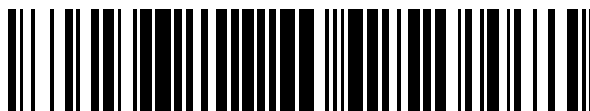


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 624**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**C07K 14/495** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **96925740 .1**  
96 Fecha de presentación: **12.07.1996**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0837938**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.1998**

54 Título: **Uso de MP52 o MP121 para el tratamiento y prevención de enfermedades del sistema nervioso**

30 Prioridad:  
**12.07.1995 DE 19525416**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.10.2012**

73 Titular/es:  
**BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR  
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON  
PHARMAKA MBH (100.0%)  
CZERNYRING 22  
69115 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:  
**HÖTTEN, GERTRUD;  
POHL, JENS;  
BECHTOLD, ROLF;  
PAULISTA, MICHAEL y  
UNSICKER, KLAUS**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, Isabel**

ES 2 389 624 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

Uso de MP52 o MP121 para el tratamiento y prevención de enfermedades del sistema nervioso

5 La presente invención se refiere al uso de MP52 y/o MP121, dos factores de crecimiento y/o diferenciación de la superfamilia de TGF- $\beta$ , para el tratamiento y la prevención de enfermedades del sistema nervioso y/o para el tratamiento de situaciones neuropatológicas que son provocadas por la alteración del sistema nervioso. Además de ello, la invención se refiere a medicamentos para el tratamiento o la prevención de las indicaciones anteriores que contienen MP52 y/o M P121.

10 Muchos factores de crecimiento de la superfamilia de TGF- $\beta$  (Kingsley, Genes & Development 8, 133-146 (1994) y la bibliografía citada en la misma) son relevantes para una amplia gama de métodos de tratamientos médicos y aplicaciones que conciernen, en particular, a la cicatrización y a la regeneración de tejido. A estos pertenecen, en particular, miembros del TGF- $\beta$  (factor de crecimiento y transformación, véase, p. ej., Roberts y Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990), págs. 419-432, comps. Sporn y Roberts), de la BMP (proteína morfogenética del hueso, véase, p. ej., Rosen y Thies, Growth Factors in Perinatal Development (1993), págs. 39-58, comps. Tsang, Lemons y Balistreri) y la inhibina/activina (véase, p. ej., Vale et al., The Physiology of Reproduction, Segunda Edición, (1994), págs. 1861-1878, comps. Knobil y Neill). A pesar de que los miembros de esta familia presentan en la porción madura elevadas homologías de aminoácidos, en particular la mayoría de las veces 7 cisteínas conservadas, muestran considerables variaciones en sus funciones precisas. Las proteínas similares a TGF- $\beta$  pertenecen a una superfamilia estructural, todas las cuales presentan un motivo nudo cistina (Cell, Vol. 73 (1993), págs. 421-424). Otros miembros de esta superfamilia son proteínas de la familia NGF (factor de crecimiento nervioso) – familia de neurotrofina y PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas). A menudo, factores de crecimiento individuales muestran varias funciones al mismo tiempo, de modo que su aplicación es de interés en el caso de distintas indicaciones médicas.

Algunas de estas proteínas multifuncionales muestran, junto a funciones tales como, p. ej., la regulación de la proliferación y diferenciación en el caso de muchos tipos de células (Roberts y Sporn, Handbook of Experimental, Pharmacology 95 (1990), pág. 419-472, comps. Sporn y Roberts; Sakurai et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), págs. 14118-14122) también efectos fomentadores de la supervivencia en el caso de neuronas. Así, p. ej. para TGF- $\beta$  se detectaron in vitro efectos tróficos en neuronas motoras y sensoriales embrionales (Martinou et al., Devl. Brain Res. 52, págs. 175-181 (1990) y Chalazonitis et al., Dev. Biol. 152, págs. 121-132 (1992)). Además, para las proteínas TGF- $\beta$ -1, -2, -3, activina A y GDNF (factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales), una proteína que presenta similitudes estructurales con miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ , se detectaron efectos fomentadores de la supervivencia en neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, no siendo inducido este efecto a través de astrocitos (Kriegelstein et al., EMBO J. 14, págs. 736-742 (1995)).

Los documentos WO 93/16099, WO 95/04819 y WO 96/01316 dan a conocer las secuencias de ADN y proteínas de proteínas similares a TGF- $\beta$ , en particular de MP52 y MP121. En el documento WO 95/04819 se da a conocer un potencial inductor del cartílago y los huesos para MP52.

La aparición de proteínas de la superfamilia de TGF- $\beta$  en diferentes fases de tejido y fases de desarrollo está en coincidencia con diferencias en relación con funciones más precisas, así como sitios diana, duración de vida, requisitos para factores auxiliares, entornos fisiológicos celulares necesarios y/o estabilidad frente a la degradación.

La misión en la que se basa la presente invención consiste en habilitar una proteína que posibilite un tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso. De interés son el tratamiento de trastornos o pérdidas de funciones nerviosas. Estas pueden provocarse por estados patológicos agudos tales como deficiencias cerebrovasculares, inflamatorias, infecciosas, metabólicas y/o deficiencias provocadas por influencias tóxicas, lesiones, desarrollo de tumores o intervenciones quirúrgicas. Además, trastornos o pérdidas de funciones nerviosas pueden ser provocadas por estados patológicos crónicos tales como, preferiblemente, enfermedades neurodegenerativas. Situaciones neuropatológicas son provocadas a menudo también por la alteración del sistema nervioso.

Este problema se resuelve mediante el uso de MP52 y/o MP121 biológicamente activa para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del sistema nervioso y/o para el tratamiento de situaciones neuropatológicas que son provocadas por la alteración del sistema nervioso.

Con la presente invención pudo demostrarse que MP52 presenta una influencia positiva sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas (véase la Figura 3). Sin embargo, esta influencia es inducida, apartándose de TGF- $\beta$ s y activina A, al menos en parte, a través de los astrocitos asociados con células nerviosas (véase la Figura 4). Por consiguiente, MP52 es útil en el tratamiento o prevención de enfermedades del sistema nervioso, en particular enfermedades que afectan al cerebro. En tal caso son de particular interés enfermedades neurodegenerativas tales como, p. ej., la enfermedad de Parkinson, posiblemente también enfermedades tales como Alzheimer o la enfermedad de Huntington. Además de ello, utilizando MP52 se consigue fomentar la supervivencia de neuronas y, con ello, determinar una conservación de funciones nerviosas. Todas las posibilidades de aplicación se mantienen tanto en el caso de estados patológicos agudos como también crónicos, también las medidas de prevención. Como estados patológicos agudos se han de mencionar en tal caso, preferiblemente, fenómenos de deficiencia cerebrovasculares, inflamatorios, infecciosos, metabólicos y/o deficiencias provocadas por influencias tóxicas, lesiones, desarrollos de tumores u operaciones quirúrgicas.

Un estado patológico crónico que puede ser tratado en el marco de la invención es, p. ej., una enfermedad neurodegenerativa.

Con la presente invención pudo demostrarse, además, que MP52 tiene una influencia estimulante también sobre neuronas de la retina. Durante el desarrollo del sistema visual, los axones procedentes de las células ganglionares de la retina migran a regiones especiales en el cerebro. Por parte de varios grupos pudo demostrarse que fracciones solubles que se aislaron de zonas visuales del cerebro, pueden estimular a las células ganglionares en la retina (Nurcombe, V. y Bennett, M.R., Exp. Brain Res. 44, 249-258 (1981), Hyndman, A.G., Adler, R., Dev. Neurosci. 5, 40-53 (1982), Turner, J. E. et al., Dev. Brain Res. 6, 77-83 (1983), Carri, N.G. y Ebendal, T., Dev. Brain Res. 6, 219-229 (1983)). La formación de haces de fibras nerviosas, que probablemente son axones ópticos que parten de células ganglionares de la retina, depende de factores neurotróficos.

Ensayos con MP52 demostraron que esta proteína puede actuar también en este sistema como un factor neurotrófico.

Así, cultivos de tejidos recientemente aislados de la retina embrionaria procedente de gallinas pudo demostrarse que MP52 fomenta de manera significativa el desarrollo de fibras nerviosas (véanse para ello la Figura 6 y la Tabla 1).

Durante estos experimentos pudo demostrarse también que otros miembros de la familia de TGF- $\beta$  tienen asimismo un efecto estimulante. A ellos pertenece, en particular, también la MP121 (documentos WO93/16099 y WO96/01316) que presenta un efecto aproximadamente de la misma intensidad que MP52 (véanse para ello la Figura 6 y la Tabla 2).

