuvieron 30 ng de ADNc de cerebro fetal de ratón (6 ng/ $\mu$ l; Origene Technologies) del correspondiente pocillo de la placa principal y se pusieron en un volumen total de 25  $\mu$ l que también contenía: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados (es decir, el cebador C2 (NBNint.sense) y el cebador C2as (NBNint.antisense) de neublastina), 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.), y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/ $\mu$ l; Advanced Biotechnologies, Reino Unido).

Se usaron las siguientes condiciones de ciclos térmicos de la PCR: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto cada uno, reasociación a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 90 segundos; y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Se analizaron las 96 reacciones de PCR individuales en un gel de agarosa al 2% que contenía tinción con bromuro de etidio. Se encontró que el producto de la PCR positivo, de 220 pb, visto en un pocillo, correspondía a una única subplaca de 96 pocillos.

Después las 96 reacciones de la PCR individuales se analizaron por electroforesis en gel, en un gel de agarosa al 2% que contenía tinción de bromuro de etidio. El producto de la PCR positivo de 220 pb que se había identificado correspondía a un único pocillo de la subplaca de 96 pocillos.

5 **Cribado de la subplaca:** La subplaca fetal de ratón de 96 pocillos se cribó por amplificación mediada por PCR poniendo 1 µl de solución madre en glicerol del correspondiente pocillo de la subplaca en un volumen final total de 25 µl que contenía 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados, 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/µl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido). Los ciclos térmicos de la PCR se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones descritas antes para el cribado de la placa principal.

Después se analizaron las 96 reacciones individuales de la PCR en un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio y se identificó un pocillo positivo que produjo el fragmento de 220 pb.

15 **PCR de la colonia:** Se diluyó 1 ml de la solución madre en glicerol del pocillo positivo de la subplaca 1:100 en caldo de Luria (LB). Después se pusieron 1 ml y 10 ml de la dilución mencionada en dos placas de LB separadas que contenían carbenicilina 100 µg/ml, y se incubaron toda la noche a 30°C. Se aislaron un total de 96 colonias y se transfirieron a un placa de PCR de 96 pocillos que contenía: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados, 1x tampón de PCR estándar (tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), dNTP 0,2 mM (Amersham-Pharmacia), GC-Melt 0,1 M (Clontech Laboratories, EE.UU.), y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/µl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido), en un volumen final de 25 µl.

25 Los ciclos térmicos de la PCR se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones descritas antes (véase "cribado de la placa principal", más arriba). Se analizaron las 96 reacciones de la PCR individuales mediante electroforesis en gel, en un gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio. Se identificó una colonia positiva por la presencia del fragmento de 220 pb. A partir de esta colonia positiva se preparó el ADN plasmídico. El clon se secuenció por secuenciación automática de ADN usando el kit de secuenciación BigDye<sup>®</sup> terminator cycle con la ADN polimerasa AmpliTaq. Los geles de secuenciación se hicieron correr en el ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, EE.UU.). La secuencia resultante de este clon puso de manifiesto un ADNc de longitud completa de 2136 pb (SEQ ID N°: 15). El ADNc incluye un marco de lectura abierto con la secuencia de aminoácidos prevista mostrada en la SEQ ID N°: 16, que codifica un polipéptido de pre-pro-neublastina de ratón.

### 35 **Ejemplo 2: Clonación de Neublastina genómica**

Como se ha discutido antes, los autores de la invención identificaron un fragmento de ácido nucleico de 290 pb en dos clones BAC humanos con entradas de datos de GenBank (con los n° de acceso AC005038 y AC005051) que tenían regiones de homología con la persefina y con las secuencias flanqueadoras de la persefina. Los autores de la invención usaron la secuencia prevista de 861 pb descrita antes para diseñar cebadores adicionales, con el objetivo de clonar un ácido nucleico que codificara ácidos nucleicos de Neublastina adicionales usando el software Lasergene (DNASStar, Inc.). Se usaron dos pares de cebadores para clonar el gen de Neublastina usando reacciones de PCR con el ADN genómico. Los dos pares de cebadores se ilustran a continuación.

#### 45 **Par de cebadores n° 1**

5' CCA AgC CCA CCT ggg TgC CCT CTT TCT CC 3' (homosentido) (ID SEC N°: 23)

5' CAT CAC CCA CCg gCA ggg gCC TCT CAg 3' (antisentido) (ID SEC N°: 24)

#### **Par de cebadores n° 2**

5' gAgCCCAtgCCCggCCTgATCTCAgCCCgA ggACA 3'(homosentido) (ID SEC N°: 25)

50 5' CCCTggCTgAggCCgCTggCTAgTgggACTCTgC 3' (antisentido) (ID SEC N°: 26)

Usando el par de cebadores n° 1, se amplificó un fragmento de ADN de 887 pb a partir de una preparación de ADN genómico humano adquirido en Clontech Laboratories (n° de cat. 6550-1).

55 **Protocolo de la PCR:** La PCR se llevó a cabo usando el sistema de PCR de alta fidelidad Expand<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim) con el tampón 1. La mezcla de reacción de la PCR se complementó con dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% y 17,5 pmol de cada dNTP en un volumen total de 50 µl. Los ciclos térmicos se llevaron a cabo con una etapa previa de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de dos etapas a 94°C durante 10 segundos, y

68°C durante 1 minuto, respectivamente. Los ciclos térmicos se terminaron por incubación a 68°C durante 5 minutos. Los ciclos térmicos se llevaron a cabo en un termocilador 225 DNA Engine Tetrad (MJ Research, MA). Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel en agarosa al 2% (FMC) y después se fotografiaron.

5 El fragmento de 887 pb amplificado a partir del ADN genómico humano con el par de cebadores nº 1 se clonó en el vector pCRII (Invitrogen), y se transformó en células competentes de *E. coli* con XL 1-Blue (Stratagene). El plásmido resultante, denominado neublastina-2 se secuenció usando Thermosequenase (Amersham Pharmacia Biotech). Los productos de secuenciación se analizaron por electroforesis en un secuenciador automático ALFExpress (Amersham Pharmacia Biotech).

10 Se secuenciaron los fragmentos obtenidos por amplificación por PCR del ADN genómico humano con el segundo par de cebadores (par de cebadores nº 1, anterior), poniendo de manifiesto una región adicional de 42 pb en el extremo 3' del cebador del marco de lectura abierto. La secuencia de longitud entera se analizó comparándola con las secuencias de ácidos nucleicos de otros factores neurotróficos, así como por cartografía de las fronteras exón-intrón usando programas de software para encontrar genes que identifican uniones de corte y empalme probables y regiones de alto potencial de codificación, usando el software Netgene y Gene Mark (Brunak y col., *J. Mol. Biol.*, 220, pp. 49-65 (1991); Borodovsky y col., *Nucl. Acids Res.*, 23, pp. 3554-62 (1995)). Las fronteras exón-intrón se confirmaron por el ADNc obtenido del cribado rápido descrito antes.

20 Como se ilustra en la figura 7, el gen de neublastina resultante tiene dos exones separados por un intrón de 70 pb. Juntos, los exones tienen una secuencia de aminoácidos prevista de un polipéptido de neublastina de longitud entera. El ADNc previsto (SEQ ID N°: 3) contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica 238 restos de aminoácidos (SEQ ID N°: 4). El clon de neublastina-2 contenía la secuencia codificante completa de la pro-neublastina. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen mostró una alta homología con tres proteínas, la persefina, neurturina y GDNF.

### **Ejemplo 3: Expresión de ácidos nucleicos de neublastina**

30 Se detectó la expresión del ARN de neublastina tanto en el tejido nervioso como no nervioso en roedores y en seres humanos, y en diferentes etapas de desarrollo inmaduro y adulto, usando las técnicas descritas a continuación.

**Procedimiento para detectar la expresión del ARN de neublastina usando RT-PCR:** Se sintetizaron los siguientes cebadores de acuerdo con la secuencia de ADN de neublastina identificada como SEQ ID N°: 1: (1) un cebador C2 de neublastina 5'-GGCCACCGCTCCGACGAG-3' (SEQ ID N°: 21), y (2) un cebador C2as de neublastina 5'-GGCGGTCCACGGTTCTCCAG-3' (SEQ ID N°: 22). Este conjunto de cebadores se usó para amplificar por RT-PCR un fragmento de ADN a partir de ARNm de cerebro entero humano adulto y fetal. Entre los fragmentos de ADN producidos por esta reacción había uno de 220 pb. La identificación de este fragmento de ADN de 220 pb confirmaba que el gen de neublastina se expresa en tejido cerebral adulto y fetal. También se amplificó un fragmento de ADN de 220 pb a partir del ADN genómico usando estos cebadores.

40 **Procedimiento para detectar la expresión del ARN de neublastina por hibridación de transferencia northern:** Las transferencias northern con ARN poliA<sup>+</sup> de tejido humano adulto se adquirieron en un proveedor comercial (Clontech Laboratories, EE.UU.) y se trataron con la sonda de ADNc de neublastina marcado con <sup>32</sup>P. El ADNc de neublastina marcado se preparó de acuerdo con los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 anterior.

45 **Preparación de sondas:** Un fragmento de ADN de ácido nucleico de neublastina (nucleótidos 296-819 de la SEQ ID N°: 8) se marcó con el kit de marcaje Redprime II (Amersham; nº de cat. RPN1633) para usar como una sonda de hibridación, de acuerdo con la recomendación del fabricante. Brevemente, la muestra de ADN se diluyó a una concentración de 2,5-25 ng en 45 µl de tampón de TE 10 mM (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Después el ADN se desnaturalizó calentando la muestra a 95-100°C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, enfriando la muestra rápido poniéndola en hielo durante 5 minutos, y después centrifugándola brevemente para llevar el contenido a la parte inferior del tubo de reacción. La cantidad total de ADN desnaturalizado se añadió junto con 5 µl de Redviue (<sup>32</sup>P)dCTP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) en el tubo de reacción que contenía la solución tamponada de dATP, dGTP, dTTP, enzima Klenow sin exonucleasa y cebador aleatorio en forma estabilizada seca. La solución se mezcló pipeteando hacia arriba y abajo 2 veces, moviendo la punta de la pipeta en círculos en la solución, y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. La reacción de marcaje se paró por adición de 5 µl de EDTA 0,2 M. Para usar como una sonda de hibridación el ADN marcado se desnaturalizó en dos cadenas individuales calentando la muestra de ADN a 95-100°C durante 5 minutos, y después enfriando instantáneamente la muestra de ADN en hielo durante 5 minutos. El tubo se centrifugó y su contenido se mezcló bien. Finalmente la sonda de ADN monocatenaria se purificó usando el kit de Nucleotide Removal (Qiagen).

60 **Técnicas de hibridación:** Las transferencias northern preparadas se adquirieron en un proveedor comercial ("Multiple Tissue Northern Blots", Clontech Laboratories, EE.UU., N° de catálogo 7760-1 y 7769-1) y se hibridaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando la sonda de neublastina marcada con <sup>32</sup>P preparada antes. Para la hibridación, se usó solución ExpressHyb (Clontech Laboratories, EE.UU.), y se usó una concentración de

aproximadamente 3 ng/ml de la sonda marcada. La solución de ExpressHyb se calentó a 68°C y después se agitó para disolver cualquier precipitado. Todas las membranas de transferencia northern (10x10 cm) se prehibridaron en al menos 5 ml de solución ExpressHyb a 68°C durante 30 minutos en un horno de hibridación Hybaid de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda de neublastina marcada con <sup>32</sup>P se desnaturalizó a 95-100°C durante 2 minutos y después se enfrió rápidamente en hielo. Se añadieron 14 µl de la sonda marcada a 5 ml de solución reciente ExpressHyb, y se mezcló bien. La solución ExpressHyb usada en la prehibridación se substituyó distribuyendo uniformemente sobre las transferencias los 5 ml de solución reciente ExpressHyb que contenía la sonda de ADN marcada. Las transferencias se incubaron a 68°C durante 1 hora en un horno de hibridación Hybaid. Después de la incubación, las transferencias se aclararon y se lavaron varias veces con restricción baja (2x tampón SSC que contenía SDS al 0,05% a temperatura ambiente) seguido de un lavado de restricción alta (0,1x SSC que contenía SDS al 0,1% a 50°C) (20x SSC en NaCl 0,3 M/citrato de Na 0,3 M, pH 7,0). Las transferencias se expusieron en una película Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) a -80°C usando pantallas intensificadoras.

Los resultados de los experimentos de hibridación de la transferencia northern se presentan en la fig. 1. Las fig. 1A (izquierda) y fig. 1B (derecha) son transferencias northern de ARN poliA<sup>+</sup> que se trataron con sondas de ADNc de neublastina marcadas con <sup>32</sup>P, como se describe en el Ejemplo 3. Los marcadores representan polinucleótidos de tamaños de 1,35 kilopares de bases ("kb"), 2,4 kb, 4,4 kb, 7,5 kb y 9,5 kb. La membrana de la fig. 1A se preparó con ARNm extraído de diferentes tejidos humanos adultos: A partir de los resultados del análisis de la hibridación de la transferencia northern, los autores de la invención concluyeron que el ARNm de neublastina se expresa en muchos tejidos humanos adultos. El nivel más alto de expresión de neublastina se detecta en el corazón, en el músculo esquelético y en el páncreas. La membrana de la fig. 1B se preparó con ARN extraído de diferentes regiones del cerebro humano adulto. Dentro del cerebro adulto, el nivel mayor de expresión se ve en el núcleo caudado y en el tálamo. Un ARNm transcrito de aproximadamente 5 kb era la forma predominante de ARNm de neublastina expresada en el cerebro.

#### **Procedimiento para detectar la expresión de ARN de neublastina usando la hibridación in situ en tejidos:**

Se usan las siguientes técnicas para medir la expresión del ARN de neublastina en tejidos animales, p. ej. tejidos de roedores, con una sonda antisentido de neublastina.

#### **Expresión en ratón:**

**Preparación de muestras de tejido:** Se sacrificaron ratones preñados (B&K Universal, Estocolmo, Suecia) por dislocación cervical en el día de gestación 13,5 o 18,5. Se sacaron los embriones por disección en condiciones estériles, y se sumergieron inmediatamente en una solución de tampón de fosfato 0,1 M (PB) que contenía paraformaldehído al 4% ("PFA") durante 24-30 horas, y después se sacaron del PFA y se almacenaron en PBS. El tejido se preparó para la división en secciones mediante inmersión del tejido en una solución de sacarosa al 30%, y después insertándolo en TissueTech (O.C.T. Compound, Sakura Finetek USA, Torrance, CA). Se cortaron 6 series de las secciones coronal o sagital (12 µm de cada una) en un criostato y se motaron descongelaadas en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Se fijaron las cabezas/cerebros neonatales (P1, P7) siguiendo el mismo protocolo que para las etapas embrionarias, y se diseccionó el tejido cerebral adulto, se congeló inmediatamente en hielo, y se cortó en un criostato sin ninguna inserción previa.

**Preparación de ribosondas de neublastina:** Se hizo una sonda de ARN de neublastina antisentido (en lo sucesivo una "ribosonda de neublastina"). Se subclonaron los nucleótidos 1109-1863 de la secuencia de ADNc de neublastina de ratón (SEQ ID N°: 15) en el vector BlueScript (Stratagene). El plásmido resultante se cortó en un ADN lineal usando la endonucleasa de restricción EcoRI. El fragmento EcoRI de ADN se transcribió in vitro con ARN polimerasa T3 y el kit de marcaje de ARN con digoxigenina ("DIG") de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim).

**Hibridación:** Las secciones del criostato se fijaron durante 10 minutos en PFA al 4%, se trataron durante 5 minutos con 10 mg/ml de proteinasa K, se deshidrataron secuencialmente en etanol al 70% y al 95% durante 5 y 2 min, respectivamente, y después se dejaron secar al aire. Se calentó tampón de hibridación (formamida desionizada al 50%, 10% de una solución de sulfato de dextrano al 50%, solución de Denhardt al 1%, ARNt de levadura 250 µg/ml, NaCl 0,3 M, Tris-HCl 20 mM (pH 8), EDTA 5 mM, NaPO<sub>4</sub> 10 mM, sarcosilo al 1%) que contenía 1 µg/ml de sonda marcada con DIG, a 80°C durante 2 minutos, y se aplicó sobre las secciones. Después las secciones se cubrieron con Parafilm y se incubaron a 55°C durante 16-18 horas.

Al día siguiente las secciones se lavaron con restricción alta (2x SSC que contenía formamida al 50%) a 55°C durante 30 minutos, y después se lavaron con tampón de RNasa y se incubaron con RNasa A 20 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Con el fin de detectar la sonda marcada con DIG, las secciones se preincubaron en solución de bloqueo (PBS que contiene Tween-20 al 0,1% y suero de cabra inactivado por calor al 10%) durante 1 hora y después se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-DIG acoplado con fosfatasa

alcalina (Boehringer Mannheim). Al día siguiente, cada sección se lavó 2 horas 4 veces en PBS que contenía Tween-20 al 0,1%, y después se lavó 10 minutos 2 veces en tampón de NTMT (NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 9,5), MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tween-20 al 0,1%). Después las secciones se incubaron en sustrato púrpura BM que contenía levamisol 0,5 mg/ml durante 48 horas. La reacción de color se paró por lavado en PBS. Las secciones se secaron al aire y se cubrieron con cubreobjetos con DPX (KEBO-lab, Suecia).

Los resultados de las reacciones de hibridación in situ se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1: Expresión de neublastina en ratones**

Estructura	E13,5	E18,5	P1	P7	Adulto
Cerebro anterior	++				
Cerebro medio ventral	-				
Ganglios de la raíz dorsal	++				
Médula espinal	+				
Retina		+++	+++	+	
Bulbo olfativo		++	++	++	
Pulpa dentaria		++	++	+	
Ganglios del trigémino		++	++	++	
Cuerpo estriado		+	+	++	
Corteza		++	++	++	+
Circunvolución dentada				++	+

Como se muestra en la Tabla 1, el día embrionario 13,5 ("E13,5"), la neublastina se expresaba en la médula espinal y en el metencéfalo, y débilmente en el cerebro anterior. También se detectó expresión de neublastina en la retina en desarrollo y en los ganglios sensoriales (ganglios de la raíz dorsal y ganglios del trigémino (V)). Fuera del sistema nervioso, se encontró una señal débil en el riñón, el pulmón y el intestino, que indicaba que la neublastina también se expresa en esos tejidos.

El día embrionario 18,5 ("E18,5"), la neublastina se expresaba de forma más predominante en el ganglio del trigémino (V). También se detectó la expresión de neublastina en la retina, el cuerpo estriado y la corteza. Además, se vio expresión en el primordio dental.

Otra vez con respecto a la tabla 1, se observó aumento de la expresión de neublastina desde el tiempo E18,5 a los días 1 y 7 postnatales, en la corteza, el cuerpo estriado y el ganglio del trigémino (V). La expresión de neublastina era más predominante en las capas exteriores de la corteza que en las capas interiores de la corteza. En P7, se encontró expresión en las mismas estructuras que el día 1, pero se encontró además expresión de neublastina en el hipocampo, en especial en la circunvolución dentada y en el cerebelo. En el cerebro murino adulto, la neublastina se expresaba fuertemente en la circunvolución dentada, detectándose expresión de neublastina muy baja o en niveles indetectables en otros tejidos ensayados.

#### **Expresión en rata:**

El siguiente experimento describe la hibridación de tejidos de rata con sonda antisentido de oligodesoxinucleótidos de neublastina marcados con fosfatasa alcalina.

**Preparación de las muestras de tejidos:** Se obtuvieron embriones (E14) de rata de ratas Wistar preñadas (Møllegaard, Dinamarca) después de anestesia pentorbital. Las ratas postnatales (P0, P7, adulta) se sacrificaron por decapitación. Los cerebros diseccionados y las cabezas enteras se sumergieron inmediatamente en NaCl al 0,9% frío, se congelaron enseguida y se dividieron en secciones de 20 µm en un criostato (secciones coronal y sagital, 10 series)

**Hibridación in situ:** Se hibridaron 2 series de secciones usando una sonda de oligodesoxinucleótidos antisentido conjugada con fosfatasa alcalina (AP) (5'-NCA GGT GGT CCG TGG GGG GCG CCA AGA CCG G-3' (SEQ ID N°: 27), Oligo n° 264675, DNA Technology, Dinamarca). Esta sonda es complementaria de las bases 1140 a 1169 del ADNc de neublastina de ratón de la SEQ ID N°: 15).

Antes de la hibridación, las secciones se secaron al aire a temperatura ambiente, se calentaron a 55°C durante 10 min, y después se trataron con etanol al 96% a 4°C toda la noche. Las secciones después se secaron al aire y se incubaron en medio de hibridación (5,0 pmol de sonda/ml) toda la noche a 39°C (Finsen y col., 1992. *Neurosci.* 47: 105-113; West y col., 1996. *J. Comp. Neurol.*, 370: 11-22).

El tratamiento después de hibridación consistía en cuatro aclarados de 30 minutos en 1x SSC (NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M) a 55°C, seguido de tres aclarados de 10 minutos en Tris-HCl, pH 9,5 a temperatura ambiente antes de aplicar el revelador de AP. El revelador de AP se preparó inmediatamente antes de usarlo y contenía azul de

nitrotetrazolio (NBT, Sigma), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Sigma), y tampón de Tris-HCl-MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5 (Finsen y col, *Neurosci.* 1992 47 105-113). El revelado con AP se produjo en la oscuridad a temperatura durante 48 horas. La reacción de color se paró mediante aclarado de las secciones en agua destilada. Las secciones se deshidrataron en acetona graduada, se ablandaron en creosota de xilen-fenol Allchem, Reino Unido), se limpiaron en xileno y se cubrieron con un cubreobjetos Eukitt (Bie & Berntsen, Dinamarca).

