

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 173**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99931023 .8**
- 96 Fecha de presentación: **05.07.1999**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1095140**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2001**

54 Título: **FACTORES NEUROTRÓFICOS.**

30 Prioridad:

06.07.1998 DK 90498
09.07.1998 US 92229 P
19.08.1998 DK 104898
25.08.1998 US 97774 P
06.10.1998 DK 126598
13.10.1998 US 103908 P
02.07.1999 US 347613

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:

NSGENE A/S
154 BALTORPVEJ
2750 BALLERUP, DK

72 Inventor/es:

JOHANSEN, Teit, E.;
BLOM, Nikolaj y
HANSEN, Claus

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 173 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

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES

10 Los factores neurotróficos son proteínas naturales que estimulan la supervivencia, mantienen la diferenciación fenotípica, evitan la degeneración e incrementan 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 funcionalmente y estructuralmente, también referidos como familias, superfamilias o subfamilias. Entre las superfamilias de los factores neurotróficos están las superfamilias del factor de crecimiento de fibroblastos, neurotrofina y factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Las especies individuales de factores neurotróficos se distinguen por su estructura física, su interacción con sus receptores compuestos y sus efectos sobre varios tipos de células nerviosas. Clasificados dentro de la superfamilia TGF- β (*Massague, et al, Trends in Cell Biology*, 1994 4 172-178) están los ligandos del factor neurotrófico derivado de línea celular glial ("GDNF"; WO 93/06116), que incluye GDNF, persefina (PSP"; *Milbrandt et al., Neuron* 1998 20 245-253) y neurturina ("NTN"; WO 97/08196). Los ligandos de la subfamilia GDNF tienen en común su capacidad para inducir la señalización a través de la tirosina quinasa del receptor RET. Estos tres ligandos de la subfamilia GDNF se diferencian en sus afinidades relativas para una familia de receptores neurotróficos, los receptores GFR α .

20 Debido a los efectos de los factores neurotróficos en el tejido neuronal, todavía existe una necesidad de identificar y caracterizar factores neurotróficos adicionales para diagnosticar y tratar los trastornos del sistema nervioso.

25 Los miembros anteriores de la familia de ligandos GDNF y sus receptores y funciones correspondientes han sido revisados adicionalmente por Unsicker (Unsicker et al., *Cell & Tissue Research*, 1996 286(2) 175-178). También se hace referencia a las entradas de la base de datos relacionada con la presente invención, concretamente una secuencia de nucleótidos con fecha del 10 de marzo de 1998 de un EST de una biblioteca de ADNc de tejido tumoral de la glándula paratiroidea (Entrada de EMBL No. AA844072) y al clon BAC de *Homo sapiens* RP11-486I22 con fecha del 15 de junio de 1998 (No. de Registro EMBL AC005038, que lista 5 cóntigos de orden desconocido).

RESUMEN DE LA INVENCION

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

35 En particular, la invención se refiere a un polinucleótido aislado de Neublastina que codifica un polipéptido que posee actividad neurotrófica, en el que el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ NO: 1,

40 b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de Neublastina o un polipéptido derivado de éste, en el que la parte madura de dicho polipéptido presenta un grado de identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2;

c) un polinucleótido que hibrida específicamente bajo condiciones de hibridación de una disolución de astringencia alta con el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 1

d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 70% idéntica a la secuencia del polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1.

45 En otra realización, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido. La invención también proporciona una célula huésped aislada que comprende dicho vector de expresión. La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico de cebador de PCR que consiste en una cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26 ó 28. También se proporciona por la invención un gen sintético que codifica un polipéptido de Neublastina, comprendiendo el gen sintético una secuencia mostrada en las SEQ ID NOs: 29 ó 30.

50 En otra realización, la invención se refiere a un polipéptido que posee actividad neurotrófica y que está codificado por un polinucleótido de la invención. La invención se refiere además a un polipéptido en el que la parte madura de dicho polipéptido presenta un grado de identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2,

en el que dicho polipéptido posee actividad neurotrófica. Además, la invención proporciona un método para preparar dicho polipéptido de la invención, así como un método para producir uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 6 ó 7, que comprende cultivar una célula que contiene una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEQ ID NOs: 1 ó 3 bajo condiciones que permitan la producción del polipéptido y recuperar el polipéptido del medio de cultivo.

5

En otra realización, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido de Neublastina de la invención, comprendiendo el método:

(a) introducir un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que codifica cuando se expresa un polipéptido de Neublastina en una célula o introducir una secuencia reguladora por recombinación homóloga en una célula, de manera que la secuencia reguladora regule la expresión de un gen de Neublastina endógeno, para preparar una célula que produce Neublastina;

10

(b) cultivar la célula que produce Neublastina bajo condiciones de cultivo que resulten en la expresión de un polipéptido de Neublastina.

En otra realización, la invención proporciona un péptido de Neublastina que consiste en cualquiera de las secuencias siguientes:

15

GPGRARAAGARGC (AA 30-43 de SEQ ID NO:9);

LGHRSEDLVRFRC (AA 57-70 de SEQ ID NO:9);

CRRARSPHDLSL (AA 74-85 de SEQ ID NO:9);

LRPPGSRPVSQPC (AA 94-107 de SEQ ID NO:9);

STWRTVDRLSATIC (AA 123-136 de SEQ ID NO:9);

CRLRSQLVPRALGLGHRSEDLVRFRC (AA 43-70 de SEQ ID NO:9);

CRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPGSRPVSQPC (AA 74-107 de SEQ ID NO:9);

CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATIC (AA 108-136 de SEQ ID NO:9);

CRPTRYEAVSFMDVNST (AA 108-124 de SEQ ID NO:9); o

ALRPPGSRPVSQPC (AA 93-107 de SEQ ID NO:9).

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de dichos péptidos de Neublastina.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la invención se refiere a un polipéptido de la invención para usarse como un medicamento, en particular al uso de un polipéptido de la invención en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa. También se proporciona un polipéptido de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.

20

Un "polipéptido de neublastina", tal y como se usa en la presente memoria, es un polipéptido que posee actividad neurotrófica (p. ej., como se describe en los Ejemplos 6, 7, 8 y 9) e incluye aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" humanos mostrados en AA₉₅-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₉₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4 ("pro"), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₈₀-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (prepro de "tipo salvaje"), AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (pro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 5 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 6 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 7 (113AA maduro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 11 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 12 (113AA maduro) y variantes y derivados de éstos. Además, esta invención contempla aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" murinos mostrados en AA₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16.

25

30

Preferiblemente, la secuencia C terminal de los polipéptidos de neublastina identificados anteriormente tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en AA₇₂-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₁₀₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9), más preferiblemente AA₄₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₇₆-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9) o la secuencia de aminoácidos mostrada en AA₁₉₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16.

35

También, es preferible que el polipéptido de neublastina retenga los 7 residuos de Cys conservados que son característicos de la familia GDNF y de la superfamilia TGF-beta.

Preferiblemente, el polipéptido de neublastina tiene una secuencia de aminoácidos con más de 85% de homología, lo más preferiblemente más de 95% de homología con las secuencias anteriores (es decir, AA₉₅-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₉₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₈₀-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (prepro de "tipo salvaje"), AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (pro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 5 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 6 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 7 (113AA maduro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 11 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 12 (113AA maduro)) y AA₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16.

Un "ácido nucleico de neublastina", tal y como se usa en la presente memoria, es un polinucleótido que codifica un polipéptido de neublastina. De acuerdo con esto, un ácido nucleico de neublastina aislado es una molécula de polinucleótido que tiene un marco de lectura abierto de codones de nucleótido que, cuando se expone a los componentes apropiados requeridos para la traducción, codificará, 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 a y/o se transcribe a partir de, un ARNm de neublastina ("ADNc"). Así, un ácido nucleico de neublastina de la invención, incluye además moléculas de polinucleótido que hibridan específicamente, bajo condiciones de hibridación de astringencia alta, con un polinucleótido que codifica 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 éstos. En determinadas realizaciones de la invención, determinados de estos cebadores son sondas específicas de neublastina útiles para la hibridación con un ácido nucleico de neublastina, pero no con ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia GDNF. Por "específico", "especificidad" o "específicamente", se quiere decir una capacidad para hibridar con ácido nucleico de neublastina y la incapacidad para hibridar con ácidos nucleicos que no son de neublastina, incluyendo una incapacidad para hibridar con ácidos nucleicos que codifican únicamente los 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, bien por tener una secuencia de ácido nucleico complementaria o por demostrar que hibrida con especificidad en condiciones de hibridación de astringencia alta con un polinucleótido que codifica neublastina. Los ácidos nucleicos de neublastina particulares incluyen, sin limitación, las secuencias de ácido nucleico mostradas en la presente memoria y designadas SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30 así como los cebadores SEQ ID NOS: 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, incluyendo sin limitación los fragmentos de ácido nucleico mostrados en la FIG. 8.

Los ácidos nucleicos de neublastina de la invención pueden usarse para expresar un polipéptido de neublastina, p. ej., por expresión de un polipéptido de neublastina *in vitro*, o por administración de un ácido nucleico de neublastina a una animal para la expresión *in vivo*. Los ácidos nucleicos de neublastina pueden estar incluidos en un vector de ácido nucleico, p. ej., un vector de expresión o un vector de clonación. Un ácido nucleico de neublastina puede, pero no es necesario, mantenerse, reproducirse, transferirse o expresarse como parte de un vector de ácido nucleico. Un vector de expresión recombinante que contiene una secuencia de polinucleótido de neublastina puede introducirse en y/o mantenerse en una célula. Las células huéspedes de un vector de neublastina pueden ser procariotas. Alternativamente, un ácido nucleico de neublastina puede introducirse en una célula eucariota, p. ej., una célula eucariota que contiene el aparato apropiado para el procesamiento posterior a la traducción de un polipéptido en una proteína madura y/o el aparato apropiado para secretar un polipéptido en el entorno extracelular de la célula.

La invención presenta además un factor neurotrófico de neublastina, "neublastina". La neublastina puede estar en la 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 están asociados como multímeros por asociaciones estructurales intermoleculares conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo sin limitación interacción cisteína-cisteína, enlaces sulfhidrilo e interacciones no covalentes. Los polipéptidos de neublastina particulares incluyen, sin limitación, una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria y designada SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 16.

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 traumatismos incluyen, pero no están limitados a, nervios del bulbo raquídeo o de la médula espinal. Los polipéptidos de neublastina son útiles en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, p. ej., lesión neuronal isquémica cerebral; neuropatías, 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 usarse en el tratamiento de alteraciones de la memoria, p. ej., deterioro de la memoria asociado con la demencia.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La FIG.1 es una imagen fotográfica de dos transferencias northern ensayadas con ADNc de neublastina marcado con P³², que compara los niveles relativos de expresión del gen de neublastina en varios tipos de tejido adultos humanos (panel A) y en varias regiones del cerebro adulto humano (panel B).

5 La FIG.2 es una imagen fotográfica de una transferencia northern ensayada con ADNc de neublastina marcado con P³², que compara la cantidad de ADNc de neublastina expresada en una línea celular no transfectada, HiB5, con la cantidad de ADNc de neublastina expresada en una línea celular transfectada con ADNc de neublastina y con una línea celular transfectada con ADNc de GDNF.

10 La FIG. 3 es una imagen fotográfica de dos transferencias western que compara los grados en los que se expresa la proteína neublastina en células HiB5 no transfectadas (carril 1) respecto a una línea celular HiB5 transfectada de manera estable con ADNc de neublastina (carril 2) que se ensayaron con anticuerpo Ab-2 específico de neublastina (transferencia de la izquierda, Panel A) o el anticuerpo Ab-1 específico de neublastina (transferencia de la derecha; Panel B).

15 La FIG. 4 es una ilustración gráfica del efecto de la neublastina en la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral embrionarias de rata cultivadas, y actividad ChAT en neuronas motoras colinérgicas del nervio craneal 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 ChAT (dpm/hora). La FIG. 4B es una ilustración de la actividad ChAT (dpm/hora) usando medio condicionado diluido de células que producen neublastina o que producen GDNF. La FIG. 4C es una ilustración del número de células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa por pocillo.

20 La FIG. 5 es una ilustración del efecto de la neublastina secretada a partir de células HiB5pUbi1zNBN22 sobre la función y supervivencia de cultivos de secciones de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral embrionarias de cerdo, co-cultivadas con células HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o células HiB5 (control). Las FIG. 5A y Fig. 5B ilustran la dopamina liberada al medio en DIV12 [Dopamina (pmol/ml) - día 12] y DIV21 [Dopamina (pmol/ml) - día 21], respectivamente. La FIG. 5C es una ilustración del número de células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa por cultivo [células TH-ir por cultivo] en DIV21.

25 La FIG. 6 es una ilustración del efecto *in vivo* de neublastina producida por lentivirus en neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra.

30 La FIG. 7 es un diagrama esquemático de la estructura genómica del gen de neublastina, incluyendo los cebadores de ácido nucleico que pueden usarse para identificar el gen de neublastina de longitud completa y su orientación espacial respecto a la secuencia genómica codificadora de Neublastina (es decir, gen).

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 humano que hibrida con los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de neublastina, pero que no hibrida con ácidos nucleicos que codifican los demás miembros de la familia GDNF conocidos (es decir, GDNF, Persefina y neurturina).

35 La FIG. 9 ilustra la actividad neurotrófica en cultivos de células disociadas del ganglio de la raíz dorsal de rata en diferentes estadios de desarrollo de un polipéptido descrito en la presente invención en comparación con los obtenidos con factores neurotróficos conocidos [0 experimento control (en ausencia de factores); 1 en presencia de GDNF; 2 en presencia de Neurturina; 3 en presencia de Neublastina de la invención; E12 día embrionario 12; E16 día embrionario 16; P0 el día del nacimiento; P7 día 7 después del nacimiento; y P15 día 15 después del nacimiento].

40 La FIG. 10 ilustra la producción de neublastina por líneas celulares CHO.

La FIG. 11 ilustra una comparación de la unión de neublastina y GDNF a receptores GFR α -1 y GFR α -3.

La FIG. 12 es una imagen fotográfica de una transferencia western que ilustra la unión a neublastina del anticuerpo anti-péptido R30 y anticuerpo anti-péptido R31.

45 La FIG. 13 es un dibujo de un gel que muestra la extracción de neublastina por unión de afinidad en RETL3-Ig.

La FIG. 14 es un mapa plasmídico de pET19b-Neublastina, junto con la secuencia del gen sintético de Neublastina.

La FIG. 15 es un mapa plasmídico de pMJB164-HisNeublastina, junto con la secuencia del gen sintético de HisNeublastina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Los solicitantes han identificado un ácido nucleico que codifica un factor neurotrófico nuevo que se refiere en la presente memoria como "neublastina" o "NBN". La neublastina es un miembro de la subclase de factor neurotrófico

derivado de línea celular glial (GDNF) de la superfamilia de factores neurotróficos del factor de crecimiento transformante β (TGF- β).

El ADNc que codifica neublastina se identificó originariamente como sigue. Usando el algoritmo TBLASTN 1.4.11 (Atschul *et al.*, Nucl. Acids Res. 1997 **25** 3389-3402) y la peresfina humana como búsqueda (No. de Registro GenBank AF040962) se identificó inicialmente un fragmento de 290 pb en la Secuencia Genómica de Alto Rendimiento (HGTS) de dos cromosomas bacterianos artificiales (BAC) humanos con las entradas GenBank AC005038 y AC005051. AC005038 consiste en aproximadamente 190.000 pb de 5 cóntigos de secuencias no ordenadas y AC005051 consiste en aproximadamente 132.000 pb de 12 cóntigos de secuencias no ordenadas. Se demostró que el fragmento de 290 pb identificado en los dos clones BAC tenía regiones que eran homólogas, pero no idénticas, a una región codificadora del ADNc del factor neurotrófico, peresfina humana.

A partir de esta secuencia de 290 pb, se sintetizaron dos cebadores de PCR específicos de Neublastina (Cebador de la Cadena Superior [SEQ ID NO: 17] y Cebador de la Cadena Inferior [SEQ ID NO: 18]). Se realizó el cribado de una biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano. El cribado inicial comprendió un cribado en 96 pocillos basado en PCR con los dos cebadores de PCR [SEQ ID NOS: 17 y 18] de una "Placa Maestra" de biblioteca de ADNc a partir de 500.000 clones de ADNc que contienen aproximadamente 5.000 clones/pocillo. Se realizó un segundo cribado basado en PCR en una "Sub-Placa" de biblioteca de ADNc de cerebro fetal humano que contiene preparación madre de glicerol de *E. coli* con aproximadamente 5.000 clones/pocillo.

Se identificó un fragmento de 102 pb [SEQ ID NO: 13] en los cribados basados en PCR tanto de la Placa Maestra como de la Sub Placa. Se seleccionó un clon de ADNc positivo (que posee el fragmento de 102 pb), se colocó en dos placas que contenían LB/antibiótico y se les dejó crecer toda la noche. A partir de estas placas, se seleccionó un total de 96 colonias bacterianas y se pusieron individualmente en los pocillos de una placa nueva de 96 pocillos de PCR que contenía ambos cebadores de PCR [SEQ ID NOS: 17 y 18] y los reactivos requeridos de amplificación por PCR. Se realizó la amplificación por PCR y las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se identificó la colonia positiva con el clon que contiene el fragmento de 102 pb. A partir de la colonia positiva que contiene el fragmento de 102 pb se obtuvo el ADN plasmídico y se secuenció. Los análisis de secuenciación posteriores revelaron la presencia de un ADNc de longitud completa de 861 pb [SEQ ID NO: 8]. El Marco de Lectura Abierto (ORF) de 663 pb, o región codificadora (CDS), identificado en SEQ ID NO: 8, codifica el pre-pro-polipéptido (designado "pre-pro-Neublastina") y se muestra en SEQ ID NO: 9. Tomando como base la SEQ ID NO: 9, se identificaron tres variantes de polipéptidos de Neublastina. Estas variantes incluyen:

(i) el polipéptido de 140 AA designado en la presente memoria como NBN140, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 10;

(ii) el polipéptido de 116 AA designado en la presente memoria como NBN116, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 11; y

(iii) el polipéptido de 113 AA designado en la presente memoria como NBN113, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 12.

La secuencia de ADNc completa que contiene ADN no traducido 5' de 782 pb, ADN codificador de 663 pb y no traducido 3' de 447 (en total 1.992 pb) se ha enviado a GenBank con el Número de Registro AF 120274.

La secuencia genómica codificadora de Neublastina se identificó como sigue:

Con el objetivo de clonar la secuencia genómica codificadora de neublastina, se preparó un conjunto adicional de cebadores. En particular, el Par de Cebadores No. 1 comprendió [sentido = SEQ ID NO: 23 y antisentido = SEQ ID NO: 24] y el Par de Cebadores No. 2 comprendió [sentido = SEQ ID NO: 25 y antisentido = SEQ ID NO: 26].

Usando el Par de Cebadores No. 2, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 887 pb 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 putativa de ADNc de 861 pb (que codifica una proteína denominada neublastina en la presente memoria) (como se muestra en la SEQ ID NO: 3). De manera similar, usando el Par de Cebadores No. 1, se obtuvo por PCR un fragmento de ADN de 870 pb a partir de ADN genómico humano. En este fragmento se encontró una región de 42 pb adicional en el extremo 3' terminal del Marco de Lectura Abierto (ORF), en comparación con la secuencia de 887 pb. La estructura genómica del gen de la neublastina se predijo comparándolo con las secuencias de los ácidos nucleicos de otros factores neurotróficos, mapeando los límites exón-intrón. Este análisis demostró que el gen de la neublastina tiene al menos dos exones separados por un intrón de 70 pb.

Esta secuencia también se usó para cribar GenBank para secuencias EST de neublastina. Se identificaron tres con las entradas GenBank AA844072, AA931637 y AA533512, lo que indica que los ácidos nucleicos de neublastina se transcriben en ARNm.

La comparación de la secuencia de ADNc completa obtenida (AF 120274) y la secuencia genómica presente en las entradas de GenBank AC005038 y AC005051 reveló que el gen de la neublastina consiste en al menos cinco

exones (incluyendo tres codificadores) separados por cuatro intrones (véase, p. ej., la Fig. 8). Conjuntamente, los exones tienen una secuencia de aminoácidos predicha de un polipéptido de Neublastina de longitud completa. También debe indicarse que se encontró que el fragmento de 887 pb contiene la región codificadora completa de la pro-neublastina. El ADNc predicho [SEQ ID NO: 3] contiene un Marco de Lectura Abierto (ORF) que codifica la pro-neublastina (181 residuos de aminoácidos) que mostró homología con las tres proteínas humanas conocidas, Persefina, Neurturina y GDNF.

Ácidos Nucleicos de 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 anti-sentido, e incluyen polinucleótidos naturales, sintéticos y manipulados intencionadamente. Los polinucleótidos de la invención también incluyen secuencias que están degeneradas como resultado del código genético, pero que codifican la expresión de un polipéptido de Neublastina.

Tal y como se define en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, preferiblemente al menos 15 bases de longitud. Por "polinucleótido aislado" se quiere decir un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificadoras a las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se obtiene. El término incluye, por lo tanto, ADN recombinante que se incorpora en un vector de expresión, en un plásmido que se replica de manera autónoma o virus, o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula independiente, 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 se diferencia de las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria en una o más posiciones de nucleótidos.

En una realización preferida, el polinucleótido de la invención tiene una secuencia de ácido nucleico (ADN) que es capaz de hibridar con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15, su cadena complementaria, o una subsecuencia de éstas bajo al menos condiciones de astringencia 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 preferido al menos 90%, lo más preferido al menos 95% homóloga a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15.

En su realización más preferida, el polinucleótido tiene la secuencia de ADN presentada como SEQ ID NO: 1, la secuencia de ADN presentada como SEQ ID NO: 3, la secuencia de ADN presentada como SEQ ID NO: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15.

Esta invención también proporciona cebadores nuevos y secuencias de ADN para identificar, aislar y amplificar polinucleótidos de Neublastina que codifican la expresión de polipéptidos de Neublastina o fragmentos de éstos. Dichos cebadores incluyen los polinucleótidos mostrados en las SEQ ID NOS: 17-28 y 31-32. Además, esta invención proporciona secuencias de ADN de Neublastina generadas a partir de estos cebadores, incluyendo las mostradas en las SEQ ID NOS: 13 y 14. Además, esta invención proporciona secuencias de ADN de regiones 3' ó 5' no traducidas ("UTR") en ADN genómico que flanquean los exones de Neublastina; dichas secuencias son útiles para identificar, aislar y amplificar los polinucleótidos de Neublastina que codifican la expresión de polipéptidos de Neublastina o fragmentos de éstos.

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

nucleótidos 721 - 865 de SEQ ID NO: 1,

nucleótidos 718 - 861 de SEQ ID NO: 3,

nucleótidos 718 - 861 de SEQ ID NO: 8,

nucleótidos 1.647 - 2.136 de SEQ ID NO: 15, y

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

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

nucleótidos 1 - 10 de SEQ ID NO: 1,

nucleótidos 1 - 57 de SEQ ID NO: 8,

nucleótidos 1 - 974 de SEQ ID NO: 15, y

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

- 5 Los polinucleótidos de la invención pueden obtenerse preferiblemente por procedimientos de clonación, p. ej., como se describe en "Current Protocols in Molecular Biology" [John Wiley & Sons, Inc.]. En una realización preferida, el polinucleótido se clona de, o se produce tomando como base, una biblioteca de ADN genómico o ADNc de cerebro humano.

Homología de secuencias de ADN

- 10 La homología de secuencia de ADN referida anteriormente puede determinarse como el grado de identidad entre dos secuencias indicando una derivación de la primera secuencia de la segunda. La homología puede determinarse adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionado en el paquete informático GCG [*Needleman, S.B. y Wunsch C.D., Journal of Molecular Biology* 1970 **48** 443-453]. Usando GAP con los ajustes siguientes para la comparación de secuencias de ADN: penalización por creación de hueco de 5,0 y penalización por la extensión de hueco de 0,3, la región codificadora de las secuencias de ADN análogas referidas anteriormente presenta un grado de identidad preferiblemente de al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, con la parte CDS (codificadora) de la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 1, o la parte CDS (codificadora) de la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 3, o la parte CDS (codificadora) de la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 8, la parte CDS (codificadora) de la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 15.