Las actividades de MP52 y MP121 pueden utilizarse para la curación de enfermedades en el ojo, en particular de la retina y del nervio óptico. Se han de destacar en este caso, en particular, también el tratamiento de lesiones de la capa neuronal de la retina y del nervio óptico. Lesiones de este tipo podrían ser provocadas, p. ej., por accidentes, inflamaciones o trastornos del riego sanguíneo. Son asimismo ventajosas aplicaciones en el caso de trasplantes de retina. Pero también, además, debería ser importante una curación o alivio de lesiones en otros nervios del cerebro. Se ha de destacar en este caso, p. ej. el trigémino (nervio trigémino) el cual inerva también partes del ojo. Así, miembros de la familia de TGF- $\beta$ , en particular de la MP52 y de la MP121, pueden encontrar también aplicación en el caso de trasplantes de córnea. El crecimiento de la córnea es influenciado también por parte del suministro nervial. También es imaginable un empleo en el caso de sólo lesiones segmentales de la córnea tal como se manifiestan, p. ej., en el caso de infecciones por herpes en el ojo.

En particular, se ha de destacar el uso en el caso de enfermedades degenerativas de la superficie del ojo.

En una forma de realización preferida de la presente invención se utiliza como MP52 biológicamente activa

- (a) la porción madura y, eventualmente, otras porciones funcionales de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1;
- (b) partes de la proteína madura que presentan esencialmente la misma actividad;
- (c) proteínas maduras con un extremo N modificado que presentan en esencia la misma actividad;
- (d) una proteína madura o partes de la misma, la cual, en virtud de su procedencia de otros vertebrados, presenta una variación en la secuencia de aminoácidos, pero conserva esencialmente la misma actividad.

En otra forma de realización preferida, en calidad de MP121 biológicamente activa se utiliza

- (a) la porción madura y, eventualmente, otras porciones funcionales de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 3 ó 4;
- (b) partes de la proteína madura que presentan esencialmente la misma actividad;
- (c) proteínas maduras con un extremo N modificado que presentan en esencia la misma actividad;
- (d) una proteína madura o partes de la misma, la cual, en virtud de su procedencia de otros vertebrados, presenta una variación en la secuencia de aminoácidos, pero conserva esencialmente la misma actividad.

Otras características y ventajas de la invención se desprenden de la descripción de las formas de realización preferidas y de las figuras. El protocolo de secuencias y las figuras se describen en lo que sigue brevemente.

SEQ ID NO. 1 muestra la secuencia completa de aminoácidos de la pre-pro-proteína de la proteína de TGF- $\beta$  humana MP52 que se derivó de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 2 y que ya se da a conocer en el documento WO 95/04819. El comienzo de la proteína madura se encuentra preferiblemente en el intervalo de los aminoácidos 361-400, de manera particularmente preferida en el aminoácido 382.

SEQ ID NO. 2 muestra la secuencia de nucleótidos completa del ADN que codifica la proteína de TGF- $\beta$  MP52, tal como se da a conocer ya en el documento WO 95/04819. El codón de inicio ATG comienza con el nucleótido 640. El comienzo de la proteína madura completa comienza de manera particularmente preferida detrás del nucleótido 1782. El codón de terminación comienza con el nucleótido 2143.

SEQ ID NO. 3 muestra la secuencia de aminoácidos completa de la pre-pro-proteína de la proteína de TGF- $\beta$  humana MP121, que ya se da a conocer en el documento WO 96/01316. El comienzo de la proteína madura se encuentra preferiblemente en el intervalo de los aminoácidos 217-240, de manera particularmente preferida en el aminoácido 236 ó 237, de la forma más preferida, en el aminoácido 237.

SEQ ID NO. 4 muestra la secuencia de aminoácidos completa de la pre-pro-proteína de la proteína de TGF- $\beta$  MP121 de ratón, que asimismo se da a conocer en el documento WO 96/01316. El comienzo de la proteína madura se encuentra, en analogía a la proteína humana, en el intervalo de los aminoácidos 217 - 240, el comienzo de la proteína madura preferida en el aminoácido 236 ó 237.

La Figura 1 muestra un gel teñido con plata con MP52 madura, expresada en el sistema procariótico, con metionina antepuesta así como MP52 madura con un colgante de histidina en el extremo N delante y detrás del repliegamiento.

La Figura 2 muestra un cromatograma para la separación de MP52 madura dímera y monómera con extremo N-modificado detrás del repliegamiento.

La Figura 3 muestra una influencia positiva sobre la supervivencia de neuronas dopaminérgicas mediante tratamiento con MP52 parcialmente purificada procedente de un sistema de expresión eucariótico, así como MP52 madura replegada y purificada con extremo N-modificado procedente de un sistema de expresión procariótico.

La Figura 4 muestra que el efecto fomentador de la supervivencia de MP52 sobre neuronas dopaminérgicas se ha de atribuir, al menos en parte, a un aumento del número de astrocitos.

La Figura 5 demuestra una transferencia Western con anticuerpos de conejo contra MP121, la cual se sintetizó con ayuda del sistema de expresión de virus vacuna en células HepG2.

La Figura 6 muestra la influencia estimulante de MP52 purificada y MP121 sobre el desarrollo de fibras nerviosas procedentes de la retina embrionaria.

En el marco de la presente invención, la porción madura de la proteína MP52 abarca desde el aminoácido 382 hasta el aminoácido 501. En el caso de MP121, la porción madura abarca preferiblemente desde el aminoácido 237 hasta el aminoácido 352 de la SEQ ID NO. 3 o bien de la SEQ ID NO. 4. Además de ello, sin embargo, en el marco de la invención están también incluidas eventualmente zonas parciales funcionales de la proteína completa más cortas o más largas que, en esencia, presentan la misma actividad biológica, en particular zonas parciales que comprenden al menos la zona de las siete cisteínas conservadas. En la presente invención pudo demostrarse, entre otros, que modificaciones en el extremo N de la proteína madura no afectan esencialmente a la actividad.

Están comprendidas también proteínas MP52 o bien MP121 que se aíslan de otros vertebrados, dado que éstas presentan esencialmente las mismas actividades.

Por otra parte, junto a la porción madura de MP52 o MP121, las proteínas pueden comprender también, además, porciones de señal y/o de pro-péptidos funcionales de otras proteínas, p. ej. de proteínas con el motivo nudo cistina (Cell, Vol. 73 (1993), págs. 421-424) y, en particular, de otras proteínas de la superfamilia de TGF- $\beta$ , p. ej. las proteínas de TGF o BMP o activina/inhibina arriba mencionadas, en particular también MP121 o bien MP52. Las secuencias de nucleótidos correspondientes se pueden deducir de las referencias arriba mencionadas y de la bibliografía citada en ellas y/o del banco de datos EMBL o de GenBank, a cuya divulgación se hace con ello referencia. En tal caso, es importante que se conserve el marco de lectura correcto para la proteína madura. En función del tipo de células hospedantes en el que tenga lugar la expresión, la presencia de otra secuencia señal y/o de otra porción de pro-péptido podría afectar positivamente a la expresión. El intercambio de porciones de pro-péptido por parte de correspondientes porciones de otras proteínas se describe, p. ej., en Mol. Endocrinol. 5 (1991), págs. 149-155 y Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), págs. 2905-2909.

Otra forma de realización preferida de la invención es el uso de proteínas de fusión que presentan derivados funcionales o bien porciones de MP52 o bien MP121 conforme a la definición anterior y tal y como se muestra preferiblemente en SEQ ID NO. 1 o bien 3 ó 4, en particular porciones funcionales de la proteína madura y, además de ello, porciones de otra proteína. La otra proteína puede ser en tal caso de nuevo una proteína con el "motivo nudo de cistina", la cual pertenece también preferiblemente la superfamilia de TGF- $\beta$  tal como, p. ej., también combinación de MP52 con MP121. Sin embargo, también pueden estar presentes porciones de una proteína completamente distinta, p. ej. dominios de proteínas que se unen al receptor que confieren a la proteína MP52 o bien MP121 original otra especificidad. Otra forma de realización de la invención preferida de nuevo es el uso de proteínas heterodímeras a base de un monómero de una MP52 o MP121 biológicamente activa conforme a la definición anterior y un monómero de una proteína de la superfamilia de las proteínas con el "motivo nudo de cistina", preferiblemente de un miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ . Proteínas heterodímeras similares se describen, p. ej., en el documento WO 93/09229, el documento EP 0 626 451 A2 y J. Biol. Chem. 265 (1990), págs. 13198-13205. Las características de la proteína pueden variar en función de la formación de homodímeros o heterodímeros y pueden ser relevantes para aplicaciones terapéuticas.

La secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO. 2, partes de la misma o una secuencia que codifica proteínas quiméricas de acuerdo con la invención pueden utilizarse para la producción de MP52. La expresión puede tener lugar en células hospedantes eucariotas y procariotas. Sistemas de expresión adecuados son conocidos por el experto en la materia y es fácilmente determinable qué porción mínima de SEQ ID NO. 2 es necesaria con el fin de obtener una proteína expresada que muestre actividad en los ensayos indicados. A los sistemas de expresión pertenecen también sistemas de virus tales como, p. ej., el sistema de baculovirus o el sistema de virus vacuna. Para la producción de una cantidad suficiente de las proteínas de acuerdo con la invención purificadas, procedentes de la célula hospedante y/o del sobrenadante del cultivo celular, para empleo en el tratamiento médico puede utilizarse una bacteria tal como, por ejemplo, E. coli o Bacillus, un hongo tal como, por ejemplo, levadura, una célula vegetal tal como, por ejemplo, tabaco o Arabidopsis, o una línea animal de células de vertebrados tales como, por ejemplo, CHO, líneas de células HuTK, NIH-3T3, COS o Mo, o una línea de células de insectos tales como, por ejemplo, Spodoptera frugiperda (SF9) o Trichoplusia ni (TN368). Aprovechando virus de insectos recombinantes tales como, p. ej., el virus de la polihedrosis nuclear Bombyx mori o baculovirus es posible una expresión también en larvas de insectos tales como, por ejemplo, Bombyx mori o Spodoptera frugiperda. Un sistema de este tipo se describe, p. ej., en Ishida et al. (J. Biochem. 115 (1994), págs. 279-285). En la producción en bacterias, la proteína de acuerdo con la invención puede presentarse en forma de cuerpos de inclusión (inclusion bodies). Estos cuerpos de inclusión se renaturalizan según métodos en sí conocidos con el fin de obtener la proteína en una forma activa. Dentro de la invención pudo demostrarse que para la actividad es necesaria una renaturalización para formar MP52 dímera, dado que MP52 monómera no muestra actividad alguna (véase la Figura 3). Algo similar se cumple para la producción de MP121 que se describe con detalle en el documento WO 96/01316.

Para la producción de proteínas heterodímeras con otros miembros de la "familia de nudo cistina" los dos monómeros de proteínas se expresan en la misma célula o bien por separado, pareciendo adecuada también una renaturalización común en el caso de formas resultantes de cuerpos de inclusión. En la co-expresión en la misma célula son adecuados de nuevo, en particular, también sistemas virales tales como, p. ej., el sistema de baculovirus o el sistema de virus vacuna. La producción y purificación de proteínas heterodímeras es, en principio, conocida por el experto en la materia y está descrita, p. ej., en el documento WO 93/09229 y el documento EP 0 626 451 A2. Los heterodímeros pueden separarse de homodímeros, p. ej. empleando sucesivamente columnas de afinidad con anticuerpos específicos para en cada caso un monómero.

La producción de proteínas quiméricas con otras porciones de proteínas requiere una modificación correspondiente en el plano del ADN que es habitual para el experto en la materia y que puede ser llevada a cabo por éste (EMBO J. 10 (1991), págs. 2105-2110; Cell 69 (1992) págs. 329-341; J. Neurosci. 39 (1994), págs. 195-210).

5 En otra forma de realización preferida, adicionalmente a MP52 y/o MP121 biológicamente activa, se administran en una de las formas arriba mencionadas, gangliósidos que se presentan de forma natural, sus derivados, sales o análogos sintéticos. Además, se prefiere administrar adicionalmente un factor de crecimiento. En tal caso, se trata preferiblemente de una proteína de la superfamilia de las proteínas con "motivo nudo de cistina", tratándose preferiblemente de una proteína de la superfamilia de TGF- $\beta$ , de la familia de NGF/neurotrofina o de la familia de PDGF. Son particularmente preferidos factores de crecimiento que pertenecen a la familia de NGF/neurotrofina tales como, p. ej., los factores de crecimiento NGF, BDNF, NT-3 o NT4/5 (véase también Guidebook to Cytokines and their Receptors, Nicos A., Nicola, A Sambrook and Tooze Publication, Oxford University Press, 1994, páginas 140-143 y la bibliografía citada en ella). Otros factores de crecimiento preferidos son FGF, EGF y factor de crecimiento glial. Combinaciones de este tipo pueden conducir a efectos sinérgicos tal como se muestra, p. ej., para miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  (Ogawa et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 14233-14237 o documento US 5413989).

En la medida en que sea necesario o ventajoso, resulta natural para el experto en la materia agregar otros materiales de soporte, coadyuvantes, diluyentes o materiales de carga habituales en farmacia.

20 La administración de una composición con contenido en MP52 y/o MP121 se realiza convenientemente de modo que se alcance el mayor efecto posible, pudiendo ser ventajoso, en particular, su empleo cercano al sitio diana. La administración puede tener lugar, entre otros, por vía intracerebral, oral, mediante inyección, mediante inhalación o en forma de aplicación externa local.

25 Otro objeto de la presente invención es el uso de MP52 y/o MP121 biológicamente activa para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de enfermedades del sistema nervioso y/o para el tratamiento de situaciones neuropatológicas que son provocadas por la alteración del sistema nervioso. Formas de realización y posibilidades de aplicación preferidas corresponden en tal caso a las formas de realización que ya se describieron en detalle para el objeto antes mencionado de la presente invención.

30 Otro objeto de la presente invención es una proteína de fusión que contiene al menos partes de la porción madura de la secuencia de MP52 mostrada en SEQ ID NO. 1 así como al menos partes de otra proteína de la superfamilia de las proteínas con "motivo de nudo cistina".

35 Una proteína de fusión de acuerdo con la invención de este tipo contiene preferiblemente

(a) toda la porción de proteína madura de SEQ ID NO. 1 así como, eventualmente, otras porciones funcionales de las secuencias de proteínas mostradas en SEQ ID NO. 1;

(b) la porción madura de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1, pero con extremo N modificado, preferiblemente una metionina antepuesta; o

40 (c) la porción madura de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1 o partes de la misma que, en virtud de su procedencia de otros vertebrados, presenta variaciones, pero conserva esencialmente la misma actividad.

45 La producción de proteínas de fusión de este tipo ya se ha descrito arriba, igualmente proteínas adecuadas a modo de ejemplo a partir de las cuales puede derivarse la porción de proteína no MP52.

De nuevo, otro objeto de la presente invención es una proteína heterodímera que contiene al menos una parte de la secuencia de la proteína MP52 madura mostrada en SEQ ID NO. 1 en forma de un monómero, así como un segundo monómero de otra proteína procedente de la superfamilia de las proteínas con "motivo de nudo cistina". También aquí se prefiere de nuevo que la porción de MP52 (el monómero de MP52) contenga

(a) toda la porción de proteína madura de SEQ ID NO. 1 así como, eventualmente, otras porciones funcionales de las secuencias de proteínas mostradas en SEQ ID NO. 1;

(b) la porción madura de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1, pero con extremo N modificado, preferiblemente una metionina antepuesta; o

55 (c) la porción madura de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1 o parte de la misma que, en virtud de su procedencia de otros vertebrados, presenta variaciones, pero conserva esencialmente la misma actividad.

La producción de proteínas heterodímeras así como proteínas que se adecuan como segundo monómero ya se ha mencionado de nuevo arriba en la descripción.

- 5 Todavía otro objeto de la presente invención son medicamentos para el tratamiento y la prevención de enfermedades del sistema nervioso y/o para el tratamiento de situaciones neuropatológicas que son provocadas por la alteración del sistema nervioso y que contienen una cantidad biológicamente eficaz de MP52 y/o MP121 en calidad de principio activo. El medicamento de acuerdo con la invención contiene como MP52 biológicamente activo, preferiblemente
- (a) la porción madura y, eventualmente, otras porciones funcionales de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1;
  - 10 (b) partes de la proteína madura que presentan esencialmente la misma actividad;
  - (c) proteínas maduras con un extremo N modificado que, en esencia, presentan la misma actividad;
  - (d) una proteína madura o partes de la misma, la cual, en virtud de su origen de otros vertebrados, presenta una variación en la secuencia de aminoácidos, pero conserva esencialmente la misma actividad.
- 15 En una segunda forma preferida, el medicamento de acuerdo con la invención contiene en calidad de MP121 biológicamente activo
- (a) la porción madura y, eventualmente, otras porciones funcionales de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 3 ó 4;
  - (b) partes de la proteína madura que presentan esencialmente la misma actividad;
  - 20 (c) proteínas maduras con un extremo N modificado que, en esencia, presentan la misma actividad;
  - (d) una proteína madura o partes de la misma, la cual, en virtud de su origen de otros vertebrados, presenta una variación en la secuencia de aminoácidos, pero conserva esencialmente la misma actividad.