Las reacciones de control consistían en (1) tratar previamente las secciones con RNasa A (50 µg/ml, Pharmacia, Suecia) antes de la hibridación; (2) hibridar las secciones con un exceso de cien veces de sonda sin marcar; y (3) hibridar las secciones sólo con tampón de hibridación. Los resultados de las reacciones de hibridación se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Expresión de neublastina en ratas**

Estructura	E14	P0/P1	P7	Adulto
Cerebro anterior	++			
Cerebro medio ventral	-			
Ganglios de la raíz dorsal	++			
Médula espinal	+			
Retina	+			
Bulbo olfativo	(+)	++	++	
Cerebelo		+	++	+
Ganglios del trigémino		++	++	
Cuerpo estriado		+	+(+)	
Corteza	(+)	++	++	+
Hipocampo		(+)	++	++

El día embrionario 14 (E14), la neublastina se expresaba débilmente en embriones de rata en el cerebro anterior, en el metencéfalo y en la médula espinal. También se detectó ARNm de neublastina en el ojo (retina), ganglios de la raíz dorsal, ganglios del trigémino (V) y en los riñones, pulmones, corazón, hígado e intestinos. En ratas recién nacidas (P0) había expresión notable de neublastina en la corteza y el cuerpo estriado. También se detectó expresión de neublastina en el bulbo olfativo y en el hipocampo. En las ratas de 7 días de edad (P7), la neublastina se expresaba en la corteza, el cuerpo estriado, el bulbo olfativo y en el cerebelo. Se observó una señal notable en el hipocampo. En las ratas adultas, se detectaron niveles muy bajos o indetectables de expresión de neublastina en la mayoría de las áreas del cerebro. Se detectaron señales débiles en el núcleo talámico, y se detectó expresión notable de neublastina en el hipocampo.

#### **Ejemplo 4: Polipéptidos de neublastina**

El marco de lectura abierto o región codificante (CDS), identificada en la SEQ ID N°: 8 codifica el pre-pro-polipéptido (denominado "pre-pro-neublastina"). La secuencia de aminoácidos prevista de este marco de lectura abierto se muestra en la SEQ ID N°: 9. De acuerdo con la SEQ ID N°: 9 se identificaron 3 variantes de polipéptidos de neublastina. Estas variantes incluyen: (i) el polipéptido designado en el presente documento NBN140, que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 10; (ii) el polipéptido designado en el presente documento NBN116 que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 11; y (iii) el polipéptido denominado en el presente documento NBN113, que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 12.

De forma similar, de acuerdo con la región codificante (CDS) identificada en la SEQ ID N°: 3. que codifica el pre-pro-polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos (designada como SEQ ID N°: 4), se identificaron tres variantes de neublastina. Estas variantes incluyen: (i) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 5; (ii) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 6; y (iii) el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID N°: 7.

Basándose en un alineamiento de secuencias múltiples basado en Clustal W (1.75), la neublastina de la SEQ ID N°: 9 (línea 2) se alineó con las secuencias de aminoácidos de la neurturina (SEQ ID N°: 49; línea 1), la persefina (SEQ ID N°: 50; línea 3) y GDNF (SEQ ID N°: 51, línea 4). Este alineamiento se muestra en la Tabla 3.

<b>Tabla 3: Comparación de secuencias de aminoácidos de neublastina con persefina, neurturina y GDNF</b>	
Neurturina entera	-----MQRWKAALASVLCSSVLSIWMCREGLLLSHRLGPA
Neublastina	MELGLGGLSTLSHCPWPRRQPALWPTLAALALLSSVAEASLGSAPRSPAPREGPPP
Persefina entera	-----
GDNF humano entero	----MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALS SDS
Neurturina entera	LVPLHRLPRTLDARIARLAQYRALLQGAPDAMELRELT PWAGRPPGPRRRRAGPRRR
Neublastina	VLASPAGHLPGGRTARWCSEGRARRPPPQSRPAPPPPAPPSPALPRGGRAARAGGPG
Persefina entera	-MAVGKFLGSLLLSLQLQGQGWGPDARGVVPVADGEFSSSEQVAKAGGTWLGTHRPL
GDNF humano entero	NMPEDYDPQFDDVMDFTIQTIKRLKRS PDKQMAVLPRRERNRQAAAAANPENS RGKG
Neurturina entera	RARARLGARPCGLRELEVRVSEL <u>G</u> LGYASDETVL <u>F</u> RYCAGACEA-AARVYDLGLRR
Neublastina	SRARAAGARGCRLRSQLVVRA <u>L</u> GLGHRSELV <u>R</u> FRFCSGSCRR-ARSPHDL SLAS
Persefina entera	ARLRRLSGPCQLWSLTLVAEL <u>G</u> LGYASEEKVI <u>F</u> RYCAGSCPRGARTQHGLALAR
GDNF humano entero	RRGQRGKNRGCVLTAIHLNVDTL <u>G</u> LGYETKEELI <u>F</u> RYCSGSCDA-AETTYDKILKN * * : * *****: : . * : ** : * : * * * * * : . *
Neurturina entera	LRQRRRLRRE--RVRAQPCCRPTAYEDEVSF <del>L</del> DAHSRYHTVHEL <u>S</u> ARECACV-
Neublastina	LLGAGALRPPPGSRPVSQPCCRPTRYE-AVSFMDVNSTWRTVDRLS <u>A</u> TACGCLG
Persefina entera	LQGQGRAHGG-----PCCRPTRYT-DVAFLDDRHRWQRLPQLS <u>A</u> AACGCGG
GDNF humano entero	LSRNRLVSD---KVGQACCRPIAFDDDL <del>S</del> F <del>L</del> DDNLVYHILRKHSAKRCGCI- * .**** : : : * . : : . ** * . *
* indica posiciones que tienen un solo resto completamente conservado.	
: indica que uno de los siguientes grupos “fuertes” se conserva completamente:	
<b>-STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.</b>	
. indica que uno de los siguientes grupos “débiles” se conserva completamente:	
<b>-CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, HFY.</b>	

A partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos en la Tabla 3, se puede ver que la neublastina tiene 7 restos de cisteína conservados en posiciones que son conservadas dentro de la superfamilia de TGF-β. En una realización, el polipéptido de neublastina preferido contiene 7 cisteínas conservadas como en la SEQ ID N°: 2 en las posiciones 8, 35, 39, 72, 73, 101 y 103, o como en las SEQ ID N°: 4 y 9 en las posiciones 43, 70, 74, 107, 108, 136 y 138. Se sabe que estos 7 restos de cisteína conservados dentro de la superfamilia de TGF-β forman tres enlaces disulfuro intramonómeros (contemplados, p. ej., en la SEQ ID N°: 2 entre los restos de cisteína 8-73, 35-101, y 39-103, y p. ej., en las SEQ ID N°: 4 y 9 entre los restos de cisteína 43-108, 70-136, y 74-138) y un enlace disulfuro entre monómeros (contemplado, p. ej., en la SEQ ID N°: 2 entre los restos de cisteína 72-72, y p. ej., en las SEQ ID N°: 4 y 9 entre los restos de cisteína 107-107), los cuales junto con la región de cadena beta extendida constituyen el patrón estructural conservado para la superfamilia TGF-β. Véase, p. ej., Daopin y col., *Proteins* 1993, 17, 176-192.

De acuerdo con el alineamiento de secuencias, la neublastina demostró ser un miembro de la subfamilia de GDNF de los factores neurotróficos (LGLG - FR(Y/F)CSGSC - QxCCRP - SAxxCGC, la huella dactilar de la subfamilia GDNF, subrayada en la tabla 3).

Los polipéptidos de neublastina truncados descritos en el presente documento preferiblemente incluyen una secuencia de polipéptido que abarca los 7 restos de cisteína conservados en la secuencia de neublastina. Por ejemplo, los polipéptidos de neublastina truncados preferiblemente incluyen los aminoácidos 15-113 (una forma de NBN de 99 AA) de un polipéptido NBN113, o los aminoácidos 12-113 del polipéptido NBN113 (una forma de NBN de 102 AA). Estas secuencias de aminoácidos se pueden encontrar, p. ej., en los aminoácidos 42-140 de la secuencia del polipéptido de NBN humano mostrada en la SEQ ID N°: 9 (polipéptido de NBN de 99 AA; SEQ ID N°: 48); y los aminoácidos 39-140 de la SEQ ID N°: 9 (polipéptido de NBN de 102 AA; SEQ ID N°: 45), respectivamente. Las

secuencias también se encuentran, p. ej., en los aminoácidos 126-224 de la SEQ ID N°: 34 (polipéptido de NBN de rata de 99 AA) y en los aminoácidos 123-224 de la SEQ ID N°: 34 (polipéptido de NBN de rata de 102 AA). De la misma forma, también están incluidas las secuencias de neublastina truncada de NBN99, NBN100, NBN101, NBN102, NBN103, NBN104, NBN105, NBN106, NBN107, NBN108, NBN109, NBN110, NBN111 y NBN112, definidas antes.

Se calculó la homología de la neublastina con otros miembros de la familia de GDNF, y los resultados se presentan en la siguiente tabla 4.

10 **Tabla 4: Homología de polipéptidos de neublastina con otros miembros de la familia de GDNF**

	NBN140 Proteína madura			NBN113 Proteína madura				
	Homología			Homología de péptidos de longitud entera	Homología			Homología de péptidos de longitud entera
Factor neurotrófico	Identidad	Superposición (aa)	Homología fuerte	Identidad	Identidad	Superposición (aa)	Homología fuerte	Identidad
<b>GDNF</b>	34% (47/137)	137	48% (67/137)	31,9%	36% (41/111)	111	52% (59/111)	29,5%
<b>NTN</b>	48% (61/127)	127	56% (72/127)	36,9%	49% (56/114)	114	57% (66/114)	44,7%
<b>PSP</b>	44% (55/125)	125	56% (71/125)	36,9%	45% (51/111)	111	57% (65/111)	44,3%
<b>IHA</b>	31% (25/81)	81	-	25,2%	31% (25/81)	81	-	22,5%
<b>TGF-β2</b>	23% (17/73)	73	-	18,5%	23% (17/73)	73	-	20,2%

GDNF = Factor neurotrófico derivado de línea de células gliales

NTN = Neurturina

PSP = Persefina

IHA = Inhibina-α

TGF-β2 = Factor de crecimiento transformante β2.

La homología fuerte indica que uno de los siguientes grupos “fuertes” se conserva: STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.

### 25 **Ejemplo 5: Producción de neublastina**

La neublastina se ha producido tanto en células eucariotas como procariotas, como se describe a continuación.

**Vectores de expresión.** Se insertó el ADNc que codifica la neublastina en el vector de expresión eucariota pUbi1Z. Este vector se generó por clonación del promotor humano UbC en una versión modificada de pcDNA3.1/Zeo. El pcDNA3.1/Zeo sin modificar está disponible en el comercio (Invitrogen). El pcDNA3.1/Zeo modificado es más pequeño que el vector de origen, porque se han eliminado el gen de la ampicilina (de la posición 3933 a 5015) y una secuencia de la posición 2838 a la 3134. En esta versión modificada de pcDNA3.1/Zeo, el promotor de CMV se sustituyó por el promotor UbC de pTEJ-8 (Johansen y col., *FEBS Lett.* 1990 **267** 289-294), dando como resultado pUbi1Z.

**Expresión en células de mamífero** El vector pUbi1Z que contenía las secuencias codificantes de neublastina después se transfirió en la línea celular de mamífero HiNB5, que es una línea celular neural de rata inmortalizada (Renfranz y col., *Cell*, 66, pp. 713-729 (1991)). Se han establecido varias líneas celulares HiB5 que expresan neublastina de forma estable (determinadas por RT-PCR). En una de estas líneas celulares estables, se confirmó la expresión de HiB5pUbi1zNBN22 por hibridación del ARN total en una transferencia northern con una sonda de neublastina marcada con <sup>32</sup>P. Los resultados de estos estudios se muestran en la fig. 2. Después se usó HiB5pUbi1zNBN22 como una fuente de neublastina para algunos estudios de la actividad neurotrófica de la neublastina.

La fig. 2 muestra la expresión del ADNc de neublastina en el clon HiB5pUbi1zNBN22 (es decir, transferencia northern con sonda de ADNc de neublastina marcado con  $^{32}\text{P}$  de la presente invención como se ha descrito antes). La transferencia se preparó de ARN total extraído de células transfectadas HiB5, células HiB5pUbi1zNBN22 y células HiB5pUbi1zGDNF14, respectivamente, como se indica. Las posiciones de las bandas de ARNr 28S y 18S correspondientes a 4,1 kb y 1,9 kb, respectivamente, se indican en la transferencia.

Como se muestra en la fig. 3, los anticuerpos producidos contra los polipéptidos derivados de neublastina también reconocían una proteína de aproximadamente 13 kilodaltons ("kD") en medio condicionado del clon HiB5pUbi1zGDNF14 pero no de las células HiB5 no transfectadas (véase el ejemplo 6).

Se determinó que los pesos moleculares previstos de los polipéptidos de neublastina no modificados (es decir, que carecían de modificaciones postraduccionales) NBN140 (SEQ ID N°: 10), NBN116 (SEQ ID N°: 11) y NBN113 (SEQ ID N°: 12) eran 14,7 kilodaltons ("kD"), 12,4 kD y 12,1 kD, respectivamente.

**Procedimientos:** Se preparó una transferencia northern con ARN total (10  $\mu\text{g}$ ) a partir de células HiB5 no transfectadas y el clon HiB5pUbi1zNBN22 por electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído al 0,8% y se transfirió por adsorción a una membrana de nailon (Duralone, Stratagene). La transferencia se hibridó y se lavó como se describe en el ejemplo 3 con una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  de 1,3 kb preparada por marcaje aleatorio que cubre la SEQ ID N°: 8 y nucleótidos adicionales de 5'UTR y 3'UTR del ADNc de neublastina. La transferencia se expuso a una película Hyperfilm MP (Amersham) a  $-80^\circ\text{C}$  usando pantallas intensificadoras.

El medio condicionado de HiB5pUbi1zNBN22 o células HiB5 no transfectadas incubado toda la noche en medio sin suero complementado con complemento de N2 (Life Technologies; n° de cat. 17502-048) se concentró y se separó en geles de poliacrilamida al 15% (Amersham Pharmacia Biotech; n° de cat. 80-1262-01). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech; n° de cat. RPN-303F) y se bloquearon los sitios de unión de proteínas no específicos con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS con Tween-20 al 0,1%. Las membranas se incubaron toda la noche con un anticuerpo de neublastina policlonal (1:1000), seguido de incubación con un anticuerpo IgG anti-conejo secundario (Amersham Pharmacia Biotech; n° de cat. NA 934) conjugado con peroxidasa de rábano picante (1: 2000). La inmunotinción se visualizó usando quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech; n° de cat. RPN2109) o ECL+ (Amersham Pharmacia Biotech; n° de cat. RPN2132) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 3. La figura 3A y 3B son ilustraciones de la expresión de la proteína de neublastina en células HiB5 transfectadas. El medio de toda la noche de células HiB5 no transfectadas (calle 1) o de un clon de HiB5 estable transfectado con ADNc de neublastina (calle 2) se concentró como se describe más adelante. Después el medio se analizó por transferencia Western usando dos anticuerpos policlonales diferentes, Ab-1 y Ab-2 descritos en el Ejemplo 10, específicos para la neublastina. En el medio derivado de células transfectadas, se encontró que ambos anticuerpos reconocían una proteína con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Esta proteína no se veía en células HiB5 no transfectadas.

El ADNc clonado que codifica la neublastina también se puede insertar en otro vector de expresión eucariota, p. ej., el vector de expresión eucariota TEJ-8 (Johansen y col, *FEBS Lett.*, 1990.267: 289-294) o pCDNA-3 (Invitrogen), y el plásmido de expresión resultante se puede transfectar en una línea celular de mamífero alternativa, p. ej., células de ovario de hámster chino ("CHO"), las líneas celulares HEK293, COS, PC12 o RN33b, o una célula de tallo neural humano. Las líneas de células estables que expresaban neublastina se usaron, p. ej., para producir la proteína de neublastina.

### Expresión en células CHO

**Construcción del plásmido pJC070.14** Con el fin de expresar el ADNc de neublastina en las células de ovario de hámster chino, se insertó un fragmento de ADNc que codificaba la forma pre-pro de la neublastina humana, en el vector de expresión de mamífero pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14.pEAG347 que contiene el tándem de promotores temprano de SV40 y tardío principal de adenovirus (derivados del plásmido pAD2beta; Norton and Coffin, *Mol. Cell. Biol.* 5: 281 (1985)), un sitio único de clonación NotI, seguido de las señales de terminación de la transcripción tardía de SV40 y polyA (derivadas del plásmido pCMVbeta; MacGregor and Caskey, *Nucl. Acids. Res.* 17: 2365 (1989)). Además, pEAG347 contiene una cadena principal plasmídica derivada de pUC19 y una dhfr derivada de pSV2dhfr para la selección de MTX y amplificación en células CHO transfectadas.

El plásmido pJC070.14 se generó en dos etapas. Primero se aisló un fragmento que codificaba la forma pre-pro de la neublastina humana del plásmido pUbi1Z-NBN usando la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos KD2-824 5'AAGGAAAAA GCGGCCGCCA TGGAACCTGG ACTTGGAGG3' (SEQ ID N°: 31), KD2-825 5'TTTTTTCTT GGCGGCCGCT CAGCCAGGC AGCCGCAGG3' (SEQ ID N°: 32) y PFU polimerasa. El fragmento se clonó en el sitio Srf-1 de pPCR-Script Amp SK(+) para generar el plásmido pJC069. En la segunda etapa, se llevó a cabo una digestión parcial con Not-1 en el plásmido pJC069 para generar un fragmento de 685 pb (que contiene el gen de neublastina) que se clonó en el sitio Not-1 del plásmido pEAG347 para generar el plásmido

pJC070.14. La transcripción del gen de neublastina en el plásmido pJC070.14 es controlada por el promotor tardío principal de adenovirus.

**Generación de líneas celulares CHO que expresan neublastina.** Se linearizaron 200 µg de pJC070.14 por digestión con la endonucleasa de restricción Mlu-1. Se extrajo el ADN con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se hizo precipitar con etanol. El ADN linearizado se volvió a suspender en Hepes 20 mM pH 7,05, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,7 mM, dextrosa 6 mM (HEBS) y se introdujo en células ~4E7 CHO dukx *Bl(dhfr-)* (p23) por electroporación (280 V y 960 µF). Después de la electroporación, las células se devolvieron al cultivo en medio de Eagle modificado α+ (MEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) durante dos días. Después las células se tripsinizaron y se volvieron a poner en placas de 100 mm (100.000 células/placa) en α-MEM (que carecía de ribo- y desoxirribonucleósidos), complementado con FBS dializado al 10%, durante 5 días. Posteriormente las células se dividieron a una densidad de 100.000 células/placa de 100 mm, y se seleccionaron en metotrexato 200 nM. Se recogieron las colonias resistentes y se cambiaron a una escala de placas de 6 pocillos; el medio condicionado de cada clon se cribó usando un ensayo específico para la neublastina descrito a continuación. Los 12 clones que expresaban el nivel más alto de neublastina se pasaron a una escala de matraces T162 y posteriormente se volvieron a ensayar. Como se muestra en la figura 10, las líneas celulares CHO producían neublastina en el intervalo de 25 a 50 ng/ml.

**Ensayo de complejo ternario para la neublastina.** La presencia de neublastina se evaluó en medio de líquidos sobrenadantes de línea celular CHO usando una forma modificada de un ensayo de complejo ternario descrito por Sanicola y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6238 (1997)).

En este ensayo, se puede evaluar la capacidad de las moléculas de tipo GDNF para mediar la unión entre el dominio extracelular de RET y diferentes correceptores, GFRα1, GFRα2 y GFRα3. Se generaron formas solubles de RET y los correceptores como proteínas de fusión. Se ha descrito una proteína de fusión entre el dominio extracelular de RET de rata y la fosfatasa alcalina de placenta (RET-AP) y una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GFRα1 de rata (descrito en la solicitud publicada WO9744356; 27 de noviembre, 1997, incorporada en el presente documento por referencia) y el dominio Fc de la IgG1 humana (rGFRα1-Ig) (Sanicola y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6238 (1997)).

Para generar una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GFRα3 murino y el dominio Fc de IgG1 humana (mGFRα3-Ig), se ligó un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 1-359 de RETL3 murino a un fragmento que contiene el dominio Fc de la IgG1 humana y se clonó en el vector de expresión pEAG347 para generar el plásmido pGJ144. El plásmido pGJ144 se transfeció en células de ovario de hámster chino (CHO) para generar una línea celular estable que producía la proteína de fusión, la cual se purificó en columna de inmunoafinidad de proteína A-Sefarosa usando procedimientos estándar. En resumen, si la molécula de tipo GDF puede mediar la unión del correceptor a RET en este ensayo, entonces la proteína de fusión RET-AP será retenida en la placa y se podrá medir la cantidad que es retenida usando un sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina.

Se recubrieron placas para ELISA Dynex Microlite-1 (Dynex Technologies) con anticuerpo de cabra 1 µg/ml específico para Fc humano en bicarbonato/carbonato 50 mM, pH 9,6 durante 16 h. Las placas se vaciaron y se llenaron con 300 µl de I-block al 1% (Tropix) en TBS/Tween-20 al 0,5% (TBST), durante 1 h. Después de lavar 3 veces con TBST, los pocillos se llenaron con 100 µl de rGFRα1-Ig o mGFRα3-Ig 1 µg/ml diluido en medio condicionado de células 293-EBNA que expresan el gen de fusión RET-AP. Después se añadieron 100 µl de medio condicionado de clones de neublastina de CHO al pocillo superior de una columna de pocillos, y se llevaron a cabo diluciones seriadas de 2 veces hacia abajo de cada fila de pocillos, y se incubaron durante 1,5 h a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron tres veces con TBST, y dos veces con Tris 200 mM pH 9,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM (tampón de CSPD). Después la solución de lavado se substituyó por CSPD 425 µM (Tropix) en tampón de CSPD que contenía potenciador de quimioluminiscencia Sapphire 1 mg/ml (Tropix), y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. El rendimiento quimioluminiscente se midió usando un luminómetro Dynatech.

Los experimentos iniciales investigaron si la neublastina producida por las líneas celulares CHO podía mediar la unión de GFRα1 o GFRα3 al dominio extracelular de RET. Como se muestra en la figura 11, el medio condicionado del clon de células CHO nº 53 produjo una señal fuerte en el ensayo de complejo ternario cuando se incluyó la proteína de fusión mGFRα3-Ig, pero no había señal cuando se incluyó la proteína de fusión rGFRα1-Ig, lo que indicaba que la neublastina se une a GFRα3 pero no a GFRα1. Este comportamiento distingue claramente la neublastina de GDNF; como se muestra en la figura 11, el GDNF se une a GFRα1 pero no a GFRα3. No se observó señal con la proteína de fusión del correceptor, cuando se ensayó el medio condicionado de la línea celular CHO de origen o medio directo.

Con el fin de cuantificar los niveles de expresión de neublastina en las líneas celulares CHO, se preparó una curva patrón usando rGFRα1-Ig y GDNF empezando con una concentración de 1 ng/ml. Después se calcularon las concentraciones de neublastina de diferentes líneas celulares CHO usando esta curva patrón; los niveles producidos por 5 líneas celulares CHO se muestran en la figura 10. Debido a que este cálculo depende la hipótesis no ensayada

de que la afinidad de unión entre el GDNF y GFR $\alpha$ 1 es similar a la afinidad de unión entre la neublastina y GFR $\alpha$ 3, estos niveles son sólo aproximados.