- 25 El término "identidad de secuencia" se refiere al grado en el que dos secuencias de polinucleótido son idénticas en una base nucleótido por nucleótido sobre una región particular de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para rendir el número de posiciones equivalentes, dividiendo el número de posiciones equivalentes por el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para rendir el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal y como se usa en la presente memoria indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 85 por ciento de identidad de secuencia y frecuentemente un 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia comparado con una secuencia de referencia sobre una región de comparación.

Protocolo de Hibridación

- 35 Los 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 NO: 1, la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8, o la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15, o su cadena complementaria, o una sub-secuencia de éstas bajo al menos condiciones de astringencia media, media/alta o alta, como se describe con más detalle a continuación.

- 40 Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación entre una sonda de nucleótidos y una secuencia de ADN o ARN homóloga, implica prehumedecer el filtro que contiene los fragmentos de ADN o ARN para hibridar en 5 x SSC [Cloruro de sodio/Citrato de sodio; véase *Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY 1989] durante 10 minutos y prehibridar el filtro en una disolución de 5 x SSC, 5 x disolución de Denhardt [véase *Sambrook et al.; Op cit.*], 0,5% SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado mediante ultrasonidos [véase *Sambrook et al.; Op cit.*], seguido de hibridación en la misma disolución que contiene una concentración de 10 ng/ml de una sonda cebada al azar [*Feinberg A P & Vogelstein B; Anal. Biochem.* 1983 **132** 6-13], marcada con ³²P-dCTP (actividad específica > 1 x 10⁹ cpm/µg) durante 12 horas a aproximadamente 45^oC. El filtro se lava entonces dos veces durante 30 minutos en 0,1 x SSC, 0,05% SDS a una temperatura de al menos 60^oC (condiciones de astringencia media), preferiblemente de al menos 65^oC (condiciones de astringencia media/alta), más preferido de al menos 70^oC (condiciones de astringencia alta) e incluso más preferido de al menos 75^oC (condiciones de astringencia muy alta). Las moléculas con las que hibrida la sonda de oligonucleótido bajo estas condiciones pueden detectarse usando una placa de rayos x.

Polinucleótidos Clonados

- 55 El polinucleótido aislado de la invención puede ser, en particular, un polinucleótido clonado. Tal y como se define en la presente memoria, el término "polinucleótido clonado", se refiere a un polinucleótido o secuencia de ADN clonada según los procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para reubicar un segmento de ADN, que puede ser en particular ADNc, es decir derivado enzimáticamente de ARN, de su localización natural a un sitio diferente en el que se reproducirá.

La clonación puede conseguirse por cualquier ruta adecuada y puede implicar técnicas tales como tecnología de transcriptasa inversa, tecnología de PCR, y semejantes, así como escisión y aislamiento del segmento de ADN deseado.

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

Fuentes Biológicas

El polinucleótido aislado de la invención puede obtenerse de cualquier fuente adecuada.

- 10 En una realización preferida, en la que el polinucleótido de la invención se clona a partir de, o se produce tomando como base, una biblioteca de ADNc, p. ej. una biblioteca de ADNc del cerebro fetal o adulto, en particular del prosencéfalo, rombencéfalo, corteza, cuerpo estriado, amígdala, cerebelo, núcleo caudado, cuerpo calloso, hipocampo, núcleo talámico, núcleo subtalámico, núcleo olfativo, putamen, sustancia negra, ganglios de la raíz dorsal, ganglio trigémino, arteria mesentérica superior, o tálamo; de la médula espinal; del corazón; 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 del diente; del folículo piloso; 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 p. ej. en Stratagene y Clontech. El polinucleótido aislado de la invención puede obtenerse por métodos estándar, p. ej. los descritos en los ejemplos de trabajo.

Polipéptidos de Neublastina de la Invención

- 20 Como se ha indicado anteriormente, un "polipéptido de neublastina", tal y como se usa en la presente memoria, es un polipéptido que posee actividad neurotrófica (p. ej., como se describe en los Ejemplos 6, 7, 8 y 9) e incluye aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" mostrados en AA₉₅-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₉₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₈₀-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (prepro de "tipo salvaje"), AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (pro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 5 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 6 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 7 (113AA maduro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 11 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 12 (113AA maduro), AA₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16 (prepro murino) y variantes y derivados de cada uno de los anteriores.

- 25 Preferiblemente, la secuencia C terminal de los polipéptidos de neublastina identificados anteriormente tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en AA₇₂-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₁₀₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9), más preferiblemente AA₄₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₇₆-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9).

También, es preferible que el polipéptido de neublastina retenga los 7 residuos de Cys conservados que son característicos de la familia GDNF y de la superfamilia TGF-beta.

- 35 Preferiblemente, el polipéptido de neublastina tiene una secuencia de aminoácidos con más de 85% de homología, lo más preferiblemente más de 95% de homología, con las secuencias anteriores (es decir, AA₉₅-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2, AA₉₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 4, AA₈₀-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (prepro de "tipo salvaje"), AA₄₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9 (pro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 5 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 6 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 7 (113AA maduro), AA₁-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 10 (140AA maduro), AA₁-AA₁₁₆ de SEQ ID NO: 11 (116AA maduro), AA₁-AA₁₁₃ de SEQ ID NO: 12 (113AA maduro) y AA₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16 (prepro murino), y preferiblemente cualquiera de los polipéptidos anteriores con una secuencia C terminal de los polipéptidos de neublastina identificados anteriormente tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en AA₇₂-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₁₀₇-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9), más preferiblemente AA₄₁-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 (es decir, AA₇₆-AA₁₄₀ de SEQ ID NO: 9), o AA₁₉₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16.

- 40 Además, esta invención contempla aquellos polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de homología con los polipéptidos de "neublastina" murinos mostrados en AA₁-AA₂₂₄ de SEQ ID NO: 16.

Entre los polipéptidos preferidos de la invención en una realización representan la preprosecuencia (como se muestra en las SEQ ID NOS: 2, 4, 9 y 16, respectivamente), la secuencia pro (como se muestra en AA₇₅-AA₁₀₅ de SEQ ID NO: 2 o AA₄₁-AA₁₄₀ de las SEQ ID NOS: 4 y 9, respectivamente) y la secuencia madura de la neublastina (como se muestra en las SEQ ID NOS: 5, 6, 7, 10, 11 ó 12, preferiblemente las SEQ ID NOS: 10, 11, 12).

- 50 Los polipéptidos de la invención incluyen polipéptidos variantes. En el contexto de esta invención, el término "polipéptido variante" significa un polipéptido (o proteína) que tiene una secuencia de aminoácidos que se diferencia de la secuencia presentada como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 16, en una o más posiciones de aminoácidos. Dichos polipéptidos variantes incluyen los polipéptidos modificados descritos anteriormente, así como sustituciones conservativas, variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos.
- 55

Tal y como se define en la presente memoria, el término "sustituciones conservativas" indica la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo, biológicamente similar. Por ejemplo, se esperaría que las sustituciones de aminoácidos conservativas tuvieran poco o ningún efecto en la actividad biológica, particularmente si representan menos del 10% del número total de residuos en el polipéptido o proteína. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos conservativas representan cambios en menos del 5% del polipéptido o proteína, lo más preferiblemente menos del 2% del polipéptido o proteína (p. ej., cuando se calcula según NBN113, las sustituciones conservativas más preferidas representarían menos de 3 sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos madura de tipo salvaje). En una realización particularmente preferida, existe una única sustitución de aminoácidos en la secuencia madura, en la que tanto el aminoácido sustituido como el de reemplazo no son cíclicos.

Otros ejemplos de sustituciones conservativas particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina, y semejantes.

El término sustitución conservativa también incluye el uso de un residuo de aminoácido sustituido en lugar de un residuo de aminoácido parental no sustituido siempre que los anticuerpos producidos frente al polipéptido sustituido también inmunoreaccionen con el polipéptido no sustituido.

Las modificaciones de esta secuencia de aminoácidos primaria pueden resultar en proteínas que tienen una actividad sustancialmente equivalente comparada con el polipéptido equivalente sin modificar, y así pueden considerarse análogos funcionales de las proteínas naturales. Dichas modificaciones pueden ser deliberadas, p. ej. como mutagénesis dirigida de sitio, o pueden ocurrir espontáneamente, e incluyen variantes de corte y empalme, isoformas, homólogos de otras especies y polimorfismos. Dichos análogos funcionales también se contemplan según la invención.

Además, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos primaria pueden resultar en proteínas que no retengan la actividad biológica de la proteína natural, incluyendo formas dominantes negativas, etc. Una proteína dominante negativa puede interferir con la proteína de tipo salvaje uniéndose a, o secuestrando de otra manera a agentes reguladores, tales como componentes más arriba o más abajo, que normalmente interaccionan funcionalmente con el polipéptido. Dichas formas dominantes negativas también se contemplan según la invención.

Un "péptido señal" es una secuencia peptídica que dirige un polipéptido recién sintetizado al que está unido el péptido señal al retículo endoplásmico (ER) para procesamiento adicional posterior a la traducción y distribución.

Un "péptido señal heterólogo", tal y como se usa en la presente memoria en el contexto de la neublastina, significa un péptido señal que no es el péptido señal de la neublastina humana, típicamente el péptido señal de alguna proteína de mamíferos distinta de la neublastina.

Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia de ADN de la neublastina humana (bien ADNc o ADN genómico), o las secuencias que se diferencian del ADN de la neublastina humana debido a cambios de codones silenciosos o a cambios de codones que producen sustituciones de aminoácidos conservativas, pueden usarse para modificar genéticamente células humanas cultivadas de manera que sobreexpresarán y secretarán la enzima.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos quiméricos o polipéptidos de fusión escindibles en los que otro polipéptido se fusiona en el extremo N terminal o el C terminal del polipéptido o fragmento de éste. Un polipéptido quimérico puede producirse fusionando una secuencia de ácido nucleico (o una parte de ésta) que codifica otro polipéptido a una secuencia de ácido nucleico (o una parte de ésta) de la presente invención.

Las técnicas para producir polipéptidos quiméricos son técnicas estándar. Dichas técnicas requieren habitualmente unir las secuencias de manera que ambas estén en el mismo marco de lectura y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del mismo o de los mismos promotores y terminador.

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen formas truncadas de la molécula de neublastina de longitud completa. En dichas moléculas truncadas, uno o más aminoácidos se han deletado del extremo N terminal o del C terminal, preferiblemente del N terminal.

Homología en la Secuencia de Aminoácidos

El grado en 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 alto nivel de identidad de secuencia indica una probabilidad de que la primera secuencia derive de la segunda.

La homología se determina por análisis informático, tal como, sin limitaciones, el programa informático de alineamiento 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 la presente memoria. 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 preferido de al menos 95%, lo más preferido de al menos 98% con la secuencia de aminoácidos presentada en la presente memoria como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 16.

5 Tomando como base la determinación de la homología se confirma que el polipéptido de la invención, que pertenece a la superfamilia TGF- β , está relacionado con la subfamilia GDNF, pero representa un miembro distinto de esta subfamilia.

Polipéptidos Bioactivos

10 El polipéptido de la invención puede proporcionarse en cualquier forma bioactiva, incluyendo la forma de pre-proteínas, pro-proteínas, proteínas maduras, proteínas glicosiladas, proteínas fosforiladas, o cualquier otra proteína modificada después de la traducción.

El polipéptido de la invención puede ser, en particular, un polipéptido N-glicosilado, polipéptido que está preferiblemente glicosilado en los residuos N indicados en los listados de secuencia.

15 En una realización preferida, el polipéptido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 9, que consta de un residuo de asparagina glicosilado en la posición 122; la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 10, que consta de un residuo de asparagina glicosilado en la posición 122; la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 11, que consta de un residuo de asparagina glicosilado en la posición 98; o la secuencia de aminoácidos presentada como SEQ ID NO: 12, que consta de un residuo de asparagina glicosilado en la posición 95.

20 Esta invención también contempla proteínas de fusión de neublastina, tales como fusiones Ig, como se describe, p. ej., en la patente de los Estados Unidos 5.434.131.

En una realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 85%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente 98% y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 99% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 2.

25 En otra realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, más preferida al menos 95%, aún más preferida al menos 98%, lo más preferida al menos 99% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 4.

30 En una tercera realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 5.

En una cuarta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 6.

35 En una quinta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 7.

El polipéptido de neublastina de la invención incluye variantes alélicas, p. ej., las secuencias de aminoácidos de polipéptido de SEQ ID NOS: 5-7, en las que Xaa designa Asn o Thr e Yaa designa Ala o Pro.

40 En una sexta realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 9.

En una séptima realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 10.

45 En una octava realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 11.

50 En una novena realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 12.

En una décima realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos al menos 90%, más preferida al menos 95%, lo más preferida al menos 98% homóloga a la secuencia presentada como SEQ ID NO: 16, que es una pre-pro-neublastina de origen murino.

5 En otra realización, el polipéptido de la invención consta de una huella de la familia GDNF, es decir, los residuos de aminoácidos subrayados en la Tabla 3.

10 En una realización adicional, la invención proporciona un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar bajo condiciones de astringencia alta con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1, su cadena complementaria, o una subsecuencia de ésta. En una realización preferida, el polipéptido de la invención está codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención está codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1.

15 En una realización adicional más, la invención proporciona polipéptidos nuevos codificados por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar bajo condiciones de astringencia alta con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3, su cadena complementaria, o una subsecuencia de ésta. En una realización preferida, el polipéptido de la invención está codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención está codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 3.

20 En una realización adicional más, la invención proporciona polipéptidos nuevos codificados por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar bajo condiciones de astringencia alta con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8, su cadena complementaria, o una subsecuencia de ésta. En una realización preferida, el polipéptido de la invención está codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención está codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 8.

25 En una realización adicional más, la invención proporciona polipéptidos nuevos codificados por una secuencia de polinucleótido capaz de hibridar bajo condiciones de astringencia alta con la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15, su cadena complementaria, o una subsecuencia de ésta. En una realización preferida, el polipéptido de la invención está codificado por una secuencia de polinucleótido que es al menos 70% homóloga a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15. En su realización más preferida, el polipéptido de la invención está codificado por la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 15.

30 **Origen Biológico**

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

35 En una realización lo más preferida, el polipéptido de la invención puede aislarse de tejido de corazón humano, de músculo esquelético humano, de páncreas humano, o de tejido cerebral humano, en particular de núcleo caudado o de tálamo, o puede obtenerse de ADN de origen mamífero, como se discute con más detalle a continuación.

Actividad Neurotrófica

40 Los polipéptidos de Neublastina de la invención son útiles para moderar el metabolismo, crecimiento, diferenciación o supervivencia de una célula nerviosa o neurona. En particular, los polipéptidos de Neublastina se usan para tratar o para aliviar un trastorno o enfermedad de un animal vivo, p. ej., un ser humano, cuyo trastorno o enfermedad es sensible a la actividad de un agente neurotrófico. Dichos tratamientos y métodos se describen con más detalle a continuación.

Anticuerpos

45 Los polipéptidos o fragmentos de polipéptido de Neublastina de la invención se usan para producir anticuerpos específicos de Neublastina. Tal y como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo específico de Neublastina" es un anticuerpo, p. ej., un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, que es inmunoreactivo frente a un polipéptido o fragmento de polipéptido de Neublastina, o que se une con especificidad a un epítipo de un polipéptido de Neublastina.

50 La preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales es muy conocida en la técnica. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse, en particular, como describen, p. ej., *Green et al.*,: "Production of Polyclonal Antisera" en *Immunochemical Protocols* (Manson, Ed.); Humana Press, 1992, páginas 1-5; *Coligan et al.*,: "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 la presente memoria por referencia. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse, en particular, como describen, p. ej., *Kohler & Milstein*, *Nature*, 1975, **256**:495; *Coligan et al.*, en *Current Protocols in*

Immunology, 1992, Secciones 2.5.1 - 2.6.7; y *Harlow et al.*, en "Antibodies: A Laboratory Manual"; Cold Spring Harbor Lab. Press 1988, página 726.

5 Brevemente, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse inyectando, p. ej., a ratones, una composición que comprende un antígeno, verificando la presencia de la producción de anticuerpos tomando una muestra de suero, tomando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen los anticuerpos frente al antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

10 Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse de los cultivos de hibridoma por varias técnicas bien establecidas, incluyendo cromatografía de afinidad con Sefarosa con proteína A, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico, véanse, p. ej. *Coligan et al.*, en Current Protocols in Immunology, 1992, Secciones 2.7.1 - 2.7.12 y Secciones 2.9.1 - 2.9.3; y *Barnes et al.*: "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" en Methods in Molecular Biology; Humana Press, 1992, Vol. 10, Páginas 79-104. Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden purificarse además opcionalmente, p. ej. por unión a y elución de una matriz a la que se une el polipéptido frente al que se han producido los anticuerpos.

15 Los anticuerpos que se unen al polipéptido de neublastina de la invención pueden prepararse usando un polipéptido intacto o fragmentos que contienen péptidos pequeños de interés como el antígeno de inmunización. El polipéptido usado para inmunizar un animal puede obtenerse por técnicas de ADN recombinante o por síntesis química y pueden conjugarse opcionalmente a una proteína transportadora. Las proteínas transportadoras usadas comúnmente que se acoplan químicamente al péptido incluyen hemocianina de lapa (KLH), tiroglobulina, albúmina de suero bovino (BSA) y toxoide tetánico. El péptido acoplado puede usarse entonces para inmunizar el animal, que puede ser, en particular, un ratón, una rata, un hámster o un conejo.

20 En una realización, los anticuerpos se producen usando los péptidos siguientes:

Péptido 1: CRPTRYEAVSFMDVNST (aminoácidos 108-124 de SEQ ID NO: 9); o

25 Péptido 2: ALRPPPGSRPVSQPC (aminoácidos 93-107 de SEQ ID NO: 9). Los métodos para producir anticuerpos usando estos polipéptidos se describen en el Ejemplo 10.

También generamos anticuerpos policlonales de conejo frente a los péptidos siguientes:

Péptido R27: GPGSRARAAGARGC (aminoácidos 30-43 de SEQ ID NO: 9);

Péptido R28: LGHRSDLVRFRC (aminoácidos 57-70 de SEQ ID NO: 9);

Péptido R29: CRRARSPHDLSL (aminoácidos 74-85 de SEQ ID NO: 9);

30 Péptido R30: LRPPPGSRPVSQPC (aminoácidos 94-107 de SEQ ID NO: 9);

Péptido R31: STWRTVDRLSATAC (aminoácidos 123-136 de SEQ ID NO: 9).

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

35 También hemos identificado péptidos derivados de neublastina adicionales derivados de la proteína madura, como se detalla a continuación, que son bucles expuestos en la superficie predichos tomando como base la estructura conocida de GDNF (*Eigenbrot y Gerber, Nat. Struct. Biol.*, 1997 **4** 435-438) y son así útiles para la generación de anticuerpos:

Región 1: CRLRSQLVPRALGLGHRSDLVRFRC (AA43-70 de SEQ ID NO: 9);

Región 2: CRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPPGSRPVSQPC (AA74-107 de SEQ ID NO: 9);

40 Región 3: CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAC (AA108-136 de SEQ ID NO: 9).

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos que se unen específicamente a neublastina o péptidos derivados de neublastina pueden usarse para detectar la presencia de dichos factores neurotróficos de neublastina en varios medios y, en particular, para el diagnóstico de condiciones o enfermedades asociadas con las moléculas de neublastina de la invención. Una variedad de protocolos para dicha detección, incluyendo ELISA, RIA y FACS son conocidos en la técnica.

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

Métodos para Producir los Polipéptidos de la Invención

Una célula que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de neublastina de la invención se cultiva bajo condiciones que permitan la producción del polipéptido, seguido de la recuperación del polipéptido del medio de cultivo, como se detalla a continuación. Cuando las células se van a modificar genéticamente para los propósitos de producir un polipéptido de neublastina, las células pueden modificarse por métodos convencionales o por activación génica.

Según los métodos convencionales, una molécula de ADN que contiene un ADNc o secuencia de ADN genómico de neublastina puede estar contenida en una construcción de expresión y transfectarse en células por métodos estándar incluyendo, pero sin limitarse a, transfección mediada por liposomas, polibreno o DEAE dextrano, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección o microproyectiles dirigidos por velocidad ("biolística"). Alternativamente, se podría usar un sistema que administra ADN por un vector viral. Los virus que se sabe que son útiles para la transferencia génica incluyen adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, virus del herpes, virus de la parotiditis, poliovirus, retrovirus, virus Sindbis y virus vaccinia tal como virus de la peste de canario, así como infección con Baculovirus de células de insecto, en particular células de insecto Sf9.

Alternativamente, las células pueden modificarse usando un método de activación génica ("GA"), tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5.733.761 y 5.750.376, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia.

De acuerdo con esto, el término "genéticamente modificada", tal y como se usa en la presente memoria en referencia a células, pretende englobar células que expresan un producto génico particular después de la introducción de una molécula de ADN que codifica el producto génico y/o elementos reguladores que controlan la expresión de una secuencia codificadora para el producto génico. La molécula de ADN puede introducirse por direccionamiento génico, lo que permite la incorporación de la molécula de ADN en un sitio genómico particular.

Vectores de Expresión Recombinantes

En un aspecto adicional, 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 ubiquitina pTEJ-8 (*Johansen TE, Schoeller MS, Tolstoy S, Schwartz T; FEBS Lett.* 1990 **267** 289-294) y los derivados de éste, p. ej. pUbi1Z. Un vector de expresión eucariota preferido disponible comercialmente es p. ej. el vector que contiene promotor de virus pcDNA-3 (disponible en Invitrogen). Otro vector de expresión preferido usa los promotores tempranos de SV40 y el tardío principal de adenovirus (derivado del plásmido pAD2beta; *Norton y Coffin, Mol. Cell. Biol.* 1985 **5** 281).

Esta invención también proporciona vectores de expresión procariotas y genes sintéticos (singenes) con optimización de codones para la expresión procariota. Los singenes se construyeron con bajo contenido en GC y codones bacterianos preferidos (p. ej., *E. coli*). El singén se clona en dos vectores, pET19b y pMJB164, un derivado de pET19b. La construcción con pET19b se muestra en la Fig. 14. En esta construcción, la secuencia que codifica el dominio maduro de la neublastina se fusiona directamente con una metionina de inicio. La construcción con pMJB164 se muestra en la Fig. 15.

Células Productoras

En un aspecto adicional más, la invención proporciona una célula productora manipulada genéticamente para comprender la secuencia del polinucleótido aislada de la invención, y/o un vector de expresión recombinante de la invención. La célula de la invención puede, en particular, manipularse genéticamente para expresar, sobreexpresar o co-expresar de manera transitoria o estable, el polipéptido de la invención. Los métodos para generar la expresión transitoria y estable son conocidos en la técnica.

El polinucleótido de la invención puede insertarse en un vector de expresión, p. ej. un plásmido, virus u otro vehículo de expresión, y unirse operativamente a secuencias de control de la expresión por ligación de manera que se consiga la expresión de la secuencia codificadora bajo condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores, amplificadores, 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 permitir la traducción apropiada del ARNm. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

El promotor puede ser, en particular, un promotor constitutivo o inducible. Cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago λ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac). Cuando se clona en sistemas de mamíferos, pueden usarse los promotores derivados el genoma de células de mamíferos, p. ej. el promotor de ubiquitina, el promotor TK o el promotor de metalotioneína o de virus de mamíferos, p. ej. la repetición terminal larga de retrovirus, el promotor tardío de adenovirus o el promotor 7,5K de virus vaccinia.

Los promotores obtenidos por técnicas de ADN recombinante o sintéticas también pueden usarse para proporcionar la transcripción del polinucleótido de la invención.

Los vectores de expresión adecuados comprenden típicamente un origen de expresión, un promotor así como genes específicos que permiten la selección fenotípica de las células transformadas e incluyen vectores como el vector de expresión basado en T7 para la expresión en bacterias [*Rosenberg et al*; 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], los vectores derivados de baculovirus para la expresión en células de insectos y el vector de expresión en oocitos PTLN [*Lorenz C, Pusch M & Jentsch TJ*; 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 embrionaria de riñón humano (HEK), p. ej., una célula HEK293, una célula BHK21, una célula de Ovario de hámster chino (CHO), una célula de oocito de *Xenopus laevis* (XLO). En otra realización, la célula de la invención es una célula fúngica, p. ej., una célula fúngica filamentosa. En otra realización preferida, la célula es una célula de insecto, lo más preferiblemente la célula Sf9. Las células de mamífero adicionales preferidas de la invención son las líneas celulares PC12, HiB5, RN33b y las células progenitoras neurales humanas. Las más preferidas son las células humanas.