25 Las posibilidades de terapia de la proteína pueden variar en función de la formación de homodímeros o heterodímeros con otras proteínas con "motivo de nudo cistina" y, en particular, proteínas de TGF- $\beta$  o NGF, así como mediante el uso de proteínas quiméricas. Estructuras de este tipo pueden manifestarse asimismo adecuadas para aplicaciones clínicas y, por lo tanto, forman asimismo otro objeto de la presente invención.

30 Por consiguiente, también quedan incluidas composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas heterodímeras y/o proteínas de fusión de acuerdo con la invención. Puede ser ventajosa, en el caso de una composición farmacéutica, también la combinación de MP52 o MP121 con otras proteínas de la superfamilia de TGF- $\beta$  tales como p. ej., GDNF, las TGF- $\beta$ s, las BMPs y las activinas, o con proteínas de la familia NGF/neurotrofina tales como, p. ej., la NGF, las neurotrofinas tales como, p. ej., NT-3, -4/5 o BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) o también factores de crecimiento tales como FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidermal), factor de crecimiento glial, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas). Combinaciones de este tipo son asimismo objeto de la solicitud.

40 Eventualmente, una composición de acuerdo con la invención comprende, junto a los principios activos, sustancias de soporte, coadyuvantes, agentes diluyentes y/o materiales de carga farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente, una composición de este tipo puede comprender también gangliósidos que se presentan de forma natural, sus derivados, sales o análogos sintéticos.

45 Para el tratamiento o la prevención de enfermedades nerviosas pueden administrarse MP52 o MP121 mediante inyección, por vía oral, no oral, intracerebral, por inhalación, en forma de aplicación local externa o mediante cualesquiera otros métodos farmacéuticamente habituales. La dosis se encuentra en el intervalo de 0,1 a 1000  $\mu$ g/kg de peso corporal.

50 Es imaginable una aplicación de MP52 y/o MP121 biológicamente activa o bien de proteínas heterodímeras y/o proteínas quiméricas de acuerdo con la invención p. ej., pero también a través de células madre embrionarias no humanas implantadas que previamente, mediante transfección de elementos de ADN adecuados, se llevaron a una expresión constitutiva de las proteínas de acuerdo con la invención, en particular de MP52 o MP121. Además, es posible una habilitación de las proteínas de acuerdo con la invención, en particular de MP52 o MP121 biológicamente activo por parte de determinados sistemas virales. Por consiguiente, es posible transfectar vectores adecuados con la secuencia de ADN de acuerdo con la invención in vitro o in vivo en células de pacientes o transfectar los vectores in vitro en células e implantar luego éstas a un paciente.

Además, la aplicación de esta composición farmacéutica no está limitada al hombre, sino que puede también

comprender animales, en particular animales domésticos.

En general, con las proteínas utilizadas de acuerdo con la invención pueden tratarse enfermedades del sistema nervioso que en una forma cualquiera están relacionadas con la expresión de MP52 o bien MP121 o que responden de alguna forma a MP52 o MP121, por una parte mediante el aumento de la cantidad o bien de la actividad de MP52 o MP121 existente, por otra parte, también mediante la supresión de la actividad de MP52 o bien MP121. Una supresión de la actividad de MP52 o bien MP121 puede tener lugar mediante la inhibición de la transcripción y/o de la traducción, p. ej. mediante ácidos nucleicos antisentidos conocidos por el experto en la materia. Otra posibilidad es la unión de moléculas a receptores de MP52 o MP121 que, en contraposición a MP52 o bien MP121, no desencadenan transmisión de señales alguna. Por lo tanto, en el marco de la invención son también de interés los receptores para MP52 o MP121 en células. Para la búsqueda de receptores pueden someterse a ensayo, en principio, diferentes líneas de células en cuanto a su comportamiento en la unión de MP52 o bien MP121 radiactivamente marcada ( $^{125}\text{I}$ -MP52 o  $^{125}\text{I}$ -MP121) con subsiguiente reticulación. De células que unen MP52 o bien MP121 puede establecerse seguidamente una genoteca de ADNc en un vector de expresión (p. ej. adquirible de InVitrogen). Células que fueron transfectadas con ADNc receptor pueden entonces seleccionarse a través de la unión de MP52 o bien MP121 radiactivamente marcada. Estos son métodos conocidos por el experto en la materia tal como se utilizaron, p. ej., para el aislamiento de receptores de activina (Mathews, L.S. y Vale, W.W. Cell 65 (1991), págs. 973-982) y receptores de TGF- $\beta$  del tipo II (Lin et al. Cell 68 (1992) págs. 775 -785). Por analogía a los receptores de activina, TGF- $\beta$  y BMP conocidos se ha de suponer en el caso del receptor para MP52 y MP121 se trata asimismo de un complejo receptor perteneciente a esta familia, de modo que para el hallazgo de partes del complejo heterómero se pueden utilizar otros métodos conocidos por el experto en la materia tales como, p. ej., PCR con oligonucleótidos degenerados. Este método se ha aplicado, p. ej., también en el caso del receptor de activina de tipo I, receptores de TGF- $\beta$  de tipo I y receptores de BMP de tipo I (Tsuchida et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11242-11246; Attisano et al. (1993) Cell 75, 671-680; Franzén et al. (1993) Cell 75, 681-692; ten Dijke et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 16985-16988; Koenig et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 5961-5974).

La invención se ha de explicar mediante los siguientes Ejemplos.

### **Ejemplo 1**

#### **Expresión eucariótica y purificación de MP52**

Para la expresión de MP52 se eligieron virus vacuna, cuyo uso está ampliamente descrito y resulta repasable para el experto en la materia en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons (1989-1995)), en lo que sigue abreviado CP, bajo el Capítulo 16, Unidad 16.15-16.18. El ADNc con toda la zona codificadora para MP52 fue clonado en el vector pBP1. El plásmido resultante (pBP1MP52s) se depositó en la DSM (número de depósito 9217) el 24 de mayo de 1994 y se empleó para la producción de virus vacuna recombinantes tal como se da a conocer en el documento WO 95/04819. La expresión de MP52 en células 143B (HuTk-, ATCC CRL 8303) después de la infección con virus vacuna recombinantes tuvo lugar tal como se describe en el documento WO 95/04819. La purificación parcial de MP52 tuvo lugar tal como se describe en la misma divulgación, a través de una columna de heparina (HiTrap<sup>TM</sup>, Pharmacia n° 17-0407-01) y una subsiguiente HPLC de fase inversa (columna C8, Aquapore RP300, Applied Biosystems, tamaño de partículas: 7  $\mu\text{m}$ , tamaño de poros: 300 Å). Las fracciones con MP52 se agruparon, liofilizaron y se almacenaron a -80°C.

### **Ejemplo 2:**

#### **Expresión procariótica, purificación y replegamiento para formar MP52 activa**

La posible expresión de MP52 en E. coli ya se ha dado a conocer en los documentos WO 93/16099 y WO 95/04819, la expresión de MP52 maduro, también con histidinas colgadas en el extremo N, se ha dado asimismo a conocer (documento WO 95/04819). Las histidinas adicionales facilitan la purificación de la proteína mediante unión a columnas de quelatos de metales. Después de la purificación, la proteína MP52 madura expresada en E. coli en forma de monómero puede ser replegada para formar un dímero. La mayor parte de la porción madura de MP52 (aminoácidos 383 a 501 en SEQ ID NO. 2) con 10 aminoácidos adicionales, incluidas 6 histidinas en el extremo N (MHHHHHKL) se expresó en el vector pBP2 procariótico. Este vector es un derivado de pBR322 con resistencia a ampicilina, el cual contiene adicionalmente al promotor T7 procedente del plásmido pBluescript II SK (Stratagene). Además, el vector contiene, detrás del promotor T7, un lugar de unión ribosomal y un codón de iniciación como parte de un lugar de corte por restricción Nde I, seguido de 6 codones para histidina. Detrás de varios sitios de corte por