**Análisis de neublastina de líquidos sobrenadantes de líneas celulares CHO.** Con el fin de analizar más la neublastina producida por las líneas celulares CHO, se extrajo la proteína del medio usando la proteína de fusión GFR $\alpha$ 3-Ig y se analizó por transferencias western con anticuerpos policlonales producidos contra péptidos de neublastina.

En el primer experimento, se extrajo la neublastina con mGFR $\alpha$ 3-Ig unido a perlas de Sefarosa. Se unió mGFR $\alpha$ 3-Ig a perlas de Sefarosa usando las condiciones sugeridas por el fabricante, Pharmacia Inc. Se añadieron 100  $\mu$ l de mGFR $\alpha$ 3-Ig-Sefarosa a muestras de 1,0 ml de medio condicionado de una línea celular CHO de control negativo o de la línea celular CHO que produce neublastina nº 16. Las suspensiones se incubaron durante 2 horas en una plataforma oscilante. Se centrifugó cada suspensión y se quitó el líquido sobrenadante seguido de tres lavados con 1,0 ml de HEPES 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5. Se volvió a suspender cada resina en 100  $\mu$ l de 2X tampón de muestra de reducción y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Se aplicaron 20  $\mu$ l de líquido sobrenadante de tampón de muestra y 10  $\mu$ l de un patrón de peso molecular (FMC) a cada pocillo de un gel de SDS-PAGE profundido al 10-20% (Owl Scientific). Se hizo la electroforesis del gel a una corriente constante de 40 mA durante 72 minutos.

Para el análisis de transferencia western, la proteína se electrotransfirió a nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) en un aparato Hofer Scientific en un sistema de tampón de CAPS 10 mM, metanol al 10%, SDS al 0,05%, pH 11,2 (45 minutos a corriente constante de 400 mA). Después de la transferencia, se quitó el filtro de nitrocelulosa de la caja y los marcadores de peso molecular se visualizaron por tinción con una solución de Ponceau S al 0,1% en ácido acético al 1% durante 60 segundos. La membrana se cortó en dos secciones y el exceso de tinte se eliminó por agitación suave en agua destilada. Las membranas se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 2% en TBS toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron individualmente con dos anticuerpos anti-péptido de neublastina purificados por afinidad (R30 y R31) con una concentración de 1,0  $\mu$ g/ml en leche en polvo sin grasa al 2% en TBS). Las membranas se lavaron con 3 lavados de 10 minutos en TBS-Tween y se incubaron en una dilución 1:5000 de conjugado de IgG-HRP anti-conejo de cabra (Biorad) durante 30 minutos. Las membranas se lavaron con 3 lavados de 10 minutos de TBS-Tween y se revelaron con sustrato ECL (Amersham). Como se muestra en la figura 12, se detectaron bandas específicas en las proteínas extraídas de la línea celular CHO que producía neublastina con ambos anticuerpos (calles 2 y 4), cuando se compararon con las bandas observadas en las proteínas extraídas de la línea celular de control negativo (calles 1 y 3).

El peso molecular de las especies inferiores es aproximadamente 13 kD y probablemente representan el dominio maduro de neublastina, generado después de escisión del dominio pro-. Esta escisión se podía producir después de los restos de Arg de la cuarta posición en uno cualquiera de los tres restos de escisión (p. ej., -RXXR↓-) presentes en la proteína de pre-pro-neublastina, para generar cualquiera de las formas de 140 AA, 116 AA o 113 AA, expuestas en las SEQ ID N°: 10, 11 ó 12, respectivamente. Se determinó que los pesos moleculares previstos de los polipéptidos de neublastina no modificados (es decir, que carecen de modificaciones postraduccionales) NBN140 (SEQ ID N°: 10), NBN116 (SEQ ID N°: 11), y NBN113 (SEQ ID N°: 12) eran 14,7 kD, 12,4 kD, y 12,1 kD, respectivamente. Será necesario otro análisis para confirmar la estructura de esta especie así como de las otras bandas específicas de neublastina.

En el segundo experimento, la neublastina se extrajo con hGFR $\alpha$ 3-Ig capturado en una placa ELISA. Para generar una proteína de fusión entre el dominio extracelular del GFR $\alpha$ 3 humano (descrito en la solicitud publicada WO97/44356; 27 de noviembre, 1997, incorporada en el presente documento por referencia) y el dominio Fc de la IgG1 humana (hGFR $\alpha$ 3-Ig), se ligó un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 1-364 de GFR $\alpha$ 3 humano con un fragmento que contiene el dominio Fc de la IgG1 humana y se clonó en el vector de expresión CH269 descrito por Sanicola y col. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6238 (1997)). La proteína de fusión codificada por este plásmido se expresó de forma transitoria en células con antígeno nuclear codificado por el virus 293-Epstein-Barr (EBNA) y se purificó en una columna de inmutafinidad de Proteína A-Sefarosa usando procedimientos estándar.

Se recubrieron 6 pocillos de una placa de 96 pocillos toda la noche a 4°C con IgG anti-humana de cabra (fragmento específico Fc $\gamma$ ; Jackson Immunologics) con una concentración de 25  $\mu$ g/ml en PBS (300  $\mu$ l/pocillo). Los pocillos se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 400  $\mu$ l de BSA al 1% en PBS. Después de 3 lavados con PBST (PBS + Tween 20 al 0,05%), se añadieron a cada pocillo 300  $\mu$ l de hGFR $\alpha$ 3-Ig (10  $\mu$ g/ml en PBS que contenía BSA al 0,1%). La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se agitó suavemente (200 golpes/minuto) para maximizar la unión. Después los pocillos se vaciaron y se lavaron otra vez 3 veces con PBST. Se añadieron a cada uno de 3 pocillos 250  $\mu$ l de medio condicionado de una línea celular CHO de control negativo o de la línea celular CHO que producía neublastina nº 25. La placa se incubó durante 3 h a temperatura ambiente y se agitó suavemente (300 golpes/minuto). Después los pocillos se lavaron 2 veces con PBST. Se añadieron 25  $\mu$ l de tampón de carga de Laemli no reductor al primer pocillo y la placa se agitó rápidamente durante 5 min para eluir las proteínas unidas (1300 golpes/min). El contenido se transfirió al siguiente pocillo y el procedimiento se repitió para eluir las proteínas unidas en el segundo y tercer pocillo. Después de añadir  $\beta$ -mercaptoetanol (5% final), las muestras se hirvieron

durante 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10-20%.

Para el análisis de transferencia western, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa. La membrana se bloqueó y se trató con una sonda en leche en polvo sin grasa al 5%, PBST y se lavó en PBST. La neublastina se detectó por electroquimioluminiscencia después de reacción con anticuerpos policlonales (R30 y R31) producidos contra dos péptidos de neublastina (1 µg/ml) seguido de reacción con anticuerpos de anti-conejo de cabra conjugados con HRP (BioRad). Como se muestra en la figura 13, se detectaron 5 bandas específicas de neublastina en las proteínas extraídas de la línea celular CHO que producía neublastina (calle 2). Las dos bandas inferiores eran muy similares a las bandas observadas en la figura 12; otra vez, la banda inferior probablemente representa el dominio maduro de la neublastina generada después de escisión del dominio pro.

El análisis posterior (no se muestran los datos) de las bandas en la figura 13 muestra que la desglicosilación con PGNasa F de la banda de aproximadamente 18 kD, reduce esta banda a un tamaño equivalente a la banda más inferior en el gel de la figura 13. Esto sugiere que la neublastina se puede producir como una proteína glicosilada en células de mamíferos.

#### Expresión de neublastina en *E. coli*

Con el fin de expresar el gen de neublastina en *E. coli*, se construyeron genes sintéticos con contenido inferior de GC y codones de *E. coli* preferidos. El gen sintético se clona en dos vectores, pET19b y pMJB164, un derivado de pET19b. La construcción con pET19b se muestra en la figura 14. En esta construcción, la secuencia que codifica NBN113 se fusiona directamente con una metionina de iniciación. Se muestran construcciones de genes sintéticos adicionales para la NBN en las SEQ ID N°: 52-54. La construcción con pMJB164 se muestra en la figura 15. En esta construcción, la NBN113 se fusiona con un marcador de histidina (es decir, 10 histidinas) separado por un sitio de escisión de enteroquinasa. Se muestran construcciones de genes sintéticos adicionales para la NBN fusionados con un marcador de histidina en las SEQ ID N°: 55-57. La metionina de iniciación precede al marcador de histidina.

#### Secuencia de nucleótidos que codifica la neublastina en la figura 14

```
ATGGCTGGAGGACCGGGATCTCGTGCTCGTGCAGCAGGAGCACGTGGCTGTGCTGCGTTCTCAACTA
GTGCCGGTGGTGCCTGCACTCGGACTGGGACACCGTCCGACGAACTAGTACGTTTTCGTTTTTGTTCAGGA
TCTTGCTCGTGCACGTTCTCCGCATGATCTATCTCTAGCATCTCTACTAGGAGCCGGAGCACTAAGA
CCGCCCGCGGGATCTAGACCTGTATCTCAACCTTGTTGTAGACCTACTAGATACGAAGCAGTATCTTTC
ATGGACGTAACCTCTACATGGAGAACCGTAGATAGACTATCTGCAACCGCATGTGGCTGTCTAGGATGA
```

(SEQ ID N°: 29)

#### Secuencia de nucleótidos que codifica la neublastina marcada con his en la figura 15

```
ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACTCGAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGGCT
GGAGGACCGGGATCTCGTGCTCGTGCAGCAGGAGCACGTGGCTGTGCTGCGTTCTCAACTAGTGCCG
GTGCGTGCCTCGGACTGGGACACCGTCCGACGAACTAGTACGTTTTCGTTTTTGTTCAGGATCTTGT
CGTGTGCACGTTCTCCGCATGATCTATCTCTAGCATCTCTACTAGGAGCCGGAGCACTAAGACCGCCG
CCGGGATCTAGACCTGTATCTCAACCTTGTTGTAGACCTACTAGATACGAAGCAGTATCTTTCATGGAC
GTAAACTCTACATGGAGAACCGTAGATAGACTATCTGCAACCGCATGTGGCTGTCTAGGATGATAATAG
```

(SEQ ID N°: 30)

#### **Ejemplo 6: Efecto de la neublastina en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas embrionarias de rata y actividad de ChAT**

En esta serie de experimentos se evaluó el efecto del medio condicionado de células HiB5pUbi1zNBN22 que producen neublastina descritas antes.

**Preparación de cultivos:** Se diseccionaron el mesencéfalo ventral o la médula espinal de embriones E14 de rata en solución salina de Hanks tamponada (HBSS) fría. Se incubaron trozos de tejido en tripsina al 0,1% esterilizada por filtración (Worthington) y DNasa al 0,05% (Sigma) en HBSS a 37°C durante 20 min. Después los trozos de tejido se aclararon 4 veces en HBSS + DNasa al 0,05% y se disociaron usando una pipeta automática de 1 ml. Después la suspensión se centrifugó a 600 rpm durante 5 min y el sedimento se volvió a suspender en medio condicionado de suero (SCM; DMEM con suero ternero fetal al 10%). El número total de células se evaluó por el procedimiento de

exclusión con tinta azul de tripán con una densidad de 100.000 células/m<sup>2</sup> en portaobjetos de cámara de 8 pocillos recubiertos con poli-L-lisina (Nunc) para evaluar la supervivencia de neuronas dopaminérgicas o con 200.000 células/m<sup>2</sup> en placas de 48 pocillos (Nunc) para mediciones de la actividad de ChAT. Las células se incubaron en SCM en CO<sub>2</sub> al 5%/O<sub>2</sub> al 95% y humedad al 95% a 37°C durante 24-48 h antes de cambiar a medio sin suero (SFM) con adición de factores neurotróficos.

Las células para evaluar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas se dejaron durante 5 días en SFM + adiciones de factor trófico y después se fijaron durante 5 min en PFA al 4% y se tificaron para la tirosina hidroxilada por inmunohistoquímica.

Las células para la actividad de ChAT se dejaron durante 3 días con SFM y después se lisaron en HBSS + Triton X-100 al 0,1% y se congelaron inmediatamente en hielo seco hasta la medición de la actividad de ChAT.

**Adición de factor trófico:** Se recogió medio condicionado de HiB5 no transfectado de control o HiB5 que producían neublastina (HiB5pUbi1zNBN22) o GDNF (HiB5pUbi1zGDNF-L17). HiB5pUbi1zNBN22 produce aproximadamente 20 ng de GDNF/24 horas/10<sup>5</sup> células determinado por GDNF-ELISA en medio condicionado recogido de las células. Las respectivas líneas celulares se incubaron toda la noche con DMEM + FCS al 1% y el líquido sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C hasta su uso. Los líquidos sobrenadantes se diluyeron 1:50 en SFM cuando se añadieron a las células. Se trataron pocillos por separado con líquido sobrenadante de control de HiB5 (1:50) + GDNF recombinante de rata purificado (de 0,03 - 10 ng/ml).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 4. Las figuras 4A-4C son ilustraciones del efecto de la neublastina, segregada de células HiB5pUbi1zNBN22, en la supervivencia de neuronas mesencefálicas ventrales, dopaminérgicas, embrionarias de rata cultivadas y la actividad de ChAT en neuronas motoras del nervio craneal colinérgico en medio sin suero como se ha descrito antes en el ejemplo 5.1.

La fig. 4A es una ilustración de la curva de respuesta a la dosis para GDNF recombinante en la actividad de ChAT (dpm/hora) medido en DIV5 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente de mesencéfalos ventrales de E14 (es decir, HiB5; GDNF 0,03 ng/ml; GDNF 0,1 ng/ml; GDNF 0,3 ng/ml; GDNF 1 ng/ml; GDNF 10 ng/ml; GDNF 100 ng/ml).

La fig. 4B es una ilustración de la actividad de ChAT (dpm/hora) medida en DIV5 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente de mesencéfalos ventrales de E14. Se añadieron medios condicionados diluidos de células HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) que producían neublastina o células HiB5GDNFL-17 que producían GDNF (GDNFL-17) como se indica en la figura (es decir, neublastina 1:10; neublastina 1:50; GDNF L-17 1:50).

La fig. 4C es una ilustración del número de células inmunorreactivas para la tirosina hidroxilasa por pocillo (Nº de células TH+/pocillo) en DIV7 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente de mesencéfalos ventrales de rata E14. Se añadió medio condicionado diluido de células HiB5 no transfectadas (HiB5) o de células HiB5pUbi1zNBN22 que producían neublastina (neublastina) o de GDNF recombinante, en diferentes concentraciones, como se indica en la figura (es decir, HiB5 1:10; HiB5 1:40; GDNF 0,1 ng/ml; GDNF 10 ng/ml; GDNF 100 ng/ml; y neublastina 1:40).

El medio condicionado de células HiB5 transfectadas con neublastina diluido 1:40 aumenta significativamente el número de células inmunorreactivas para TH por pocillo comparado con las células HiB5 de control (no transfectadas) con una dilución equivalente y una inferior (1:10 y 1:40) (véase, p. ej., la fig. 4B). El aumento de células inmunorreactivas para TH es comparable con el aumento visto con una concentración de GDNF máxima (10 ng/ml). Esto indica que la neublastina segregada al medio tiene un efecto en la supervivencia de la población de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral embrionario de rata. En contraste, a diferencia del GDNF segregado de células HiB5 transfectadas, no se ve efecto del medio condicionado de células HiB5 transfectadas con neublastina en otra población neuronal en el mismo cultivo, las neuronas colinérgicas (véase, p. ej., la fig. 4A).

#### **Ejemplo 7: Efecto de la neublastina en la supervivencia de cultivos de láminas de neuronas mesencefálicas ventrales dopaminérgicas embrionarias de cerdo**

Este experimento evaluaba el efecto de cocultivar células HiB5pUbi1zNBN22 que producen neublastina con cultivos de láminas de mesencéfalos ventrales de embriones porcinos.

**Preparación de los cultivos:** Se aislaron mesencéfalos ventrales (VM) de embriones porcinos (E28; n= 12) en condiciones estériles, se cortaron en láminas de 400 µm y se pusieron en solución salina equilibrada de Gey (GIBCO) enfriada, con glucosa (6,5 mg/ml). Las láminas de tejido se cultivaron por el procedimiento de cultivo de interfase desarrollado originalmente por Stoppini y col. (L. Stoppini, PA. Bucks, D. Mutter, *J. Neurosci. Methods* 1991, 37, 173-182).

Brevemente, las láminas se pusieron en membranas semiporosas (Millipore, 0,3 µm; 8 láminas/membrana

correspondiente a un VM) puestas como insertos en placas de 6 pocillos (Costar) con medio que contenía suero (Gibco BRL). Cada pocillo contenía 1 ml de medio (Optimem al 50%, suero de caballo al 25%, solución salina equilibrada de Hank al 25% (todos GIBCO)) complementado con D-glucosa hasta una concentración final de 25 mM. El día 0, se sembraron 7000 células HiB5pUbi1zNBN22 transfectadas (neublastina) o 7000 células HiB5 no transfectadas (control) en cada lámina de tejido. Los cocultivos se hicieron crecer primero en un incubador a 33°C durante 48 horas, dejando las células HiB5 inmortalizadas con un oncogén sensible a la temperatura para proliferar, y después se pusieron en un incubador a 37°C, donde las células HiB5 se diferenciaban. El medio se cambió dos veces por semana. No se usaron antimicóticos ni antibióticos en ninguna etapa.

10 **Determinación de la dopamina por HPLC:** El día 12 y 21 in vitro, se recogió el medio de cultivo y se analizó la dopamina usando HPLC con detección electroquímica (W.N. Slooth, J.B.P. Gramsbergen, *J. Neurosci. Meth.* 1995 60 141-49).

15 **Procesamiento del tejido e inmunohistoquímica:** El día 21, los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato durante 60 min, se deshidrataron en una solución de sacarosa al 20% durante 24 horas, se congelaron, se seccionaron en el criostato a 20  $\mu\text{m}$  (4 series), y se montaron en portaobjetos de microscopio recubiertos de gelatina. Una serie de secciones se inmunotizó para la tirosina hidroxilasa (TH). Brevemente, las secciones se lavaron en solución salina con tris 0,05 M (TBS, pH 7,4) que contenía Triton X-100 al 1% durante 3x15 min y se incubaron con suero bovino fetal al 10% (FBS, Life Technologies) en TBS durante 30 min. Después el tejido se incubó durante 24 horas a 4°C con anticuerpo monoclonal anti-TH de ratón (Boehringer Mannheim) diluido 1:600 en TBS con FBS al 10%. Después de aclarar en TBS con Triton X-100 al 1% durante 3x 15 min, las secciones se incubaron durante 60 min con anticuerpo IgG anti-ratón biotinilado (Amersham) diluido 1:200 en TBS con FBS al 10%. Después las secciones se lavaron con TBS con Triton X-100 al 1% (3x 15 min) y se incubaron durante 60 min con estreptavidina-peroxidasa (Dako) diluido 1:200 en TBS con FBS al 10%. Después de lavar en TBS (3x 15 min), la actividad de unión se visualizó por tratamiento con 3,3-diaminobencidina al 0,05% (Sigma) en TBS que contenía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01%. Finalmente, las secciones se deshidrataron en alcohol, se aclararon en xileno y se cubrieron con el cubreobjetos en Eukitt.

30 **Recuentos de células y análisis morfométrico:** Se llevó a cabo la cuantificación de las neuronas inmunorreactivas para TH-ir usando un microscopio de campo brillante (Olympus). Sólo se contaron las células que presentaban una tinción intensa con una estructura celular bien conservada y un núcleo distinguible. El cálculo se basó en los recuentos de células en cada cuarto de sección de cultivo usando un objetivo de x20. El número de células se corrigió para el recuento doble de acuerdo con la fórmula de Abercrombie (M. Abercrombie, *Anat. Rec.* 1946 94 239-47), usando el diámetro medio de los núcleos en las neuronas TH-ir (6,6 $\pm$ 0,2  $\mu\text{m}$ , n = 30). Se calculó el tamaño de los núcleos usando un sistema de seguimiento de neuronas (NeuroLucida, MicroBrightField, Inc.).

40 Los resultados de estos experimentos se muestran en la fig. 5. Las figuras 5A-5C son ilustraciones del efecto de la Neublastina segregada de células HiB5pUbi1zNBN22 en la función y supervivencia de cultivos de láminas de neuronas mesencefálicas ventrales dopaminérgicas embrionarias de cerdo cocultivadas con células HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o células HiB5 (control) como se describe abajo.

45 La fig. 5A y fig. 5B ilustran la liberación de dopamina al medio en DIV12 (dopamina (pmol/mol) - día 12 y DIV21 (dopamina (pmol/ml) - día 21), respectivamente. La fig. 5C es una ilustración del número de células inmunorreactivas para la tirosina hidroxilasa por cultivo (células TH-ir por cultivo) en DIV21.

50 El día 12, el análisis de HPLC puso de manifiesto que el medio de los cocultivos de HiB5-neublastina contenía 84% más de dopamina que el medio de los cocultivos de HiB5-C (fig. 5A). El día 21 la diferencia era de 78% (fig. 5B), y los recuentos de células mostraron que los cocultivos de HiB5-neublastina contenían 66% más neuronas inmunorreactivas para la tirosina hidroxilasa que los cocultivos de HiB5-C (P<0,05) (fig. 5C). Esto indica que la Neublastina segregada del clon HiB5pUbi1zNBN22 tiene un efecto de supervivencia potente en las neuronas dopaminérgicas embrionarias porcinas.

### **Ejemplo 8: Supervivencia de las células de ganglios de la raíz dorsal en medio sin suero**

55 Este ejemplo muestra la actividad neurotrófica de un polipéptido de Neublastina comparado con factores neurotróficos conocidos.

60 Se sacrificaron ratones hembra preñados por dislocación cervical. Los embriones se procesaron para el cultivo como sigue.

65 Se usaron agujas de tungsteno afiladas electrolíticamente para diseccionar los ganglios de la raíz dorsal de las etapas indicadas de ratones C57/B16 (Møllegaard Breeding, Dinamarca). Los ganglios embrionarios se incubaron durante 5 min a 37°C con tripsina al 0,05% (Gibco/BRL) en solución salina equilibrada de Hanks sin calcio ni magnesio. Los ganglios postnatales se trataron con colagenasa/dispasa 1 mg/ml durante 30 a 45 minutos y después tripsina/DNasa al 0,25% durante 15 minutos. Después de separar la solución de tripsina, los ganglios se lavaron una

vez con 10 ml de DMEM que contenía suero de caballo inactivado con calor al 10%, y se trituraron suavemente con una pipeta Pasteur esmerilada a la llama para dar una sola suspensión de células.