Los ejemplos de células primarias o secundarias incluyen fibroblastos, células epiteliales incluyendo células epiteliales mamarias e intestinales, células endoteliales, células de la sangre incluyendo linfocitos y células de la médula ósea, células gliales, hepatocitos, queratinocitos, células musculares, células neurales, o los precursores de estos tipos de células. Los ejemplos de líneas celulares humanas inmortalizadas útiles en los presentes métodos incluyen, pero no están limitados a, células de Melanoma de Bowes (No. de Registro ATCC CRL 9607), células Daudi (No. de Registro ATCC CCL 213), células HeLa y derivados de células HeLa (Nos. de Registro ATCC CCL 2, CCL 2.1 y CCL 2.2), células HL-60 (No. de Registro ATCC CCL 240), células HT-1080 (No. de Registro ATCC CCL 121), células Jurkat (No. de Registro ATCC TIB 152), células de carcinoma KB (No. de Registro ATCC CCL 17), células de leucemia K-562 (No. de Registro ATCC CCL 243), células de cáncer de mama MCF-7 (No. de Registro ATCC BTH 22), células MOLT-4 (No. de Registro ATCC 1582), células Namalwa (No. de Registro ATCC CRL 1432), células Raji (No. de Registro ATCC CCL 86), células RPMI 8226 (No. de Registro ATCC CCL 155), células U-937 (No. de Registro ATCC CRL 1593), células WI-38VA13 sublínea 2R4 (No. de Registro ATCC CLL 75.1), y células de carcinoma de ovario 2780AD (*Van der Blick et al. Cancer Res.* 1988 **48** 5927-5932), así como células de heterohibridoma producidas por fusión de células humanas y células de otra especie. También pueden usarse cepas de fibroblastos humanos secundarias, tales como WI-38 (No. de Registro ATCC CCL 75) y MRC-5 (No. de Registro ATCC CCL 171).

Cuando la célula de la invención es una célula eucariota, la incorporación del polinucleótido heterólogo de la invención puede realizarse, en particular, por infección (empleando un vector viral), por transfección (empleando un vector plasmídico), usando precipitación con fosfato de calcio, microinyección, electroporación, lipofección, u otros métodos físico-químicos 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 transfecta en una célula huésped de mamíferos, una célula progenitora neural, un astrocito, una célula T, una célula madre hematopoyética, 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 la transformación celular.

La activación de un gen endógeno en una célula huésped puede conseguirse introduciendo elementos reguladores, en particular, introduciendo un promotor capaz de efectuar la transcripción de un gen endógeno que codifica el polipéptido de neublastina de la invención.

Composiciones Farmacéuticas

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

Para usarse en terapia, el polipéptido de la invención puede administrarse 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 se prepara por el experto en la técnica usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender el polipéptido de la invención o anticuerpos de éste. La composición puede administrarse sola o en combinación con uno o más agentes, fármacos u hormonas adicionales.

La composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por cualquier ruta adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, aplicación sublingual o rectal, bucal, vaginal, intraorbital,

intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, transmucosal o mediante inhalación.

Los métodos de administración intrapulmonar, aparatos y preparación del fármaco se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. 5.785.049, 5.780.019 y 5.775.320. La administración puede ser por inyecciones periódicas de un bolo de la preparación o puede hacerse de manera más continua por administración intravenosa o intraperitoneal desde un reservorio que es externo (*p. ej.*, una bolsa IV) o interno (*p. ej.*, un implante bioerosionable, un órgano bioartificial o una colonia de células productoras de neublastina implantada). Véanse, *p. ej.*, las Patentes U.S. 4.407.957, 5.798.113 y 5.800.828. Los métodos de administración intrapulmonar y aparatos se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607.

10 En particular, la administración de una neublastina según esta invención puede conseguirse usando cualquier medio de administración adecuado, incluyendo:

(a) bomba (véanse, *p. ej.*, Annals of Pharmacotherapy, 27:912 (1993); Cancer, 41:1270 (1993); Cancer Research, 44:1698 (1984),

(b) microencapsulación (véanse, *p. ej.*, las patentes de los Estados Unidos 4.352.883; 4.353.888; y 5.084.350,

15 (c) implantes de polímero de liberación continua (véase, *p. ej.*, Sabel, patente de los Estados Unidos 4.883.666,

(d) macroencapsulación (véanse, *p. ej.*, las patentes de los Estados Unidos 5.284.761, 5.158.881, 4.976.859 y 4.968.733 y las solicitudes de patente PCT publicadas WO 92/19195, WO 95/05452,

(e) injertos celulares desnudos o sin encapsular en el SNC (véanse, *p. ej.*, las patentes de los Estados Unidos 5.082.670 y 5.618.531,

20 (f) inyección, bien subcutáneamente, intravenosamente, intra-arterialmente, intramuscularmente o en otro sitio adecuado; y

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

En una realización de esta invención, una neublastina se administra directamente en el SNC, preferiblemente en los ventrículos cerebrales, parénquima cerebral, el espacio intratecal u otra localización del SNC adecuada, lo más preferiblemente intratecalmente.

25 En otra realización preferida, se contempla la administración sistémica por inyección subcutánea, administración intravenosa o infusión intravenosa.

En otra realización preferida, se contempla la administración sistémica por inyección subcutánea, administración intravenosa o infusión intravenosa.

Otros sistemas de administración parenterales útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, administración por bomba, administración de células encapsuladas, administración liposomal, inyección con aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación y parche transdérmico.

30 Los detalles adicionales sobre las técnicas para la formulación y administración pueden encontrarse en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA).

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

35 El ingrediente activo puede administrarse en una o varias dosis al día. Las dosificaciones apropiadas contempladas actualmente están 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 diariamente. La composición farmacéutica de neublastina debe proporcionar una concentración local de factor neurotrófico de aproximadamente 5 ng/ml de fluido cerebroespinal ("CSF") a 25 ng/ml de CSF.

40 La dosis administrada debe, por supuesto, ajustarse cuidadosamente a la edad, peso y condición del individuo que se está tratando, así como a la ruta de administración, forma y régimen de dosificación, y el resultado deseado, y la dosificación exacta debe, por supuesto, ser determinada por el médico.

En realizaciones adicionales, el polipéptido de Neublastina de la invención puede administrarse por administración genética, usando líneas celulares y vectores como se describe a continuación en los métodos de tratamiento. Para generar dichas líneas celulares terapéuticas, el polinucleótido de la invención puede insertarse en un vector de expresión, *p. ej.* un plásmido, virus u otro vehículo de expresión y unirse operativamente a secuencias de control de la expresión por ligación de manera que la expresión de la secuencia codificadora se consiga bajo condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión adecuadas incluyen promotores, amplificadores, 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 permitir la traducción apropiada del ARNm. Las secuencias de control de la expresión también pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líder y secuencias como pareja de fusión.

50 pueden incluir componentes adicionales tales como secuencias líder y secuencias como pareja de fusión.

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

Métodos de Tratamiento

La presente invención, que se refiere a polinucleótidos y proteínas, polipéptidos, fragmentos de péptidos o derivados producidos a partir de éstos, así como a anticuerpos dirigidos frente a dichas proteínas, péptidos o derivados, puede usarse 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 pueden usarse directamente a través, p. ej., de 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 de éste, puede usarse para la expresión del factor neurotrófico de la invención. Esto puede conseguirse mediante líneas celulares que expresan dichas proteínas, péptidos o derivados de la invención, o mediante vectores virales 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 pueden administrarse a áreas diana de tratamiento para influir en un proceso patológico sensible a los polipéptidos de neublastina.

Los vectores de expresión adecuados pueden derivarse de lentivirus, retrovirus, adenovirus, virus de herpes o *vaccinia*, o de varios plásmidos producidos por bacterias y pueden usarse para la administración *in vivo* de secuencias de nucleótidos a un organismo completo o a un órgano, tejido o población celular diana. Otros métodos incluyen, pero no están limitados a, transfección con liposomas, electroporación, transfección con péptidos transportadores que contienen señales de localización nuclear u otras señales de localización, y administración génica mediante sistemas de liberación lenta. En otro aspecto más de la invención, pueden usarse secuencias de nucleótido "antisentido" complementarias al gen de neublastina o partes de éste, para inhibir o amplificar la expresión de neublastina.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un uso 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.

El trastorno o enfermedad puede ser, en particular, lesiones en el sistema nervioso causadas por trauma, cirugía, isquemia, infección, enfermedades metabólicas, deficiencia nutricional, neoplasias malignas o agentes tóxicos y procesos genéticos o idiopáticos.

La lesión puede haber ocurrido, en particular, en las neuronas sensoriales o células de ganglios de la retina, incluyendo neuronas en el ganglio de la raíz dorsal o en cualquiera de los tejidos siguientes: Los ganglios geniculado, petroso y nodoso; el complejo vestibuloacústico del VIII par craneal; el polo ventrolateral del lóbulo maxilomandibular del ganglio trigémino; y el núcleo trigeminal mesencefálico.

En una realización preferida de los usos de la invención, la enfermedad o trastorno es una enfermedad neurodegenerativa que implica neuronas lesionadas y traumáticas, tales como lesiones traumáticas de los nervios periféricos, el bulbo raquídeo, y/o la médula espinal, lesión neuronal isquémica cerebral, neuropatía y especialmente neuropatía periférica, trauma o lesión de nervios periféricos, ictus isquémico, lesión cerebral aguda, lesión aguda de la médula espinal, tumores del sistema nervioso, esclerosis múltiple, exposición a neurotoxinas, enfermedades metabólicas tales como diabetes o disfunciones renales y lesión causada por agentes infecciosos, trastornos neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, síndromes Parkinson-Plus, Parálisis Supranuclear progresiva (Síndrome de Steele-Richardson-Olszewski), Atrofia Olivopontocerebelosa (OPCA), Síndrome de Shy-Drager (atrofia de sistemas múltiples), complejo parkinsonismo demencia Guamaniano, esclerosis lateral amiotrófica, o cualquier otra enfermedad congénita o neurodegenerativa y deterioro de la memoria relacionado con la demencia.

En una realización preferida, se contempla el tratamiento de neuronas sensoriales y/o del sistema autónomo. En otra realización preferida, se contempla el tratamiento de enfermedades de neuronas motoras tales como esclerosis lateral amiotrófica ("ALS") y atrofia muscular espinal. En otra realización preferida más, se contempla el uso de las moléculas de neublastina de esta invención para incrementar la recuperación nerviosa después de una lesión traumática. En una realización, se contempla el uso de un canal de guía para los nervios con una matriz que contiene polipéptidos de neublastina. Dichos canales de guía para los nervios se describen, p. ej., en la patente de los Estados Unidos No. 5.834.029.

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 tratamiento con las moléculas de esta invención están las neuropatías inducidas por traumatismos, p. ej., las causadas por lesión física o estado patológico, lesión física en el cerebro, lesión física en la médula espinal, ictus asociado con daño cerebral, y trastornos neurológicos relacionados con la neurodegeneración.

5 También se contempla el tratamiento de neuropatías inducidas por quimioterapia (tales como las causadas por la administración de agentes quimioterapéuticos, p. ej., taxol o cisplatino); neuropatías inducidas por toxinas, neuropatías inducidas por fármacos, neuropatías inducidas por deficiencia de vitaminas; neuropatías idiopáticas; y neuropatías diabéticas. Véanse, p. ej., las patentes de los Estados Unidos 5.496.804 y 5.916.555.

También se contempla el tratamiento de no neuropatías, neuropatías mono-múltiples y poli-neuropatías, incluyendo neuropatías axonales y desmielinizantes, usando los nucleótidos y polipéptidos de neublastina de esta invención.

10 En otra realización preferida, los polipéptidos y ácidos nucleicos de esta invención (y las composiciones farmacéuticas que los contienen) se usan en el tratamiento de varios trastornos del ojo, incluyendo pérdida de fotorreceptores en la retina en pacientes afectados por degeneración macular, retinosis pigmentaria, glaucoma y enfermedades similares.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para la prevención de los cambios degenerativos relacionados con las enfermedades y trastornos anteriores, implantando en el cerebro de mamíferos, incluyendo el ser humano, vectores o células capaces de producir una forma biológicamente activa de neublastina o un precursor de neublastina, es decir, una molécula que puede convertirse fácilmente en una forma biológicamente activa de neublastina por el cuerpo, o adicionalmente pueden encapsularse células que secretan neublastina, p. ej. en membranas semipermeables.

20 Las células pueden cultivarse *in vitro* para usarse en el trasplante o injerto en el cerebro de mamíferos incluyendo el ser humano.

25 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 celular madre neural inmortalizada de rata como HiB5 y RN33b, o en una línea celular progenitora neural inmortalizada humana y la línea celular resultante se implanta en el cerebro de un cuerpo vivo, incluyendo un ser humano, para secretar el polipéptido terapéutico de la invención en el SNC, p. ej. usando los vectores de expresión descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO 98/32869.

Métodos de Diagnóstico y Cribado

30 Un ácido nucleico de neublastina puede usarse para determinar si un individuo está predispuesto a desarrollar un trastorno neurológico que resulta de un defecto en el gen de la neublastina, p. ej., un defecto en un alelo de la neublastina, que se ha adquirido, p. ej., por herencia genética, por desarrollo embrionario anormal, o por lesión en el ADN adquirida. El análisis puede hacerse, p. ej., detectando una o varias deleciones o una o varias mutaciones puntuales en el gen de neublastina o detectando la herencia de dicha predisposición de dichos defectos genéticos con polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) específicos, detectando la presencia o ausencia de un gen de neublastina normal hibridando una muestra de ácido nucleico del paciente con una sonda o sondas de
35 ácido nucleico específicas para el gen de la neublastina, y determinando la capacidad de la sonda para hibridar con el ácido nucleico.

40 En particular, un ácido nucleico de neublastina puede usarse como una sonda de hibridación. Dichos ensayos de hibridación pueden usarse para detectar, pronosticar, diagnosticar o monitorizar las distintas condiciones, trastornos o estados patológicos asociados con niveles aberrantes de los ARNm que codifican la proteína Neublastina. Un ácido nucleico de neublastina puede interpretarse como un "marcador" para los procesos fisiológicos dependientes del factor neurotrófico neublastina. Estos procesos incluyen, pero no están limitados a, procesos fisiológicos "normales" (p. ej., función neuronal) y procesos patológicos (p. ej., enfermedad neurodegenerativa). La caracterización de una subpoblación o subpoblaciones de pacientes particular con niveles aberrantes (es decir, elevados o deficientes) de la proteína neublastina y o del ARNm que codifica la neublastina puede dar lugar a
45 nuevas clasificaciones de enfermedades. Por "niveles aberrantes", tal y como se define en la presente memoria, se quiere decir un nivel incrementado o disminuido respecto al de una muestra o individuo control que no tiene el trastorno determinado por medios cuantitativos o cualitativos.

50 Los ácidos nucleicos y polipéptidos de neublastina de esta invención también pueden usarse para cribar e identificar análogos de neublastina, incluyendo miméticos como moléculas pequeñas de neublastina. En una realización contemplada, la invención proporciona un método para identificar un compuesto candidato que induce un efecto biológico mediado por neublastina, comprendiendo el método 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 es indicativa de la capacidad del compuesto candidato para inducir el efecto biológico mediado por la neublastina.

55 Además, los ácidos nucleicos y polipéptidos de neublastina de esta invención pueden usarse en un chip de ADN o chips de proteína, o en programas informáticos para identificar secuencias génicas nuevas relacionadas y proteínas codificadas por éstas, incluyendo variantes alélicas y polimorfismos de un único nucleótido ("SNP"). Dichos métodos

se describen, p. ej., en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.795.716; 5.754.524; 5.733.729; 5.800.992; 5.445.934; 5.525.464.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Métodos para Aislar Ácidos Nucleicos de Neublastina

5 **Método 1: Cribado Rápido de ADNc de Cerebro Fetal Humano para el Gen de la neublastina**

Se identificó un fragmento de 290 pb en dos secuencias genómicas con rendimiento alto (HGTS) enviadas a GenBank (No. de Registro 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 cadena superior de neublastina ("NBNint.sence") tenía la secuencia 5'-CCT GGC CAG CCT ACT GGG-3' [SEQ ID NO: 17]. El cebador de cadena inferior de neublastina ("NBNint.antisence") tenía la secuencia 5'-AAG GAG ACC GCT TCG TAG CG-3' [SEQ ID NO: 18]. Con estos cebadores, se realizaron reacciones de PCR en 96 pocillos.

Se cargó una placa maestra de 96 pocillos, que contiene ADN plasmídico de 500.000 clones de ADNc, con aproximadamente 5.000 clones por pocillo. Se utilizó una sub-placa de 96 pocillos con preparación madre de glicerol de *E. coli* DH10B que contiene 50 clones por pocillo.

Se identificó un ácido nucleico de neublastina por tres rondas de amplificación usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"); la amplificación incrementa el número de copias del ácido nucleico en la muestra.

Cribado de la Placa Maestra: Usando la técnica de cribado por PCR en 96 pocillos descrita anteriormente, se cribó una placa maestra de ADNc de cerebro fetal humano con los cebadores específicos de gen para aislar el ADNc de neublastina humano.

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

Las reacciones de termociclado de PCR se realizaron usando el procedimiento y condiciones siguientes. El ADN se desnaturizó inicialmente a 94°C durante 3 minutos y se siguió con 35 ciclos de desnaturización a 94°C durante 1 minuto cada uno, hibridación 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. Los productos de las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron por electroforesis en gel usando un gel de agarosa al 2% que contiene tinción con bromuro de etidio. Se encontró que el producto de 102 pb de PCR positivo observado en un pocillo se correspondía con una única sub-placa de 96 pocillos.

El fragmento de ácido nucleico de 102 pb tenía la secuencia siguiente [SEQ ID NO: 13]:

35 5'-CCTGGCCAGCCTACTGGGCGCCGGGGCCCTGCGACCGCCCCG
GGCTCCCGGCCCGTCAGCCAGCCCTGCTGCCGACCCACGCGCTAC
GAAGCGGTCTCCTT-3'

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

Se utilizaron las mismas condiciones de termociclado de PCR descritas para el cribado de la placa maestra. Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron en un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio y se identificó un pocillo positivo que proporcionó el fragmento de PCR de 102 pb.

PCR de Colonias: Un ml de la preparación madre de glicerol del pocillo positivo de la sub-placa se diluyó 1:100 en caldo Luria (LB). Un ml y 10 ml de la dilución mencionada anteriormente se sembraron en dos placas de agar independientes que contienen caldo Luria ("LB") y 100 μg/ml de carbenicilina. Las placas LB se incubaron toda la noche a 30°C. A partir de estas placas, se tomaron 96 colonias en una nueva placa de PCR de 96 pocillos que contiene: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados anteriormente, 1x tampón de PCR estándar (Tampón V; Advanced Biotechnologies, Reino Unido), 0,2 mM dNTP (Amersham-Pharmacia), 0,1 M

GC-Melt (Clontech Laboratories, EEUU); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5U/ μ l; Advanced Biotechnologies, Reino Unido) en un volumen final de 25 μ l.

Se utilizaron las mismas condiciones de termociclado de PCR descritas para el cribado de la placa maestra. Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron en un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio. Se identificó posteriormente una colonia positiva que contenía el fragmento de 102 pb.

La secuenciación del ADN plasmídico preparado a partir de esta colonia positiva reveló un ADNc de longitud completa de 861 pb [SEQ ID NO: 8]. El ADNc codificaba una pre-pro-neublastina [SEQ ID NO: 9]. La secuenciación automática del ADN se realizó usando el kit de secuenciación de ciclo terminador BigDye® (PE Applied Biosystems, EEUU). Los geles de secuenciación se corrieron en un ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, EEUU).

10 **Método 2: Clonación del ADNc de Neublastina de Cerebro Humano:**

Un método adicional para amplificar el ADNc de longitud completa o fragmento de ADNc de Neublastina puede realizarse por RACE (Amplificación Rápida de los extremos de ADNc) y los cebadores específicos de Neublastina NBNint.sence y NBNint.antisence descritos anteriormente, combinado con cebadores específicos de vector o específicos de adaptador, por ejemplo usando el kit de amplificación de ADNc Marathon (Clontech Laboratories, EEUU, No. de Cat. K1802-1).

Puede usarse ADNc completo de cerebro humano Marathon-Ready (Clontech Laboratories, EEUU, No. de Cat. 7400-1) para amplificar el ADNc de longitud completa de Neublastina. Los cebadores útiles para la amplificación incluyen un cebador de cadena superior de Neublastina 5'-ATGGAAGCTTGGACTTGG-3' [SEQ ID NO: 19] ("NBNint.sence") y un cebador de cadena inferior de Neublastina 5'-TCCATCACCCACCGGC-3' [SEQ ID NO: 20] ("NBNint.antisence"), combinados con el cebador adaptador AP1 incluido en el Marathon-Ready ADNc. También se ha usado un cebador de cadena superior alternativo, 5'-CTAGGAGCCCATGCCC-3' [SEQ ID NO: 28]. También puede usarse un cebador de cadena inferior alternativo adicional, 5'-GAGCGAGCCCTCAGCC-3' [SEQ ID NO: 33]. Asimismo, también pueden usarse los cebadores de cadena inferior alternativos SEQ ID NOS: 24 y 26.

25 **Método 3: Clonación del ADNc de Neublastina de Cerebro Humano:**

Otro método para clonar el ADNc de Neublastina es cribar bibliotecas de cerebro humano adulto o fetal con una o más de las sondas de Neublastina descritas en la presente memoria (y como se ejemplifica en la Figura 1). Estas bibliotecas incluyen: cerebro humano λ gt11 (Clontech Laboratories, EEUU, No. de Cat. HL3002b); o cerebro fetal humano λ gt11 (Clontech Laboratories, EEUU, No. de Cat. HL3002b).

30 **Método 4: Cribado Rápido de ADNc Fetal de Ratón para el Gen de Neublastina**

Se realizó un procedimiento de cribado rápido para el gen de Neublastina de la manera siguiente. Una placa maestra de 96 pocillos, que contiene ADN plasmídico de 500.000 clones de ADNc, se cargó con aproximadamente 5.000 clones por pocillo. Se utilizó una sub-placa de 96 pocillos con preparación madre de glicerol de *E. coli* que contiene 50 clones por pocillo. Se realizaron tres rondas de amplificación mediada por PCR con el fin de identificar un gen de interés (es decir, Neublastina).

35 **Cribado de la Placa Maestra:** Se cribó una placa maestra de ADNc fetal de ratón por PCR de 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.sence); 5'-GGCCACCGCTCCGACGAG-3' [SEQ ID NO: 21]; y (2) cebador C2as de Neublastina (NBNint.antisence): 5'-GGCGTCCACGGTCTCCAG-3' [SEQ ID NO: 22]. Usando estos dos cebadores específicos de gen se identificó un producto de PCR positivo de 220 pb. El ácido nucleico de 220 pb poseía la secuencia siguiente [SEQ ID NO: 14]:

```
5'-GGCCACCGCTCCGACGAGCTGATACGTTTCCGCTTCTGCAGCGG
CTCGTGCCGCCGAGCACGCTCCCAGCACGATCTCAGTCTGGCCAG
CCTACTGGGCGCTGGGGCCCTACGGTCGCCTCCCGGGTCCCGGC
45 CGATCAGCCAGCCCTGCTGCCGGCCACTCGCTATGAGGCCGTCT
CCTTCATGGACGTGAACAGCACCTGGAGAACCGTGGACCGCC-3'
```

Se realizaron reacciones de PCR en 96 pocillos de la manera siguiente. Treinta nanogramos de ADNc de cerebro fetal de ratón (6ng/ μ l; Origene Technologies) se obtuvieron del pocillo correspondiente de la placa maestra y se pusieron en un volumen total de 25 μ l que también contenían: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados anteriormente (es decir, cebador C2 (NBNint.sence) y cebador C2as de Neublastina (NBNint.antisence)), 1x tampón de PCR estándar (Tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), 0,2 mM

dNTP (Amersham-Pharmacia), 0,1 M GC-Melt (Clontech Laboratories, EEUU), y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido).