restricción (Hind III, Eco RI, Xho I, Bam HI, Sma I y Apa I) para la inserción de insertos así como codones de terminación en todos los tres marcos de lectura, sigue un terminador (T $\phi$ ). El plásmido pBP2MP52His se depositó el 2 de junio de 1995 en la DSM (número de depósito: DSM 10028). El mismo vector se utilizó, aprovechando el lugar de corte por restricción Nde I para la expresión de la MP52 madura (aminoácidos 382 a 501 en SEQ ID NO. 1) con sólo una metionina adicional en el extremo N. El plásmido pBP2MP52m se depositó el 2 de junio de 1995 en la DSM (número de depósito: DSM 10029). La expresión de la proteína MP52 con (MP52His) o sin (MP52m) colgante de histidina puede tener lugar mediante habilitación simultánea de T7-ARN polimerasa. La T7-ARN polimerasa puede habilitarse a través de diferentes métodos tales como, p. ej., un segundo plásmido con un gen para T7-ARN polimerasa o mediante infección con fagos que codifican la T7-ARN polimerasa o bien mediante cepas bacterianas especiales que tienen integrado al gen para T7-ARN polimerasa. Utilizando la cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS (Novagen, nº 69451-1) y la inducción de la T7-ARN polimerasa según los datos del fabricante con IPTG, se forma la proteína MP52 con y sin His-Tag en cuerpos de inclusión, a partir de los cuales pueden aislarse las proteínas según métodos convencionales. En virtud de His-Tag, la proteína MP52His puede purificarse a través de columnas formadoras de quelatos de metales tal como se describen, p. ej., en Hochuli et al. (BIO/Technology Vol. 6, 1321-1325 (1988)). MP52His y MP52m se purificaron adicionalmente a través de una HPLC de fase inversa. Se utilizó una columna de fase inversa (Nucleosil 300-7C4 de Macherey-Nagel, Art. 715023) con un caudal de 2 ml/min y un gradiente de acetonitrilo en TFA al 0,1% de 0 a 90% en 100 min. Bajo estas condiciones, comienza la elución de MP52His monómera y MP52m en acetonitrilo aproximadamente al 35%. La determinación de que se trata de la proteína MP52 se realizó en cada caso a través de análisis de transferencia Western con anticuerpos específicos para MP52. MP52m (121 aminoácidos) o bien MP52His (129 aminoácidos) muestran en geles de SDS-poliacrilamida (15%) un peso molecular aparente de aprox. 14 kD (peso molecular teórico: 13,7 kD) o bien de 15 kD (peso molecular teórico: 14,8 kD) tal como se muestra en la Figura 1 después de tinción con plata.

Con el fin de obtener material biológicamente activo, la MP52 monómera expresada en *E. coli* y purificada puede replegarse para formar una MP52 dímera. Esto puede tener lugar según métodos conocidos por el experto en la materia tal como se describen, p. ej., por Jaenicke, R. y Rudolph, R. (Protein structure, comp. Creighton, T.E., IRL Press, Capítulo 9 (1989)). Dado que para cada proteína varían particularmente las condiciones para el replegamiento, se sometieron a ensayo las condiciones para las proteínas MP52His y MP52m en relación con la solubilización así como valores del pH, temperatura y sistemas redox durante la renaturalización. Para la solubilización de las proteínas MP52 purificadas y liofilizadas se manifestaron adecuados reactivos típicos tales como urea y cloruro de guanidinio. Preferiblemente, la solubilización tuvo lugar a lo largo de 2 horas a la temperatura ambiente en tampón de solubilización (cloruro de guanidinio 6 M, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, DTT 3 mM, pH 8,0) a una concentración final de 2,6 mg de MP52His o MP52m por ml. El producto solubilizado se añadió luego a tampón de renaturalización, preferiblemente en una concentración final de 150 - 200  $\mu$ g de MP52His o MP52m por ml.

Para la renaturalización se demostró que el uso de intervalos de pH elevados (pH 8-10) repercutía favorablemente sobre el replegamiento para formar proteínas MP52 dímeras activas. En tal caso, pueden utilizarse sistemas tampón habituales tales como tampón fosfato o Tris con NaCl 1-2 M y otros aditivos tales como, p. ej., EDTA (2-10 mM) y Chaps (15-40 mM). Pueden emplearse sistemas redox habituales, descritos en la bibliografía (p. ej. Jaenicke R. y Rudolph, R., Protein structure, comp. Creighton, T.E., IRL Press, Capítulo 9, (1989)) tales como, p. ej., glutatión oxidado y reducido (p. ej.: GSSG 1 mM, GSH 2 mM). El replegamiento puede llevarse a cabo de manera efectiva en el intervalo de 4°C hasta la temperatura ambiente a lo largo de, p. ej., 48 horas. Las proteínas MP52 se pueden transformar bajo tales condiciones en un 50-90% en la forma dímera. Las condiciones mencionadas se han de considerar a modo de ejemplo y no son limitantes. Para el experto en la materia resulta posible, mediante la variación de condiciones individuales, transformar MP52 con eficacias similares en una proteína dímera activa. El análisis de las proteínas replegadas tuvo lugar a través de HPLC de fase inversa así como en geles teñidos con plata. Para la HPLC, las proteínas se ligaron a una columna (Aquapore RP-300, 7  $\mu$ m, Applied Biosystems) a tampón B al 35% (tampón A: TFA al 0,1% en agua; tampón B: acetonitrilo al 90%, TFA al 0,1%) con un caudal de 0,2 ml/min. En un gradiente de acetonitrilo de tampón B al 35 hasta 60% a lo largo de 50 min, las proteínas MP52 monómeras y dímeras se pueden separar una de otra (véase la Figura 2). La proporción de MP52His o bien MP52m replegada se estima en aprox. 70-90%. En geles de poliacrilamida al 15%, la MP52m dímera discurre a aproximadamente 22 kD (peso molecular teórico: 27,4 kD), y MP52His a aproximadamente 24 kD (peso molecular teórico: 29,6 kD), estimado según un marcador de peso molecular (véase la Figura 1). El colgante de histidina no muestra en tal caso influencia significativa alguna de la eficacia de replegamiento. Si se somete a ensayo la actividad de las dos proteínas a través de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP – siglas en alemán) en células ROB-C26, tal como se da a conocer, p. ej., en el documento WO 95/04819, entonces se demuestra que MP52His es activa a pesar del extremo N modificado, pero la actividad está ligeramente reducida con respecto a MP52m.

**Ejemplo 3:****Influencia de MP52 sobre neuronas dopaminérgicas**

5 Para investigar la influencia de MP52 sobre neuronas dopaminérgicas se aislaron neuronas del fondo del mesencéfalo de embriones de rata de 14 días de edad (E14) según un método descrito en Shimoda et al. (Brain Res. 586, 319-331 (1992)). La individualización y el cultivo de las células tuvo lugar tal como se describe por Krieglstein et al. (Neuroscience 63, 1189-1196 (1994)). La densidad de células asciende a 200.000 células/cm<sup>2</sup> en cubreobjetos revestidos con poliornitina/laminina. Al cabo de 24 horas de cultivo y seguidamente cada tres días se retiraron dos tercios del medio (500 µl) y se reemplazaron por medio de reciente aportación con los correspondientes aditivos. La MP52 parcialmente purificada y liofilizada tras heparina-Sepharose y HPLC de fase inversa se disolvió en acetonitrilo al 50% y se añadió al medio. Esto mismo tuvo lugar con MP52His replegada y purificada. La concentración final de MP52 o bien MP52His en el medio asciende a 20 ng/ml (la concentración final de acetonitrilo es 0,3%). Como control se disolvió y empleó una cantidad equiparable de MP52His monómera purificada en acetonitrilo al 50%. El control del medio contiene asimismo acetonitrilo al 0,3%. Al cabo de ocho días, los cultivos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 10 min a la temperatura ambiente, las células se permeabilizaron con acetona (10 min, -20°C) y se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfatos). Después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% en PBS, lavado y bloqueo con suero de caballo, tuvo lugar una tinción inmunocitoquímica. La tirosinahidroxilasa (TH) es una enzima limitante en la biosíntesis de dopamina y otras catecolaminas, de modo que TH puede ser utilizada como marcador para zonas dopaminérgicas en los presentes cultivos (no se aíslan células con contenido en noradrenalina). TH se detectó a lo largo de incubación durante una hora a 37°C con un anticuerpo monoclonal de ratón contra TH de rata (dilución 1:200, Boehringer Mannheim) y subsiguiente detección con el kit Vectastain ABC (Vecto Labs). Las células TH-positivas se recontaron en una superficie de 0,12 cm<sup>2</sup>. Para la tinción inmunocitoquímica de GFAP (proteína de carácter ácido fibrilar glial), las células fijadas se permeabilizaron con acetona (20 min, 20°C) y se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfatos). Después de la incubación con un anticuerpo monoclonal de ratón contra GFAP (Sigma), diluido a razón de 1:200, le siguió una incubación con un anticuerpo acoplado a peroxidasa contra el anticuerpo monoclonal de ratón. La visualización tuvo lugar según métodos convencionales mediante la adición del sustrato enzimático DAB (diaminobenzidina).