5 Las células se pusieron en placas de 24 pocillos (Nunc), que se recubrieron previamente con poliornitina (0,5 mg/ml, toda la noche) y laminina (20 mg/ml durante 4 h; Gibco/BRL). Las neuronas se incubaron a 37°C en un incubador con CO<sub>2</sub> al 5% humidificado, en un medio definido que consistía en Hams F14 complementado con glutamina 2 mM, albúmina de suero bovino al 0,35%, progesterona 60 ng/ml, putrescina 16 mg/ml, L-tiroxina 400 ng/ml, selenito de sodio 38 ng/ml, triyodo-tironina 340 ng/ml, penicilina 60 mg/ml y estreptomycinina 100 mg/ml.

10 Después de 48 horas de incubación, las neuronas se reconocían claramente por su morfología bipolar con ópticas de contraste de fase. Se evaluó el porcentaje de supervivencia de neuronas en ausencia o presencia de factores tróficos (añadidos al medio de cultivo antes de poner las neuronas en placas con 10 ng/ml), o de medio condicionado de las células HiB5pUbi1zNBN22 que producen neublastina, contando las neuronas en los pocillos a las 48 horas.

15 Los resultados de estos experimentos se presentan en la fig. 9, en cuya figura:

0 representa el experimento de control (en ausencia de factores);

20 1 representa experimentos en presencia de GDNF;

2 representa experimentos en presencia de neurturina;

3 representa experimentos en presencia de la neublastina de la invención;

25 La fig. 9 presenta datos de experimentos llevados a cabo en células DRG aisladas de fetos en desarrollo en diferentes momentos de tiempo designados como sigue:

E12 representa el día embrionario 12;

30 E16 representa el día embrionario 16;

P0 representa el día de nacimiento;

35 P7 representa el día 7 después del nacimiento; y

P15 representa el día 15 después del nacimiento.

Estos resultados muestran claramente que el factor neurotrófico de la invención muestra actividades comparables, o incluso mejores que las de los factores neurotróficos bien establecidos.

40

### **Ejemplo 9: Efectos in vivo de la neublastina en neuronas dopaminérgicas nigrales**

45 Con el fin de ensayar la capacidad de la neublastina (neublastina) para proteger las neuronas dopaminérgicas nigrales del adulto (DA) frente a la degeneración inducida por 6-hidroxidopamina, se usó un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson (Sauer and Oertel, *Neuroscience* 1994, 59, 401-415) y transferencia de neublastina de gen lentivírico.

50 **Producción de lentivirus:** Para generar un vector de transferencia lentivírico que codifique neublastina, pHR<sup>-</sup>-neublastina, se subclonó un fragmento BamH1 de 1331 pb del ADNc de neublastina en el sitio BamH1/Bg1 II de pSL301 (Invitrogen). A partir de esta construcción se cortó un fragmento BamH1/Xho1 de 1519 pb y se ligó en el sitio BamH1/Xho1 de pHR<sup>-</sup> que lleva un fragmento postraduccional del virus de la hepatitis de la marmota (Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ: "Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors"; *J. Virol.* 1999, 73 (4) 2886-2892). Para generar pHR-GDNF se ligó un fragmento BamH1/Xho1 de 701 pb de pUbi1z-GDNF en el sitio BamH1/Xho1 de pHR<sup>-</sup>.

55

La producción del vector lentivírico está descrita p. ej. por Zufferey y col. (Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D: "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*"; *Nat. Biotechnol.* 1997, 15 (9) 871-875). Brevemente, las construcciones de transferencia y los plásmidos auxiliares pR8.91 y pMDG se cotransfectaron en células 293T. Los viriones liberados al medio se recogieron 48 y 72 h después de la transfección. Para concentrar el virus el medio se centrifugó 1,5 h a 141.000 g, y el sedimento se disolvió en DMEM. La valoración de un control que llevaba el gen de la proteína fluorescente verde ("GFP") se determinó que era 10<sup>8</sup> unidades transformantes (UT)/ml por la fluorescencia de GFP en células 293T. Se usó una técnica de transferencia en ranura de ARN (von Schwedler U, Song J, Aiken C, Trono D: "Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells"; *J. Virol.* 1993 67 (8) 4945-4955) para determinar la valoración de partículas víricas. 65 En el líquido sobrenadante de GDNF y el líquido sobrenadante de neublastina había 10 veces menos partículas

comparados con el líquido sobrenadante de GFP.

**Procedimientos quirúrgicos:** Todos los trabajos que implicaban animales se llevaron a cabo de acuerdo con el conjunto de normas del Comité Ético para el Uso de Animales de Laboratorio en la Universidad de Lund.

Se usó un total de 21 ratas Sprague Dawley hembras adultas jóvenes (B&K Universal, Estocolmo, Suecia) y se alojaron con ciclos de 12 horas de luz:oscuridad con acceso libre a comida para ratas y agua. El marcaje retrógrado y las lesiones por 6-OHDA se llevaron a cabo 3 semanas antes de la lesión de acuerdo con Sauer y Oertel [Sauer and Oertel, *Neuroscience* 1994 59: 401-415]. Brevemente, a las ratas con anestesia de equitesina (0,3 ml/100g) se les inyectó bilateralmente 0,2  $\mu$ l de una solución al 2% (disuelto en NaCl al 0,9%) del trazador retrógrado Fluoro-Gold (FG; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO). Las inyecciones se hicieron usando una jeringuilla de Hamilton de 2  $\mu$ l en las coordenadas: AP= +0,5 mm; ML=  $\pm$ 3,4 mm respecto al bregma; DV= -5,0 mm respecto a la duramadre y la barra de incisión fijada a 0,0 mm. Además, se inyectaron 0,05  $\mu$ l/ml dejando otros 5 min antes de retirar la aguja.

Catorce días después de las inyecciones de FG, los animales recibieron un total de 5 depósitos (1  $\mu$ l/depósito) de un vector lentivírico que llevaba el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), neublastina o GDNF. Cuatro de los depósitos estaban en el cuerpo estriado junto con los dos conductos de la agujas en las siguientes coordenadas: AP= +1,0 mm, ML= -2,6mm, DV<sub>1</sub> = -5,0 mm DV<sub>2</sub>= -4,5 mm y AP = 0,0 mm, ML= -3,7mm, DV<sub>1</sub> = -5,0 mm DV<sub>2</sub> = -4,5 mm. El depósito sobre la sustancia negra se hizo en AP= -5,2 mm, ML= -2,0 mm, DV<sub>1</sub> =-6,3 mm. La barra dental se fijó en -2,3 mm.

Veintiún días después del marcaje retrógrado, y 7 días después de las inyecciones lentivíricas los animales se volvieron a anestesiarse con una jeringuilla Hamilton de 10  $\mu$ l y se inyectó un solo depósito de 20  $\mu$ g de 6-OHDA (Sigma; calculado como base libre y disuelta en 3  $\mu$ l de solución salina enfriada con hielo complementada con ácido ascórbico al 0,02%) en el cuerpo estriado derecho en el mismo sitio que los depósitos de FG. La velocidad de inyección era 1  $\mu$ l/min, dejando otros 3 min antes de retirar la aguja.

**Procesamiento del tejido:** A los 21 días después de la inyección de 6-OHDA, los animales se anestesiaron profundamente con hidrato de cloral y se perfundieron transcardiacamente con solución salina (pH 7,4; temperatura ambiente) durante 1 min seguido de 200 ml de solución de formaldehído enfriada con hielo (paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,4). Se diseccionaron los cerebros y después se fijaron en el mismo fijador durante 3-4 horas y después se transfirieron a sacarosa al 25%/tampón de fosfato 0,1 M durante 48 horas. Se cortaron 5 series de secciones de 40  $\mu$ m a lo largo del cuerpo estriado y la sustancia negra (SN) en un microtomo de congelación.

**Cálculo cuantitativo de las neuronas dopaminérgicas en la SN:** Se calculó el número de FG marcado en las partes compactas de la SN mediante un observador ciego como se ha descrito previamente [Sauer and Oertel, *Neuroscience* 1994 59: 401-415]. Brevemente, se usaron 3 secciones consecutivas centradas en torno al nivel del núcleo terminal medio del conducto óptico accesorio (MTN; -5,3 en el atlas de Paxinos y Watson (1997)) y se contaron todas las neuronas marcadas/teñidas lateralmente al MT con un aumento de 40x (n=6-7/grupo). Las neuronas marcadas con FG se incluyeron si eran fluorescentes brillantes con epi-iluminación a 330 nm, presentaban un perfil neuronal y cubrían al menos un proceso neurítico.

En el lado de la lesión en los animales que recibieron inyecciones de lentivirus que llevaban GFP, el número de neuronas nigrales positivas para FG se redujo al 18% de las del lado intacto. En contraste, los animales a los que se inyectó lenti-neublastina mostraron una protección casi completa del número de neuronas nigrales positivas para FG (89%). Era tan eficaz como los animales tratados con lenti-GDNF donde 87% de las neuronas marcadas de forma retrógrada permanecían en el lado lesionado. Esto muestra que la Neublastina es un factor de supervivencia potente para las neuronas dopaminérgicas nigrales de adulto lesionadas, y que es tan potente como el GDNF.

La fig. 6 es una ilustración del efecto in vivo de la Neublastina producida por lentivirus en neuronas dopaminérgicas nigrales. Las neuronas de las partes compactas de la SN, en ratas hembra Sprague Dawley, se marcaron de forma retrógrada con Fluoro-Gold (FG), 3 semanas antes de una sola inyección de 6-hidroxildopamina (6-OHDA) en el cuerpo estriado derecho. Una semana antes de la inyección de 6-OHDA, los animales recibieron inyecciones con vectores lentivíricos que expresaban Neublastina (neublastina), GDNF (GDNF) o proteína fluorescente verde (GFP) como se indica en la figura. Veintiún días después de las inyecciones de 6-OHDA, se determinó el número de neuronas marcadas con FG en ambos lados del cuerpo estriado. La figura muestra el porcentaje (% lesión de FG/intactas) de neuronas marcadas con FG en el lado lesionado (derecho) frente al lado intacto (izquierdo) del cuerpo estriado de los tres grupos de animales.

#### **Ejemplo 10: Producción de anticuerpos**

Para preparar los anticuerpos contra la Neublastina, se inmunizaron 2 conejos con el péptido 1: CRPTRYEAVSFMDVNST(aminoácidos 108-124 de la SEQ ID N°: 9); o el péptido 2:

ALRPPGSRPVSQPC(aminoácidos 93-107 de la SEQ ID N°: 9) conjugados con proteína transportadora a intervalos de 3 semanas. Se inmunizaron 2 conejos por cada péptido la semana 0, 3, 6 y 10, y se recogió sangre las semanas 7 y 11. La segunda extracción de sangre se purificó por afinidad con una columna de afinidad de péptidos. Los anticuerpos se llamaron Ab-1 y Ab-2, de acuerdo con el péptido.

**Transferencia western:** Se incubaron toda la noche  $2 \times 10^6$  células HiB5, transfectadas establemente con ADNc de neublastina (HiB5pUbi1zNBN22), o células HiB5 no transfectadas, en medio sin suero con complemento de  $N_2$  (GIBCO). El medio se concentró en concentradores pequeños con membranas de corte de exclusión de 5 kDa (Millipore, Bedford, MA). Las muestras concentradas se añadieron a 5x tampón de muestra de Laemmli y se calentaron a 95°C durante 5 minutos. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en geles de acrilamida al 15% y se transfirieron a membranas de PVDF. Los sitios de unión de proteínas residuales se bloquearon con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS con Tween-20 al 0,1%. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpo de neublastina (1:1000), seguido de incubación con un anticuerpo IgG anti-conejo o anti-ratón secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2000).

La inmunotinción se visualizó usando quimioluminiscencia potenciada Plus (ECL+) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham). Los resultados de estos experimentos se muestran en la fig. 3 y ejemplo 5.

Usando técnicas estándar también se produjeron anticuerpos policlonales de conejo contra los siguientes péptidos:

**Péptido R27: GPGSRARAAGARGC (aminoácidos 30-43 del ID SEC N°: 9);**  
**Péptido R28: LGHRSEDELVRFRFC (aminoácidos 57-70 del ID SEC N°: 9);**  
**Péptido R29: CRRARSPHDLSL (aminoácidos 74-85 del ID SEC N°: 9);**  
**Péptido R30: LRPPGSRPVSQPC (aminoácidos 94-107 del ID SEC N°: 9); y**  
**Péptido R31: STWRTVDRLSATAAC (aminoácidos 123-136 del ID SEC N°: 9).**

Sólo los péptidos R30 y R31, relativamente cerca del extremo C, reconocían la proteína desnaturalizada en condiciones reductoras en una transferencia Western.

**Ejemplo 11: Actividad biológica de un polipéptido de neublastina truncado de rata que comprende los últimos 102 aminoácidos carboxi-terminales.**

La secuencia de aminoácidos de la pre-pro-neublastina de rata se proporciona en el siguiente SEQ ID N°: 34:

**1 MELGLGEPTA LSHCLRPRWQ PALWPTLAAL ALLSSVTEAS LDPMSRSPAS**  
**51 RDVPSVPLAP PTDYLPGGHT AHLCSERALR PPPQSPQFAP PPPGALQSP**  
**113aa N-7 -9 -11 -14**  
**101 PAALRGARAA RAGTRSSRAR ATDARGCLR SQLVPVSALG LGHSSDELIR**  
**151 FRFCSGSCRR ARSPHDLSLA SLLGAGALRS PPGSRPISQP CCRPTRYEAV**  
**201 SFMDVNSTWR TVDHLATAAC GCLG (SEC ID N°: 34)**

Cada una de las neublastinas truncadas descritas a continuación se identifica encima de los correspondientes restos iniciales (letras en negrita en la secuencia anterior). El inicio de la forma de neublastina de 113 aminoácidos (NBN113) también está marcada.

Se examinó en las células la actividad biológica de una forma truncada de neublastina que contenía los 102 aminoácidos carboxi-terminales de neublastina de rata. La neublastina truncada se generó por digestión de una forma de 113 aminoácidos de neublastina de rata, que tiene la secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos 111-224 (NBN113 de rata, subrayado más arriba) de la SEQ ID N°: 34, con una aminopeptidasa no específica (Sigma, MO) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de esta digestión, la neublastina se sometió a cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) para separar cualesquiera componentes contaminantes de la proteína. El peso molecular de la neublastina truncada (designada "NBN113 (N-11)") se confirmó por espectrometría de masas y se determinó que era 10,931 kDa, el peso previsto del polipéptido de 102 aminoácidos (NBN102). Como control, se trató NBN113 de rata en paralelo con tampón de enzima (Tris 25 mM pH 8) solo. No se observó digestión con este control, y se identificó el polipéptido adecuado de 12,047 kDa.

Se compararon las actividades biológicas de NBN113, NBN113 tratado con tampón de enzima y NBN113 (N-11) en un ensayo de activación de RET celular (*c-RET*). La actividad de la neublastina se determinó por su capacidad para estimular la fosforilación de *c-RET* en células NB41A3-mRL3, una línea de células de neuroblastoma murino transfectadas establemente con GFR $\alpha$ 3 murino y que expresa RET y GFR $\alpha$ 3. Las células NB41A3-mRL3 se pusieron en placa en DMEM complementado con FBS al 10% con  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, y se cultivaron durante 18 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de quitar el medio y un lavado de las células con 1 ml de PBS por pocillo, las células se estimularon con DMEM que contenía NBN113, NBN113 tratado con tampón de enzima y NBN113 (N-11) durante 10 minutos a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Para parar la actividad, se quitó el medio y las células se lavaron con PBS inmediatamente antes de la lisis con Tris 10 mM, pH 8,0, NP40 al 0,5%, DOC al 0,2%, NaF 50 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,1 mM, y PMSF 1 mM. Después de 1 h de incubación a 4°C, los lisatos se agitaron mediante pipeteo repetido y se transfirieron (0,25 ml por pocillo) a una placa ELISA de 96 pocillos recubierta con mA b anti-RET (AA.GE7.3). Los pocillos se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora con tampón de bloqueo (TBST que contenía 1% de suero de ratón normal y BSA al 3% en tampón de TBS (Tris 15 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) seguido de 6 lavados con TBST (TBS + Tween 20 al 0,05%) solo.

Se detectó RET fosforilado por incubación (2 horas) del receptor capturado con 4G10 (Upstate Biotechnology, NY) un anticuerpo de fosfotirosina conjugado con HRP (0,2  $\mu$ g por pocillo). Después de incubación, los pocillos se lavaron 6 veces con TBST, y la actividad de la HRP se detectó a 450 nm con un ensayo colorimétrico. Se midieron los valores de absorbancia de los pocillos tratados con lisato o con tampón de lisis solo, se corrigieron con el ruido de fondo, y los datos se representaron gráficamente como función de la concentración de neublastina presente en la mezcla de activación. Los resultados se muestran en la fig. 16. Se midieron los valores de absorbancia de los pocillos tratados con lisato o con tampón de lisis y las señales corregidas con el ruido de fondo se representaron gráficamente como una función de la concentración de neublastina.

Estos resultados demuestran que la forma truncada amino-terminal (102 aminoácidos) de la neublastina presenta actividad biológica celular que es indistinguible de la de la forma de neublastina NBN113.

#### **Ejemplo 12: Actividad biológica de tres formas truncadas amino-terminales (99, 104 y 106 aminoácidos) de la neublastina.**

Se examinaron las actividades de los polipéptidos de neublastina truncados (99 y 106 aminoácidos) en el ensayo de activación de RET celular, y los resultados se muestran en la fig. 17. Además de las formas de 99 y 106 aminoácidos, se incluyeron otras dos moléculas de neublastina en este ensayo para la comparación: NBN113 de rata, que servía como referencia, y una muteína de la neublastina de rata de 113 aminoácidos en la que la arginina de la posición 14 de la secuencia de NBN113 de rata se sustituía por un resto de lisina ("NBN R14K (N)"). Esta muteína facilitaba la generación de la forma de 99 aminoácidos que carecía de 14 aminoácidos amino-terminales ("NBN R14K (N-14)"), cuando se escindía en este sitio usando una proteasa específica de lisina (Endo Lys C; WAKO, VA). La forma de 106 aminoácidos, que carecía de 7 restos de amino-terminales ("NBN 113 (N-7)"), se generó a partir de NBN113 de rata por proteólisis parcial con tripsina (Biozyme, San Diego). Todos los productos truncados se caracterizaron por espectroscopía de masas como en el ejemplo 11 anterior.

Se examinaron las actividades de NBN113, NBN R14K (N), NBN R14K (N-14), y NBN113 (N-7) con concentraciones de 0,005 nM a 100 nM, 0,05 nM a 100 nM, 0,006 nM a 114 nM y 0,05 nM a 107 nM, respectivamente. La actividad se midió como la absorbancia a A<sub>450nm</sub> como se describe en el ejemplo 11. Todas las formas de neublastina presentaban una actividad similar a todas las concentraciones ensayadas. Estos resultados demuestran que las formas truncadas de NBN113 de rata que carece de 14 ó 7 restos amino-terminales son activas como la NBN113 de rata en el ensayo de activación de KIRA.

El ensayo de activación de KIRA mostrado en la fig. 18 se llevó a cabo para determinar la actividad biológica de una forma de neublastina de 104 aminoácidos ("NBN104 (N-9)"). Este polipéptido, que carecía de 9 restos amino-terminales presentes en la molécula de NBN113 de rata salvaje, se generó tratando la NBN113 de rata expresada en CHO con tripsina. Como antes, la masa molecular se confirmó por espectrometría de masas. La actividad de los dos polipéptidos (NBN104 (N-9) y NBN113) se examinó con concentraciones de 0,05 nM a 115 nM. La actividad se midió como la absorbancia a A<sub>450nm</sub> como se describe en el ejemplo 11. La actividad de la forma N-9 era al menos tan alta como la actividad de la NBN113 de rata. Estos resultados demuestran que una forma truncada (104 aminoácidos) que carece de los 9 aminoácidos amino-terminales del polipéptido NBN113 de rata es al menos tan activa como la NBN113 de rata en el ensayo de activación de KIRA-ELISA.

La Tabla 5 ilustra la relación entre las secuencias del polipéptido de pre-pro-neublastina descrito de la invención. La línea 1 proporciona el polipéptido de la SEQ ID N°: 2, la línea 2 proporciona el polipéptido de la SEQ ID N°: 4, y la línea 3 proporciona el polipéptido de la SEQ ID N°: 9. Los 7 restos de cisteína conservados se designan por los símbolos ("\*", "#", "+" y "|") para indicar los puentes disulfuro intramoleculares (\* con \*, # con #, y + con +) e intermoleculares ("|") formados en el ligando de neublastina dimerizado maduro. El extremo amino de cada uno de los polipéptidos de neublastina truncados se designa por "o" para NBN112 a NBN99, respectivamente.