Se utilizaron las condiciones de termociclado de PCR siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto cada uno, hibridación a 55°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 90 segundos; y una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron en un gel de agarosa al 2% que contiene tinción con bromuro de etidio. Se encontró que el producto de 220 pb de PCR positivo observado en un pocillo se correspondía con una única sub-placa de 96 pocillos. Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron por electroforesis en gel en un gel de agarosa al 2% que contiene tinción con bromuro de etidio. El producto de 220 pb de PCR positivo que se había identificado se correspondía con un único pocillo de la sub-placa de 96 pocillos.

Cribado de la Sub-placa: La sub-placa fetal de ratón de 96 pocillos se cribó por amplificación mediada por PCR poniendo 1 μl de la preparación madre de glicerol del pocillo correspondiente de la sub-placa en un volumen final total de 25 μl que contenían: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados anteriormente; 1x tampón de PCR estándar (Tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido); 0,2 mM dNTP (Amersham-Pharmacia); 0,1 M GC-Melt (Clontech Laboratories, EEUU); y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido). El termociclado de PCR se realizó según las condiciones descritas anteriormente para el cribado de la placa maestra.

Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron en un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio y se identificó un pocillo positivo que producía el fragmento de 220 pb.

PCR de Colonias: Un ml de la preparación madre de glicerol del pocillo positivo de la sub-placa se diluyó 1:100 en caldo Luria (LB). Un ml y 10 ml de la dilución mencionada anteriormente se sembraron en dos placas de LB independientes, que contienen 100 μg/ml de carbenicilina y se incubaron a 30°C toda la noche. Se aislaron un total de 96 colonias y se transfirieron a una placa de PCR de 96 pocillos que contiene: 0,2 mM de cada uno de los dos cebadores específicos de gen mencionados anteriormente, 1x tampón de PCR estándar (Tampón V, Advanced Biotechnologies, Reino Unido), 0,2 mM dNTP (Amersham-Pharmacia); 0,1 M GC-Melt (Clontech Laboratories, EEUU), y 0,5 unidades de ADN polimerasa *Taq* (5 U/μl; Advanced Biotechnologies, Reino Unido) en un volumen final de 25 μl.

El termociclado de PCR se realizó según las condiciones descritas anteriormente (véase, "cribado de la placa maestra", más adelante). Las 96 reacciones de PCR individuales se analizaron por electroforesis en gel en un gel de agarosa al 2% que contiene bromuro de etidio. Se identificó una colonia positiva por la presencia del fragmento de 220 pb. A partir de esta colonia positiva se preparó ADN plasmídico. El clon se secuenció por secuenciación automática de ADN usando el kit de secuenciación de ciclo terminador BigDye® con ADN polimerasa *Ampli Taq*. Los geles de secuenciación se corrieron en el ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems). La secuencia resultante de este clon reveló un ADNc de longitud completa de 2.136 pb [SEQ ID NO: 15]. El ADNc incluye un marco de lectura abierto con la secuencia de aminoácidos predicha mostrada en SEQ ID NO: 16, que codifica un polipéptido de pre-neublastina de ratón.

Ejemplo 2: Clonación de Neublastina Genómica

Como se ha discutido anteriormente, los solicitantes identificaron un fragmento de ácido nucleico de 290 pb en dos clones BAC humanos con entradas en GenBank (con los Nos. de Registro AC005038 y AC005051) que tenía regiones de homología con persefina y con las secuencias flanqueantes de persefina. Los solicitantes usaron la secuencia predicha de 861 pb descrita anteriormente para diseñar cebadores adicionales, con el objetivo de clonar un ácido nucleico que codifica ácidos nucleicos de Neublastina adicionales usando el Programa Informático Lasergene (DNASTar, Inc.). Se usaron dos pares de cebadores para clonar el gen de Neublastina usando reacciones de PCR en ADN genómico. Los dos pares de cebadores se ilustran a continuación.

Par de Cebadores No. 1

5' CCA AgC CCA CCT ggg TgC CCT CTT TCT CC 3' (sentido) [SEQ ID NO: 23].

5' CAT CAC CCA CCg gCA ggg gCC TCT CAg 3' (antisentido) [SEQ ID NO: 24].

Par de Cebadores No. 2

5' gAgCCCAtgCCCggCCTgATCTCAgCCCgA ggACA 3' (sentido) [SEQ ID NO: 25].

5' CCCTggCTgAggCCgCTggCTAgTgggACTCTgC 3' (antisentido) [SEQ ID NO: 26].

Usando el par de cebadores No. 1, se amplificó un fragmento de ADN de 887 pb a partir de una preparación de ADN genómico humano adquirido en Clontech Laboratories, (No. de Cat. 6550-1).

Protocolo de PCR: La PCR se realizó usando el sistema de PCR Expand™ High Fidelity (Boehringer Mannheim) con el tampón 1. La mezcla de reacción de PCR se suplementó con 5% dimetilsulfóxido (DMSO) y 17,5 pmoles de cada dNTP en un volumen total de 50 µl. El termociclado se realizó con una etapa de pre-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. El termociclado se terminó por incubación a 68°C durante 5 minutos. El termociclado se realizó en un termociclador PTC-225 DNA Engine Tetrad (MJ Research, MA). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel en 2% agarosa (FMC) y se fotografiaron.

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

Los fragmentos obtenidos por amplificación por PCR del ADN genómico humano con el segundo par de cebadores (Par de Cebadores No. 1, anteriormente), se secuenciaron, revelando una región de 42 pb adicional en el extremo 3' del marco de lectura abierto. La secuencia de longitud completa se analizó comparándola con las secuencias de ácidos nucleicos de otros factores neurotróficos, así como mapeando los límites exón-intrón usando programas informáticos de búsqueda de genes que identifican uniones de corte y empalme probables y regiones con un alto potencial codificador usando los programas informáticos Netgene y Gene Mark (*Brunak et al., J. Mol. Biol.* 1991 **220** 49-65); *Borodovsky et al., Nucl. Acids Res.* 1995 **23** 3554-62). Los límites exón-intrón se confirmaron por el ADN obtenido del Cribado Rápido descrito anteriormente.

Como se ilustra en la FIG. 7, el gen de neublastina resultante tiene dos exones separados por un intrón de 70 pb. Conjuntamente, los exones tienen una secuencia de aminoácidos predicha de un polipéptido de Neublastina de longitud completa. El ADNc predicho [SEQ ID NO: 3] contiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica 238 residuos de aminoácidos [SEQ ID NO: 4]. El clon Neublastina-2 contenía la secuencia codificadora completa de la pro-neublastina. La secuencia de aminoácidos codificada por el gen mostró una alta homología con tres proteínas, persefina, neurturina y GDNF.

Ejemplo 3: Expresión de los Ácidos Nucleicos de Neublastina

La expresión del ARN de neublastina se detectó tanto en tejido nervioso como no nervioso en roedores y en seres humanos, y en varias etapas de desarrollo inmaduro y adulto, usando las técnicas descritas a continuación.

Método para detectar la expresión del ARN de Neublastina usando RT-PCR: Tomando como base la secuencia del ADN de neublastina identificada como SEQ ID NO: 1, se sintetizaron los cebadores siguientes: (1) un cebador C2 de neublastina 5'-GGCCACCGCTCCGACGAG-3' [SEQ ID NO: 21], y (2) un cebador C2as de neublastina 5'-GGCGGTCCACGGTTCTCCAG-3' [SEQ ID NO: 22]. Este conjunto de cebadores se usó para amplificar por RT-PCR un fragmento de ADN a partir de ARNm de cerebro completo 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 confirmó que el gen de neublastina se expresa en tejido de cerebro adulto y fetal. También se amplificó un fragmento de ADN de 220 pb a partir de ADN genómico usando estos cebadores.

Método para detectar la expresión del ARN de Neublastina por hibridación en transferencia Northern: Las transferencias Northern con poliA⁺ ARN de tejido humano adulto se adquirieron de un proveedor comercial (Clontech Laboratories, EEUU) y se ensayaron con un ADNc de neublastina marcado con ³²P. El ADNc de neublastina marcado se preparó según los métodos descritos en el Ejemplo 1, anterior.

Preparación de las Sondas: Un fragmento de ácido nucleico ADN de neublastina (nucleótidos 296-819 de SEQ ID NO: 8) se marcó con el kit de marcaje Rediprime II (Amersham; No. de Cat. RPN1633) para usarse como una sonda de hibridación, como recomienda el fabricante. Brevemente, la muestra de ADN se diluyó hasta una concentración de 2,5-25 ng en 45 µl de 10 mM Tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA). El ADN se desnaturalizó calentando la muestra hasta 95-100°C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, enfriando rápidamente la muestra poniéndola en hielo durante 5 minutos y centrifugándola brevemente para llevar los contenidos al fondo del tubo de reacción. La cantidad total de ADN desnaturalizado se añadió junto con 5 µl de Redivue [³²P] dCTP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) en el tubo de reacción que contiene la disolución tamponada de dATP, dGTP, dTTP, enzima de Klenow sin exonucleasa y cebador aleatorio en forma seca estabilizada. La disolución se mezcló pipeteando arriba y abajo 2 veces, moviendo la punta de la pipeta en redondo en la disolución, y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 10 minutos. La reacción de marcaje se paró añadiendo 5 µl de 0,2 M EDTA. Para usarse como una sonda de hibridación, el ADN marcado se desnaturalizó en cadenas únicas calentando la muestra de ADN hasta 95-100°C durante 5 minutos y enfriando rápidamente la muestra de ADN en hielo durante 5 minutos. El tubo se centrifugó y sus contenidos se mezclaron bien. Finalmente, la sonda de ADN de cadena única se purificó usando el Kit de Eliminación de Nucleótidos (Qiagen).

Técnicas de Hibridación: Las transferencias northern preparadas se adquirieron de un proveedor comercial ("Multiple Tissue Northern Blots, Clontech Laboratories, EEUU, Nos. de Catálogo 7760-1 y 7769-1) y se hibridaron

según las instrucciones del fabricante usando la sonda de neublastina marcada con P^{32} preparada anteriormente. Para la hibridación, se usó Disolución ExpressHyb (Clontech Laboratories, EEUU) y se empleó una concentración de aproximadamente 3 ng/ml de la sonda marcada. La disolución ExpressHyb se calentó hasta 68°C y se agitó para disolver cualquier precipitado. Cada membrana de transferencia northern (10x10 cm) se pre-hibridó en al menos 5 ml de Disolución ExpressHyb a 68°C durante 30 minutos en un Horno de Hibridación Hybaid según las instrucciones del fabricante. La sonda de neublastina marcada con P^{32} se desnaturalizó a 95-100°C durante 2 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. Catorce microlitros (14 μ l) de la sonda marcada se añadieron a 5 ml de ExpressHyb fresco y se mezcló bien. La Disolución ExpressHyb usada en la pre-hibridación se reemplazó distribuyendo uniformemente sobre las transferencias los 5 ml de Disolución ExpressHyb fresca que contiene 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 lavaron y se lavaron varias veces a astringencia baja (tampón 2x SSC que contiene 0,05% SDS a temperatura ambiente) seguido de un lavado a astringencia alta (0,1x SSC que contiene 0,1% SDS a 50°C) [20X SSC es 0,3 M NaCl/0,3 M citrato Na, pH 7,0]. Las transferencias se expusieron a un Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd.) a -80°C usando pantallas amplificadoras.

Los resultados de los experimentos de hibridación en transferencia northern se presentan en la FIG. 1. La FIG. 1A (izquierda) y la FIG. 1B (derecha) son transferencias northern de poliA⁺ ARN que se ensayaron con ADNc de neublastina marcado con ^{32}P como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los marcadores representan polinucleótidos con un tamaño de 1,35 pares de kilobases ("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 varios tejidos adultos humanos: A partir de los resultados de los análisis de hibridación de transferencia northern, los solicitantes concluyen que el ARNm de neublastina se expresa en muchos tejidos adultos humanos. El mayor nivel 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 varias regiones del cerebro humano adulto. En el cerebro adulto, el mayor nivel de expresión se observa en el núcleo caudado y en el tálamo. Un transcrito de ARNm de aproximadamente 5 kb fue la forma predominante de ARNm de neublastina expresado en el cerebro.

Método para detectar la expresión del ARN de Neublastina usando Hibridación in situ en Tejidos:

Las técnicas siguientes se usan para medir la expresión del ARN de neublastina en tejidos animales, p. ej., tejidos de roedores, con una sonda anti-sentido de neublastina.

Expresión en ratones:

Preparación de Muestras de Tejido: Se sacrificaron ratones preñados de tiempo (B&K Universal, Estocolmo, Suecia) por dislocación cervical en el día gestacional 13,5 ó 18,5. Los embriones se extrajeron por disección bajo condiciones estériles e inmediatamente se sumergieron en una disolución de 0,1M tampón fosfato (PB) que contiene 4% paraformaldehído ("PFA") durante 24-30 horas y se sacaron del PFA y se almacenaron en PBS. El tejido se preparó para seccionarlo sumergiendo el tejido en una disolución de 30% sacarosa e incluyéndolo en TissueTech (Compuesto O.C.T., Sakura Finetek USA, Torrance, CA). Se cortaron seis series de secciones coronales o sagitales (12 μ m cada una) en un criostato y se montaron descongeladas en portas de vidrio cargados positivamente. Se fijaron cabezas/cerebros neonatales (P1, P7) según el mismo protocolo que para las etapas embrionarias y el tejido cerebral adulto se diseccionó, se congeló inmediatamente en nieve carbónica y se cortó en un criostato sin ninguna inclusión previa.

Preparación de Ribosondas de Neublastina: Se preparó una sonda de ARN antisentido de neublastina (de aquí en adelante una "ribosonda de neublastina") como sigue. Los nucleótidos 1.109-1.863 de la secuencia de ADNc de neublastina de ratón [SEQ ID NO: 15] se sub-clonaron en el vector BlueScript (Stratagene). El plásmido resultante se cortó en un ADN lineal usando endonucleasa de restricción *EcoRI*. El fragmento de ADN de *EcoRI* se transcribió *in vitro* con ARN polimerasa T3 y el Kit de Marcaje de ARN con digoxigenina ("DIG") según las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim).

Hibridación: Las secciones de criostato se fijaron durante 10 minutos en 4% PFA, se trataron durante 5 minutos con 10 mg/ml de proteinasa K, se deshidrataron secuencialmente en 70% y 95% etanol durante 5 y 2 min, respectivamente y se dejó que se secaran al aire. El tampón de hibridación (50% formamida desionizada, 10% de una disolución de sulfato de dextrano 50%, 1% disolución de Denhardt, 250 μ g/ml ARNt de levadura, 0,3M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH8), 5 mM EDTA, 10 mM NaPO₄, 1% sarcosil) que contiene 1 μ g/ml de la sonda marcada con DIG se calentó hasta 80°C durante 2 minutos y se aplicó en las secciones. Las secciones se cubrieron con parafilm y se incubaron a 55°C durante 16-18 horas.

Al día siguiente, las secciones se lavaron a astringencia alta (2x SSC que contiene 50% formamida) a 55°C durante 30 minutos y se lavaron en tampón RNasa y se incubaron con 20 μ g/ml de RNasaA durante 30 minutos a 37°C. Con el fin de detectar la sonda marcada con DIG, las secciones se pre-incubaron en disolución de bloqueo (PBS que contiene 0,1% Tween-20 y 10% suero de cabra inactivado con calor) durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con una dilución 1:5.000 de anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim). Al día siguiente, a cada sección se le hizo cuatro lavados de dos horas en PBS que contiene 0,1% Tween-20 y se le hizo dos lavados de diez minutos en tampón NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9,5), 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20). Las secciones se incubaron en sustrato BM-purple que contiene 0,5 mg/ml de levamisol durante 48

horas. La reacción de color se paró lavando en PBS. Las secciones se secaron al aire y se cubrieron con cubre 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
Prosencéfalo	++				
Mesencéfalo ventral	-				
Ganglios de la Raíz Dorsal	++				
Médula espinal	+				
Retina		+++	+++	+	
Bulbo olfativo		++	++	++	
Pulpa del diente		++	++	+	
Ganglio trigémino		++	++	++	
Cuerpo estriado		+	+	++	
Corteza		++	++	++	+
Giro dentado				++	+

5

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

10

En el día embrionario 18,5 ("E18,5"), la neublastina se expresaba lo más mayoritariamente en el ganglio trigémino (V). La expresión de neublastina también se detectó en la retina, el cuerpo estriado y la corteza. Además, se observó expresión en el anclaje del diente.

15

De nuevo en referencia a la Tabla 1, se observó un incremento de expresión de neublastina, desde el punto de tiempo E18,5 hasta los días postnatales 1 y 7, en la corteza, el cuerpo estriado y el ganglio trigémino (V). La expresión de neublastina fue más mayoritaria en las capas externas de la corteza que en las capas internas de la corteza. En P7, se encontró expresión en las mismas estructuras que en el día 1 pero además se encontró expresión de neublastina en el hipocampo, especialmente en el giro dentado y en el cerebelo. En el cerebro murino adulto, la neublastina se expresó con fuerza en el giro dentado, con unos niveles muy bajos o indetectables de expresión de neublastina detectados en otros tejidos ensayados.

20

Expresión en la Rata:

El experimento siguiente describe la hibridación de tejidos de rata con una sonda de oligodesoxinucleótido anti-sentido de neublastina marcada con fosfatasa alcalina.

25

Preparación de muestras de tejido: Los embriones de rata (E14) se obtuvieron a partir de ratas Wistar preñadas (Mollegaard Breeding, Dinamarca) después de anestesia con pentobarbital. Las ratas postnatales (P0, P7, adulto) se sacrificaron por decapitación. Los cerebros y las cabezas completas diseccionadas se sumergieron inmediatamente en 0,9% NaCl frío, se congelaron frescas y se seccionaron a 20 µm en un criostato (secciones coronales y sagitales, 10 series).

30

Hibridación in situ: Se hibridaron dos series de secciones usando una sonda de oligodesoxinucleótido anti-sentido conjugada con fosfatasa alcalina (AP) (5'-NCA GGT GGT CCG TGG GGG GCG CCA AGA CCG G-3' [SEQ ID NO: 27], Oligo No. 164675, DNA Technology, Dinamarca). Esta sonda es complementaria a las bases 1.140 a 1.169 del ADNc de la neublastina de ratón de SEQ ID NO: 15).

Antes de la hibridación, las secciones se secaron al aire a temperatura ambiente, se calentaron a 55°C durante 10 min., y se trataron con 96% etanol a 4°C toda la noche. Las secciones se secaron al aire y se incubaron en medio de

hibridación (5,0 pmoles de sonda/ml) toda la noche a 39°C (*Finsen et al., Neurosci.* 1992 **47** 105-113; *West et al., J. Comp. Neurol.* 1996 **370** 11-22).

El tratamiento posterior a la hibridación consistió en cuatro lavados de treinta minutos en 1x SSC (0,15M NaCl, 0,015 M citrato-Na) a 55°C, seguido de tres lavados de diez minutos en Tris-HCl, pH 9,5 a temperatura ambiente antes de aplicar revelador AP. El revelador AP se preparó inmediatamente antes del uso y contenía azul de nitrotetrazolio (NBT, Sigma), 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilfosfato (BCIP, Sigma) y tampón Tris-HCl-MgCl₂, pH 9,5 (*Finsen et al., Neurosci.* 1992 **47** 105-113). El revelado con AP tuvo lugar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 48 horas. La reacción de color se paró lavando las secciones en agua destilada. Las secciones se deshidrataron en acetona graduada, se ablandaron en creosota xileno-fenol (Allchem, Reino Unido), se aclararon en xileno y se cubrieron con porta usando Eukitt (Bie & Berntsen, Dinamarca).

Las reacciones control consistieron en (1) pre-tratar 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 no marcada; y (3) hibridar las secciones con tampón de hibridación solo. Los resultados de las reacciones de hibridación se presentan en la Tabla 2.

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

Estructura	E14	P0/P1	P7	Adulto
Prosencéfalo	++			
Mesencéfalo ventral	-			
Ganglios de la Raíz Dorsal	++			
Médula espinal	+			
Retina	+			
Bulbo olfatorio	(+)	++	++	
Cerebelo		+	++	+
Ganglio trigémino		++	++	
Cuerpo estriado		+	+(+)	
Corteza	(+)	++	++	+
Hipocampo		(+)	++	++

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

Ejemplo 4: Polipéptidos de Neublastina

El marco de lectura abierto, o región codificadora (CDS), identificada en SEQ ID NO: 8 codifica el pre-pro-polipéptido (designado "pre-pro-neublastina"). La secuencia de aminoácidos predicha a partir de este marco de lectura abierto se muestra en SEQ ID NO: 9. Tomando como base la SEQ ID NO: 9, se identificaron tres variantes de polipéptidos de neublastina. Estas variantes incluyen:

(i) el polipéptido designado en la presente memoria como NBN140, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 10;

(ii) el polipéptido designado en la presente memoria como NBN116, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 11; y

35 (iii) el polipéptido designado en la presente memoria como NBN113, que posee la secuencia de aminoácidos designada como SEQ ID NO: 12.

5 cisteína 8-73, 35-101 y 39-103, y p. ej., en las SEQ ID NOS: 4 y 9 entre los residuos de cisteína 43-108, 70-136 y 74-138) y un enlace disulfuro intermonomérico (contemplado, p. ej., en SEQ ID NO: 2 entre los residuos de cisteína 72-72, y, p. ej., en las SEQ ID NOS: 4 y 9 entre los residuos de cisteína 107-107), que junto con la región de cadena beta extendida constituye el residuo estructural conservado para la superfamilia TGF- β . Véase, p. ej., *Daopin et al., Proteins* 1993 **17** 176-192.

Tomando como base este alineamiento de secuencias, se mostró que la neublastina es un miembro de la subfamilia GDNF de factores neurotróficos (LGLG - FR(Y/F)CSGSC - QxCCRP - SAxxCGC, la huella de la subfamilia GDNF, subrayada en la Tabla 3).

10 Se calculó la homología de la neublastina con otros miembros de la familia GDNF y los resultados se presentan en la Tabla 4, a continuación.

Tabla 4: Homología de los Polipéptidos de Neublastina con otros miembros de la Familia GDNF

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

GDNF = Factor Neurotrófico Derivado de una línea celular Glial

NTN = Neurturina

15 PSP = Persefina

IHA = Inhibina- α

TF- β 2 = Factor de Crecimiento Transformante- β 2

La homología fuerte indica que uno de los grupos "fuertes" siguientes está conservado:

STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.

Ejemplo 5: Producción de Neublastina

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

Vectores de Expresión El ADNc de longitud completa que codifica neublastina se insertó 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 comercialmente (Invitrogen). El pcDNA3.1/Zeo modificado es más pequeño que el vector parental, porque se han eliminado el gen de ampicilina (desde la posición 3.933 a 5.015) y una secuencia desde la posición 2.838 a 3.134. En esta versión modificada de pcDNA3.1/Zeo, el promotor CMV se reemplazó por el promotor UbC de pTEJ-8 (*Johansen et al.*, *FEBS Lett.* 1990 **267** 289-294), lo que resulta en pUbi1Z.

Expresión en Células de Mamífero El vector pUbi1Z que contenía las secuencias codificadoras de la neublastina se transfirió en la línea celular de mamíferos HiB5, que es una línea celular neural inmortalizada de rata (*Renfranz et al.*, *Cell*, 1991 **66** 713-729). Se han establecido varias líneas celulares HiB5 que expresan de manera estable neublastina (según se determina por RT-PCR). En una de estas líneas celulares estables, se confirmó la expresión de HiB5pUbi1zNBN22 por hibridación de ARN total en una transferencia Northern con una sonda de neublastina marcada con ³²P. Los resultados de estos estudios se muestran en la Fig. 2. HiB5pUbi1zNBN22 se usó como fuente de neublastina para los 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 ensayada con el ADNc de neublastina marcado con ³²P de la presente invención como se describe más adelante). La transferencia se preparó por ARN total extraído de células HiB5 no transfectadas, células HiB5pUbi1zNBN22 y 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 frente a polipéptidos derivados de neublastina también reconocen una proteína de aproximadamente 13 kilodalton ("kD") en medio condicionado del clon HiB5pUbi1zNBN22 pero no de células HiB5 no transfectadas (véase el Ejemplo 6).