**Ejemplo 4:****Examen de la transcripción de MP52 en el cerebro y la médula dorsal**

35 Para comprobar si MP52 se transcribe en el cerebro y/o la médula dorsal, se aisló el ARN total de la médula dorsal de ratas y de todo el cerebro o bien regiones individuales del cerebro de ratones según métodos convencionales y se transcribió en ADNc según métodos conocidos por el experto en la materia. El ADNc, el cual se obtuvo en cada caso a partir de 100 ng de ARN, se empleó en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores empleados para la amplificación (CAACAGCAGCGTGAAGTTGGAG y ACTAATGTCAAACACGTACCTCTG) se encuentran el caso de ADN genómico humano en diferentes exones, de modo que el ADN genómico puede ser diferenciado de ADNc. Como control se emplearon 0,5 µg de ADN genómico de ratón, que, asimismo, no proporciona ningún fragmento de PCR al igual que el ADNc. La PCR se llevó a cabo a lo largo de 30 ciclos (94°C, 54°C, 72°C) en sendos 50 µl de tanda de reacción (en cada caso NTPs 200 µM, 30 pmol de cada uno de los cebadores, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 16,6 mM, Tris/HCl 67 mM pH 8,8, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 6,7 µM, β-mercaptoetanol 10 mM, 170 µg/ml de BSA, 5 U de AmpliTaq (Perkin Elmer nº N8080160). Un tercio de los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 4%, se transfirieron a membranas en la transferencia Southern y, mediante hibridación con una sonda de MP52, se detectó la especificidad de los fragmentos de la PCR. Se pudo demostrar que MP52 es transcrito tanto en la médula espinal como también en regiones individuales del cerebro.

**Ejemplo 5:****Expresión eucariótica y purificación de MP121**

5 Para la expresión de MP121 se eligieron los virus vacuna al igual que para MP52 en el Ejemplo 1. El ADNc se clonó con toda la zona codificadora para MP121 en el vector pBP1 (el plásmido pBP1MP121 resultante se depositó el 12.01.95 en la DSM bajo el número 9665) y se empleó para la producción de virus vacuna recombinantes. En el caso de la infección de células tales como, p. ej., células NIH-3T 3 (DSM ACC 59, embrión de ratón suizo), con los virus recombinantes, se produce la expresión de MP121. Las etapas individuales se divulgan de manera detallada en el documento WO 96/01316. En el transcurso de los ensayos de expresión se sometió a ensayo también a otras líneas de células. En tal caso, se demostró, sorprendentemente, que en el caso de algunas líneas de células, junto a la MP121 dímera se forman también claras cantidades de una MP121 monómera. Dado que este monómero, en el análisis en gel de poliacrilamida (con subsiguiente detección mediante análisis de transferencia Western) eluye más rápidamente que el monómero obtenido mediante reducción del dímero, se ha de tratar de una MP121 monómera plegada que presenta una estructura globular. Como ejemplo, en la Figura 5 se muestra la expresión de MP121 en células HepG2 (carcinoma hepatocelular, hombre, ATCC HB8065). Dado que entretanto se pudo demostrar mediante análisis de transferencia Northern que MP121 es expresada naturalmente en HepG2 (línea de células de hepatocitos procedente del hígado), se ha de partir del hecho de que también a la forma monómera de MP121 se le asigna una importancia fisiológica. La MP121 monómera aparece junto a la MP121 dímera en cantidades significativas, p. ej. también en Mv1Lu (NBL-7, pulmón, nutria, ATCC CCL 64) o Hela (carcinoma epitelial, cuello uterino, hombre, ATCC CCL 2).

En ensayos de expresión de MP121 aprovechando el sistema de baculovirus en larvas de insectos (*Trichoplusia ni*) se encontró la forma dímera en la hemolinfa.

La purificación parcial de MP121 a partir del sobrenadante del cultivo celular tuvo lugar tal como se describe en el documento WO 96/01316 a través de fenil-Sepharose y HPLC de fase inversa. Paralelamente, según la misma metodología, se elaboró la cantidad correspondiente de sobrenadante del cultivo celular después de la infección con virus de tipo salvaje (wt) como testigo. En el caso de ensayos para mejorar la purificación se pudo demostrar que el uso alternante de agentes eluyentes que contienen TFA (ácido trifluoroacético) o HFBA (ácido heptafluorobutírico), combinado con transcurros modificados de gradientes, se podía aumentar esencialmente el grado de pureza de MP121. Para ello, p. ej., primeramente se eluye una columna (Aquapore RP-300, Applied Biosystems, tamaño de partículas: 7 µm) a un caudal de 0,2 ml/min con TFA al 0,1% (acetoniitrilo al 1,36% por min), luego una columna con HFBA al 0,2% (acetoniitrilo al 0,23% por min) y, finalmente, una columna de nuevo con TFA al 0,1% (acetoniitrilo al 0,23% por min) en el agente eluyente. Las fracciones eluidas que contiene MP121 pueden purificarse después de cada elución, liofilizarse y luego resuspenderse para la aplicación sobre la nueva columna en TFA al 0,1%/H<sub>2</sub>O. Finalmente, las muestras liofilizadas se almacenaron a -70°C hasta su uso. La estimación cuantitativa tuvo lugar en análisis de transferencia Western en comparación con MP121m (aminoácidos 237 a 352 en SEQ ID NO. 2 con una metionina adicional en el extremo N) la cual, de manera similar a MP52, se produjo en *E. coli*, no obstante utilizando la cepa HMS 174 (DE3) (Novagen n° 69453). La purificación tuvo lugar según métodos convencionales a partir de cuerpos de inclusión con subsiguiente lavado de los cuerpos de inclusión con cloruro de guanidinio 2 M/HCl en Tris 20 mM pH 8,0 (bajo ultrasonidos) y resuspensión en cloruro de guanidinio 6 M/HCl en Tris 20 mM pH 8,0 con subsiguiente purificación a través de la fase inversa según métodos convencionales.

**Ejemplo 6:****Influencia de MP52 y MP121 sobre neuronas de la retina**

Con el fin de investigar la influencia de MP52 y MP121 en otro sistema, se aislaron cultivos de tejidos de la retina procedentes de embriones de gallina. El método para el aislamiento de trocitos de tejido en forma de un pequeño disco de un tamaño aproximadamente igual procedentes de la retina se describe en detalle en Carri, N.G. y Ebendal, T. (*Dev. Brain Res.*, Vol. 6 (1983), 219-229), Carri, N.G. y Ebendal, T. (*Anat. Rec.*, Vol. 214 (1986), págs. 226-229) y Carri, N. G. et al. (*J. Neurosci. Res.* Vol. 19 (1988) págs. 428-439).

En estos ensayos se mide la estimulación in vitro del desarrollo de fibras nerviosas a partir de explantes de la retina embrionarios en una matriz de colágeno. En síntesis, las partes de tejido se retiran con un capilar de vidrio de la retina de embriones de gallina (Leghorn blanca, 6º día del desarrollo embrionario) y mediante lavado repetido se separa el epitelio pigmentario de la retina y células mesenquimales. Las partículas de tejido, así tratadas, se

transfirieron a placas de cultivo revestidas sobre colágeno y se incubaron durante una noche (37,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>). A continuación, se añadieron los correspondientes factores o controles y los cultivos se continuaron incubando. Para MP52 se empleó la MP52m dímera, tal como se describe en el Ejemplo 2, en diferentes concentraciones. La MP52 monómera que, hasta ahora, no había mostrado actividad alguna en ningún ensayo, se empleó como control negativo en las concentraciones correspondientes. Para MP121 se empleó en diferentes concentraciones el material parcialmente purificado descrito en el Ejemplo 5 después de fenil-Sepharose y HPLC de fase inversa. El material obtenido de manera correspondiente después de la infección con tipo salvaje se empleó como control. Como control independiente, los explantes se mantuvieron en medio de cultivo con algo de albúmina de suero bovino.

Las proteínas se disolvieron en un tampón acuoso o acetonitrilo al 50% y se continuaron diluyendo en el medio de cultivo hasta concentraciones finales de 1,25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml. El tipo de disolución no tenía influencia alguna sobre el resultado.

Al cabo de cuatro días en cultivo, se midió la longitud máxima de los haces de nervios conductores bajo el microscopio en el campo oscuro. Tal como se muestra en las Tablas 1 y 2, tanto MP52 como también MP121 estimulan, en función de la dosis, el desarrollo de las neuritas. MP52 tiene la actividad máxima en el intervalo de 25 - 100 ng/ml y MP121 muestra una actividad máxima en el intervalo de aprox. 25 ng/ml, lo cual corresponde a una longitud real de las fibras 1,3 - 1,7 mm o bien de 1,7 mm frente a 0,2 mm para el control negativo. MP52 monómera y el control de tipo salvaje no mostraron estimulación alguna que sobrepasara al control negativo.