## ES 2 366 610 T3

SEQ ID N°: 2	Polipéptido de neublastina humana de la secuencia 1	200 aa
SEQ ID N°: 3	Región codificante(CDS) de un pre-pro-polipéptido humano	861 bp
SEQ ID N°: 4	Polipéptido de neublastina humana de la secuencia 3	238 aa
SEQ ID N°: 5	Variante de la neublastina humana en la secuencia 4 (Xaa1 es Asn o <u>Thr</u> ; Xaa2 es <u>Ala</u> o Pro)	140 aa
SEQ ID N°: 6	Variante de la neublastina humana en la secuencia 4 (Xaa1 es Asn o <u>Thr</u> ; Xaa2 es <u>Ala</u> o Pro)	116 aa
SEQ ID N°: 7	Variante de la neublastina humana en la secuencia 4 (Xaa1 es Asn o <u>Thr</u> ; Xaa2 es <u>Ala</u> o Pro)	113 aa
SEQ ID N°: 8	ADNc de colonia positiva de PCR de ADNc de cerebro fetal humano.	861 bp
SEQ ID N°: 9	Polipéptido de pre-pro-neublastina de cerebro fetal humano que incluye "parada" (corresponde a la sec. 8)	221 aa
SEQ ID N°: 10	Variante de pre-pro-neublastina (sec. 9) NBN140, 14,7 kD	140 aa
SEQ ID N°: 11	Variante de pre-pro-neublastina (sec. 9) NBN116, 12,4 kD	116 aa
SEQ ID N°: 12	Variante de pre-pro-neublastina (sec. 9) NBN113, 12,1 kD	113 aa
SEQ ID N°: 13	Producto de PCR del cribado de la placa principal de ADNc de cerebro fetal humano usando las SEQ ID N° 17 y 18 como cebadores	102 pb
SEQ ID N°: 14	Producto de PCR del cribado de la placa principal de ADNc fetal de ratón usando las SEQ ID N° 21 y 22 como cebadores	220 pb
SEQ ID N°: 15	ADNc de neublastina de ratón de longitud entera	2136 pb
SEQ ID N°: 16	Polipéptido de pre-pro-neublastina de ratón	224 aa
SEQ ID N°: 17	Cebador superior "NBNint.sense" para NBN de ADNc de cerebro fetal humano complementario de las bases 551-568 de la SEQ ID N°: 1	18 nt
SEQ ID N°: 18	Cebador inferior "NBNint.antisense" para NBN de ADNc de cerebro fetal humano complementario de las bases 633-652 de la SEQ ID N°: 1	20 nt
SEQ ID N°: 19	Cebador superior "NBNnext.sense" para RT-PCR de ARNm de cerebro humano entero complementario de las bases 58-74 de la SEQ ID N°: 8	17 nt
SEQ ID N°: 20	Cebador inferior "NBNnext.antisense" para RT-PCR de ARNm de cerebro humano entero complemento inverso de las bases 850-865 de la SEQ ID N°: 8	16 nt
SEQ ID N°: 21	Cebador C2 de NBN "NBNint.sense" para el cribado de la placa principal de ADNc fetal de ratón complementario de las bases 1398-1415 de la SEQ ID N°: 15	18 nt
SEQ ID N°: 22	Cebador C2as de NBN "NBNint.antisense" para el cribado de la placa principal de ADNc fetal de ratón. Complemento inverso de las bases 1598-1617 de la SEQ ID N°: 15	20 nt
SEQ ID N°: 23	Par de cebadores 1, cebador de PCR homossentido para amplificación de ADN genómico humano complementario de las bases 60-88 de la SEQ ID N°: 3	29 nt
SEQ ID N°: 24	Par de cebadores 1, cebador de PCR antisentido para amplificación de ADN genómico humano. Complemento inverso de las bases 835-861 de la SEQ ID N°: 3	27 nt
SEQ ID N°: 25	Par de cebadores 2, cebador de PCR homossentido para amplificación de ADN genómico humano complementario de las bases 1-35 de la SEQ ID N°: 3	35 nt
SEQ ID N°: 26	Par de cebadores 2, cebador de PCR antisentido para amplificación de ADN genómico humano complemento inverso de las bases 786-819 de la SEQ ID N°: 3	34 nt
SEQ ID N°: 27	Sonda de hibridación antisentido conjugada con fosfatasa alcalina, complementaria de las bases 1140-1169 del ADNc de neublastina de ratón	30 nt
SEQ ID N°: 28	Cebador superior "NBNnext.sense" para RT-PCR de ARNm de cerebro humano entero complementario de las bases 1-16 de la SEQ ID N° 1	16 nt
SEQ ID N°: 29	ORF de gen sintético de la fig. 14 de neublastina	351 nt
SEQ ID N°: 30	ORF de gen sintético de la fig. 15 de HisNeublastina	414 nt
SEQ ID N°: 31	Cebador para aislar neublastina	39 nt
SEQ ID N°: 32	Cebador para aislar neublastina	39 nt
SEQ ID N°: 33	Cebador de NBN "NBNint.antisense", complemento inverso de las bases 715-730 de la SEQ ID N° 8	16 nt

SEQ ID N°: 34	Pre-pro-neublastina de rata	224 aa
SEQ ID N°: 35	Neublastina humana (NBN112)	112 aa
SEQ ID N°: 36	Neublastina humana (NBN111)	111 aa
SEQ ID N°: 37	Neublastina humana (NBN110)	110 aa
SEQ ID N°: 38	Neublastina humana (NBN109)	109 aa
SEQ ID N°: 39	Neublastina humana (NBN108)	108 aa
SEQ ID N°: 40	Neublastina humana (NBN107)	107 aa
SEQ ID N°: 41	Neublastina humana (NBN106, N-7)	106 aa
SEQ ID N°: 42	Neublastina humana (NBN105)	105 aa
SEQ ID N°: 43	Neublastina humana (NBN104, N-9)	104 aa
SEQ ID N°: 44	Neublastina humana (NBN103)	103 aa
SEQ ID N°: 45	Neublastina humana (NBN102)	102 aa
SEQ ID N°: 46	Neublastina humana (NBN101)	101 aa
SEQ ID N°: 47	Neublastina humana (NBN100)	100 aa
SEQ ID N°: 48	Neublastina humana (NBN99, N-14)	99 aa
SEQ ID N°: 49	Neurturina - Tabla 3	197 aa
SEQ ID N°: 50	Persefina - Tabla 3	156 aa
SEQ ID N°: 51	GDNF - Tabla 3	211 aa
SEQ ID N°: 52	Gen sintético para Neublastina	365 nt
SEQ ID N°: 53	Gen sintético para Neublastina	365 nt
SEQ ID N°: 54	Neublastina sintética	114 aa
SEQ ID N°: 55	Gen sintético para HisNeublastina	442 nt
SEQ ID N°: 56	Gen sintético para HisNeublastina	442 nt
SEQ ID N°: 57	HisNeublastina sintética	135 aa

## LISTAS DE SECUENCIAS

<110> NsGene A/S  
 Biogen, Inc.  
 Johansen, Teit E.  
 5 Wen-Yee Sah, Dinah  
  
 <120> Nuevos factores neurotróficos  
  
 <130> 00689-511 PCT (C045 CIP) NBN  
 10  
 <140> Presentada a continuación  
 <141> 2002-02-28  
  
 <150> DANISH 1998 00904  
 <151> 1998-07-06  
 15  
  
 <150> USSN 60/092.229  
 <151> 1998-07-09  
  
 <150> DANISH 1998 01048  
 <151> 1998-08-19  
 20  
  
 <150> USSN 60/097.774  
 <151> 1998-08-25  
 25  
  
 <150> USSN 60/103.908  
 <151> 1998-10-13  
  
 <150> DANISH 1998 01265  
 <151> 1998-10-06  
 30  
  
 <150> U.S.S.N 09/347.613  
 <151> 1999-07-02  
  
 <150> U.S.S.N 09/804.615  
 <151> 2001-03-12  
 35  
  
 <160> 57  
  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 40  
  
 <210> 1  
 <211> 865  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (120)..(719)  
 50  
  
 <220>  
 <221> 5'UTR  
 <222> (1)..(119)  
  
 <220>  
 <221> 3'UTR  
 <222> (721)..(865)  
 55  
  
 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (120)..(179)  
 60  
  
 <220>  
 <221> mat\_peptide

```

<222> (405)..(719)
<220>
<221> misc_structure
<222> (661)..(663)
5 <223> CARBOHYD: Asparagina glicosilada en Asn87
<220>
<221> misc_structure
<222> (426)..(623)
10 <223> DISULFID - puente disulfuro Cys8-Cys73
<220>
<221> misc_structure
<222> (507)..(707)
15 <223> DISULFID: puente disulfuro Cys35-Cys101
<220>
<221> misc_structure
<222> (519)..(713)
20 <223> DISULFID: puente disulfuro Cys39-Cys103
<220>
<221> misc structure
<222> (616)..(619)
25 <223> DISULFID: puente disulfuro entre cadenas Cys72-Cys72
<400> 1
ctaggagccc atgcccgcc tgatctcagc ccgaggacag cccctccttg aggtccttcc 60
tccccagcc cacctgggtg ccctctttct ccctgaggct ccacttggtc tctccgcgc 119
atg cct gcc ctg tgg ccc acc ctg gcc gct ctg gct ctg ctg agc agc 167
Met Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ser Ser
-95 -90 -85 -80
gtc gca gag gcc tcc ctg ggc tcc gcg ccc cgc agc cct gcc ccc cgc 215
Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro Ala Pro Arg
-75 -70 -65
gaa ggc ccc ccg cct gtc ctg gcg tcc ccc gcc ggc cac ctg ccg ggg 263
Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His Leu Pro Gly
-60 -55 -50
gga cgc acg gcc cgc tgg tgc agt gga aga gcc cgg cgg ccg cgc cgc 311
Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg Pro Arg Arg
-45 -40 -35
aga cac ttc tcg gcc cgc gcc ccc gcc gcc tgc acc ccc atc tgc tct 359
Arg His Phe Ser Ala Arg Ala Pro Ala Ala Cys Thr Pro Ile Cys Ser
-30 -25 -20
tcc ccg cgg gtc cgc gcg gcg cgg ctg ggg ggc cgg gca gcg cgc tcg 407
Ser Pro Arg Val Arg Ala Ala Arg Leu Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ser
-15 -10 -5 -1 1
ggc agc ggg ggc gcg ggg tgc cgc ctg cgc tcg cag ctg gtg ccg gtg 455
Gly Ser Gly Gly Ala Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val
5 10 15
cgc gcg ctc ggc ctg ggc cac cgc tcc gac gag ctg gtg cgt ttc cgc 503
Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg
20 25 30
ttc tgc acc ggc tcc tgc ccg cgc gcg cgc tct cca cac gac ctc agc 551

```

Phe Cys Thr Gly Ser Cys Pro Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser  
 35 40 45  
 ctg gcc agc cta ctg ggc gcc ggg gcc ctg cga ccg ccc ccg ggc tcc 599  
 Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser  
 50 55 60 65  
 cgg ccc gtc agc cag ccc tgc tgc cga ccc acg cgc tac gaa gcg gtc 647  
 Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val  
 70 75 80  
 tcc ttc atg gac gtc aac agc acc tgg aga acc gtg gac cgc ctc tcc 695  
 Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser  
 85 90 95  
 gcc acc gcc tgc ggc tgc ctg ggc tgagggctcg ctccagggct ttgcagactg 749  
 Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 100 105

gacccttacc ggtggctett cctgctggg accctcccgc agagtccac tagccagcgg 809

cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg agaggcccct gccggtgggt gatgga 865

<210> 2

<211> 200

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ser Ser  
 -95 -90 -85 -80

Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro Ala Pro Arg  
 -75 -70 -65

Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His Leu Pro Gly  
 -60 -55 -50

Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg Pro Arg Arg  
 -45 -40 -35

Arg His Phe Ser Ala Arg Ala Pro Ala Ala Cys Thr Pro Ile Cys Ser  
 -30 -25 -20

Ser Pro Arg Val Arg Ala Ala Arg Leu Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ser  
 -15 -10 -5 -1 1

Gly Ser Gly Gly Ala Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val  
 5 10 15

Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg  
 20 25 30

Phe Cys Thr Gly Ser Cys Pro Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser  
 35 40 45

Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser  
 50 55 60 65

Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val  
 70 75 80

Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser  
 85 90 95

```

Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      100                               105
<210> 3
<211> 861
<212> ADN
5  <213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (7)..(717)
<220>
10 <221> 5'UTR
<222> (1)..(6)
<220>
<221> 3'UTR
<222> (718)..(861)
15 <220>
<221> sig_peptide
<222> (7)..(174)
20 <220>
<221> mat_peptide
<222> (298)..(717)
<220>
25 <221> mat_peptide
<222> (370)..(717)
<220>
30 <221> mat_peptide
<222> (379)..(717)
<220>
<221> misc_structure
<222> (661)..(663)
35 <223> CARBOHYD: Asparagina glicosilada en Asn122
<220>
<221> misc_structure
<222> (424)..(621)
40 <223> DISULFID: puente disulfuro Cys43-Cys108
<220>
<221> misc_structure
<222> (505)..(705)
45 <223> DISULFID: puente disulfuro Cys70-Cys136
<220>
<221> misc_structure
<222> (517)..(711)
<223> DISULFID: puente disulfuro Cys74-Cys138
50 <220>
<221> misc_structure
<222> (616)..(618)
<223> DISULFID: puente disulfuro entre cadenas Cys107-Cys107
55 <400> 3

```

gagccc atg ccc ggc ctg atc tca gcc cga gga cag ccc ctc ctt gag 48  
 Met Pro Gly Leu Ile Ser Ala Arg Gly Gln Pro Leu Leu Glu  
 -95 -90 -85

gtc ctt cct ccc caa gcc cac ctg ggt gcc ctc ttt ctc cct gag gct 96  
 Val Leu Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Ala Leu Phe Leu Pro Glu Ala  
 -80 -75 -70

cca ctt ggt ctc tcc gcg cag cct gcc ctg tgg ccc acc ctg gcc gct 144  
 Pro Leu Gly Leu Ser Ala Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala  
 -65 -60 -55

ctg gct ctg ctg agc agc gtc gca gag gcc tcc ctg ggc tcc gcg ccc 192  
 Leu Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro  
 -50 -45 -40

cgc agc cct gcc ccc cgc gaa ggc ccc ccg cct gtc ctg gcg tcc ccc 240  
 Arg Ser Pro Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro  
 -35 -30 -25 -20

gcc ggc cac ctg ccg ggg gga cgc acg gcc cgc tgg tgc agt gga aga 288  
 Ala Gly His Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg  
 -15 -10 -5

gcc cgg cgg ccg ccg ccg cag cct tct cgg ccc gcg ccc ccg ccg cct 336  
 Ala Arg Arg Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro  
 -1 1 5 10

gca ccc cca tct gct ctt ccc cgc ggg ggc cgc gcg gcg cgg gct ggg 384  
 Ala Pro Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly  
 15 20 25

ggc ccg ggc aac cgc gct cgg gca gcg ggg gcg cgg ggc tgc cgc ctg 432  
 Gly Pro Gly Asn Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu  
 30 35 40 45

cgc tcg cag ctg gtg ccg gtg cgc gcg ctc gcc ctg ggc cac cgc tcc 480  
 Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser  
 50 55 60

gac gag ctg gtg cgt ttc cgc ttc tgc agc gcc tcc tgc cgc cgc gcg 528  
 Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala  
 65 70 75

cgc tct cca cac gac ctc agc ctg gcc agc cta ctg ggc gcc ggg gcc 576  
 Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala  
 80 85 90

ctg cga ccg ccc ccg ggc tcc cgg ccc gtc agc cag ccc tgc tgc cga 624  
 Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg  
 95 100 105

ccc acg cgc tac gaa gcg gtc tcc ttc atg gac gtc aac agc acc tgg 672  
 Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp  
 110 115 120 125

aga acc gtg gac cgc ctc tcc gcc aac ccc tgc ggc tgc ctg ggc 717  
 Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Asn Pro Cys Gly Cys Leu Gly  
 130 135 140

tgagggctcg ctccagggt ttgcagactg gacccttacc ggtggctctt cctgcctggg 777

accctcccgc agagtccac tagccagcgg cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg 837

agaggcccct gccggtgggt gatg

<210> 4  
 <211> 237  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

5

Met Pro Gly Leu Ile Ser Ala Arg Gly Gln Pro Leu Leu Glu Val Leu  
 -95 -90 -85

Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Ala Leu Phe Leu Pro Glu Ala Pro Leu  
 -80 -75 -70

Gly Leu Ser Ala Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala  
 -65 -60 -55 -50

Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser  
 -45 -40 -35

Pro Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly  
 -30 -25 -20

His Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg  
 -15 -10 -5

Arg Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro  
 -1 1 5 10 15

Pro Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro  
 20 25 30

Gly Asn Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser  
 35 40 45

Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu  
 50 55 60

Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser  
 65 70 75

Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg  
 80 85 90 95

Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr  
 100 105 110

Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr  
 115 120 125

Val Asp Arg Leu Ser Ala Asn Pro Cys Gly Cys Leu Gly  
 130 135 140

<210> 5

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> En la que Xaa en la posición 134 designa Asn o Thr, y Xaa en la posición 135 designa Ala o Pro

<400> 5

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly  
 20 25 30  
 Asn Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln  
 35 40 45  
 Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu  
 50 55 60  
 Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro  
 65 70 75 80  
 His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro  
 85 90 95  
 Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg  
 100 105 110  
 Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val  
 115 120 125  
 Asp Arg Leu Ser Ala Xaa Xaa Cys Gly Cys Leu Gly  
 130 135 140

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> En el que Xaa en la posición 110 designa Asn o Thr, y Xaa en la posición 111 designa Ala o Pro

10 <400> 6

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

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<220>

<223> En el que Xaa en la posición 107 designa Asn o Thr, y Xaa en la posición 108 designa Ala o Pro

<400> 7

```

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

- 5     **Gly**
- <210> 8
- <211> 861
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 10     <220>
- <221> CDS
- <222> (58)..(717)
- 15     <220>
- <221> 5'UTR
- <222> (1)..(57)
- 20     <220>
- <221> 3'UTR
- <222> (718)..(861)
- 25     <220>
- <221> sig\_peptide
- <222> (58).. (174)
- 30     <220>
- <221> mat\_peptide
- <222> (298)..(717)
- 35     <220>
- <221> mat\_peptide
- <222> (379)..(717)
- 40     <220>
- <221> misc\_structure
- <222> (661)..(663)
- <223> CARBOHYD: Asparagina glicosilada en Asn122

```

<220>
<221> misc_structure
<222> (424)..(621)
<223> DISULFID: puente disulfuro Gly43-Gly108
5
<220>
<221> misc_structure
<222> (505)..(705)
<223> DISULFID: puente disulfuro Gly70-Gly136
10
<220>
<221> misc_structure
<222> (517)..(711)
<223> DISULFID: puente disulfuro Gly74-Gly138
15
<220>
<221> misc_structure
<222> (616)..(618)
<223> DISULFID: puente disulfuro entre cadenas Gly107-Gly107
20
<400> 8
aggaggggtgg ggggaacagct caacaatggc tgatgggagc tcctggtggt gatagag 57

atg gaa ctt gga ctt gga ggc ctc tcc acg ctg tcc cac tgc ccc tgg 105
Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-80 -75 -70 -65

cct agg cgg cag cct gcc ctg tgg ccc acc ctg gcc gct ctg gct ctg 153
Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-60 -55 -50

ctg agc agc gtc gca gag gcc tcc ctg ggc tcc gcg ccc cgc agc cct 201
Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
-45 -40 -35

gcc ccc cgc gaa ggc ccc ccg cct gtc ctg gcg tcc ccc gcc ggc cac 249
Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
-30 -25 -20

ctg ccg ggg gga cgc acg gcc cgc tgg tgc agt gga aga gcc cgg cgg 297
Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
-15 -10 -5 -1

ccg ccg ccg cag cct tct cgg ccc gcg ccc ccg ccg cct gca ccc cca 345
Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
1 5 10 15

tct gct ctt ccc cgc ggg ggc cgc gcg gcg cgg gct ggg ggc ccg ggc 393
Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
20 25 30

agc cgc gct cgg gca gcg ggg gcg cgg ggc tgc cgc ctg cgc tcg cag 441
Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
35 40 45

ctg gtg ccg gtg cgc gcg ctc ggc ctg ggc cac cgc tcc gac gag ctg 489
Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu

```

```

50              55              60
gtg cgt ttc cgc ttc tgc agc ggc tcc tgc cgc cgc gcg cgc tct cca 537
Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
65              70              75              80

cac gac ctc agc ctg gcc agc cta ctg ggc gcc ggg gcc ctg cga ccg 585
His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro
85              90              95

ccc ccg ggc tcc cgg ccc gtc agc cag ccc tgc tgc cga ccc acg cgc 633
Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
100              105              110

tac gaa gcg gtc tcc ttc atg gac gtc aac agc acc tgg aga acc gtg 681
Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val
115              120              125

gac cgc ctc tcc gcc acc gcc tgc ggc tgc ctg gcc tgagggctcg 727
Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
130              135              140

ctccagggct ttgcagactg gacccttacc ggtggctctt cctgectggg accctcccgc 787
agagtccac tagccagcgg cctcagccag ggacgaagge ctcaaagctg agaggcccct 847
accggtgggt gatg 861

```

<210> 9  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 9
Met Glu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Ser Thr Leu Ser His Cys Pro Trp
-80              -75              -70              -65

Pro Arg Arg Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu
-60              -55              -50

Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala Ser Leu Gly Ser Ala Pro Arg Ser Pro
-45              -40              -35

Ala Pro Arg Glu Gly Pro Pro Pro Val Leu Ala Ser Pro Ala Gly His
-30              -25              -20

Leu Pro Gly Gly Arg Thr Ala Arg Trp Cys Ser Gly Arg Ala Arg Arg
-15              -10              -5              -1

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro Pro
1              5              10              15

Ser Ala Leu Pro Arg Gly Gly Arg Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly
20              25              30

Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln
35              40              45

Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu
50              55              60

Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro
65              70              75              80

```



```

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

```

<210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (95)  
 <223> Asparagina glicosilada

5  
 10

```

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

```

Gly

<210> 13  
 <211> 102  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 cctggccagc ctactgggcg cgggggccct ggcaccgcc cggggtccc ggcccgtcag 60  
 ccagccctgc tgccgaccca cgcgtacga agcgggtctcc tt 102

15  
 20

<210> 14  
 <211> 220  
 <212> ADN

<213> Murinae gen. sp.

<400> 14

```

ggccaccgct ccgacgagct gatacgtttc cgcttctgca gcggtctgtg ccgccgagca 60
cgctcccagc acgatctcag tctggccagc ctactgggcg ctggggccct acggtcgcct 120
cccgggtccc ggccgatcag ccagccctgc tgccggccca ctcgctatga ggccgtctcc 180
ttcatggacg tgaacagcac ctggagaacc gtggaccgcc 220

```

<210> 15

5 <211> 2136

<212> ADN

<213> Murinae gen. sp.