Los pesos moleculares predichos de los polipéptidos de neublastina no modificados (es decir, que carecen de modificaciones posteriores a la traducción) NBN 140 [SEQ ID NO: 10], NBN116 [SEQ ID NO: 11] y NBN113 [SEQ ID NO: 12] se determinó que eran 14,7 kilodalton ("kD"), 12,4 kD y 12,1 kD, respectivamente.

Métodos: Se preparó una transferencia Northern con ARN total (10 µg) de células HiB5 no transfectadas y el clon HiB5pUbi1zNBN22 por electroforesis en un gel de agarosa formaldehído 0,8% y se transfirieron a una membrana de nilón (Duralone, Stratagene). La transferencia se hibridó y se lavó como se ha descrito en el Ejemplo 3 con una sonda de 1,3 kb marcada con ³²P preparada por marcaje aleatorio que abarca la SEQ ID NO: 8 y nucleótidos adicionales desde el 5'UTR y 3'UTR del ADNc de neublastina. La transferencia se expuso a un Hyperfilm MP (Amersham) a -80°C usando pantallas amplificadoras.

El medio condicionado de HiB5pUbi1zNBN22 o células HiB5 no transfectadas incubadas toda la noche en medio sin suero suplementado con suplemento N2 (Life Technologies; No. de Cat. 17502-048) se concentró y se separó en geles de poliacrilamida 15% (Amersham Pharmacia Biotech; No. de Cat. 80-1262-01). Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF (Amersham Pharmacia Biotech; No. de Cat. RPN-303F) y los sitios de unión no específica se bloquearon con leche en polvo desnatada 5% en PBS con 0,1% Tween-20. Las membranas se incubaron toda la noche con un anticuerpo policlonal frente a neublastina (1:1.000) seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Amersham Pharmacia Biotech; No. de Cat. NA 934) conjugado con peroxidasa de rábano (1:2.000). La inmunotinción se visualizó usando quimioluminiscencia incrementada (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech; No. de Cat. RPN2109) o ECL+ (Amersham Pharmacia Biotech; No. de Cat. RPN2132) según las instrucciones del fabricante (Amersham).

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 3. Las Figuras 3A y 3B son ilustraciones de la expresión de la proteína neublastina en células HiB5 transfectadas. El medio de toda la noche de células HiB5 no transfectadas [Carril 1], o de un clon de HiB5 transfectado de manera estable con el ADNc de neublastina [Carril 2] se concentraron como se describe más adelante. El medio se analizó por transferencia Western usando dos anticuerpos policlonales diferentes, Ab-1 y Ab-2 descritos en el Ejemplo 10, específicos para neublastina. En el medio derivado de las células transfectadas, se encontró que ambos anticuerpos reconocen una proteína con un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Esta proteína no se observó en las células HiB5 no transfectadas.

El ADNc clonado que codifica neublastina también puede insertarse en otro vector de expresión eucariota, p. ej., el vector de expresión eucariota TEJ-8 (*Johansen et al.*, *FEBS Lett.* 1990 **267** 289-294) o pcDNA-3 (Invitrogen) y el plásmido de expresión resultante se transfecta 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 madre neural humana. Las líneas celulares estables que expresan neublastina se usan, p. ej., para producir la proteína neublastina.

Expresión en Células CHO

Construcción del plásmido pJC070.14 Con el fin de expresar el ADNc de la Neublastina en células de Ovario de hámster chino, un fragmento de ADNc que codifica la forma prepro de la Neublastina humana se insertó en el vector de expresión de mamíferos pEAG347 para generar el plásmido pJC070.14. pEAG347 contiene los promotores temprano de SV40 y tardíos principales de adenovirus en tándem (derivados del plásmido pAD2beta; *Norton y Coffin, Mol. Cell. Biol.* 1985 **5** 281), un único sitio de clonación NotI, seguido de las señales de terminación de la transcripción y poliA tardías de SV40 (derivadas del plásmido pCMVbeta; *MacGregor y Caskey, Nucl. Acids Res.* 1989 **17** 2365). Además, pEAG347 contiene un núcleo de plásmido derivado de pUC19 y una dhfr derivada de pSV2dhfr para la selección con MTX y la amplificación en células CHO transfectadas.

El plásmido pJC070.14 se generó en dos etapas. En primer lugar, un fragmento que codifica la forma prepro de la Neublastina humana se aisló del plásmido pUbi1Z-NBN usando la reacción en cadena de la polimerasa con los oligonucleótidos KD2-824 5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCCA TGGAACCTTGG ACTTGGAGG3' [SEQ ID NO: 31], KD2-825 5'TTTTTTCTT GGCGGCCGCT CAGCCCAGGC AGCCGCAGG3' [SEQ ID NO: 32] y polimerasa PFU. El fragmento se clonó en el sitio Srf-1 de pPCR-Script Amp SK(+) para generar el plásmido pJC069. En la segunda etapa, se realizó 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 general el plásmido pJC070.14. La transcripción del gen de neublastina en el plásmido pJC070.14 está controlada por el promotor tardío principal de adenovirus.

Generación de líneas celulares CHO que expresan Neublastina. Se linealizaron 200 µg de pJC070.14 por digestión con la endonucleasa de restricción Mlu-1. El ADN se extrajo con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol. El ADN linealizado se resuspendió en 20 mM Hepes pH 7,05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM dextrosa (HEBS) y se introdujo en ~4E7 células CHO dukx B1 (*dhfr*-) (p23) por electroporación (280V y 960 µF). Después de la electroporación, se volvió a cultivar las células en Medio de Eagle Modificado α+ (MEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) durante dos días. Las células se tripsinizaron y se volvieron a colocar para cultivo en placas de 100 mm (100.000 células/placa) en α-MEM (que carece de ribo y desoxiribonucleósidos), suplementado con 10% FBS dializado, durante cinco días. Las células se subcultivaron posteriormente a una densidad de 100.000 células/placa de 100 mm y se seleccionaron en 200 nM metotrexato. Las colonias resistentes se seleccionaron y se escalaron hasta placas de 6 pocillos; el medio condicionado de cada clon se cribó usando un ensayo específico para neublastina descrito a continuación. Los doce clones que expresan el mayor nivel de neublastina se escalaron hasta matraces T162 y posteriormente se volvieron a ensayar. Como se muestra en la Figura 10, las líneas celulares CHO produjeron neublastina en el intervalo de 25 a 50 ng/ml.

Ensayo de complejo ternario para neublastina. Ensayamos la presencia de neublastina en el medio de sobrenadantes de la línea celular CHO usando una forma modificada de un ensayo de complejo ternario descrito por *Sanicola et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1997 94 6238)*.

En este ensayo, puede evaluarse la capacidad de las moléculas semejantes a GDNF para su capacidad de mediar la unión entre el dominio extracelular de RET y los distintos co-receptores, GFRα1, GFRα2 y GFRα3. Las formas solubles de RET y los co-receptores se generaron como proteínas de fusión. Se ha descrito (*Sanicola et al. Proc Natl Acad Sci USA 1997 94 6238*) 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 WO 9744356; 27 de noviembre, 1997, incorporada en la presente memoria por referencia) y el dominio Fc de IgG1 humana (rGFRα1-Ig).

Para generar una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GFRα3 murina y el dominio Fc de IgG1 humana (mGFRα3-Ig), se ligó un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 1-359 de RETL3 murina a un fragmento que contiene el dominio Fc de IgG1 humana y se clonó en el vector de expresión pEAG347 para generar el plásmido pGJ144. El plásmido pGJ144 se transfectó en células de Ovario de hámster chino (CHO) para generar una línea celular estable que produce la proteína de fusión, que se purificó en una columna de inmunoafinidad de Sefarosa Proteína A usando métodos estándar. En resumen, si la molécula semejante a GDNF puede mediar la unión del co-receptor a RET en este ensayo, la proteína de fusión RET-AP quedará retenida en la placa y la cantidad retenida puede medirse usando un sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina.

Se recubrieron placas Dynex Microlite-1 de ELISA (Dynex Technologies) con 1 µg/ml de anticuerpo de cabra específico para Fc humana en 50 mM bicarbonato/carbonato, pH 9,6 durante 16 h. Las placas se vaciaron y rellenaron con 300 µl de 1% I-block (Tropix) en TBS/0,5% Tween-20 (TBST) durante 1 h. Después de lavar tres veces con TBST los pocillos se rellenaron con 100 µl de 1 µg/ml rGFRα1-Ig o mGFRα3-Ig diluido en medio condicionado de células 293 EBNA que expresan el gen de fusión RET-AP. Se añadieron 100 µl de medio condicionado de los clones CHO de neublastina al pocillo superior de pocillos y se realizaron diluciones seriadas de 2 veces hacia abajo de cada fila de pocillos y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con TBST y dos veces con 200 mM Tris pH 9,8, 10 mM MgCl₂ (tampón CSPD). La disolución de lavado se reemplazó por 425 µM CSPD (Tropix) en tampón CSPD que contiene 1 mg/ml de

amplificador de la quimioluminiscencia Sapphire (Tropix) y se incubó durante 30' a temperatura ambiente. El resultado quimioluminiscente se midió usando un luminómetro Dynatech.

5 En los experimentos iniciales, investigamos si la neublastina producida por las líneas celulares CHO podría mediar la unión de GFR α 1 o GFR α 3 al dominio extracelular de RET. Como se muestra en la Figura 11, el medio condicionado del clon de células CHO #53 produjo una señal robusta en el ensayo de complejo ternario cuando se incluyó la proteína de fusión mGFR α 3-Ig pero no produjo señal cuando se incluyó la proteína de fusión rGFR α 1-Ig, lo que indica que la neublastina se une a GFR α 3 pero no a GFR α 1. Este comportamiento distingue claramente a la neublastina del GDNF; como se muestra en la Figura 11, el GDNF se une a GFR α 1 pero no a GFR α 3. No se observó ninguna señal con ninguna proteína de fusión de co-receptor, cuando se ensayó el medio condicionado de la línea celular CHO parental o medio solo.

10 Con el fin de cuantificar los niveles de expresión de la neublastina en las líneas celulares CHO, se preparó una curva estándar usando rGFR α 1-Ig y GDNF empezando a una concentración de 1 ng/ml. Las concentraciones de neublastina para las diferentes líneas celulares CHO se calcularon usando esta curva estándar; los niveles producidos por las cinco líneas celulares CHO se muestran en la Figura 10. Debido a que la estimación depende de la suposición no ensayada de que la afinidad de la unión entre GDNF y GFR α 1 es similar a la afinidad de la unión entre neublastina y GFR α 3, estos niveles son sólo aproximados.

Análisis de neublastina de sobrenadantes de la línea celular CHO.

20 Con el fin de analizar adicionalmente la neublastina producida por las líneas celulares CHO, la proteína se extrajo del medio usando la proteína de fusión GFR α 3-Ig y se analizó por transferencias western con anticuerpos policlonales producidos frente a péptidos de neublastina.

25 En el primer experimento, la neublastina se extrajo con mGFR α 3-Ig unida a lechos de Sefarosa. mGFR α 3-Ig se unió a los lechos de Sefarosa usando las condiciones sugeridas por el fabricante, Pharmacia Inc. Se añadieron 100 μ L de mGFR α 3-Ig-Sefarosa a muestras de 1,0 mL de medio condicionado de una línea celular CHO control negativo o de la línea celular CHO que produce neublastina #16. Las suspensiones se incubaron durante dos horas en una plataforma oscilante. Cada suspensión se centrifugó y el sobrenadante se retiró seguido de tres lavados con 1,0 mL de 10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,5. Cada resina se resuspendió en 100 μ L de 2x tampón de muestra reductor y se calentó a 100 $^{\circ}$ C durante 5 minutos. Se aplicaron 20 μ L del sobrenadante del tampón de muestra y 10 μ L de un estándar de peso molecular (FMC) en cada pocillo de un gel prefabricado 10-20% de SDS-PAGE (Owl Scientific). El gel se sometió a electroforesis a 40 mA voltaje constante durante 72 minutos.

30 Para el análisis por transferencia western, la proteína se electrotransfirió a nitrocelulosa (Schleicher y Schuell) en un aparato Hofer Scientific en el sistema de tampón 10 mM CAPS, 10% metanol, 0,05% SDS, pH 11,2 (45 minutos a 400 mA voltaje constante). Después de la transferencia, el filtro de nitrocelulosa se retiró del casete y los marcadores de peso molecular se visualizaron por tinción con una disolución de 0,1% Ponceau S en 1% ácido acético durante 60 segundos. La membrana se cortó en dos secciones y el exceso de tinción se eliminó por agitación suave en agua destilada. Las membranas se bloquearon en 2% de leche en polvo desnatada en TBS toda la noche a 4 $^{\circ}$ C. Las membranas se incubaron individualmente con dos de los anticuerpos anti-péptido neublastina purificados por afinidad (R30 y R31) a una concentración de 1,0 μ g/mL en 2% de leche en polvo desnatada en TBS). Las membranas se lavaron con tres lavados de 10 minutos en TBS-Tween y se incubaron en una dilución 1:5.000 de conjugado IgG-HRP anti-conejo de cabra (Biorad) durante 30 minutos. Las membranas se lavaron con tres 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 produce neublastina con ambos anticuerpos (carriles 2 y 4) cuando se compara con las bandas observadas en las proteínas extraídas de la línea celular control negativo (carriles 1 y 3).

45 El peso molecular de las especies menores es aproximadamente 13 kD y probablemente representa el dominio maduro de la neublastina, generado después de la escisión del pro-dominio. Esta escisión podría ocurrir después de uno cualquiera de los tres residuos Arg- (p. ej., -RXXR \downarrow -) de la prepro proteína neublastina para generar bien las formas 140 AA, 116 AA ó 113 AA, como se muestra en las SEQ ID NOS: 10, 11 ó 12, respectivamente. Se determinó que los pesos moleculares predichos de los polipéptidos de neublastina no modificados (es decir, que carecen de modificaciones posteriores a la traducción), NBN140 [SEQ ID NO: 10], NBN116 [SEQ ID NO: 11] y NBN113 [SEQ ID NO: 12], eran 14,7 kD, 12,4 kD y 12,1 kD, respectivamente. Se necesitan análisis adicionales para confirmar la estructura de estas especies así como de las otras bandas específicas de neublastina.

55 En el segundo experimento, la neublastina se extrajo con hGFR α 3-Ig capturada en una placa ELISA. Para generar una proteína de fusión entre el dominio extracelular de GFR α 3 humana (descrita en la solicitud publicada WO97/44356; 27 de noviembre, 1997, incorporada en la presente memoria por referencia) y el dominio Fc de IgG1 humana (hGFR α 3-Ig), se ligó un fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 1-364 de GFR α 3 humana a un fragmento que contiene el dominio Fc de IgG1 humana y se clonó en el vector de expresión CH269 descrito por *Sanicola et al.* (Proc Natl Acad Sci USA 1997 **94** 6238). La proteína de fusión codificada por este plásmido se

expresó de manera transitoria en células 293 que codifican el antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA) y se purificó en una columna de inmovilización de Sepharosa Proteína A usando métodos estándar.

Se recubrieron seis pocillos de una placa de 96 pocillos toda la noche a 4°C con anti-IgG humana de cabra (específica del fragmento Fc γ ; Jackson Immunologics) a una concentración de 25 mg/ml en PBS (300 ml/pocillo). Los pocillos se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 400 ml de 1% BSA en PBS. Después de 3 lavados con PBST (PBS + 0,05% Tween 20), se añadieron 300 ml de hGFR α 3-Ig (10 mg/ml en PBS que contiene 0,1% BSA) a cada pocillo. La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se agitó suavemente (200 revoluciones/min) para maximizar la unión. Los pocillos se vaciaron y se lavaron de nuevo 3 veces con PBST. Se añadieron 250 ml de medio condicionado de una línea celular CHO control negativo o de la línea celular CHO que produce neublastina #25 a cada uno de los 3 pocillos. La placa se incubó durante 3 h a temperatura ambiente y se agitó suavemente (300 revoluciones/min). Los pocillos se lavaron dos veces con PBST. Se añadieron 25 ml de tampón de carga Laemli no reductor al primer pocillo y la placa se agitó rápidamente durante 5 min para eluir las proteínas unidas (1.300 revoluciones/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 b-mercaptoetanol (5% final), las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida 10-20%.

Para el análisis por transferencia western, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa. La membrana se bloqueó y se ensayó en 5% de leche en polvo desnatada, PBST y se lavó en PBST. La neublastina se detectó por electroquimioluminiscencia después de reaccionar con anticuerpos policlonales (R30 y R31) producidos frente a dos péptidos de neublastina (a 1 μ g/ml) seguido de reacción con anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con HRP (BioRad). Como se muestra en la Figura 13, se detectaron cinco bandas específicas de neublastina en las proteínas extraídas de la línea celular CHO que produce neublastina (carril 2). Las dos bandas menores son muy similares a las bandas observadas en la Figura 12; de nuevo, la banda menor probablemente representa el dominio maduro de la neublastina generado después de la escisión del pro-dominio.

El análisis posterior (datos no mostrados) de las bandas de la Figura 13 muestra que la desglicosilación con PGNasa F de la banda de aproximadamente 18 kDa reduce esa banda a un tamaño equivalente a la banda más baja del gel de la Figura 13. Esto sugiere que la neublastina puede producirse como una proteína glicosilada en las células de mamífero.

Expresión de Neublastina en *E. coli*

Con el fin de expresar el gen de neublastina en *E. coli*, se construyeron singenes con un contenido en GC más bajo y codones preferidos de *E. coli*. El singén 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 el dominio maduro de la neublastina (NBN113) se fusiona directamente con una metionina de inicio. La construcción con pMJB164 se muestra en la Figura 15. En esta construcción, el dominio maduro de la neublastina se fusiona con una etiqueta de histidina (es decir, 10 histidinas) separadas por un sitio de escisión de enteroquinasa. La metionina de inicio precede a la etiqueta de histidina.

Secuencia de nucleótidos que codifica la neublastina en la Figura 14

```
ATGGCTGGAGGACCGGGATCTCGTGCTCGTGCGCAGCAGGAGCACGTGGCTGTCCG
TCTGCGTTCTCAACTAGTGCCGGTGCCTGCACTCGGACTGGGACACCGTTCCGA
CGAACTAGTACGTTTTCGTTTTGTTTCAGGATCTTGTCGTCGTGCACGTTCTCCG
CATGATCTATCTCTAGCATCTCTACTAGGAGCCGGAGCACTAAGACCGCCGCGG
GGATCTAGACCTGTATCTCAACCTTGTGTAGACCTACTAGATACGAAGCAGTAT
CTTTCATGGACGTAACCTCTACATGGAGAACCGTAGATAGACTATCTGCAACCGC
ATGTGGCTGTCTAGGATGATAATAG [SEQ ID NO: 29]
```

Secuencia de nucleótidos que codifica la neublastina etiquetada con his en la Figura 15

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACTCGAGCGGCCATATCGACG
 ACGACGACAAGGCTGGAGGACCGGGATCTCGTGCTCGTGACAGCAGGAGCACGT
 GGCTGTGCTGCGTTCTCAACTAGTGCCGGTGCCTGCACTCGGACTGGGACAC
 CGTTCCGACGAAGTACGTTTTCGTTTTGTTTCAGGATCTTGTCGTCGTGCAC
 GTTCTCCGCATGATCTATCTTAGCATCTCTACTAGGAGCCGGAGCACTAAGACC
 GCCGCCGGGATCTAGACCTGTATCTCAACCTTGTTGTAGACCTACTAGATACGAA
 GCAGTATCTTTCATGGACGTAACCTCTACATGGAGAACCGTAGATAGACTATCTG
 CAACCGCATGTGGCTGTCTAGGATGATAATAG [SEQ ID NO: 30]

Ejemplo 6: Efecto de la Neublastina en la supervivencia de Neuronas Dopaminérgicas Embrionarias de Rata y actividad ChAT

5 En esta serie de experimentos se evaluó el efecto del medio condicionado de células HiB5pUbi1zNBN22 productoras de neublastina descritas anteriormente.

Preparación de Cultivos: El mesencéfalo ventral o la médula espinal se diseccionó de embriones de rata E14 en Disolución Salina de Hanks Tamponada (HBSS) fría. Las piezas de tejido se incubaron en tripsina 0,1% esterilizada por filtración (Worthington) y 0,05% DNasa (Sigma) en HBSS a 37°C durante 20 min. Las piezas de tejido se lavaron
 10 cuatro veces en HBSS + 0,05% DNasa y se disociaron usando una pipeta automática de 1 ml. La suspensión se centrifugó a 600 rpm durante 5 min y el sedimento se resuspendió en medio condicionado con suero (SCM; DMEM con 10% suero fetal de ternera). El número total de células se evaluó por el método de exclusión de la tinción azul de tripán y se sembraron en placas a una densidad de 100.000 células/cm² en cámaras sobre porta de ocho pocillos recubiertas con poli-L-lisina (Nunc) para evaluar la supervivencia de neuronas dopaminérgicas o a 200.000
 15 células/cm² en placas de 48 pocillos (Nunc) para las medidas de la actividad ChAT. Las células se incubaron en SCM a 5% CO₂/95% O₂ y 95% humedad a 37°C durante 24-48 h antes de cambiar a medio sin suero (SFM) con la adición de los factores neurotróficos.

Las células para evaluar la supervivencia de neuronas dopaminérgicas se dejaron durante 5 días en SFM + adiciones de factor trófico y se fijaron durante 5 min en 4% PFA y se tiñeron para tirosina hidroxilasa por
 20 inmunohistoquímica.

Las células para actividad ChAT se dejaron durante 3 días con SFM y se lisaron en HBSS + 0,1% Tritón X-100 y se congelaron inmediatamente en nieve carbónica hasta la medida de la actividad Chat.

Adición de Factor Trófico: El medio condicionado se recogió de HiB5 no transfectada control o HiB5 productora de neublastina (HiB5pUbi1zNBN22) o GDNF (HiB5pUbi1zGDNF-L17). HiB5pUbi1zNBN22 produce aproximadamente
 25 20 ng de GDNF/24 horas/10⁵ células según se determina por GDNF-ELISA en medio condicionado, recogido de las células. Las líneas celulares respectivas se incubaron toda la noche con DMEM + 1% FCS y el sobrenadante se quitó y se almacenó a -20°C hasta su uso. Los sobrenadantes se diluyeron en 1:50 en SFM cuando se añadieron a las células. Se trataron pocillos independientes con sobrenadante control de HiB5 (1:50) + GDNF de rata recombinante purificado (de 0,03 - 10 ng/ml).

30 Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 4. Las FIGS 4A-4C son ilustraciones del efecto de la neublastina, secretada por células HiB5pUbi1zNBN22, en la supervivencia de neuronas embrionarias dopaminérgicas del mesencéfalo ventral de rata cultivadas, y actividad ChAT en neuronas motoras colinérgicas del nervio craneal en medio sin suero como se describe más adelante en el Ejemplo 5.1.

La FIG. 4A es una ilustración de la curva dosis-respuesta para GDNF recombinante en la actividad ChAT (dpm/hora) medida en DIV5 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente a partir de mesencéfalo ventral E14 [es
 35 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 ChAT (dpm/hora) medida en DIV5 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente a partir de mesencéfalo ventral E14. Se añadió medio condicionado diluido de células productoras de neublastina HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o células productoras de GDNF HiB5GDNFL-17 (GDNFL-17) como se indica en la figura [es decir, neublastina 1:10; neublastina 1:50; GDNF L-17 1:50].
 40

La FIG. 4C es una ilustración del número de células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa por pocillo [No. células TH+/pocillo] en DIV7 en cultivos sin suero que se establecieron inicialmente a partir de mesencéfalo ventral de rata E14. Se añadió medio condicionado diluido de células HiB5 no transfectadas (HiB5) o células productoras de neublastina HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o GDNF recombinante, en varias concentraciones, como se indica en
 45 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 neublastina diluido 1:40 incrementa significativamente el número de células inmunoreactivas para TH por pocillo, comparado con células HiB5 control (no transfectadas) a una dilución equivalente y más baja (1:10 y 1:40) (véase, p. ej., la Fig. 4B). El incremento en las células inmunoreactivas para TH es comparable con el incremento observado a una concentración máxima de GDNF (10 ng/ml). Esto indica que la neublastina secretada al medio tiene un efecto en la supervivencia de la población de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral embrionario de rata. Por el contrario, a diferencia del GDNF secretado por las células HiB5 transfectadas, no se observa ningún 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).