<220>

<221> CDS

10 <222> (975)..(1646)

<400> 15

```

gcggccgcga attcggcacg agggcgctctc gctgcagccc gcgatctcta ctctgcctcc 60
tggggtcttc tccaaatgtc tagccccac ctagagggac ctagcctagc cagcggggac 120
cggatccgga ggggtggagcg gccaggtag ccctgaaagg tggggcgggg cgggggcgct 180
ctgggccccca ccccgggatc tgggtgacgcc ggggctggaa tttgacaccg gacggcggcg 240
ggcaggaggc tgctgagggga tggagttggg ctcgccccc agatgcggcc cggggctct 300
gccagcaaca agtccctcgg gccccagccc tcgctgcgac tggggcttgg agccctgcac 360
ccaagggcac agaccggctg ccaaggcccc acttttaact aaaagaggcg ctgccaggtg 420
cacaactctg ggcgatgatcc acttgagctt cgggggaaag ccagcactg gtcccaggag 480
aggcgcctag aaggacacgg accaggacc ctttggtatg gagtgaacgc tgagcatgga 540
gtggaaggaa ctcaagttac tactttctcc aaccacctg gtaccttcag ccctgaagta 600
cagagcagaa gggctcttaga agacaggacc acagctgtgt gagtctcccc cctgaggcct 660
tagacgatct ctgagctcag ctgagctttg tttgccatc tggagaagtg agccattgat 720
tgaccttgty gcatcgcgaa ggaacaggtc ctgccaaagca cctaacacag agagcaaggt 780
tctccatcgc agctaccgct gctgagttga ctctagctac tccaacctcc tgggtcgtt 840
cgagagactg gagtggaagg aggaataccc caaaggataa ctaactcatc tttcagtttg 900
caagctgccg caggaagagg gtggggaaac gggctccacga aggcttctga tgggagcttc 960
tggagccgaa agct atg gaa ctg gga ctt gca gag cct act gca ttg tcc 1010
          Met Glu Leu Gly Leu Ala Glu Pro Thr Ala Leu Ser
          1             5             10
cac tgc ctc egg cct agg tgg cag tca gcc tgg tgg cca acc cta gct 1058
His Cys Leu Arg Pro Arg Trp Gln Ser Ala Trp Trp Pro Thr Leu Ala

```

ES 2 366 610 T3

15	20	25	
gtt cta gcc ctg ctg agc tgc gtc aca gaa gct tcc ctg gac cca atg			1106
Val Leu Ala Leu Leu Ser Cys Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met			
30	35	40	
tcc cgc agc ccc gcc gct cgc gac ggt ccc tca ccg gtc ttg gcg ccc			1154
Ser Arg Ser Pro Ala Ala Arg Asp Gly Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro			
45	50	55	60
ccc acg gac cac ctg cct ggg gga cac act gcg cat ttg tgc agc gaa			1202
Pro Thr Asp His Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu			
65	70	75	
aga acc ctg cga ccc ccg cct cag tct cct cag ccc gca ccc ccg ccg			1250
Arg Thr Leu Arg Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro			
80	85	90	
cct ggt ccc gcg ctc cag tct cct ccc gct gcg ctc cgc ggg gca cgc			1298
Pro Gly Pro Ala Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg			
95	100	105	
gcg gcg cgt gca gga acc cgg agc agc cgc gca cgg acc aca gat gcg			1346
Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala			
110	115	120	
cgc ggc tgc cgc ctg cgc tcg cag ctg gtg ccg gtg agc gcg ctc ggc			1394
Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly			
125	130	135	140
cta ggc cac agc tcc gac gag ctg ata cgt ttc cgc ttc tgc agc ggc			1442
Leu Gly His Ser Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly			
145	150	155	
tcg tgc cgc cga gca cgc tcc cag cac gat ctc agt ctg gcc agc cta			1490
Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu			
160	165	170	
ctg ggc gct ggg gcc cta cgg tcg cct ccc ggg tcc cgg ccg atc agc			1538
Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser			
175	180	185	
cag ccc tgc tgc cgg ccc act cgc tat gag gcc gtc tcc ttc atg gac			1586
Gln Pro Cys Arg Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp			
190	195	200	
gtg aac agc acc tgg agg acc gtg gac cac ctc tcc gcc act gcc tgc			1634
Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys			
205	210	215	220
ggc tgt ctg ggc tgaggatgat ctatctccaa gcctttgcac actagaccca			1686
Gly Cys Leu Gly			
tgtgttgccc tacctggaac agctccaccg ggctcacta accaggagcc tcaactcagc			1746
aggatatgga ggctgcagag ctcaggcccc aggccggtga gtgacagacg tcgtcggcat			1806
gacagacaga gtgaaagatg tcggaaccac tgaccaacag tcccaagttg ttcattggatc			1866
ccagctctac agacaggaga aacctcagct aaagagaact cctctggggag aatccagaaa			1926
tggccctctg tcctggggaa tgaattttga agagatatat atacatatat acattgtagt			1986
cgcggttgcg gaccagcctg tgctgaaacc agtcccgtgt tcacttgtgg aagccgaagc			2046
cctattttatt atttctaaat tattttattta ctttgaaaaa aaacggccaa gtcggcctcc			2106
ctttagttag ggtaatttg tgatccccggg			2136

<210> 16  
 <211> 224  
 <212> PRT

<213> Murinae gen. sp.

<400> 16

Met Glu Leu Gly Leu Ala Glu Pro Thr Ala Leu Ser His Cys Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Trp Gln Ser Ala Trp Trp Pro Thr Leu Ala Val Leu Ala Leu  
 20 25 30  
 Leu Ser Cys Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met Ser Arg Ser Pro  
 35 40 45  
 Ala Ala Arg Asp Gly Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro Pro Thr Asp His  
 50 55 60  
 Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu Arg Thr Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ala  
 85 90 95  
 Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ala Arg Ala  
 100 105 110  
 Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg  
 115 120 125  
 Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly Leu Gly His Ser  
 130 135 140  
 Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg  
 145 150 155 160  
 Ala Arg Ser Gln His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly  
 165 170 175  
 Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys  
 180 185 190  
 Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr  
 195 200 205  
 Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 210 215 220

<210> 17

5 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

10 <400> 17

cctggccagc ctactggg

18

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 18

aaggagaccg cttegtagcg

20

20 <210> 19

<211> 17

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
5	<400> 19	
	<b>atggaacttg gacttgg</b>	<b>17</b>
	<210> 20	
	<211> 16	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 20	
	<b>tccatcacc accggc</b>	<b>16</b>
15	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 21	
	<b>ggccaccgct ccgacgag</b>	<b>18</b>
	<210> 22	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 22	
30	<b>ggcgggtccac ggttctccag</b>	<b>20</b>
	<210> 23	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 23	
	<b>ccaagcccac ctgggtgcc tttttctcc</b>	<b>29</b>
	<210> 24	
40	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
45	<400> 24	
	<b>catcaccac ccgaggggc ctctcag</b>	<b>27</b>
	<210> 25	
	<211> 35	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 25	
	<b>gagcccatgc ccggcctgat ctccagcccga ggaca</b>	<b>35</b>
55	<210> 26	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR	
	<400> 26	
	<b>ccctggctga ggccgctggc tagtgggact ctgc</b>	<b>34</b>

<210> 27  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda de hibridación  
 <220>  
 <221> misc\_structure  
 <222> (1)  
 10 <223> en la que n representa un resto de conjugación que se une a la fosfatasa alcalina  
 <400> 27  
**ncaggtggtc cgtggggggc gccaaagaccg g** 31  
 <210> 28  
 <211> 16  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR  
 <400> 28  
**ctaggagccc atgccc** 16  
 20 <210> 29  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 29  
**atggctggag gaccgggac tctgtctcgt gcagcaggag cacgtggctg tctgtctcgt 60**  
**tctcaactag tgccgggtgc tgcactcggg ctgggacacc gttccgacga actagtacgt 120**  
**tttcgttttt gttcaggatc ttgtcgtcgt gcacgttctc cgcattgatct atctctagca 180**  
**tctctactag gagccggagc actaagaccg ccgcccggat ctagacctgt atctcaacct 240**  
**tgtttagtag ctactagata cgaagcagta tctttcatgg acgtaaactc tacatggaga 300**  
**accgtagata gactatctgc aaccgcatgt ggctgtctag gatgataata g 351**  
 <210> 30  
 <211> 414  
 <212> ADN  
 30 <213> Homo sapiens  
 <400> 30  
**atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcactcga gcggccatat cgacgacgac 60**  
**gacaaggctg gaggaccggg atctcgtgct cgtgcagcag gagcacgtgg ctgtcgtctg 120**  
**cgttctcaac tagtgccggt gcgtgcactc ggactgggac accgttccga cgaactagta 180**  
**cgttttcgtt tttgttcagg atcttctcgt cgtgcacgtt ctccgcatga tctatctcta 240**  
**gcatctctac taggagccgg agcactaaga ccgcccggg gatctagacc tgtatctcaa 300**  
**ccttgttgta gacctactag atacgaagca gtatctttca tggacgtaaa ctctacatgg 360**  
**agaaccgtag atagactatc tgcaaccgca tgtggctgtc taggatgata atag 414**  
 <210> 31  
 <211> 39  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR  
 <400> 31  
 40 **aaggaaaaaa gcggccgcca tggaacttgg acttggagg** 39  
 <210> 32  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR  
 <400> 32  
**ttttttcctt ggccggccgct cagcccaggc agccgcagg** 39  
 <210> 33  
 50 <211> 16  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

5

<400> 33

**gagcgagccc tcagcc**

16

<210> 34

10

<211> 224

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 34

Met Glu Leu Gly Leu Gly Glu Pro Thr Ala Leu Ser His Cys Leu Arg  
1 5 10 15

Pro Arg Trp Gln Pro Ala Leu Trp Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Leu  
20 25 30

Leu Ser Ser Val Thr Glu Ala Ser Leu Asp Pro Met Ser Arg Ser Pro  
35 40 45

Ala Ser Arg Asp Val Pro Ser Pro Val Leu Ala Pro Pro Thr Asp Tyr  
50 55 60

Leu Pro Gly Gly His Thr Ala His Leu Cys Ser Glu Arg Ala Leu Arg  
65 70 75 80

Pro Pro Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ala  
85 90 95

Leu Gln Ser Pro Pro Ala Ala Leu Arg Gly Ala Arg Ala Ala Arg Ala  
100 105 110

Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Ala Thr Asp Ala Arg Gly Cys Arg  
115 120 125

Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Ser Ala Leu Gly Leu Gly His Ser  
130 135 140

Ser Asp Glu Leu Ile Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg  
145 150 155 160

Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly  
165 170 175

Ala Leu Arg Ser Pro Pro Gly Ser Arg Pro Ile Ser Gln Pro Cys Cys  
180 185 190

Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr  
195 200 205

Trp Arg Thr Val Asp His Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
210 215 220

15

<210> 35

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 35

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

<210> 36  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 36

5

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

<210> 37  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37

10

Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp  
 20 25 30  
 Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg  
 35 40 45

Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu  
 50 55 60  
 Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg  
 85 90 95  
 Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 100 105 110

<210> 38  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 38

5

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

<210> 39  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 39

10

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

15 <210> 40

<211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 40

```

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

Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100                               105
    
```

5

<210> 41  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

10

```

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

Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 100                               105
    
```

15

<210> 42  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42

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

<210> 43  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 43

5

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

<210> 44  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

10

Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe  
 20 25 30  
 Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu

35 40 45  
 Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg  
 50 55 60  
 Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser  
 65 70 75 80  
 Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala  
 85 90 95  
 Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly  
 100

<210> 45  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 45

5

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

<210> 46  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 46

10

Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser  
 20 25 30  
 Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser  
 35 40 45  
 Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val  
 50 55 60  
 Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met  
 65 70 75 80  
 Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala

85

90

95

Cys Gly Cys Leu Gly  
100

<210> 47  
<211> 100  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens  
<400> 47

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

Gly Cys Leu Gly  
100

<210> 48  
<211> 99  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 48

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

Cys Leu Gly

<210> 49  
15 <211> 197  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 49

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

<210> 50  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 50

5

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

85 90 95  
 Cys Pro Arg Gly Ala Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu  
 100 105 110  
 Gln Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg  
 115 120 125  
 Tyr Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln Arg Leu  
 130 135 140  
 Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly  
 145 150 155

<210> 51  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 51

5

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro  
 20 25 30  
 Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val  
 50 55 60  
 Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala  
 85 90 95  
 Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg  
 100 105 110  
 Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr  
 115 120 125  
 Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr  
 130 135 140  
 Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu  
 145 150 155 160  
 Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln  
 165 170 175  
 Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp  
 180 185 190  
 Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys  
 195 200 205  
 Gly Cys Ile  
 210

<210> 52  
 <211> 365

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen sintético para neublastina

5 <400> 52  
 taccatggct ggaggaccgg gatctcgtgc tcgtgcagca ggagcacgtg gctgtcgtct 60  
 gcgttctcaa ctagtgccgg tgcgtgact cggactggga caccgttccg acgaactagt 120  
 acgttttcgt ttttgttcag gatcttgtcg tcgtgcacgt tctccgcatg atctatctct 180  
 agcatctcta ctaggagccg gagcactaag accgccgccg ggatctagac ctgtatctca 240  
 accttgttgt agacctacta gatacgaagc agtatctttc atggacgtaa actctacatg 300  
 gagaaccgta gatagactat ctgcaaccgc atgtggctgt ctaggatgat aatagggatc 360  
 cggct 365

<210> 53  
 <211> 365  
 <212> ADN

10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen sintético para neublastina

<400> 53  
 atggtaccga cctcctggcc ctagagcacg agcacgtcgt cctcgtgcac cgacagcaga 60  
 cgcaagagtt gatcacggcc acgcacgtga gcctgaccct gtggcaaggc tgcttgatca 120  
 tgcaaaagca aaaacaagtc ctagaacagc agcacgtgca agaggcgtac tagatagaga 180  
 tcgtagagat gatcctcggc ctcgtgattc tggcggcggc cctagatctg gacatagagt 240  
 tggacaaca tctggatgat ctatgcttcg tcatagaaag tacctgcatt tgagatgtac 300  
 ctcttggcat ctatctgata gacgttggcg tacaccgaca gatcctacta ttatccctag 360  
 gccga 365

15 <210> 54  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: neublastina sintética

<400> 54  
 Met Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala Ala Gly Ala Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly  
 20 25 30  
 His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe Cys Ser Gly Ser Cys  
 35 40 45  
 Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly  
 50 55 60  
 Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg Pro Val Ser Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn  
 85 90 95  
 Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys  
 100 105 110  
 Leu Gly

<210> 55  
 <211> 442  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Gen sintético para HisNeublastina

30 <400> 55

```
taccatgggc catcatcatc atcatcatca tcatcatcac togagcggcc atatcgacga 60
cgacgacaag gctggaggac cgggatctcg tgctcgtgca gcaggagcac gtggctgtcg 120
tctgcgttct caactagtgc cggtgcgctg actcggactg ggacaccggt cgcacgaact 180
agtacgtttt cgtttttgtt caggatcttg tcgctcgtgca cgttctccgc atgatctatc 240
tctagcatct ctactaggag cgggagcact aagaccgccg ccgggatcta gacctgtatc 300
tcaaccttgt tgtagaccta ctagatacga agcagtatct ttcattggacg taaactctac 360
atggagaacc gtagatagac tatctgcaac cgcattgtggc tgtctaggat gataataggg 420
atccggtgct taacaaagcc cg                                     442
```

<210> 56

<211> 442

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Gen sintético para HisNeublastina

<400> 56

```
atggtaccgc gtagtagtag tagtagtagt agtagtagtg agctcgcggc tatagctgct 60
gctgctgttc cgacctcctg gccctagagc acgagcacgt cgtcctcgtg caccgacagc 120
agacgcaaga gttgatcacg gccacgcacg tgagcctgac cctgtggcaa ggctgcttga 180
tcatgcaaaa gcaaaaacaa gtcctagaac agcagcacgt gcaagaggcg tactagatag 240
agatcgtaga gatgatcctc ggctcgtgta ttctggcggc ggccctagat ctggacatag 300
agttggaaca acatctggat gatctatgct tcgctataga aagtacctgc atttgagatg 360
tacctcttgg catctatctg atagacgctg gcgtacaccg acagatccta ctattatccc 420
taggcgcagc attgtttcgg gc                                     442
```

10 <210> 57

<211> 135

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: HisNeublastina sintética

<400> 57

```
Met Gly His Ser Ser Gly His
  1          5          10          15
Ile Asp Asp Asp Asp Lys Ala Gly Gly Pro Gly Ser Arg Ala Arg Ala
      20          25          30
Ala Gly Ala Arg Gly Cys Arg Leu Arg Ser Gln Leu Val Pro Val Arg
      35          40          45
Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu Val Arg Phe Arg Phe
      50          55          60
Cys Ser Gly Ser Cys Arg Arg Ala Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu
      65          70          75          80
Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly Ala Leu Arg Pro Pro Pro Gly Ser Arg
      85          90          95
Pro Val Ser Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr Glu Ala Val Ser
      100         105         110
Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg Thr Val Asp Arg Leu Ser Ala
      115         120         125
Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
      130         135
```

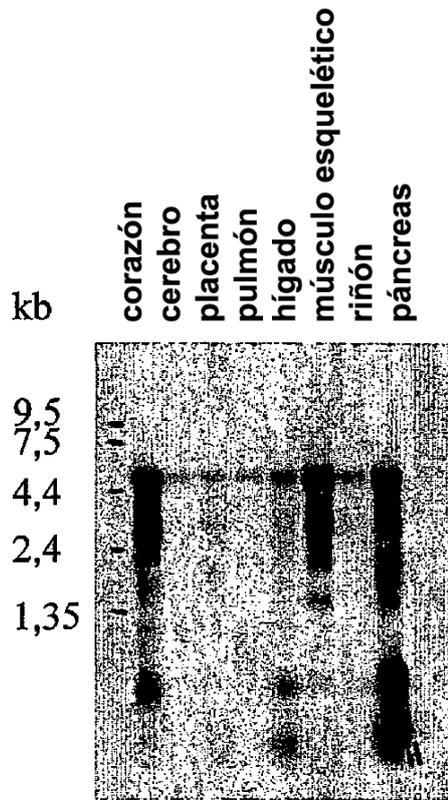
## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad neurotrófica, que presenta un grado de identidad de al menos 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 43, consistiendo dicho polipéptido esencialmente de 104 aminoácidos.
- 5 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido incluye 7 restos de cisteína en las posiciones que corresponden a las posiciones 16, 43, 47, 80, 81, 109 y 111 de la secuencia de polipéptido de la neublastina de SEQ ID N°: 12.
- 10 3. El polipéptido de las reivindicaciones 1 ó 2, que presenta un grado de identidad de al menos 98% con la SEQ ID N°: 43.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que presenta un grado de identidad de al menos 99% con la SEQ ID N°: 43.
- 15 5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho polipéptido está glicosilado.
6. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Una célula huésped transformada con el vector de la reivindicación 7.
9. La célula huésped de la reivindicación 8, en la que dicha célula huésped se selecciona del grupo que consiste en células de ovario de hámster chino, células HEK 293, células BHK21, células de oocito de *Xenopus laevis* (XLO), células fúngicas de filamentos, células Sf9, líneas celulares PC12, HiB5, RN33b, células progenitoras neurales humanas, células de melanoma de Bowe, células Daudi, células HeLa y derivados de células HeLa, células HL-60, células HT-1080, células Jurkat, células de carcinoma KB, células de leucemia K-562, células de cáncer de mama MCF-7, células MOLT-4, células Namalwa, células Raji, células RPMI 8226, células U-937, células 2R4 de sublínea WI-38VA13, células de carcinoma de ovario 2780AD, células de heterohibridoma producidas por fusión de células humanas y células de otra especie, células WI-38, células MRC-5, células huésped de mamífero, células progenitoras neurales, células astrocitarias, células T, células madre hematopoyéticas, y células endoteliales cerebrales.
- 25 10. Un procedimiento para hacer el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende: (a) proporcionar una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, (b) cultivar la célula huésped, y (c) recuperar el polipéptido.
- 35 11. Un procedimiento para hacer el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho polipéptido se obtiene: proporcionando un polipéptido de neublastina maduro, y poniendo en contacto dicho polipéptido de neublastina maduro con al menos una proteasa en condiciones suficientes para producir dicho polipéptido.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido se produce como un producto de digestión del polipéptido de neublastina por una exoproteasa, poniendo en contacto dicho polipéptido de neublastina maduro con al menos una exoproteasa.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicha exoproteasa se elige del grupo que consiste en amino peptidasa, Endo Lys C y tripsina.
- 50 14. El procedimiento de la reivindicación 12, que además comprende poner en contacto dicho producto de digestión del polipéptido de neublastina por la exopeptidasa con una dipeptidil peptidasa.
15. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 16. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 17. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar como un medicamento.
18. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en daño neuronal isquémico, lesión cerebral traumática, neuropatía periférica, dolor neuropático, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis

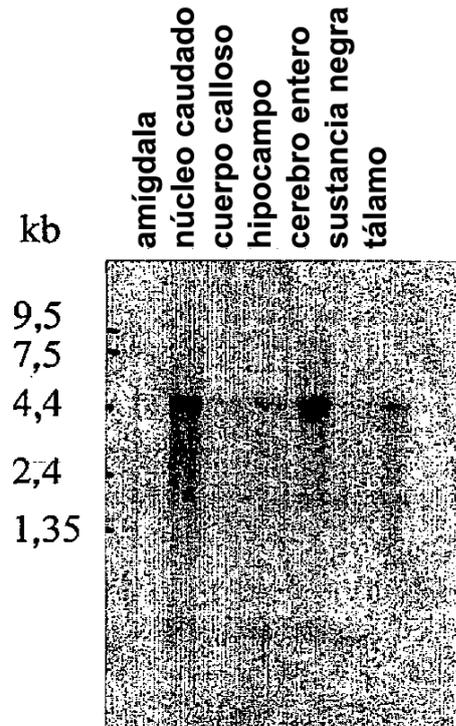
lateral amiotrófica, y deterioro de la memoria.

- 5 19. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en el tratamiento de un trastorno neuronal del sistema nervioso periférico, la médula o la médula espinal.
20. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un animal.
- 10 21. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en el tratamiento de una neuropatía periférica o dolor neuropático en un mamífero.
- 15 22. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que dicha neuropatía periférica se selecciona del grupo que consiste en neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por virus, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas.
- 20 23. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que dicho dolor neuropático está asociado con daño de nervios inducido por toxinas, daño de nervios inducido por patógenos, daño de nervios inducido por traumatismo, daño de nervios inducido por fármacos, neuropatía idiopática, neuropatía diabética, daño de nervios inducido por inflamación o neurodegeneración.
- 25 24. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el polipéptido se suministra directamente al sistema nervioso central.
- 25 25. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el polipéptido se suministra sistémicamente.
- 30 26. El polipéptido de la reivindicación 25, en el que el polipéptido se suministra sistémicamente por inyección subcutánea, administración intravenosa o infusión intravenosa.
- 30 27. El ácido nucleico de la reivindicación 6, para usar como un medicamento.
- 35 28. El ácido nucleico de la reivindicación 6, para usar en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en daño neuronal isquémico, lesión cerebral traumática, neuropatía periférica, dolor neuropático, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, y deterioro de la memoria.
- 40 29. El ácido nucleico de la reivindicación 6, para usar en el tratamiento de un trastorno neuronal del sistema nervioso periférico, la médula o la médula espinal.
- 40 30. El ácido nucleico de la reivindicación 6, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un animal.
- 45 31. El ácido nucleico de la reivindicación 6, para usar en el tratamiento de una neuropatía periférica o dolor neuropático en un mamífero.
- 50 32. El ácido nucleico de la reivindicación 31, en el que dicha neuropatía periférica se selecciona del grupo que consiste en neuropatías inducidas por traumatismo, neuropatías inducidas por virus, neuropatías inducidas por quimioterapia, neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas.
- 55 33. El ácido nucleico de la reivindicación 31, en el que dicho dolor neuropático está asociado con daño de nervios inducido por toxinas, daño de nervios inducido por patógenos, daño de nervios inducido por traumatismo, daño de nervios inducido por fármacos, neuropatía idiopática, neuropatía diabética, daño de nervios inducido por inflamación o neurodegeneración.
- 60 34. El ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, en el que el ácido nucleico se suministra directamente al sistema nervioso central.
- 60 35. Un kit que comprende, en uno o más envases, una sustancia seleccionada del grupo que consiste en el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y el ácido nucleico de la reivindicación 6.

**A.**



**B.**



Figs. 1A y 1B

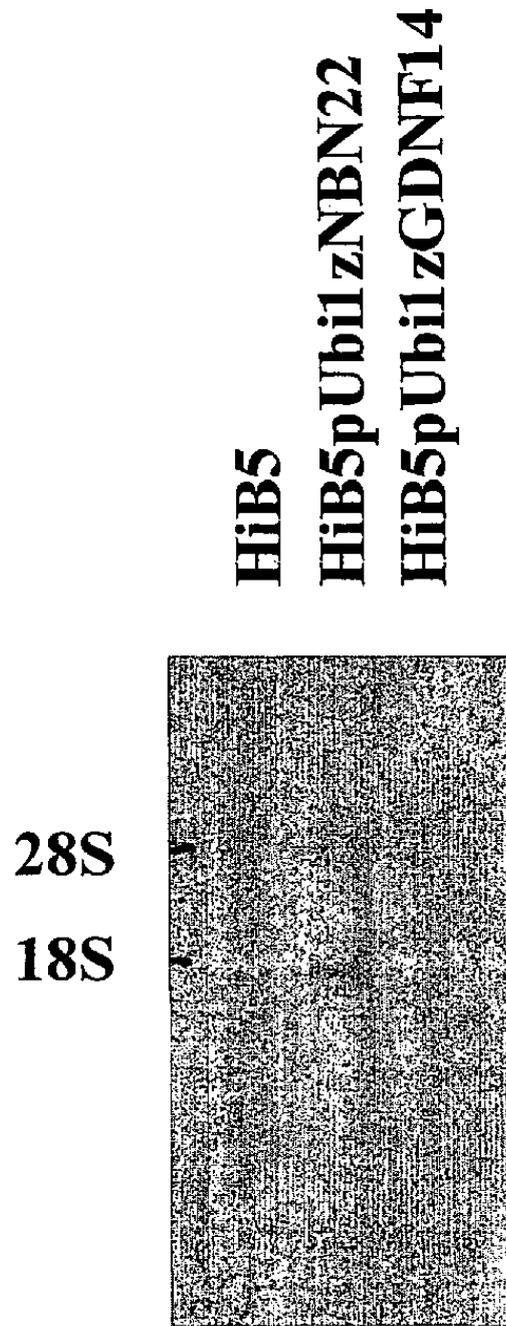


Fig. 2

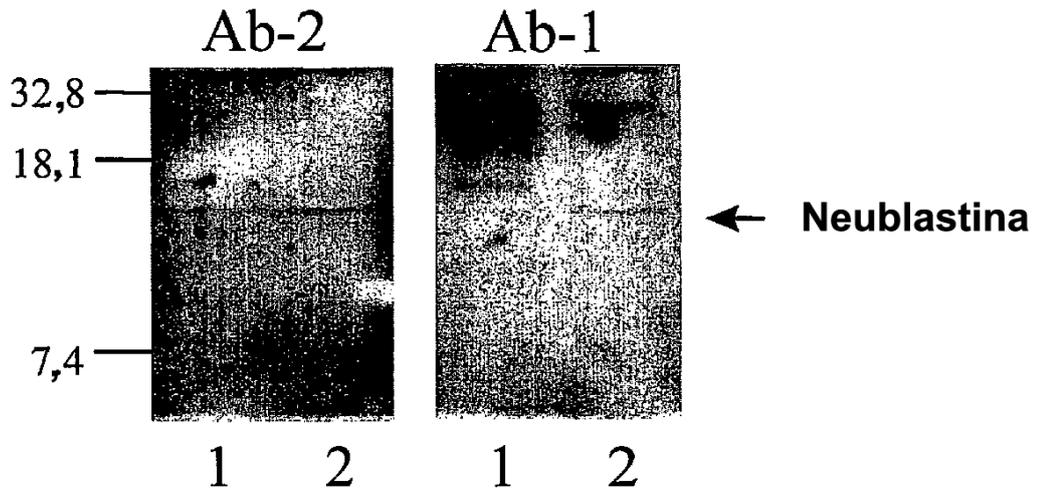
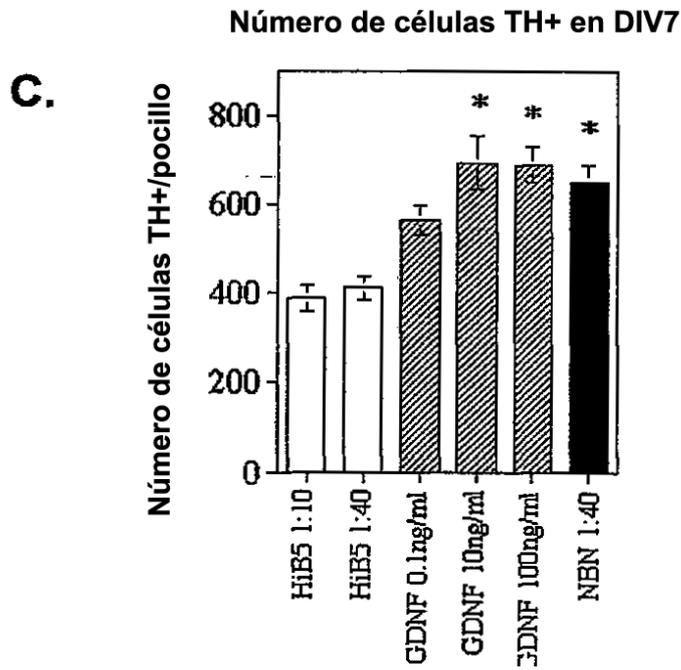
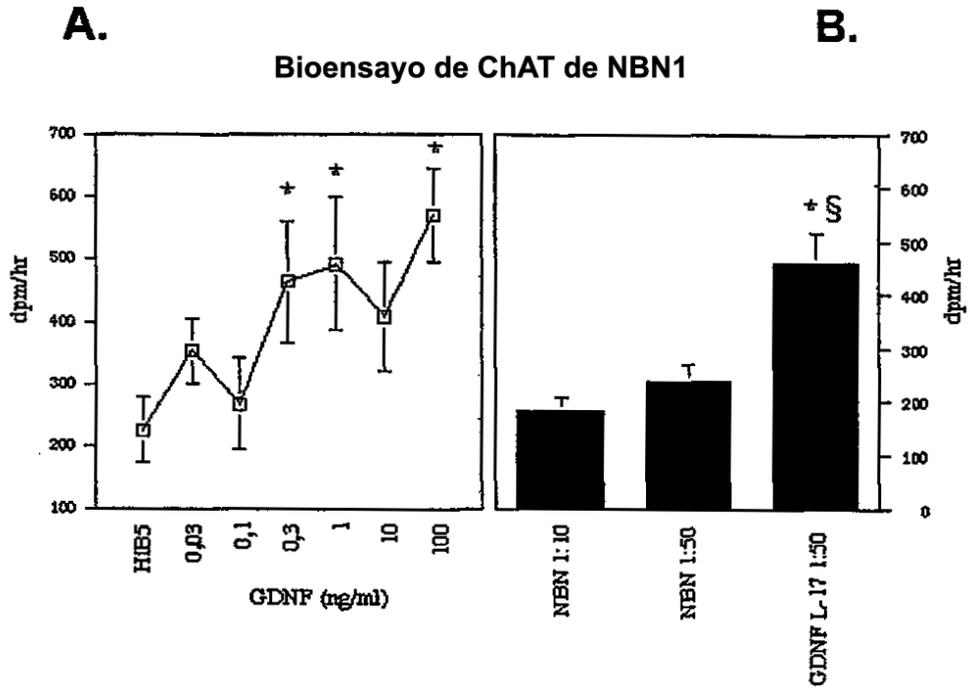
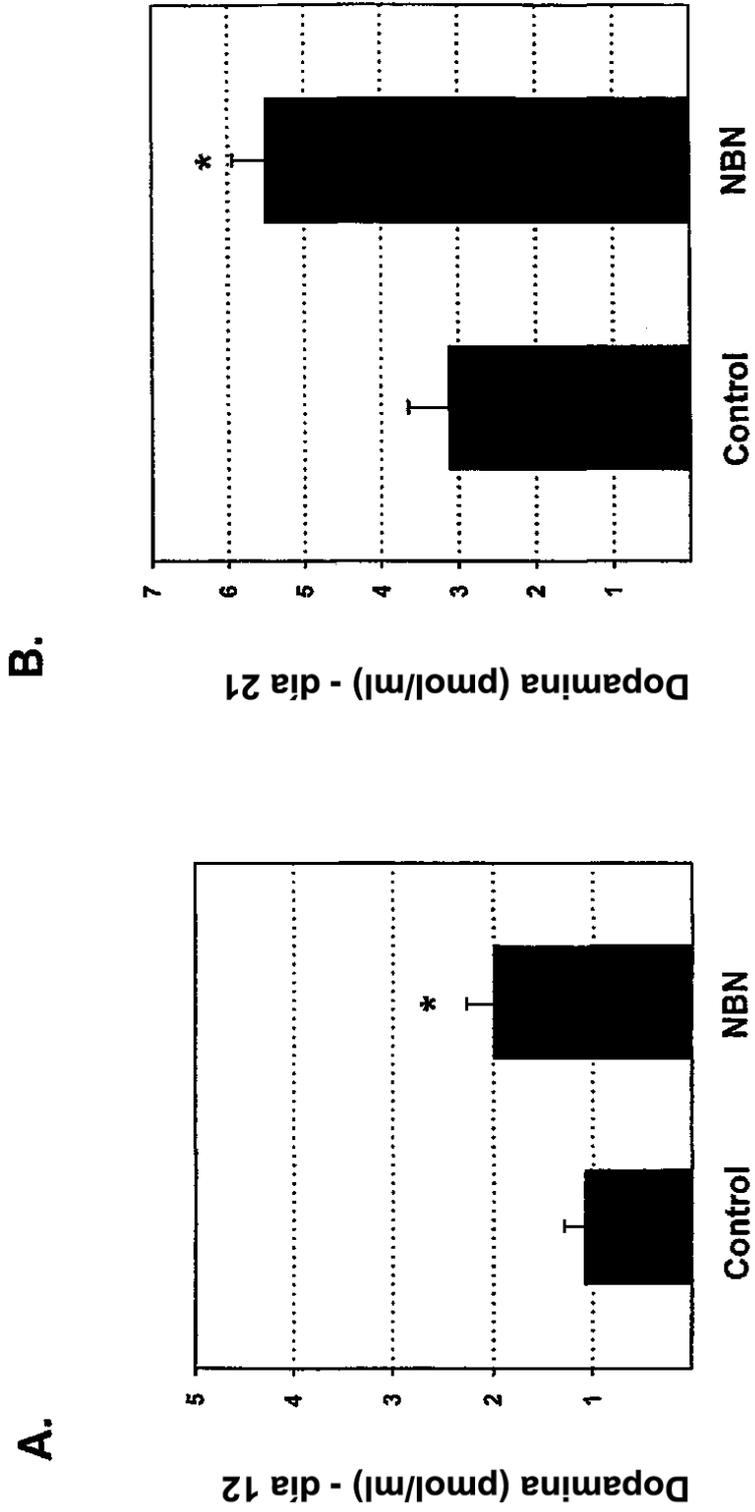


Fig. 3



Figs. 4A, 4B y 4C



Figs. 5Ay5B

C.

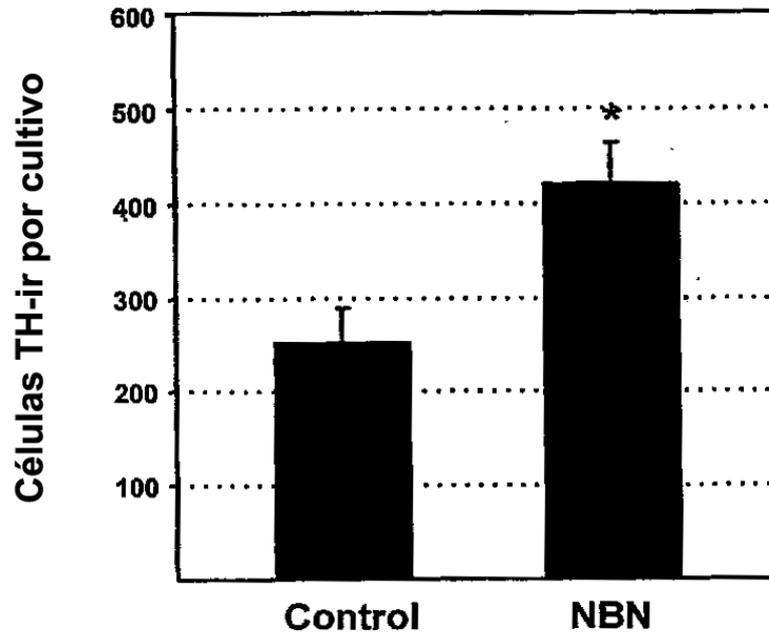
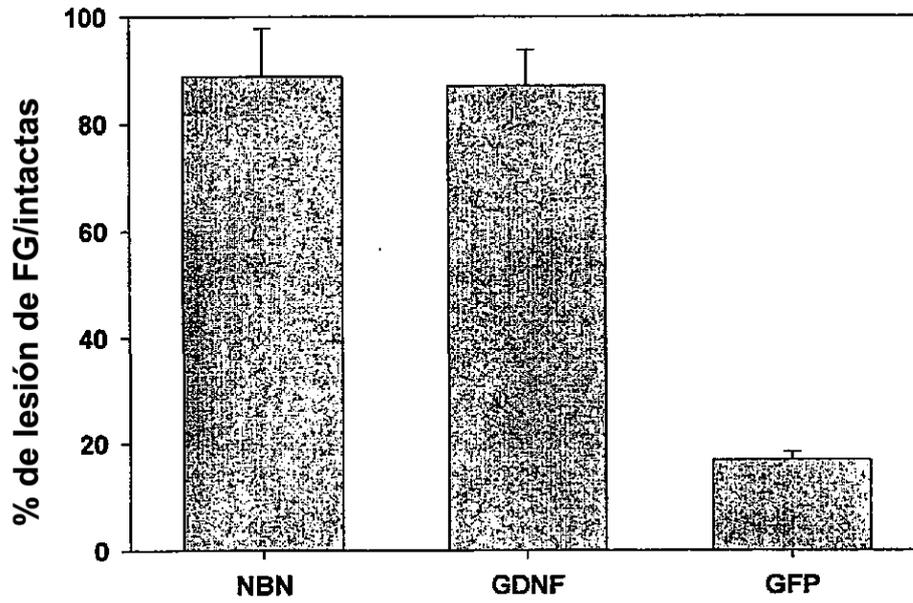


Fig. 5C

**Efectos in vivo de NBN en las neuronas dopaminérgicas nigrales**



**Fig. 6**

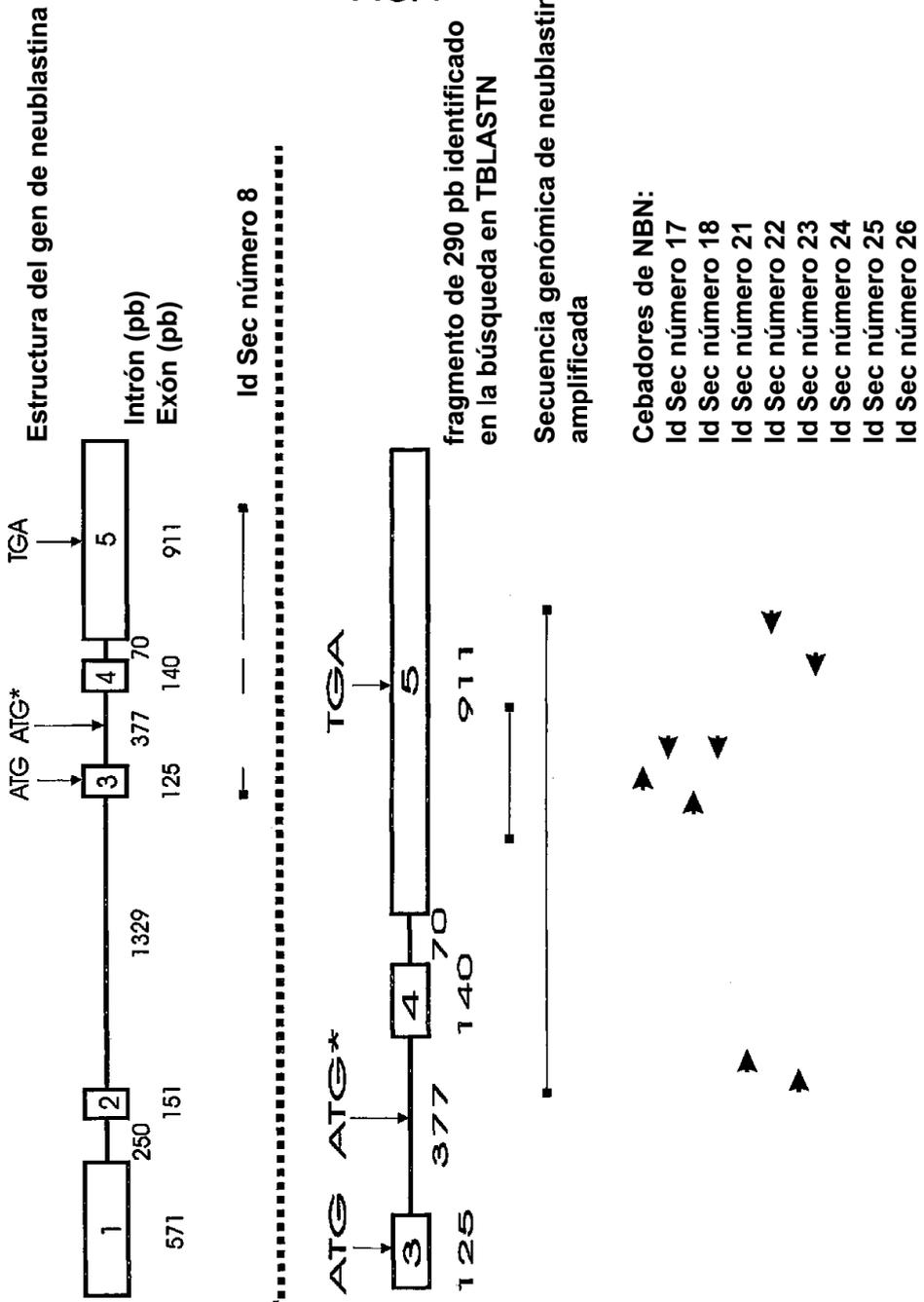


FIG. 7

**Alineamiento de cebadores de neublastina usados en el cribado rápido con regiones homólogas en otros ligandos GDNF**

5' -C CTG GCC AGC CTA CTG GG-3'	ID SEC N° 17
G CTG GCC CGG CTG CAG GG	persefina
G CTG CGA CGA CTG CGC CA	neurturina
A TTG AAA AAC TTA TCC AG	GDNF