10 **Ejemplo 7: Efecto de la Neublastina en la supervivencia de cultivos de secciones de neuronas embrionarias dopaminérgicas del mesencéfalo ventral de cerdo.**

En este experimento el efecto de co-cultivar células productoras de neublastina HiB5pUbi1zNBN22 con cultivos de secciones de mesencéfalos ventrales de embriones porcinos.

15 **Preparación de los Cultivos:** Los mesencéfalos ventrales (VM) se aislaron de embriones porcinos (E28; n=12) bajo condiciones estériles, se cortaron en rodajas de 400 μm y se pusieron en disolución salina equilibrada de Gey helada (GIBCO) con glucosa (6,5 mg/ml). Las rodajas de tejido se cultivaron por el método de cultivo en interfase, desarrollado originariamente por *Stoppini et al.* [*L. Stoppini, P.A. Buchs, D. Muller, J. Neurosci. Methods* 1991 **37** 173-182].

20 Brevemente, las secciones se pusieron en membranas semi-porosas (Millipore, 0,3 μm ; 8 rodajas/membrana que corresponden a un VM) puestas como insertos en placas de 6 pocillos (Costar) con medio que contiene suero (Gibco BRL). Cada pocillo contenía 1 ml de medio (50% Optitem, 25% suero de caballo, 25% disolución salina equilibrada de Hank (todos de GIBCO)) suplementado con D-glucosa a una concentración final de 25 mM. En el día 0, 7.000 células HiB5pUbi1zNBN22 transfectadas (neublastina) o 7.000 células HiB5 no transfectadas (control) se sembraron en cada rodaja de tejido. Los co-cultivos se crecieron en primer lugar en un incubador a 33°C durante 48 horas lo que permite que las células HiB5 se inmortalicen con un oncogén sensible a la temperatura para proliferar y entonces se pusieron en un incubador a 37°C, en el que las células HiB5 se diferencian. El medio se cambió dos veces a la semana. En ninguna etapa se utilizó antimetabólicos ni antibióticos.

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

30 **Procesamiento del Tejido e Inmunohistoquímica:** En el día 21, los cultivos se fijaron en 4% paraformaldehído en tampón fosfato durante 60 min, se deshidrataron en una disolución de 20% sacarosa durante 24 horas, se congelaron, se seccionaron en criostato a 20 μm (4 series) y se montaron en portas de microscopio recubiertos con gelatina. Una serie de secciones se inmunotizó para tirosina hidroxilasa (TH). Brevemente, las secciones se lavaron en 0,05 M disolución salina tamponada con tris (TBS, pH 7,4) que contiene 1% Tritón X-100 durante 3x15 min. y se incubaron con 10% suero fetal bovino (FBS, Life Technologies) en TBS durante 30 min. 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 10% FBS. Después de lavar en TBS con 1% Tritón X-100 durante 3x15 min., las secciones se incubaron durante 60 min. con anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado (Amersham) diluido 1:200 en TBS con 10% FBS. Las secciones se lavaron en TBS con 1% Tritón X-100 (3x15 min.) y se incubaron durante 60 min. con estreptavidina-peroxidasa (Dako) diluida 1:200 en TBS con 10% FBS. Después de lavar en TBS (3x15 min.), el anticuerpo unido se visualizó por tratamiento con 0,05% de 3,3-diaminobencidina (Sigma) en TBS que contiene 0,01% H₂O₂. Finalmente, las secciones se deshidrataron en alcohol, se aclararon en xileno y se cubrieron con un porta en Eukitt.

35 **Recuentos de células y análisis morfométrico:** La cuantificación de las neuronas inmunoreactivas TH-ir se realizó usando microscopía de campo brillante (Olympus). Sólo se cuentan las células que presentan una tinción intensa con una estructura celular bien conservada y un núcleo diferenciado. La estimación se basó en los recuentos celulares en cada cuarta sección de cultivo usando un objetivo 20x. Los números de células se corrigieron por doble recuento según 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 μm , n = 30). El tamaño de los núcleos se estimó usando un sistema de rastreo de neuronas (NeuroLucida, MicroBrightField, Inc.).

40 Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 5. Las FIGS 5A-5C son ilustraciones del efecto de la neublastina secretada de células HiB5pUbi1zNBN22 en la función y supervivencia de cultivos de secciones de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral de embriones de cerdo, co-cultivadas con células HiB5pUbi1zNBN22 (neublastina) o células HiB5 (control) como se ha describe más adelante. FIG. 5A y Fig. 5B: 45 ilustran la dopamina liberada al medio en DIV12 [Dopamina (pmoles/ml) - día 12] y en DIV21 [Dopamina (pmoles/ml) - día 21], respectivamente. La FIG. 5C es una ilustración del número de células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa por cultivo [células TH-ir por cultivo] en DIV21.

En el día 12, el análisis por HPLC reveló que el medio de co-cultivos HiB5-neublastina contenía 84% más de dopamina que el medio de co-cultivos HiB5-C (Fig. 5A). En el día 21, la diferencia fue 78% (Fig. 5B) y los recuentos celulares mostraron que los co-cultivos HiB5-neublastina contenían 66% más de neuronas inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa que los co-cultivos HiB5-C ($P < 0,05$) (Fig. 5C). Esto indica que la Neublastina secretada por el clon HiB5pUbi1zNBN22 tiene un efecto potente en la supervivencia de neuronas porcinas embrionarias dopaminérgicas.

Ejemplo 8: Supervivencia de Células del Ganglio de la Raíz Dorsal en Medio sin Suero

Este ejemplo muestra la actividad neurotrófica de un polipéptido de Neublastina en comparación con factores neurotróficos conocidos.

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

15 Se usaron agujas de tungsteno afiladas electrolíticamente para diseccionar los ganglios de la raíz dorsal a partir de etapas indicadas de ratones C57/Bl6 (Møllegaard Breeding, Dinamarca). Los ganglios embrionarios se incubaron durante 5 minutos a 37°C con 0,05% tripsina (Gibco/BRL) en disolución salina equilibrada de Hank sin calcio ni magnesio. Los ganglios postnatales se trataron con colagenasa/dispasa 1 mg/ml durante 30 a 45 minutos y después tripsina/DNasa 0,25% durante 15 minutos. Después de la eliminación de la disolución de tripsina, los ganglios se lavaron una vez con 10 ml de DMEM que contiene 10% de suero de caballo inactivado con calor y se trituraron suavemente con pipeta Pasteur pulida con fuego para proporcionar una suspensión de células únicas.

20 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc), que se precubrieron 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 humidificado con 5% CO₂ en un medio definido que consiste en Hams F14 suplementado con 2 mM glutamina, 0,35% albúmina de suero bovino, 60 ng/ml progesterona, 16 mg/ml putrescina, 400 ng/ml L-tiroxina, 38 ng/ml selenito de sodio, 340 ng/ml triyodo-tironina, 60 mg/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomocina.

25 Después de 48 horas de incubación, las neuronas se reconocieron claramente por su morfología bipolar bajo ópticas de contraste de fase. El porcentaje de supervivencia neuronal en ausencia o presencia de factores tróficos (añadidos al medio de cultivo antes de sembrar en placas las neuronas a 10 ng/ml) o de medio condicionado de las células productoras de Neublastina HiB5pUbi1zNBN22, se evaluó contando las neuronas en los pocillos a las 48 horas.

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Fig. 9, en dicha figura:

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

30 1 representa los experimentos en presencia de GDNF;

2 representa los experimentos en presencia de Neurturina;

3 representa los experimentos en presencia de Neublastina de la invención;

E12 representa los datos de los experimentos realizados en células DRG aisladas el día embrionario 12;

E16 representa los datos de los experimentos realizados en células DRG aisladas el día embrionario 16;

35 P0 representa los datos de los experimentos realizados en células DRG aisladas el día de nacimiento;

P7 representa los datos de los experimentos realizados en células DRG aisladas el día 7 después del nacimiento; y

P15 representa los datos de los experimentos realizados en células DRG aisladas el día 15 después del nacimiento.

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

Ejemplo 9: Efectos in vivo de Neublastina en neuronas dopaminérgicas nigrales

Con el fin de ensayar la capacidad de la Neublastina (neublastina) para proteger neuronas dopaminérgicas (DA) nigrales adultas de degeneración inducida por 6-hidroxi-dopamina, empleamos un modelo de rata de enfermedad de Parkinson (*Sauer y Oertel, Neuroscience* 1994 **59**, 401-415) y transferencia génica lentiviral de Neublastina.

45 **Producción de lentivirus:** Para generar un vector de transferencia lentiviral que codifica Neublastina, pHR'-neublastina, se subclonó un fragmento BamH1 de 1.331 pb del ADNc de Neublastina en el sitio BamH1/Bg II de pSL301 (Invitrogen). De esta construcción se cortó un fragmento BamH1/Xho1 de 1.519 pb y se ligó en el sitio BamH1/Xho1 de pHR' que porta un fragmento posterior a la traducción 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 general
50 pHR-GDNF se ligó un fragmento BamH1/Xho1 de 701 pb de pUbi1z-GDNF en el sitio BamH1/Xho1 de pHR'.

La producción del vector lentiviral se ha descrito p. ej. por Zufferey *et al.* (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 co-transfectaron en células 293T. Los viriones liberados al medio se recogieron a las 48 y 72 h después de la transfección. Para concentrar el virus, el medio se centrifugó 1,5 h a 141.000g y el sedimento se disolvió en DMEM. Se determinó que la titulación de un control que porta el gen para la Proteína Verde Fluorescente ("GFP") era 10^8 unidades transformadoras (TU)/ml por fluorescencia GFP en las 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 titulación de las partículas virales. En el sobrenadante de GDNF y sobrenadante de neublastina había 10 veces menos partículas comparado con el sobrenadante de GFP.

Procedimientos Quirúrgicos: Todo el trabajo que implica animales se realizó según las normas dictadas por el Comité Ético para Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Lund.

Se usó un total de 21 ratas hembra adultas jóvenes Sprague-Dawley (B&K Universal, Estocolmo, Suecia) y se estabularon bajo un ciclo de 12 horas luz:oscuridad con acceso libre a pienso de rata y agua. El marcaje retrógrado y las lesiones por 6-OHDA se realizaron 3 semanas antes de la lesión según Sauer y Oertel (Sauer y Oertel, Neuroscience 1994 **59** 401-415). Brevemente, bajo anestesia con Equithesin (0,3 ml/100 g) se inyectaron bilateralmente a las ratas 0,2 μ l de una disolución 2% (disuelta en 0,9% NaCl) del trazador retrógrado Fluoro-Gold (FG; Fluorochrome, Inc., Englewood, CO). Las inyecciones se hicieron usando una jeringa Hamilton de 2 μ l en las coordenadas: AP= +0,5 mm; ML= \pm 3,4 mm respecto a bregma; DV= -5,0 mm respecto a la dura y la barra de los incisivos ajustada a 0,0 mm. Además se inyectaron 0,05 μ l/min con una espera de otros 5 min antes de retraer la aguja.

Catorce días después de las inyecciones de FG, los animales recibieron un total de 5 depósitos (1 μ l/depósito) de un vector lentiviral que porta el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), neublastina o GDNF. Cuatro de los depósitos fueron en el cuerpo estriado a lo largo de dos extensiones de aguja en las coordenadas siguientes; AP= +1,0 mm, ML= -2,6 mm, DV₁= -5,0 mm, DV₂= -4,5 mm y AP= 0,0 mm, ML= -3,7 mm, DV₁= -5,0 mm, DV₂= -4,5 mm. El depósito supranigral se hizo en AP= -5,2 mm, ML= -2,0 mm, DV₁= -6,3 mm. La barra de dientes se ajustó a -2,3 mm.

Veintiún días después del marcaje retrógrado, y 7 días después de las inyecciones lentivirales, los animales de volvieron a anestesiarse y con una jeringa Hamilton de 10 μ l se inyectó un único depósito de 20 μ g de 6-OHDA (Sigma; calculado como base libre y disuelto en 3 μ l de disolución salina enfriada en hielo suplementada con 0,02% ácido ascórbico) en el cuerpo estriado derecho en la misma localización que los depósitos de FG. La velocidad de la inyección fue 1 μ l/min, dejando otros 3 min antes de retraer la aguja.

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

Evaluación Cuantitativa de las Neuronas Dopaminérgicas en la SN: El número de FG marcada en la *pars compacta* de la SN se evaluó por un observador ciego como se ha descrito anteriormente (Sauer y Oertel, Neuroscience 1994 **59** 401-415). Brevemente, se usaron tres secciones consecutivas centradas alrededor del nivel del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio (MTN; -5,3 en el atlas de Paxinos y Watson (1997)) y todas las neuronas marcadas/teñidas lateralmente respecto a MTN se contaron a un aumento 40x (n=6-7/grupo). Las neuronas marcadas con FG se incluyeron si eran intensamente fluorescentes bajo epi-iluminación a 330 nm, presentaban un perfil neuronal y se extendían al menos un proceso neurítico.

En el lado de la lesión en los animales que reciben inyecciones de lentivirus que portan GFP, el número de neuronas nigrales FG positivas se redujo hasta 18% respecto al del lado intacto. Por el contrario, los animales a los que se había inyectado lenti-neublastina mostraron una protección casi completa del número de neuronas nigrales FG positivas (89%). Esto fue tan eficaz como los animales tratados con lenti-GDNF en los que el 87% de las neuronas marcadas retrógradamente permanecieron en el lado lesionado. Esto muestra que la neublastina es un factor de supervivencia potente para las neuronas dopaminérgicas nigrales adultas lesionadas y que es tan potente como GDNF.

La FIG. 6 es una ilustración del efecto *in vivo* de neublastina producida por lentivirus en las neuronas dopaminérgicas nigrales. Las neuronas de la *pars compacta* de la SN, en ratas hembra Sprague-Dawley, se marcaron retrógradamente con Fluorogold (FG), 3 semanas antes de una única inyección de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el cuerpo estriado derecho. Una semana antes de la inyección de 6-OHDA, los animales recibieron inyecciones con vectores lentivirales que expresan neublastina [neublastina], GDNF [GDNF] o la Proteína Verde

Fluorescente [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 [%FG lesión/intacto] de neuronas marcadas con FG en el lado lesionado (derecho) frente al lado intacto (izquierdo) del cuerpo estriado de los tres grupos de animales.

5 **Ejemplo 10: Producción de Anticuerpos**

Para preparar anticuerpos frente a neublastina, se inmunizaron dos conejos bien con el péptido 1: CRPTRYEAVSFMDVNST (aminoácidos 108-124 de SEQ ID NO: 9); o con el péptido 2: ALRPPPGSRPVSQPC (aminoácidos 93-107 de SEQ ID NO: 9) conjugado con una proteína transportadora en intervalos de 3 semanas. Se inmunizaron dos conejos para cada péptido en la semana 0, 3, 6 y 10, y se recogieron muestras de sangre en la semana 7 y 11. La segunda muestra de sangre se purificó por afinidad mediante una columna de afinidad de péptidos. Los anticuerpos se denominaron Ab-1 y Ab-2, según el péptido.

Transferencia Western: Se incubaron 2×10^6 células HiB5, transfectadas de manera estable con el ADNc de la neublastina (Hib5pUbi1zNBN22) o células HiB5 no transfectadas, toda la noche en medio sin suero con suplemento de N_2 (GIBCO). El medio se concentró en concentradores pequeños con membranas con un punto de corte de 5 kDa (Millipore, Bedford, MA). A las muestras concentradas se añadió tampón de muestra Laemmli 5 x y se calentaron a $95^\circ C$ durante 5 minutos. Las muestras se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en geles de 15% acrilamida y se transfirieron a membranas PVDF. Los sitios de unión de proteína residuales se bloquearon con 5% de leche en polvo desnatada en PBS con 0,1% Tween-20. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpo neublastina (1:1.000) seguido de incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:2.000).

La inmunotinción se visualizó usando quimioluminiscencia incrementada Plus (ECL+) según las instrucciones del fabricante (Amersham). Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 3 y el Ejemplo 5.

Usando técnicas estándar, también produjimos anticuerpos policlonales de conejo frente a los péptidos siguientes:

Péptido R27: GPGSRARAAGARGC (aminoácidos 30-43 de SEQ ID NO: 9);

25 Péptido R28: LGHRSEDLVRFRC (aminoácidos 57-70 de SEQ ID NO: 9);

Péptido R29: CRRARSPHDLSL (aminoácidos 74-85 de SEQ ID NO: 9);

Péptido R30: LRPPPGSRPVSQPC (aminoácidos 94-107 de SEQ ID NO: 9); y

Péptido R31: STWRTVDRLSATAC (aminoácidos 123-136 de SEQ ID NO: 9).

30 Sólo los péptidos R30 y R31, relativamente cercanos al extremo C terminal, reconocieron la proteína desnaturalizada bajo condiciones reductoras en una transferencia Western.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <160> 33
<170> PatentIn versión 2.0

<210> 1
<211> 865
40 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
45 <222> (120)..(719)

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(119)
50
<220>
<221> 3'UTR
<222> (721)..(865)

55 <220>
<221> péptido_ señal

<222> (120)..(179)
 <220>
 <221> péptido_maduro
 5 <222> (405)..(719)
 <220>
 <221> estructura_miscelánea
 <222> (661)..(663)
 10 <223> CARBOHID: Asparagina glicosilada en Asn87
 <220>
 <221> estructura_miscelánea
 <222> (426)..(623)
 15 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys8-Cys73
 <220>
 <221> estructura_miscelánea
 <222> (507)..(707)
 20 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys35-Cys101
 <220>
 <221> estructura_miscelánea
 <222> (519)..(713)
 25 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys39-Cys103
 <220>
 <221> estructura_miscelánea
 <222> (616)..(619)
 <223> DISULFURO: puente de disulfuro de intercadena Cys72-Cys72
 30 <400> 1

ES 2 373 173 T3

ctaggagccc atgcccggcc tgatctcagc ccgaggacag cccctccttg aggtccttcc 60
tccccaagcc cacctgggtg ccccttttct ccttgaggct ccaattgggc 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 ctccagggt ttgcagactg 749
Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
100 105
gacccttacc ggtggctctt cctgcctggg accctcccgc agagtcccac tagccagcgg 809
cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg agaggcccct gccggtgggt gatgga 865

5 <210> 2
<211> 200
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

ES 2 373 173 T3

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
- 5 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (7)..(717)

- <220>
- <221> 5'UTR
- 15 <222> (1)..(6)

- <220>
- <221> 3'UTR
- <222> (718)..(861)

- 20 <220>
- <221> péptido_señal
- <222> (7)..(174)

- 25 <220>
- <221> péptido_maduro
- <222> (298)..(717)

- <220>
- <221> péptido_maduro

ES 2 373 173 T3

```

<222> (370)..(717)
<220>
<221> péptido_maduro
5 <222> (379)..(717)

<220>
<221> estructura_miscelánea
<222> (661)..(663)
10 <223> CARBOHID: Asparagina glicosilada en Asn122

<220>
<221> estructura_miscelánea
<222> (424)..(621)
15 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys43-Cys108

<220>
<221> estructura_miscelánea
<222> (505)..(705)
20 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys70-Cys136

<220>
<221> estructura_miscelánea
<222> (517)..(711)
25 <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys74-Cys138

<220>
<221> estructura_miscelánea
<222> (616)..(618)
30 <223> DISULFURO: puente de disulfuro de intercadena Cys107-Cys107
<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

```

ES 2 373 173 T3

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
 -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 ggc cgc 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 ggc 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 ggc 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 ctccagggct ttgcagactg gacccttacc ggtggctctt cctgcctggg 777

accctcccgc agagtccac tagccagcgg cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg 837

agaggcccct gccggtgggt gatg 861

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

<400> 4

5

10

ES 2 373 173 T3

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
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> Donde Xaa en la posición 134 designa Asn o Thr,
 e Yaa en la posición 135 designa Ala o Pro

<400> 5

ES 2 373 173 T3

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala 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 Yaa Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

<210> 6
 <211> 116
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 10 <223> Donde Xaa en la posición 110 designa Asn o Thr,
 e Yaa en la posición 111 designa Ala o Pro

<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
 15 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 Yaa Cys
 100 105 110
 Gly Cys Leu Gly
 115

<210> 7

ES 2 373 173 T3

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <223> Donde Xaa en la posición 107 designa Asn o Thr,
 e Yaa 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 Yaa Cys Gly Cys Leu
 100 105 110

10 Gly
 <210> 8
 <211> 861
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(717)

20 <220>
 <221> 5'UTR
 <222> (1)..(57)

25 <220>
 <221> 3'UTR
 <222> (718)..(861)

30 <220>
 <221> péptido_señal
 <222> (58)..(174)

<220>
 <221> péptido_maduro
 35 <222> (298)..(717)

<220>
 <221> péptido_maduro
 <222> (370)..(717)

40 <220>
 <221> péptido_maduro

ES 2 373 173 T3

```

<222> (379)..(717)

<220>
<221> estructura_misclánea
5 <222> (661)..(663)
   <223> CARBOHID: Asparagina glicosilada en Asn122

<220>
<221> estructura_misclánea
10 <222> (424)..(621)
   <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys43-Cys108

<220>
<221> estructura_misclánea
15 <222> (505)..(705)
   <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys70-Cys136

<220>
<221> estructura_misclánea
20 <222> (517)..(711)
   <223> DISULFURO: puente de disulfuro Cys74-Cys138

<220>
<221> estructura_misclánea
25 <222> (616)..(618)
   <223> DISULFURO: puente de disulfuro de intercadena Cys107-Cys107
   <400> 8
   aggagggtgg ggaacagct caacaatggc tgatgggccc 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

```

ES 2 373 173 T3

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 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 ggc tgagggctcg 727
 Asp Arg Leu Ser Ala Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

ctccagggct ttgcagactg gacccttacc ggtggctctt cctgcctggg accctcccgc 787

agagtcccac tagccagcgg cctcagccag ggacgaaggc ctcaaagctg agaggcccct 847

accggtgggt gatg 861

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

5

<400> 9

ES 2 373 173 T3

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
 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 Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

- <210> 10
- <211> 140
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CARBOHID
- 10 <222> (122)
- <223> Asparagina glicosilada
- <400> 10

ES 2 373 173 T3

Pro Pro Pro Gln Pro Ser Arg Pro Ala 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
 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 Thr Ala Cys Gly Cys Leu Gly
 130 135 140

5 <210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CARBOHID
 <222> (98)
 <223> Asparagina glicosilada

<400> 11
 Ala Ala Arg Ala Gly Gly Pro Gly Ser 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 Thr Ala Cys
 100 105 110
 Gly Cys Leu Gly
 115

15 <210> 12
 <211> 113

ES 2 373 173 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 5 <221> CARBOHID
 <222> (95)
 <223> asparagina glicosilada

<400> 12

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
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13
 cctggccagc ctactgggcg cgggggccct gcgaccgcc cggggtccc ggcccgtcag 60
 ccagccctgc tgccgaccca cgcgctacga agcgggtctcc tt 102

20 <210> 14
 <211> 220
 <212> ADN
 <213> *Murinae* gen. sp.

25 <400> 14
 ggccaccgct ccgacgagct gatacgtttc cgcttctgca gcggtctgtg ccgccgagca 60
 cgctcccagc acgatctcag tctggccagc ctactgggcg ctggggccct acggtcgcct 120
 cccgggtccc ggccgatcag ccagccctgc tgccggccca ctcgctatga ggccgtctcc 180
 ttcatggagc tgaacagcac ctggagaacc gtggaccgcc 220

30 <210> 15
 <211> 2136
 <212> ADN
 <213> *Murinae* gen. sp.

35 <220>
 <221> CDS
 <222> (975)..(1646)

ES 2 373 173 T3

```

<400> 15
g c g g c c g c g a a t t c g g c a c g a g g g c g t c t c g c t g c a g c c c g c g a t c t c t a c t c t g c c t c c 60
t g g g g t c t t c t c c a a a t g t c t a g c c c c c a c c t a g a g g g a c c t a g c c t a g c c a g c g g g g a c 120
c g g a t c c g g a g g g t g g a g c g c c a g g t g a g c c c t g a a a g g t g g g g c g g g c g g g g c g c t 180
c t g g g c c c c a c c c c g g g a t c t g g t g a c g c c g g g g c t g g a a t t t g a c a c c g g a c g g c g g c g 240
g g c a g g a g g c t g c t g a g g g a t g g a g t t g g g c t c g g c c c c a g a t g c g g c c c g c g g g c t c t 300
g c c a g c a a c a a g t c c c t c g g g c c c a g c c c t c g c t g c g a c t g g g g c t t g g a g c c c t g c a c 360
c c a a g g g c a c a g a c c g g t g c c a a g g c c c a c t t t t a a c t a a a a g a g g c g c t g c c a g g t g 420
c a c a a c t c t g g g c a t g a t c c a c t t g a g c t t c g g g g a a a g c c c a g c a c t g g t c c c a g g a g 480
a g g c g c c t a g a a g g a c a c g g a c c a g g a c c c t t t g g t a t g g a g t g a a c g c t g a g c a t g g a 540
g t g g a a g g a a c t c a a g t t a c t a c t t t c t c c a a c c c c t g g t a c c t t c a g c c c t g a a g t a 600
c a g a g c a g a a g g g t c t t a g a g a c a g a c a g c t g t g t g a g t c t c c c c c t g a g g c c t 660
t a g a c g a t c t c t g a g c t c a g c t g a g c t t t g t t g c c c a t c t g g a g a a g t g a g c a t t g a t 720
t g a c c t t g t g c a t c g c g a a g g a a c a g g t c t g c c a a g c a c c t a a c a c a g a g a c a a g g t 780
t c t c c a t c g c a g c t a c c g c t g c t g a g t t g a c t c t a g c t a c t c c a a c c t c c t g g g t c g c t t 840
c g a g a g a c t g g a g t g g a a g g a g g a a t a c c c c a a a g g a t a a c t a a c t a t c t t t c a g t t t g 900
c a a g c t g c c g c a g g a a g a g g t g g g g g a a a c g g g t c c a c g a a g g c t t c t g a t g g g a g c t t c 960
t g g a g c c g a a a g c t a t g g a a c t g g a c t t g c a g a g c c t a c t g c a t t g t c c 1010
      Met Glu Leu Gly Leu Ala Glu Pro Thr Ala Leu Ser
      1          5          10
c a c t g c c t c c g g c c t a g g t g g c a g t c a g c c t g g t g g c c a a c c t a g c t 1058
His Cys Leu Arg Pro Arg Trp Gln Ser Ala Trp Trp Pro Thr Leu Ala
      15          20          25

```

ES 2 373 173 T3

ggt 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 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 ccg acc aca gat gcg 1346
Ala Ala Arg Ala Gly Thr Arg Ser Ser Arg Ala Arg Thr Thr Asp Ala
110 115 120

gcg 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 ccg 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 Cys 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 gcc tgaggatgat ctatctccaa gcctttgcac actagacca 1686
Gly Cys Leu Gly

tgtgttgcct tacctggaac agctccaccg ggcctcacta 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

cgcgttgctg gaccagcctg tgctgaaacc agtcccgtgt tcacttgtgg aagccgaagc 2046

cctatttatt atttctaaat tatttattta ctttgaaaaa aaacggccaa gtcggcctcc 2106

ctttagttag ggtaatttg tgatcccggg 2136

- 5 <210> 16
<211> 224
<212> PRT
<213> *Murinae* gen. sp.

ES 2 373 173 T3

<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

5 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
 <400> 17
 cctggccagc ctactggg 18

15 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
 <400> 18
 aaggagaccg cttcgtagcg 20

ES 2 373 173 T3

	<210> 19	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
10	<400> 19	
	atggaacttg gacttg	17
	<210> 20	
	<211> 16	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
20	<400> 20	
	tccatcacc accggc	16
	<210> 21	
25	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
	<400> 21	
	ggccaccgct cgcgag	18
35	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
	<400> 22	
45	ggcggccac ggtctccag	20
	<210> 23	
	<211> 29	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
	<400> 23	
55	ccaagcccac ctgggtgccc tctttctc	29
	<210> 24	
	<211> 27	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR	
65	<400> 24	
	catcaccac cggcaggggc ctctcag	27

ES 2 373 173 T3

<210> 25
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

 10 <400> 25
 gagcccatgc ccggcctgat ctgagcccga ggaca 35

 <210> 26
 <211> 34
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR
 20
 <400> 26
 ccctggctga ggccgctggc tagtgggact ctgc 34

 <210> 27
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda de hibridación
 30
 <400> 27
 ncaggtggtc cgtggggggc gccaaagaccg g 31

 35 <210> 28
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

 <400> 28
 45 ctaggagccc atgccc 16

 <210> 29
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 29
 atggctggag gaccgggatc tcgtgctcgt gcagcaggag cacgtggctg tcgtctgcgt 60
 tctcaactag tgccggtgcg tgcactcgga ctgggacacc gttccgacga actagtacgt 120
 tttcgttttt gttcaggatc ttgtcgtcgt gcacgttctc cgcattgatct atctctagca 180
 tctctactag gagccggagc actaagaccg ccgccgggat ctgacctgt atctcaacct 240
 tgtttagtagac ctactagata cgaagcagta tctttcatgg acgtaaactc tacatggaga 300
 accgtagata gactatctgc aaccgcatgt ggctgtctag gatgataata g 351

 <210> 30
 55 <211> 414
 <212> ADN

ES 2 373 173 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 30
 atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcactcga gcggccatat cgacgacgac 60
 gacaaggctg gaggaccggg atctcgtgct cgtgcagcag gagcacgtgg ctgtcgtctg 120
 cgttctcaac tagtgccggt gcgtgcactc ggactggggac accgttccga cgaactagta 180
 cgttttcggt tttgttcagg atcttgctgt cgtgcacggt ctccgcatga tctatctcta 240
 gcatctctac taggagccgg agcactaaga ccgccgccgg gatctagacc tgtatctcaa 300
 ccttgttgta gacctactag atacgaagca gtatctttca tggacgtaaa ctctacatgg 360
 agaaccgtag atagactatc tgcaaccgca tgtggctgtc taggatgata atag 414

5

<210> 31
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

15

<400> 31
 aaggaaaaa gcggccgcca tggaactgg actggagg 39

20

<210> 32
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

<400> 32
 tttttcctt ggcggccgct cagcccaggc agccgcagg 39

30

<210> 33
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador PCR

<400> 33
 gagcgagccc tcagcc 16

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido de Neublastina aislado que codifica un polipéptido que posee actividad neurotrófica, en el que el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ NO: 1,
 - 5 b) un polinucleótido que codifica un polipéptido de Neublastina o un polipéptido derivado de éste, en el que la parte madura de dicho polipéptido presenta un grado de identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2;
 - c) un polinucleótido que hibrida específicamente bajo condiciones de hibridación de una disolución de astringencia alta con el ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos complementaria a la SEQ ID NO: 1;
 - 10 d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 70% idéntica a la secuencia del polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que la parte madura del polipéptido codificado presenta un grado de identidad de al menos 95% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2.
- 15 3. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es SEQ ID NO: 2.
5. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es SEQ ID NO: 4.
6. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es SEQ ID NO: 5.
- 20 7. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es SEQ ID NO: 6.
8. El polinucleótido de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado es SEQ ID NO: 7.
9. El polinucleótido de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.
10. El polinucleótido de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1.
- 25 11. El polinucleótido de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90% idéntica a la secuencia de polinucleótido presentada como SEQ ID NO: 1.
12. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Una célula huésped aislada que comprende el vector de expresión de la reivindicación 12.
14. La célula de la reivindicación 13, en la que dicha célula es una célula eucariota.
- 30 15. La célula de la reivindicación 14, en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula fúngica y una célula de levadura.
16. La célula de la reivindicación 15, en la que dicha célula de mamífero se selecciona del grupo que consiste en una célula de ovario de hámster chino, HEK293, COS, PC12, HiB5, RN33b y una célula madre neural humana.
- 35 17. Un polipéptido en el que la parte madura de dicho polipéptido presenta un grado de identidad de al menos 90% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2, en el que dicho polipéptido posee actividad neurotrófica.
18. El polipéptido de la reivindicación 17, en el que la parte madura de dicho polipéptido presenta un grado de identidad de al menos 95% con los aminoácidos 1 a 105 de SEQ ID NO: 2.
19. El polipéptido de la reivindicación 17, que es un polipéptido factor neurotrófico Neublastina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.
- 40 20. El polipéptido de la reivindicación 17, que es un polipéptido factor neurotrófico Neublastina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.
21. El polipéptido de la reivindicación 17, que es un polipéptido factor neurotrófico Neublastina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5.
- 45 22. El polipéptido de la reivindicación 17, que es un polipéptido factor neurotrófico Neublastina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

23. El polipéptido de la reivindicación 17, que es un polipéptido factor neurotrófico Neublastina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7.
24. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que dicho polipéptido está glicosilado.
- 5 25. Un polipéptido que posee actividad neurotrófica y que está codificado por un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
26. Un método para preparar el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, comprendiendo dicho método la etapa de expresar dicho polipéptido a partir de un polinucleótido de factor neurotrófico Neublastina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 10 27. El método de la reivindicación 26, que comprende la etapa de cultivar una célula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 que comprende dicho polinucleótido de factor neurotrófico Neublastina en un medio de cultivo que permite la producción de dicho polipéptido.
28. El método de la reivindicación 27, que comprende además la etapa de recuperar dicho polipéptido de dicho medio de cultivo.
29. El método de la reivindicación 28, en el que el polipéptido se purifica.
- 15 30. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
31. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 para usarse como un medicamento.
32. El uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
- 20 33. El uso de la reivindicación 32, en el que la enfermedad neurodegenerativa implica neuronas lesionadas y traumáticas.
34. El uso de la reivindicación 33, en el que las neuronas lesionadas y traumáticas se seleccionan de una o más de las lesiones traumáticas de nervios periféricos, el bulbo raquídeo y la médula espinal.
- 25 35. El uso de la reivindicación 32, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en lesión neuronal isquémica cerebral; neuropatía, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y deterioro de la memoria asociado a la demencia.
36. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en el que la enfermedad neurodegenerativa es neuropatía periférica.
- 30 37. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 para usarse en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa.
38. El polipéptido de la reivindicación 37, en el que la enfermedad neurodegenerativa implica neuronas lesionadas y traumáticas.
- 35 39. El polipéptido de la reivindicación 38, en el que las neuronas lesionadas y traumáticas se seleccionan de una o más de las lesiones traumáticas de nervios periféricos, el bulbo raquídeo y la médula espinal.
40. El polipéptido de la reivindicación 37, en el que la enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en lesión neuronal isquémica cerebral; neuropatía, neuropatía periférica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y deterioro de la memoria asociado a la demencia.
- 40 41. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, en el que la enfermedad neurodegenerativa es neuropatía periférica.
42. Una secuencia de ácido nucleico cebador de PCR que consiste en una cualquiera de las secuencias mostradas en SEQ ID NOs: 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26 ó 28.
- 45 43. Un método para producir uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 2, 4, 5, 6 ó 7, que comprende cultivar una célula que contiene una cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mostradas en SEQ ID NOs: 1 ó 3 bajo condiciones que permitan la producción del polipéptido y recuperar el polipéptido del medio de cultivo.
44. Un método para producir un polipéptido de Neublastina de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, comprendiendo el método:

- (a) introducir un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que codifica cuando se expresa un polipéptido de Neublastina en una célula o introducir una secuencia reguladora por recombinación homóloga en una células, de manera que la secuencia reguladora regule la expresión de un gen de Neublastina endógeno, para obtener una célula que produce Neublastina;
- 5 (b) cultivar la célula que produce Neublastina bajo condiciones de cultivo que resulten en la expresión de un polipéptido de Neublastina.
45. Un gen sintético que codifica un polipéptido de Neublastina, comprendiendo el gen sintético una secuencia mostrada en SEQ ID NOs: 29 ó 30.
46. Un péptido de Neublastina que consiste en cualquiera de las secuencias siguientes:
- 10 GPGSRARAAGARGC (AA 30-43 de SEQ ID NO: 9);
LGHRSEDELVRFRFC (AA 57-70 de SEQ ID NO: 9);
CRRARSPHDLSL (AA 74-85 de SEQ ID NO: 9);
LRPPGSRPVSQPC (AA 94-107 de SEQ ID NO: 9);
STWRTVDRLSATAC (AA 123-136 de SEQ ID NO: 9);
- 15 CRLRSQVLPVVRALGLGHRSEDELVRFRFC (AA 43-70 de SEQ ID NO: 9);
CRRARSPHDLSLASLLGAGALRPPGSRPVSQPC (AA 74-107 de SEQ ID NO: 9);
CRPTRYEAVSFMDVNSTWRTVDRLSATAC (AA 108-136 de SEQ ID NO: 9);
CRPTRYEAVSFMDVNST (AA 108-124 de SEQ ID NO: 9); o
ALRPPGSRPVSQPC (AA 93-107 de SEQ ID NO: 9).
- 20 47. Un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de los péptidos de la reivindicación 46.

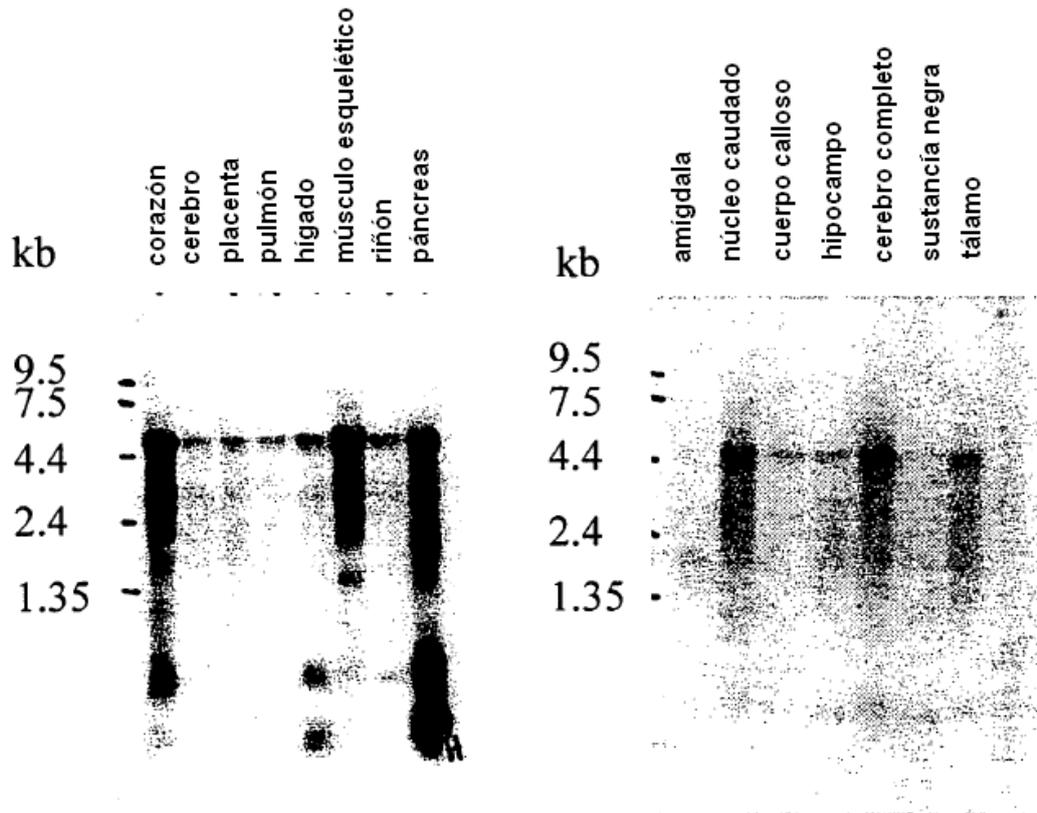


Fig. 1

2/16

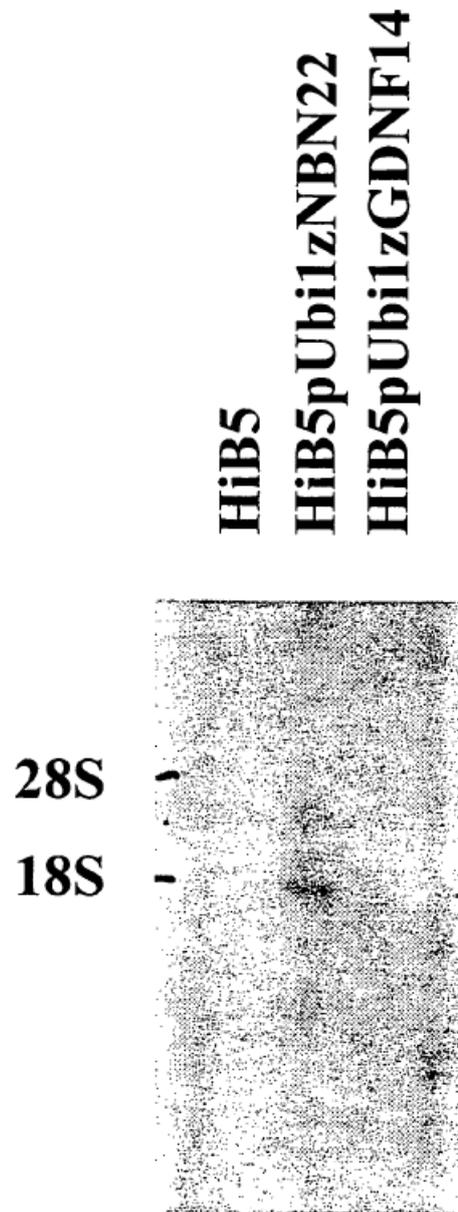


Fig. 2

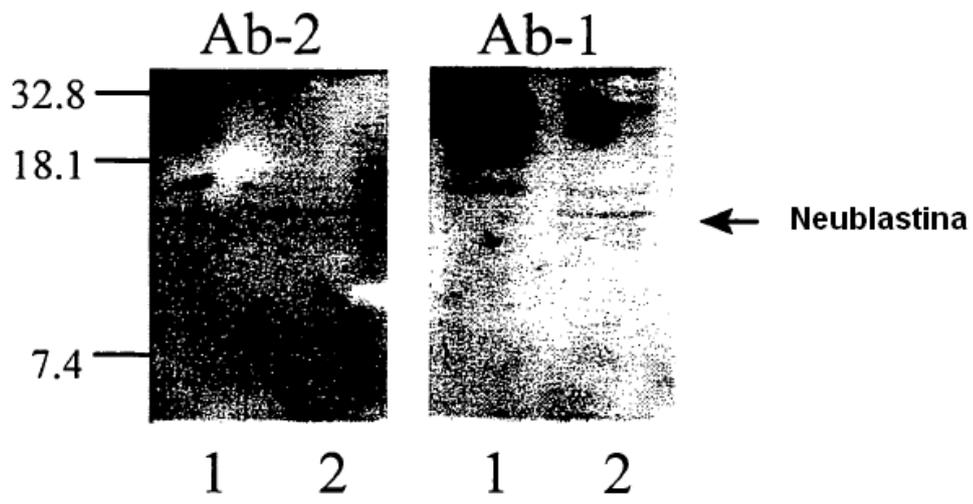
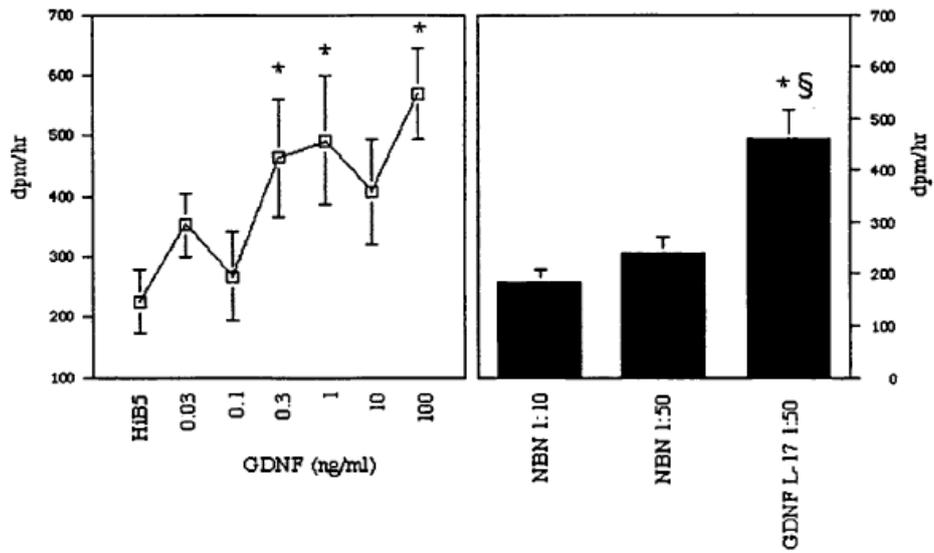
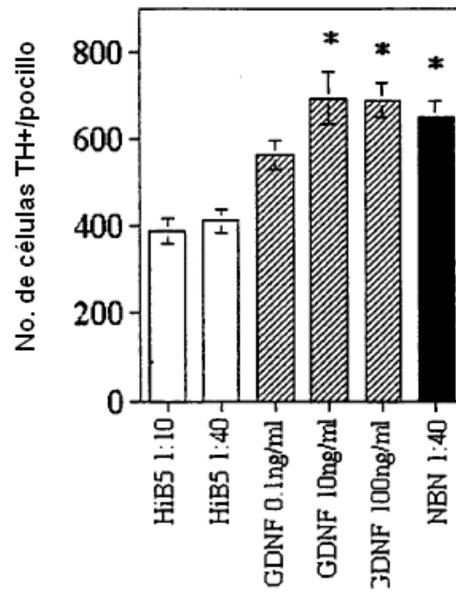


Fig. 3

Bioensayo ChAT NBN1



Número de células TH+ en DIV7



Figs. 4A, 4B y 4C

5/16

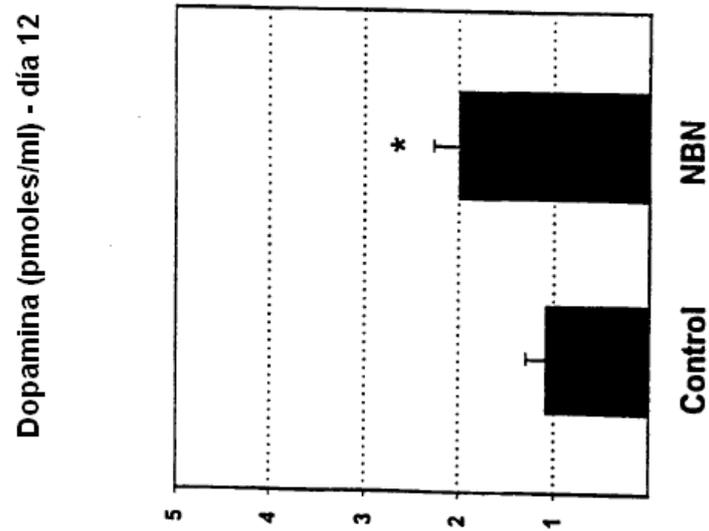
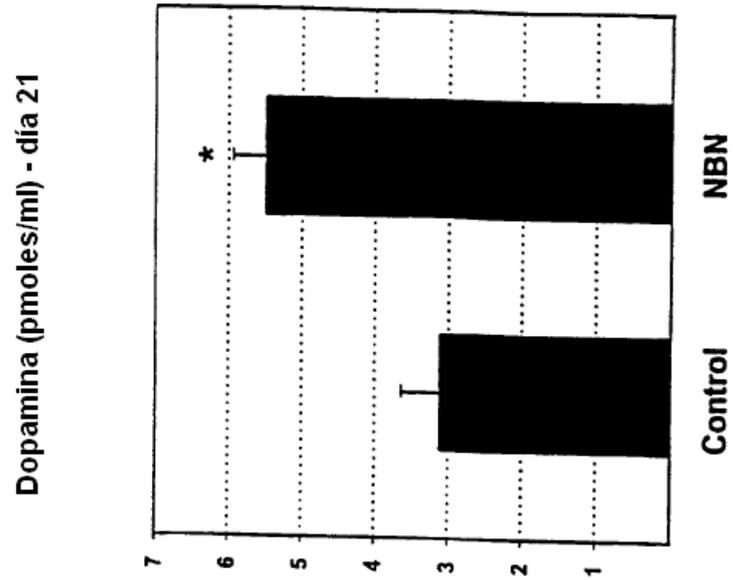