5' -AA GGA GAC CGC       TTC GTA GCG-3'	ID SEC N° 18
TA GGC CAC GTC       GGT GTA GCG	persefina
AA GGA CAC CTC GTC CTC GTA GGC	neurturina
AA CGA CAG GTC ATC ATC AAA GGC	GDNF

nucleótidos conservados mostrados en negrita

**Fig. 8**

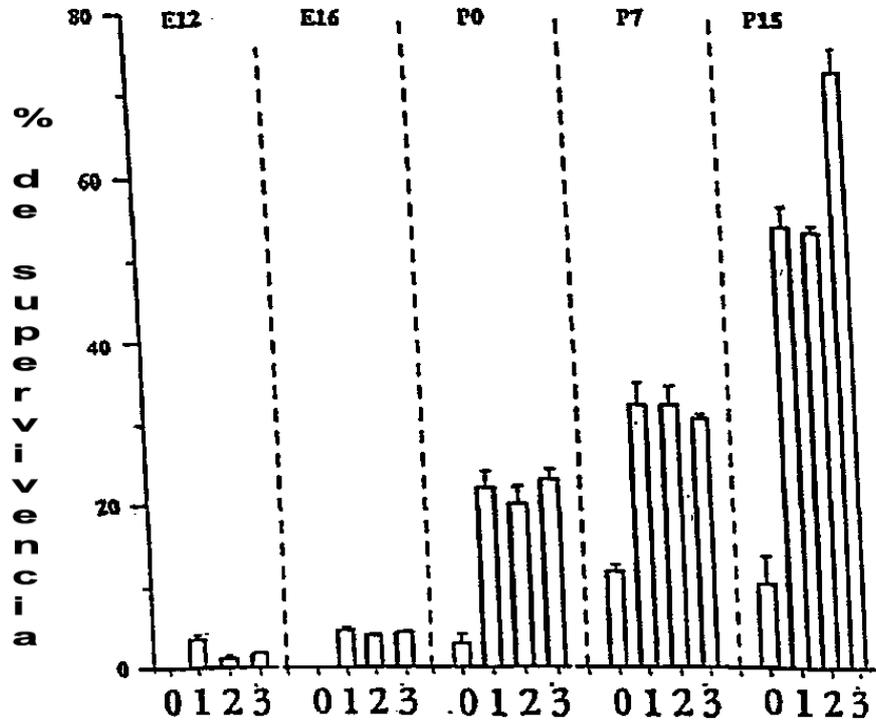


Fig. 9

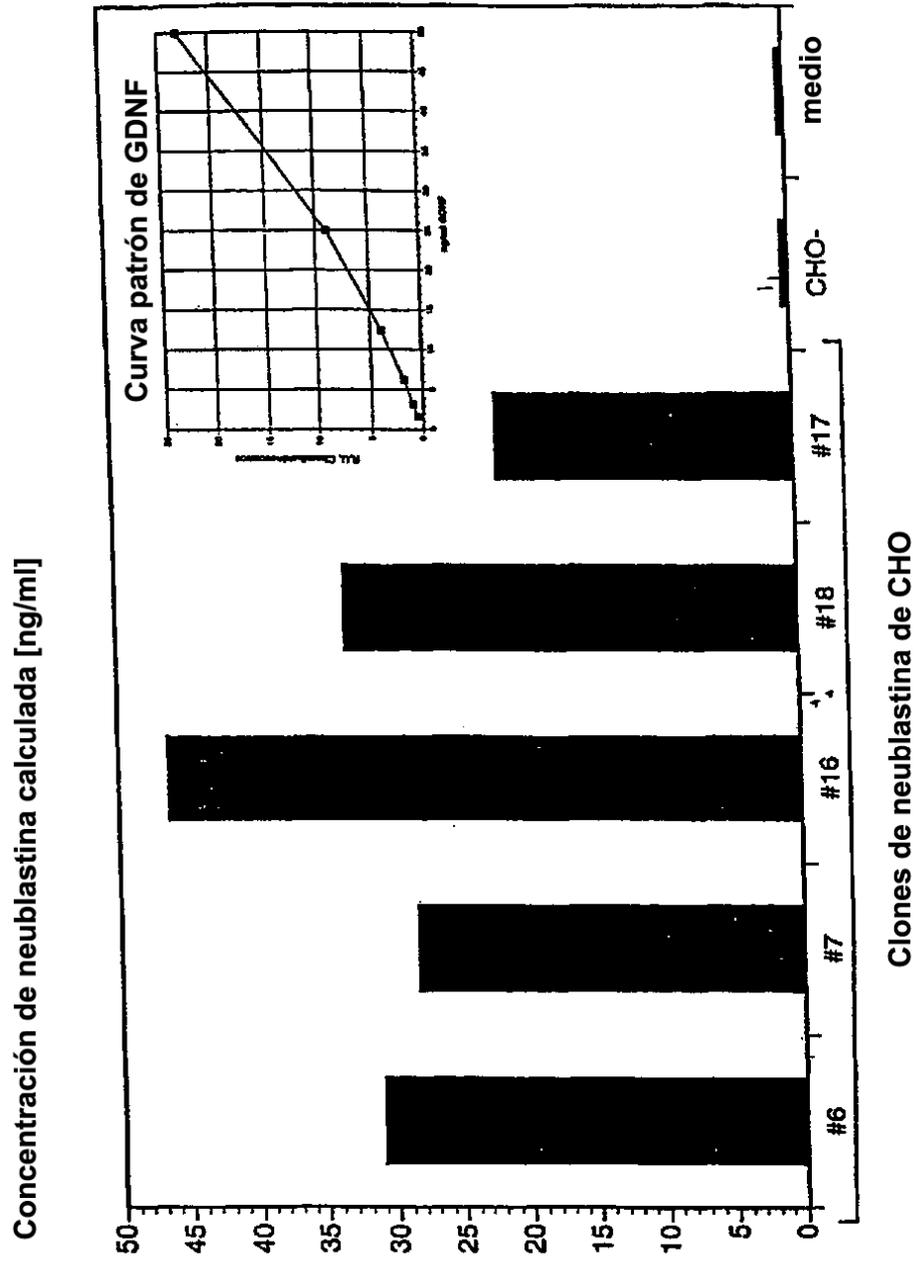


Fig. 10

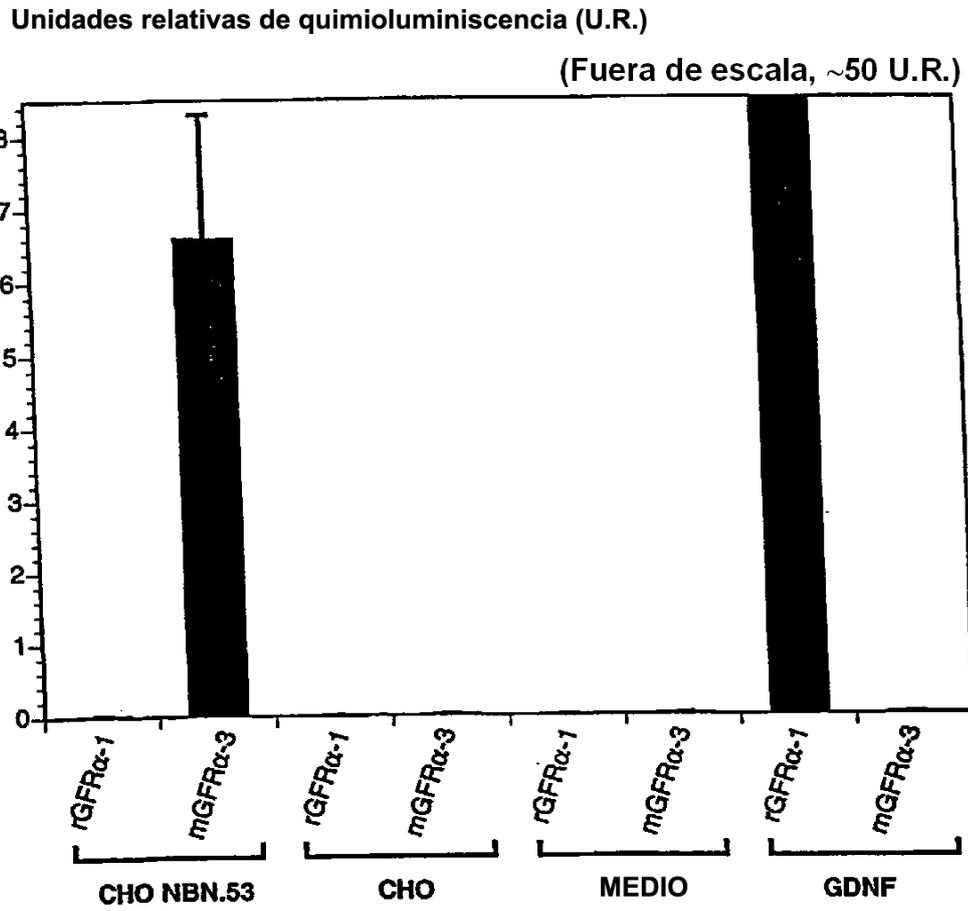
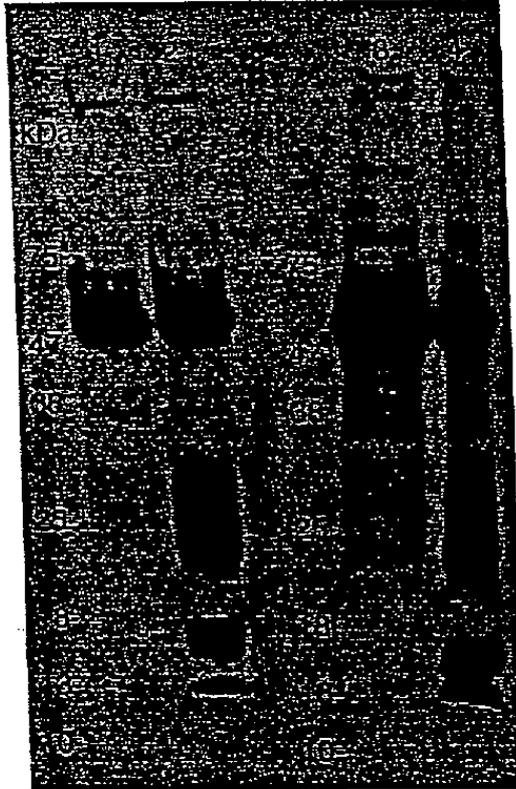
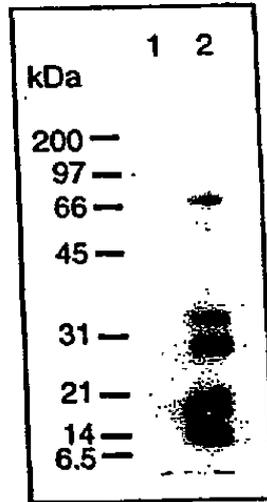


Fig. 11



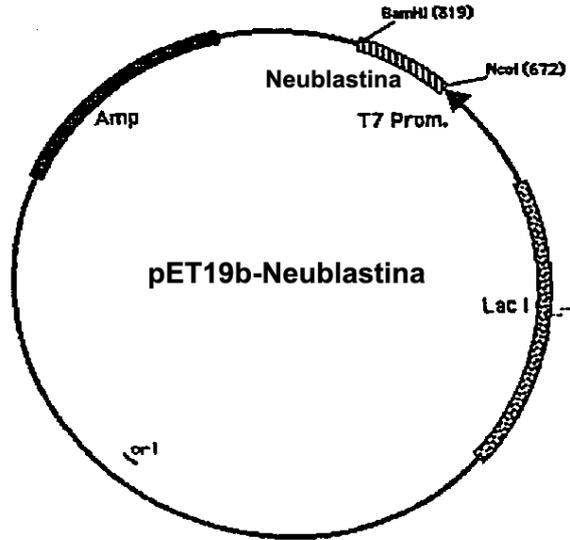
1. Medio de control teñido con anticuerpo anti-péptido R30
2. Medio condicionado que contiene neublantina teñido con anticuerpo anti-péptido R30
3. Medio de control teñido con anticuerpo anti-péptido R31
4. Medio condicionado que contiene neublantina teñido con anticuerpo anti-péptido R31

Fig. 12



**Extracción de neublastina por unión por afinidad en RETL3-Ig**  
**Calle 1: unido de medio condicionado de CHO de control**  
**Calle 2: unido de medio condicionado de CHO que sobreexpresa neublastina**

**Fig. 13**



Gen sintético de neublastina

NcoI (318)

316 TACCATGGCT GGAGGACCGG GATCTCGTGC TCGTGCAGCA GGAGCACGTG GCTGTGCTCT  
 ATCTTACCGA CCTCCTGGCC CTAGAGCAGC AGCACGTCGT CCTCGTGCAC CACAGCAGA  
 1 ▶ M A G G P G S R A R A A G A R G C R L

376 GCGTTCTCAA CTAGTGCCGG TCGGTGCACT CGGACTGGGA CACCGTCCCG ACGAACTAGT  
 CGCAAGAGTT GATCACGGCC ACGCACGTGA GCCTGACCCCT GTGGCAAGGC TGCTTGATCA  
 19 ▶ R S Q L V P V R A L G L G H R S D E L V

436 ACGTTTTCGT TTTTGTTCAG GATCTTGTGC TCGTGCACGT TCTCCGCATG ATCTATCTCT  
 TGCAAAAGCA AAAACAAGTC CTAGAACAGC AGCACGTGCA AGAGGCGTAC TAGATAGAGA  
 39 ▶ R F R F C S G S C R R A R S P H D L S L

496 AGCATCTCTA CTAGGAGCCG GAGCACTAAG ACCGCCGCCG GGATCTAGAC CTGTATCTCA  
 TCGTAGAGAT GATCCTCGGC CTCGTGATTC TGGCGGCGGC CCTAGATCTG GACATAGAGT  
 59 ▶ A S L L G A G A L R P P P G S R P V S Q

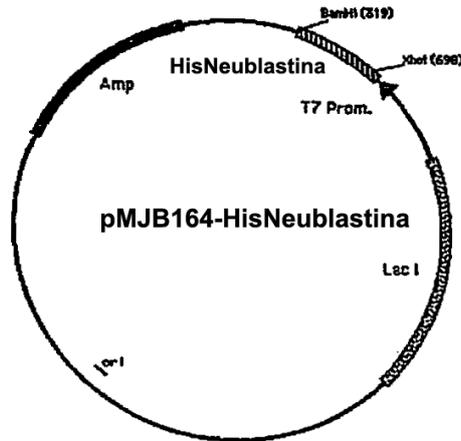
556 ACCTTGTGTG AGACCTACTA GATACGAAGC AGTATCTTTC ATGGACGTAA ACTCTACATG  
 TGGACAACA TCTGGATGAT CTATGCTTCG TCATAGAAAG TACCTGCATT TGAGATGTAC  
 79 ▶ P C C R P T R Y E A V S F M D V N S T W

BamHI (671)

616 GAGAACCGTA GATAGACTAT CTGCAACCGC ATGTGGCTGT CTAGGATGAT AATAGGGATC  
 CTCTTGGCAT CTATCTGATA GACGTGGCG TACACCGACA GATCCTACTA TTATCCCTAG  
 99 ▶ R T V D R L S A T A C G C L G . . .

676 CGGCT  
 GCCGA

Fig. 14



HisNeublastina

XhoI (340)

```

301 TACCATGGGC CATCATCATC ATCATCATCA TCATCATCAC TCGAGCGGCC ATATCGACGA
    ATCTTACCCG GTAGTAGTAG TAGTAGTAGT AGTAGTAGTG AGCTCGCCGG TATAGCTGCT
    1▶ M G H H H H H H H H H S S G H I D D

361 CGACGACAAG GCTGGAGGAC CGGGATCTCG TGCTCGTGCA GCAGGAGCAC GTGGCTGTGC
    SCTGCTGTTC CGACCTCCTG GCCCTAGAGC ACGAGCACGT CGTCCTCGTG CACCGACAGC
    19▶ D D K A G G P G S R A R A A G A R G C R

421 TCTGCGTTCT CAACTAGTGC CGGTGCGTGC ACTCGGACTG GGACACCGTT CCGACGAACT
    AGACGCAAGA GTTGATCACG GCCACGCACG TGAGCCTGAC CCTGTGGCAA GGCTGCTTGA
    39▶ L R S Q L V P V R A L G L G H R S D E L

481 AGTACGTTTT CGTTTTGTT CAGGATCTTG TGCTCGTGCA CGTTCTCCGC ATGATCTATC
    TCATGCAAAA GCAAAAACAA GTCCTAGAAC AGCAGCACGT GCAAGAGGCG TACTAGATAG
    59▶ V R F R F C S G S C R R A R S P H D L S

541 TCTAGCATCT CTACTAGGAG CCGGAGCACT AAGACCGCCG CCGGGATCTA GACCTGTATC
    AGATCGTAGA GATGATCCTC GGCCTCGTGA TTCTGGCGGC GGCCTAGAT CTGGACATAG
    79▶ L A S L L G A G A L R P P P G S R P V S

601 TCAACCTTGT TGTAGACCTA CTAGATACGA AGCAGTATCT TTCATGGACG TAAACTCTAC
    AGTTGGAACA ACATCTGGAT GATCTATGCT TCGTCATAGA AAGTACCTGC ATTTGAGATG
    99▶ Q P C C R P T R Y E A V S F M D V N S T

661 ATGGAGAACC GTAGATAGAC TATCTGCAAC CGCATGTGGC TGTCTAGGAT GATAATAGGG
    TACCTTTGG CATCTATCTG ATAGACGTTG GCGTACACCG ACAGATCCTA CTATTATCCC
    119▶ W R T V D R L S A T A C G C L G . .

721 ATCCGGCTGC TAACAAAGCC CG
    TAGGCCGACG ATTGTTTCGG GC
    
```

BamHI (719)

Fig. 15

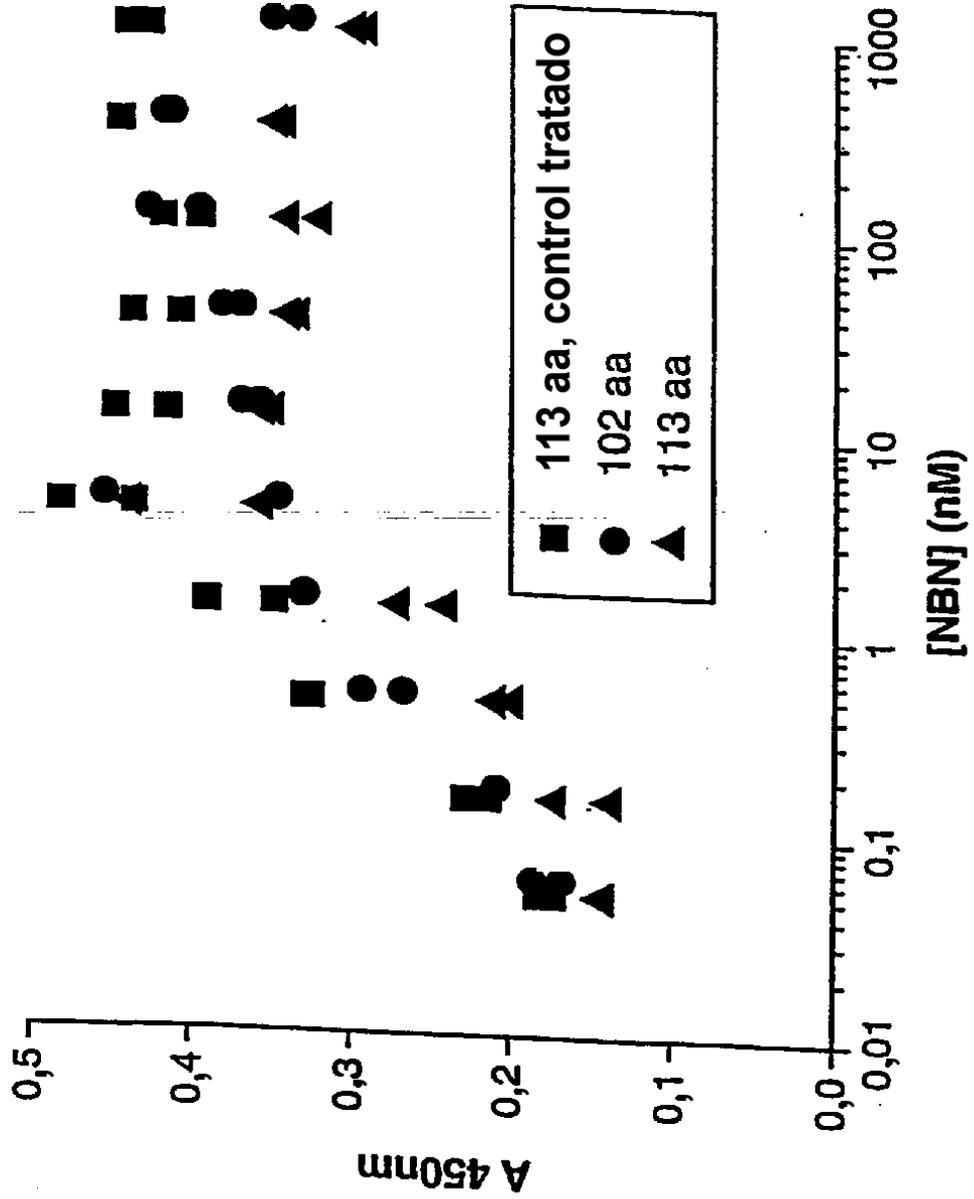


Fig. 16

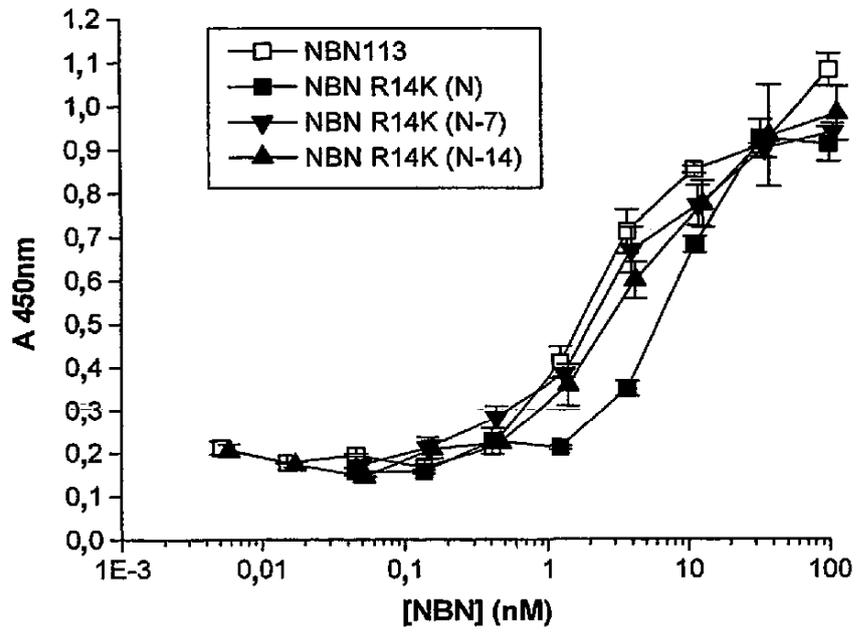


FIG. 17

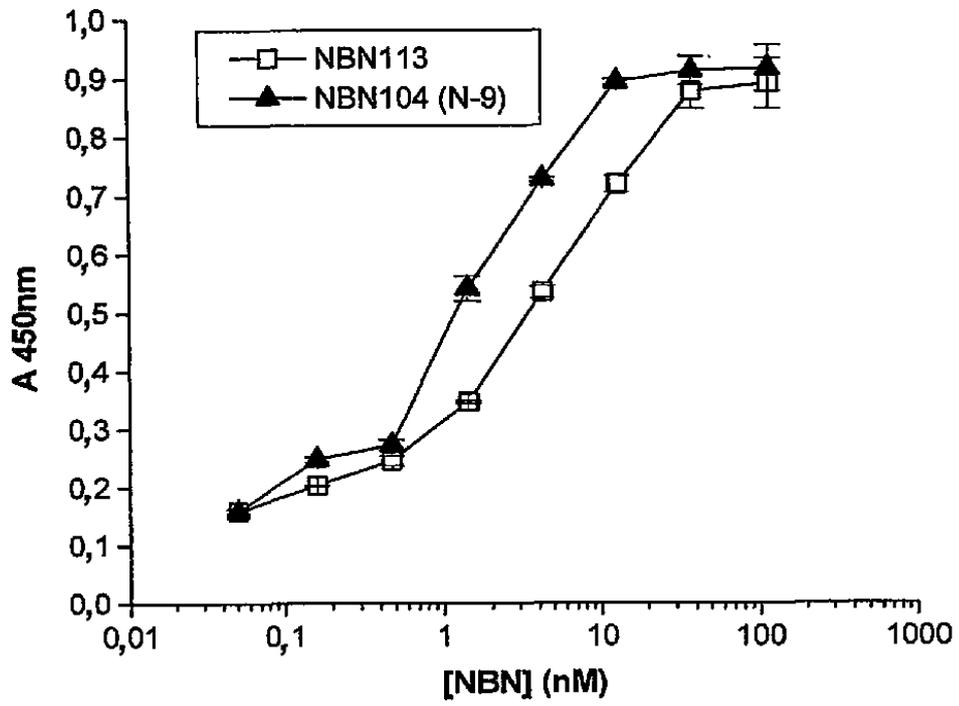


FIG. 18