Fig. 5A y 5B

Células TH-ir por cultivo

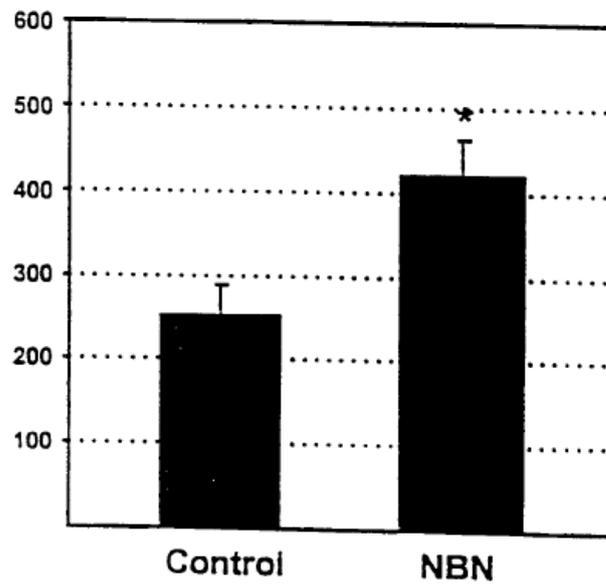


Fig. 5C

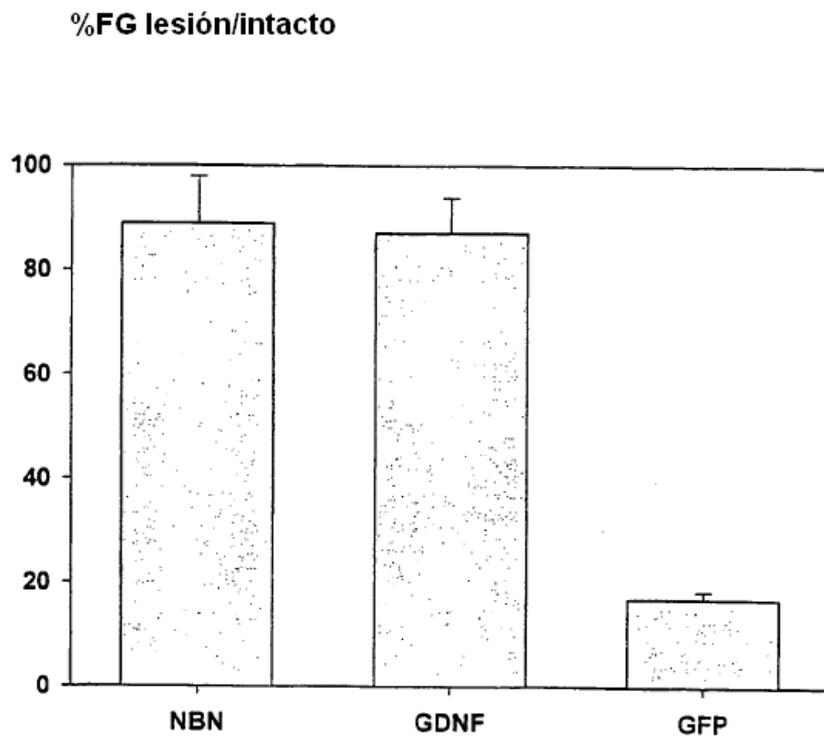
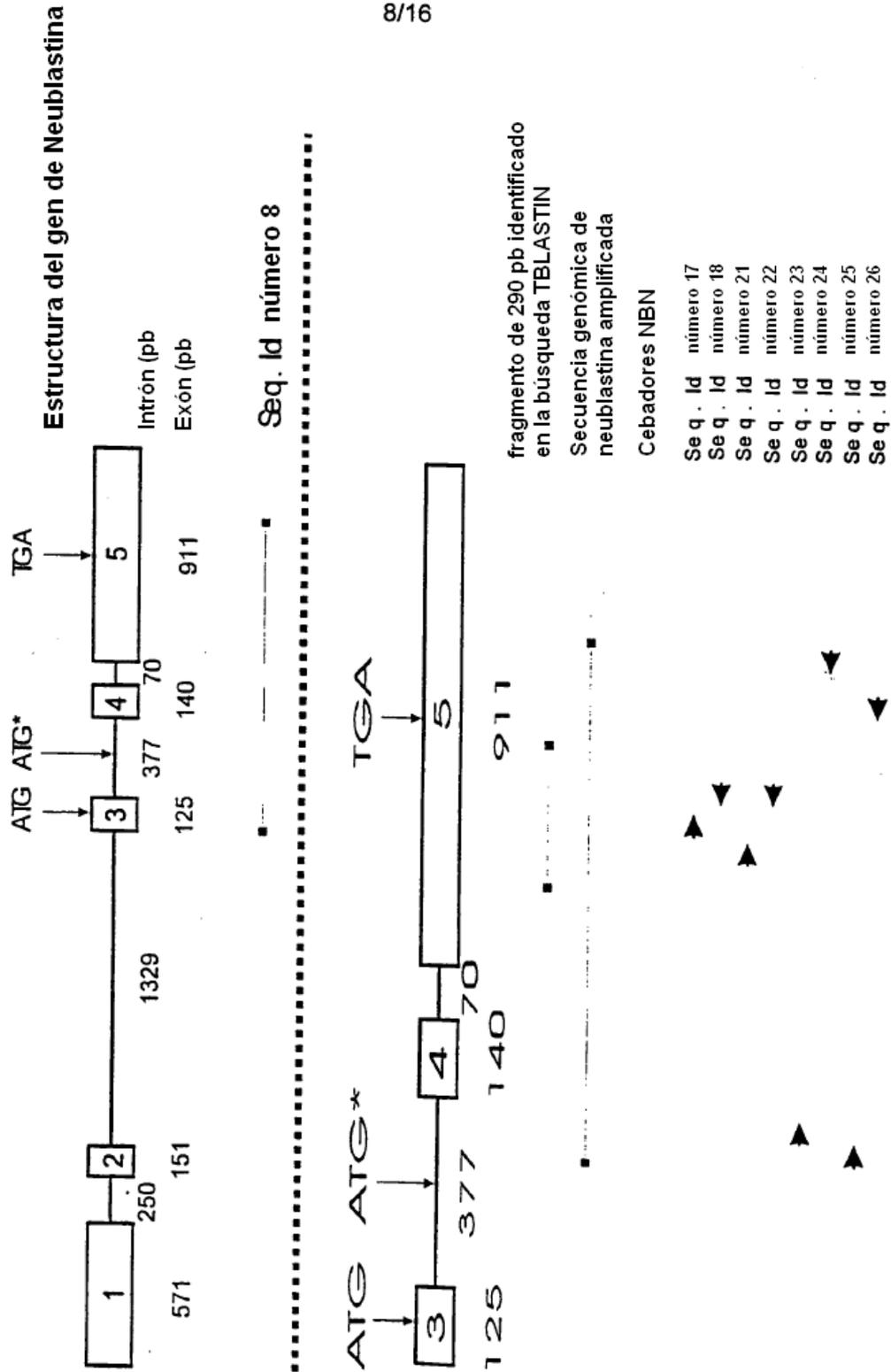


Fig. 6



8/16

Fig. 7

persefina
neurturina

Alineamiento de los cebadores de Neublastina usados en Cribado-Rápido con regiones homólogas en otros ligandos GDNF

5' -C CTG GCC AGC CTA CTG GG-3'	SEQ ID No 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'	SEQ ID No 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

los nucleótidos conservados se muestran en negrita

Fig. 8

10/16

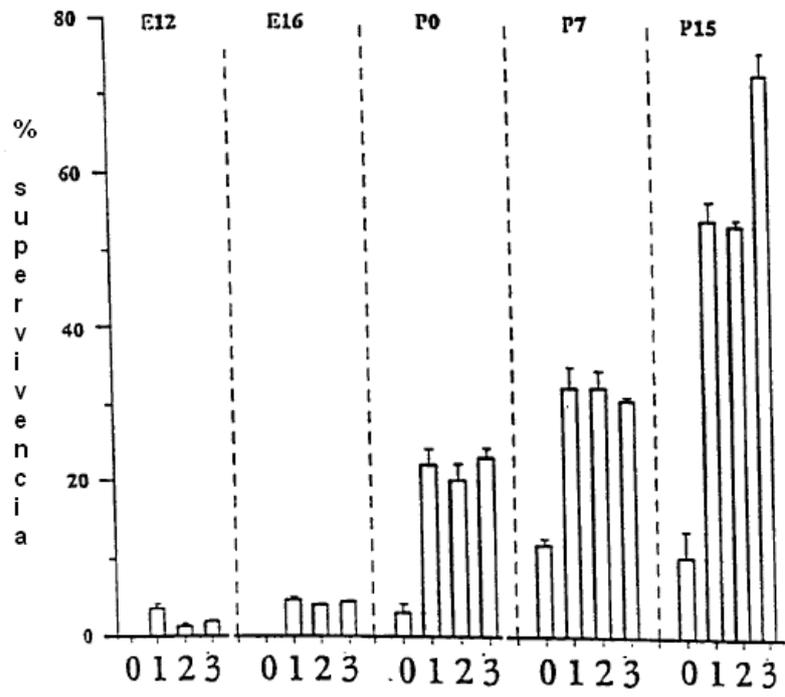


Fig. 9

11/16

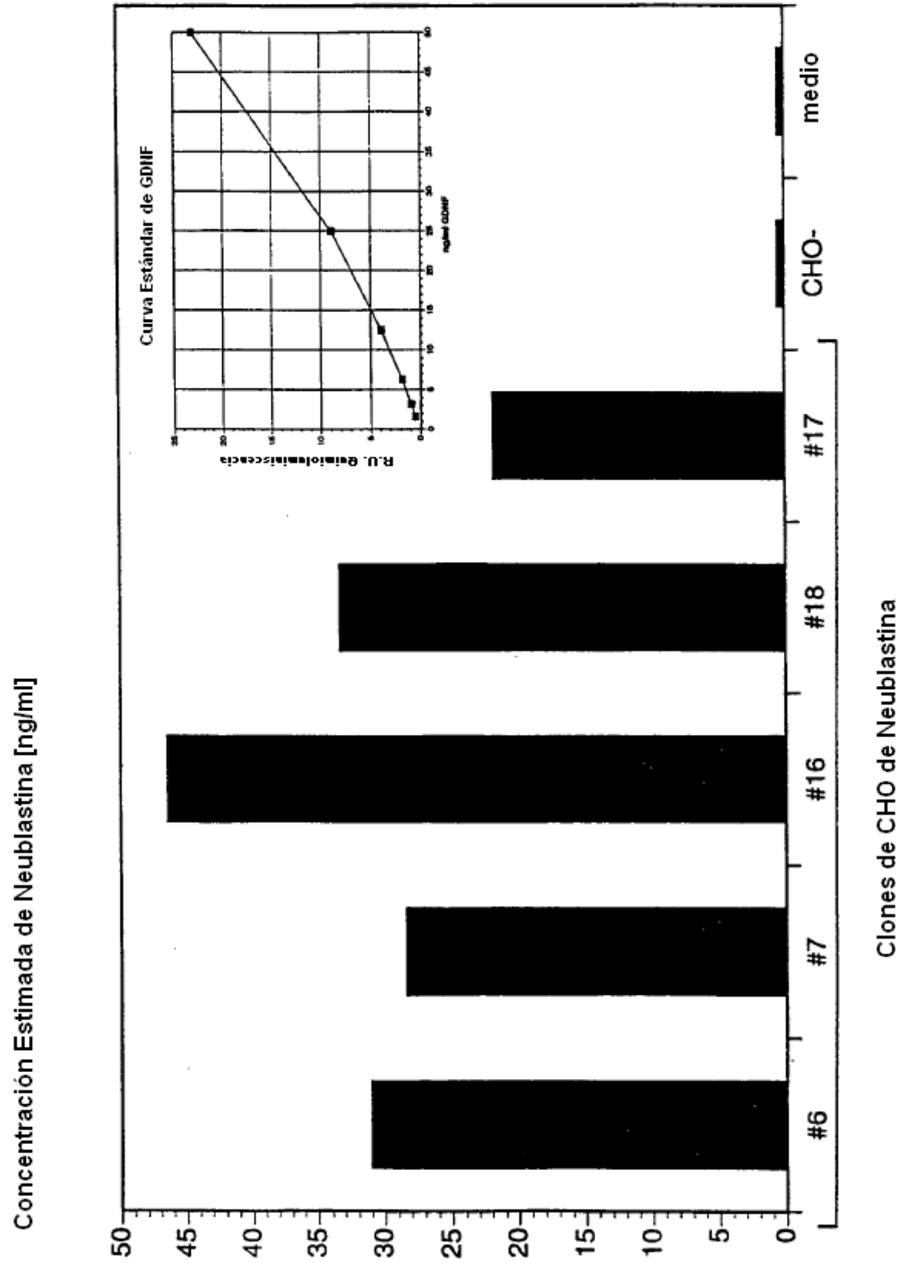


Fig. 10

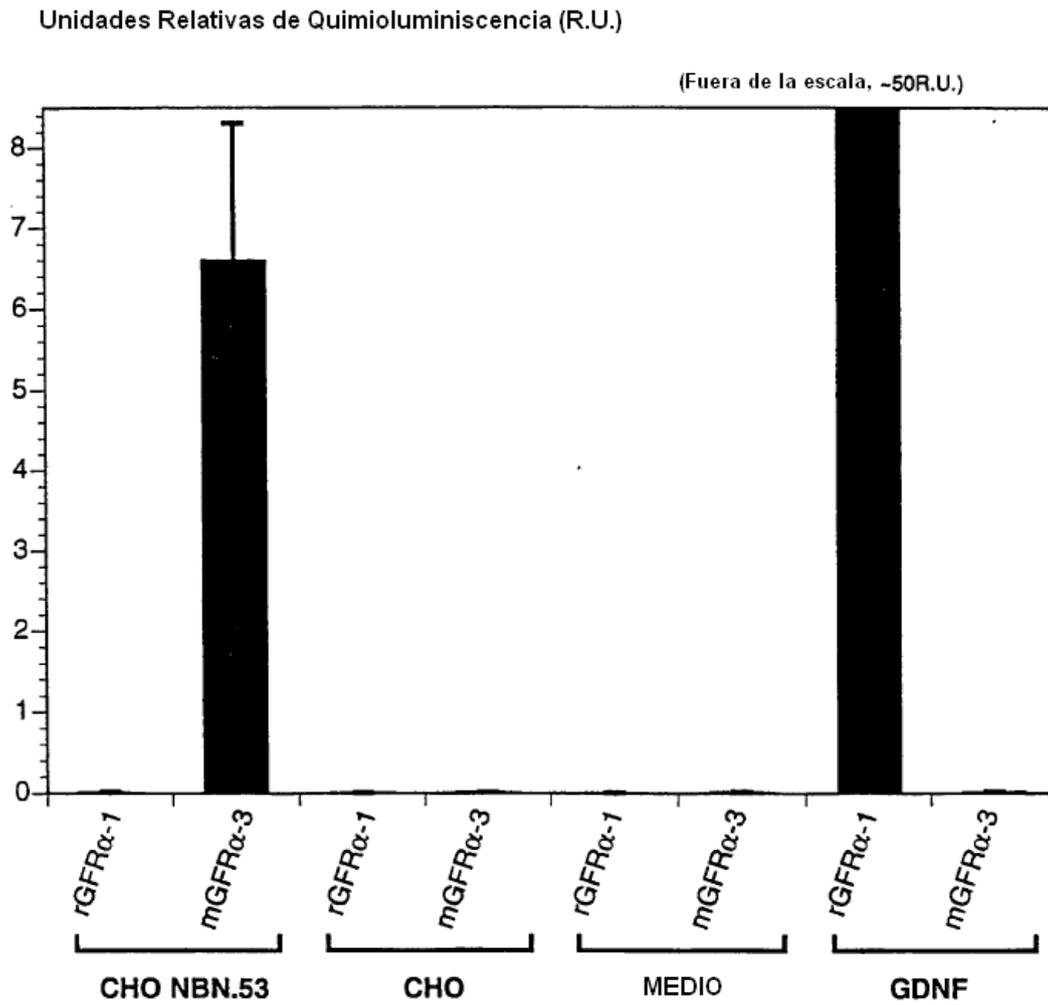
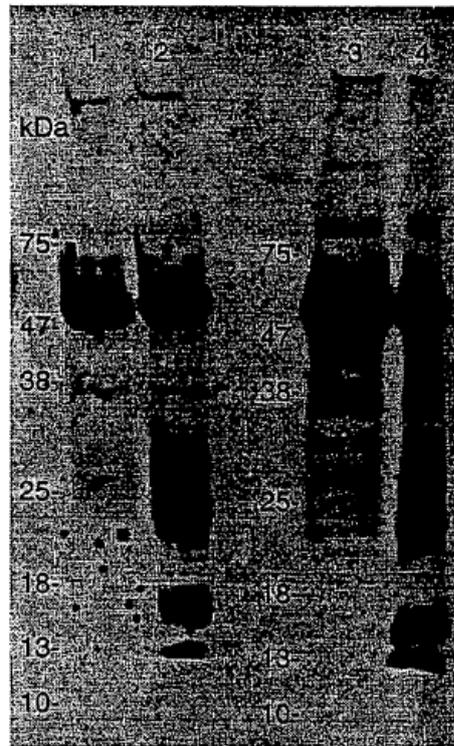
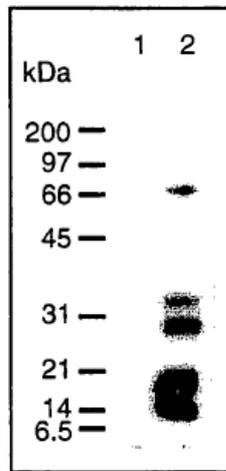


Fig. 11



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

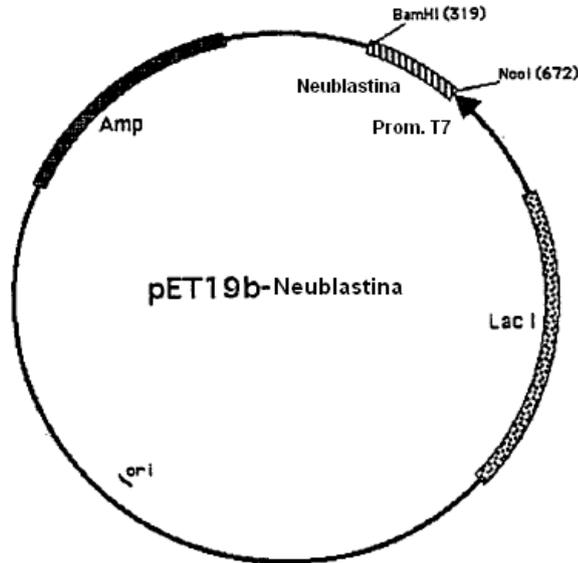
Fig. 12



Extracción de neublastina por unión de afinidad en RTEL3-Ig
Carril 1: unida de medio condicionado de CHO control
Carril 2: unida de medio condicionado de CHO que sobreexpresan neublastina

Fig. 13

15/16



Singén de Neublastina

NcoI (318)

316 TACCATGGCT GGAGGACCGG GATCTCGTGC TCGTGCAGCA GGAGCACGTG GCTGTGCTCT
 ATCCTACCGA CCTCCTGGCC CTAGAGCACG AGCACGTCTG CCTCGTGCAC CGACAGCAGA
 1 ▶ M A G G P G S R A R A A G A R G C R L

376 GCGTTCTCAA CTAGTGCCGG TGCCTGCACT CGGACTGGGA CACCGTCCG ACGAACTAGT
 CGCAAGAGTT GATCACGGCC ACGCACGTGA GCCTGACCCT GTGGCAAGGC TGCTTGATCA
 19 ▶ R S Q L V P V R A L G L G H R S D E L V

436 ACGTTTTTCGT TTTTGTTCAG GATCTTGTCG 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 ACCTTGTTGT AGACCTACTA GATACGAAGC AGTATCTTTC ATGGACGTAA ACTCTACATG
 TGGAACAACA TCTGGATGAT CTATGCTTCG TCATAGAAAAG 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 GACGTTGGCG TACACCGACA GATCCTACTA TTATCCCTAG
 99 ▶ R T V D R L S A T A C G C L G . . .

676 CGGCT
 GCCGA

Fig. 14

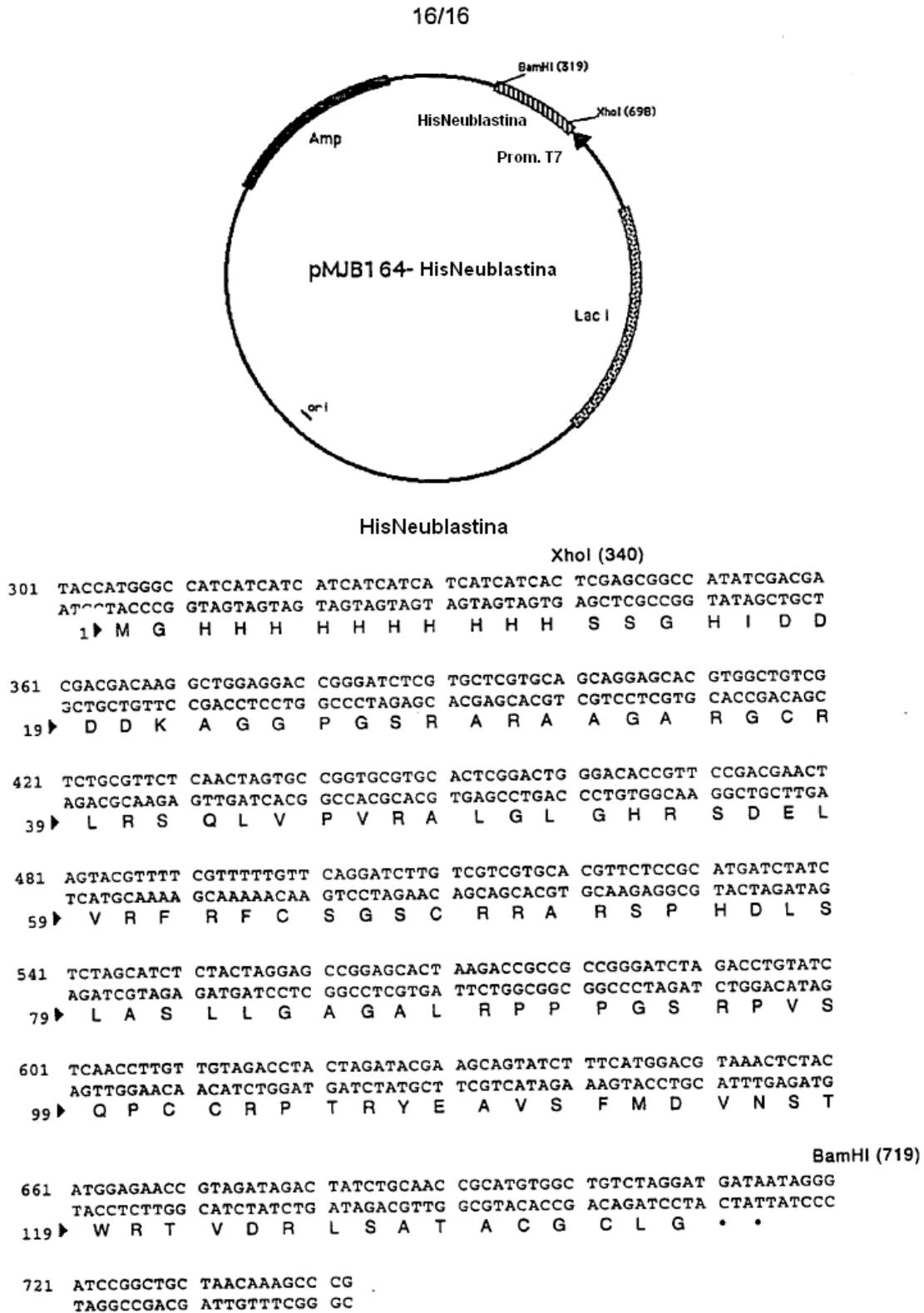


Fig. 15