Tabla 1

MP52m dímera (ng/ml)	Longitud (unidades)	Valor medio $\pm$ EMT
1,25	15/9/4/13	10,2 $\pm$ 2,4
12,5	25/18/10/21	18,5 $\pm$ 3,1
25	74/38/48/47/27/30	44,0 $\pm$ 6,9
50	62/65/52/51/50/62	57,0 $\pm$ 2,4
100	26/33/61/70/57/61	51,5 $\pm$ 7,3
200	10/13/11/9	10,7 $\pm$ 0,8

Tabla 1: Longitud de las neuritas retinales después de 4 días de cultivo bajo la acción de diferentes concentraciones de MP52. Las longitudes de las neuritas de los controles que contenían solamente medio de cultivo ascendieron a 5,5/8/10/11/4,8/7 unidades con un valor medio de 7,7 unidades (EMT 1,0). Las longitudes de las neuritas de los controles con MP52m monómera (mismas concentraciones que para MP52m dímera) proporcionaron, por término medio, las mismas longitudes que el control que solamente contenía medio de cultivo. Una unidad corresponde a una medida real de 0,03 mm en la placa de cultivo.

Tabla 2

MP121 (ng/ml)	Longitud (unidades)	Valor medio $\pm$ EMT
1,25	7/12/5/6	7,5 $\pm$ 1,5
12,5	19/20/13/26	19,5 $\pm$ 2,6
25	50/52/60/71/65/53	58,5 $\pm$ 3,4
50	37/32/48/41/36/20	35,6 $\pm$ 3,8
100	21/8/19/18	16,5 $\pm$ 2,9
200	11/8/12/10	10,2 $\pm$ 0,8

Tabla 2: Longitud de las neuritas retinales después de 4 días de cultivo bajo la acción de diferentes concentraciones de MP121. Las longitudes de las neuritas del control con el sobrenadante del cultivo celular purificado en paralelo de la infección de tipo salvaje proporcionaron, por término medio, las mismas longitudes que el control que sólo contenía medio de cultivo (véase el texto con respecto a la Tabla 1). Una unidad corresponde a una medida real de 0,03 mm en la placa de cultivo.

Descripción detallada de las figuras:

Figura 1: Gel de poliacrilamida al 15% teñido con plata, en cada caso con 0,2  $\mu$ g de MP52His (pistas 2 y 4) o 0,2  $\mu$ g

de MP52m (pistas 3 y 5) después de purificación de la forma monómera (pistas 2 y 3) o bien después del replegamiento para formar la proteína dímera activa y separación de monómeros restantes a través de la HPLC (pistas 4 y 5). El marcador del peso molecular (15 kD, 25 kD, 35 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD, 150 kD) en la pista 1 es de Novagen (nº 69149-1).

5  
Figura 2: El cromatograma muestra el comportamiento de elución de MP52His monómera solubilizada (. . .) así como la separación de MP52His dímera de formas monómeras restantes después de la renaturalización (-----) en una HPLC de fase inversa. MP52His dímera eluye bajo las condiciones elegidas antes que la forma monómera. Asimismo está dibujado el gradiente de acetonitrilo referido a % de tampón B.

10  
Figura 3: Número de las neuronas dopaminérgicas TH-inmuno-reactivas supervivientes después de aislamiento a partir del mesencéfalo de embriones de rata (E14) y cultivo durante 8 días. Junto al control con neuronas no tratadas (medio con acetonitrilo al 0,3%) se representa el efecto en el caso de la adición de 20 ng/ml de MP52His monómera purificada de la expresión en *E. coli* (monómero MP52His), 20 ng/ml de Mp52His purificada de la expresión en *E. coli* después de la renaturalización para dar la proteína dímera (dímero MP52His), así como 20 ng/ml o bien 2 ng/ml de MP52 parcialmente purificada de la expresión en virus vacuna (MP52). Se muestra el valor medio  $\pm$  EMT de una determinación triple.

15  
20  
Figura 4: Fotografía de células después del aislamiento a partir del mesencéfalo de embriones de rata (E14) después de cultivo durante 8 días y tinción de GFAPs (proteínas de carácter ácido fibrilares gliales). Se muestra el efecto de 20 ng/ml de MP52His monómera purificada (A) a partir de la expresión en *E. coli*, 20 ng/ml de MP52His dímera purificada (B) procedente de la expresión en *E. coli* después de la renaturalización, células no tratadas (C, medio con acetonitrilo al 0,3% como control), 20 ng/ml (D) o bien 2 ng/ml (E) de MP52 parcialmente purificada a partir de la expresión en virus vacuna y 2 ng/ml de TGF- $\beta$  3 (F).

25  
30  
Se fotografió en cada caso una sección representativa con un aumento de 400 veces en el microscopio (Axiophot) con contraste de interferencia. La longitud de las barras (-----) corresponde a 25  $\mu$ m.

35  
40  
Figura 5: Transferencia Western con anticuerpos de conejo contra MP121  
1: sobrenadante del cultivo celular de células Hep-G2 después de infección con virus vacuna recombinantes (con ADNc de MP121 insertado) bajo condiciones no reductoras  
2: sobrenadante del cultivo de células Hep-G2 después de infección con virus vacuna de tipo salvaje bajo condiciones no reductoras  
3: marcador del peso molecular de proteínas pre-teñido (dibujado de manera esquemática) con los pesos moleculares aparentes de 15,5/18,2/27,8/43,8/71,5 kD (Gibco BRL nº 26041-020)  
4: sobrenadante del cultivo celular de células Hep-G2 después de infección con virus vacuna recombinantes (con ADNc de MP121 insertado) bajo condiciones reductoras  
5: sobrenadante del cultivo celular de células Hep-G2 después de infección con virus vacuna de tipo salvaje bajo condiciones reductoras

45  
50  
Figura 6: Desarrollo de las fibras nerviosas procedentes de la retina de gallinas embrionarias después de 4 días en cultivo de tejidos. Toma microscópica de cultivos vivos en campo oscuro.  
A: MP52m monómera (5 ng/ml) purificada a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*.  
B: MP52m dímera (5 ng/ml) purificada a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli* y replegada para formar la proteína dímera nativa.  
C: MP121 (5 ng/ml) purificada a partir de material sobrenadante de cultivo celular después de la expresión con ayuda del sistema de vacunas en células NIH3T3.

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE:  
 (A) NOMBRE: Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung  
 von Pharmaka mbH  
 (B) CALLE: Czernyring 22  
 (C) LOCALIDAD: Heidelberg  
 10 (E) PAÍS: DE  
 (F) CÓDIGO POSTAL: 69115
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Uso de MP52 y/o MP121 para el tratamiento y la prevención de  
 15 enfermedades del sistema nervioso
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 20 (A) SOPORTE DE DATOS: Disco blando  
 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible  
 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión Nº 1.25 (OEP)

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 501 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína
- (ix) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO. 1:
- 35

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

ES 2 389 624 T3

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe  
 130 135 140  
 Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu  
 145 150 155 16  
 Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu  
 165 170 175  
 Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val  
 180 185 190  
 Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys  
 195 200 205  
 Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe  
 210 215 220  
 Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg  
 225 230 235 24  
 Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly  
 245 250 255  
 Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg  
 260 265 270  
 Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly  
 275 280 285  
 Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys  
 290 295 300  
 Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val  
 325 330 335  
 His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp  
 340 345 350  
 Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr  
 355 360 365  
 Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu  
 370 375 380  
 Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys  
 385 390 395 400  
 Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp  
 405 410 415  
 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu  
 420 425 430  
 Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val  
 435 440 445  
 Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr

```

          450                455                460
Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp
465                470                475                480
Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu
          485                490                495
Ser Cys Gly Cys Arg
          500
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 2:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
  - (A) LONGITUD: 2703 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) FORMA DE LA CADENA: ambas
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:
  - (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
  - (B) POSICIÓN: 640 ....2142
- 15 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO. 2:

```

CCATGGCCTC GAAAGGGCAG CGGTGATTTT TTTCACATAA ATATATCGCA CTAAATGAG      60
TTTAGACAGC ATGACATCAG AGAGTAATTA AATTGGTTTG GGTGGAATT CCGTTTCCAA      120
TTCCTGAGTT CAGGTTTGTG AAAGATTTTT CTGAGCACCT GCAGGCCTGT GAGTGTGTGT      180
GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGA AGTATTTTCA CTGAAAGGA TTCAAAATA      240
GGGGGAAAAA AAAACTGGAG CACACAGGCA GCATTACGCC ATTCTTCCTT CTGGAAAAA      300
TCCCTCAGCC TTATACAAGC CTCCTTCAAG CCCTCAGTCA GTTGTGCAGG AGAAAGGGGG      360
CGGTTGGCTT TCTCCTTTC AAGACGAGTT ATTTTCAGCT GCTGACTGGA GACGGTGCAC      420
GTCTGGATAC GAGAGCATTT CCACTATGGG ACTGGATACA AACACACACC CGGCAGACTT      480
CAAGACTCTC AGACTGAGGA GAAAGCCTTT CTTCTGCTG CTACTGCTGC TGCCGCTGCT      540
TTTGAAGTC CACTCCTTTC ATGGTTTTTC CTGCCAAACC AGAGGCACCT TTGCTGCTGC      600
CGCTGTTCTC TTTGGTGTCA TTCAGCGGCT GGCCAGAGG ATG AGA CTC CCC AAA      654
                               Met Arg Leu Pro Lys
                               1           5
CTC CTC ACT TTC TTG CTT TGG TAC CTG GCT TGG CTG GAC CTG GAA TTC      702
Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp Leu Asp Leu Glu Phe
                               10           15           20
ATC TGC ACT GTG TTG GGT GCC CCT GAC TTG GGC CAG AGA CCC CAG GGG      750
Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly Gln Arg Pro Gln Gly
                               25           30           35
ACC AGG CCA GGA TTG GCC AAA GCA GAG GCC AAG GAG AGG CCC CCC CTG      798
Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Glu Arg Pro Pro Leu
                               40           45           50
GCC CGG AAC GTC TTC AGG CCA GGG GGT CAC AGC TAT GGT GGG GGG GCC      846
Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser Tyr Gly Gly Gly Ala
                               55           60           65
    
```



ES 2 389 624 T3

ACC AAT GCC AAT GCC AGG GCA AAG GGA GGC ACC GGG CAG ACA GGA GGC Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly 70 75 80 85	894
CTG ACA CAG CCC AAG AAG GAT GAA CCC AAA AAG CTG CCC CCC AGA CCG Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro 90 95 100	942
GGC GGC CCT GAA CCC AAG CCA GGA CAC CCT CCC CAA ACA AGG CAG GCT Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala 105 110 115	990
ACA GCC CGG ACT GTG ACC CCA AAA GGA CAG CTT CCC GGA GGC AAG GCA Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala 120 125 130	1038
CCC CCA AAA GCA GGA TCT GTC CCC AGC TCC TTC CTG CTG AAG AAG GCC Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala 135 140 145	1086
AGG GAG CCC GGG CCC CCA CGA GAG CCC AAG GAG CCG TTT CGC CCA CCC Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro 150 155 160 165	1134
CCC ATC ACA CCC CAC GAG TAC ATG CTC TCG CTG TAC AGG ACG CTG TCC Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser 170 175 180	1182
GAT GCT GAC AGA AAG GGA GGC AAC AGC AGC GTG AAG TTG GAG GCT GGC Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly 185 190 195	1230
CTG GCC AAC ACC ATC ACC AGC TTT ATT GAC AAA GGG CAA GAT GAC CGA Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg 200 205 210	1278
GGT CCC GTG GTC AGG AAG CAG AGG TAC GTG TTT GAC ATT AGT GCC CTG Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu 215 220 225	1326
GAG AAG GAT GGG CTG CTG GGG GCC GAG CTG CGG ATC TTG CGG AAG AAG Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys 230 235 240 245	1374
CCC TCG GAC ACG GCC AAG CCA GCG GCC CCC GGA GGC GGG CGG GCT GCC Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Gly Arg Ala Ala 250 255 260	1422
CAG CTG AAG CTG TCC AGC TGC ACC AGC GGC CGG CAG CCG GCC TCC TTG Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu 265 270 275	1470
CTG GAT GTG CGC TCC GTG CCA GGC CTG GAC GGA TCT GGC TGG GAG GTG Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val 280 285 290	1518
TTC GAC ATC TGG AAG CTC TTC CGA AAC TTT AAG AAC TCG GCC CAG CTG Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu 295 300 305	1566
TGC CTG GAG CTG GAG GCC TGG GAA CGG GGC AGG GCC GTG GAC CTC CGT	1614

ES 2 389 624 T3

Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg  
 310 315 320 325

GGC CTG GGC TTC GAC CGC GCC GCC CGG CAG GTC CAC GAG AAG GCC CTG 1662  
 Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val His Glu Lys Ala Leu  
 330 335 340

TTC CTG GTG TTT GGC CGC ACC AAG AAA CGG GAC CTG TTC TTT AAT GAG 1710  
 Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp Leu Phe Phe Asn Glu  
 345 350 355

ATT AAG GCC CGC TCT GGC CAG GAC GAT AAG ACC GTG TAT GAG TAC CTG 1758  
 Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr Val Tyr Glu Tyr Leu  
 360 365 370

TTC AGC CAG CGG CGA AAA CGG CGG GCC CCA CTG GCC ACT CGC CAG GGC 1806  
 Phe Ser Gln Arg Arg Lys Asn Lys Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly  
 375 380 385

AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT CGC TGC AGT CGG AAG GCA CTG 1854  
 Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu  
 390 395 400 405

CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC 1902  
 His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro  
 410 415 420

CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG 1950  
 Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu  
 425 430 435

CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG 1998  
 Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met  
 440 445 450

AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG 2046  
 Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr  
 455 460 465

CGG CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG 2094  
 Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val  
 470 475 480 485

GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 2142  
 Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg  
 490 495 500

TAGCAGCACT GGCCCTCTGT CTTCTGGGT GGCACATCCC AAGAGCCCCT TCCTGCACTC 2202

CTGGAATCAC AGAGGGGTCA GGAAGCTGTG GCAGGAGCAT CTACACAGCT TGGGTGAAAG 2262

GGGATTCCAA TAAGCTTGCT CGCTCTCTGA GTGTGACTTG GGCTAAAGGC CCCCTTTTAT 2322

CCACAAGTTC CCCTGGCTGA GGATTGCTGC CCGTCTGCTG ATGTGACCAG TGGCAGGCAC 2382

AGGTCCAGGG AGACAGACTC TGAATGGGAC TGAGTCCCAG GAAACAGTGC TTTCCGATGA 2442

GACTCAGCCC ACCATTTCTC CTCACCTGGG CCTTCTCAGC CTCTGGACTC TCCTAAGCAC 2502

CTCTCAGGAG AGCCACAGGT GCCACTGCCT CCTCAAATCA CATTGTGCC TGGTGACTTC 2562

# ES 2 389 624 T3

CTGTCCTGG GACAGTTGAG AAGCTGACTG GGCAAGAGTG GGAGAGAAGA GGAGAGGGCT 2622  
TGGATAGAGT TGAGGAGTGT GAGGCTGTTA GACTGTTAGA TTAAATGTA TATTGATGAG 2682  
ATAAAAAGCA AAAGTGTGCC T 2703

## (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO. 3:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 352 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) FORMA DE LA CADENA:  
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína
- (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:  
15 (A) ORGANISMO: Homo sapiens
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO. 3:

ES 2 389 624 T3

Met Thr Ser Ser Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Leu Ala Pro Thr Thr  
1 5 10 15  
Val Ala Thr Pro Arg Ala Gly Gly Gln Cys Pro Ala Cys Gly Gly Pro  
20 25 30  
Thr Leu Glu Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys  
35 40 45  
Arg Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Thr Gln Arg Pro Thr Leu Asn  
50 55 60  
Arg Pro Val Ser Arg Ala Ala Leu Arg Thr Ala Leu Gln His Leu His  
65 70 75 80  
Gly Val Pro Gln Gly Ala Leu Leu Glu Asp Asn Arg Glu Gln Glu Cys  
85 90 95  
Glu Ile Ile Ser Phe Ala Glu Thr Gly Leu Ser Thr Ile Asn Gln Thr  
100 105 110  
Arg Leu Asp Phe His Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ala Gly Asp Arg Glu  
115 120 125  
Val Gln Gln Ala Ser Leu Met Phe Phe Val Gln Leu Pro Ser Asn Thr  
130 135 140  
Thr Trp Thr Leu Lys Val Arg Val Leu Val Leu Gly Pro His Asn Thr  
145 150 155 160  
Asn Leu Thr Leu Ala Thr Gln Tyr Leu Leu Glu Val Asp Ala Ser Gly  
165 170 175  
Trp His Gln Leu Pro Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln  
180 185 190  
Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Leu Glu Gly Gln Val Ala Gln Ser  
195 200 205  
Ser Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala His Arg Pro Phe Val Ala Ala Arg  
210 215 220  
Val Arg Val Gly Gly Lys His Gln Ile His Arg Arg Gly Ile Asp Cys  
225 230 235 240  
Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe  
245 250 255  
Arg Glu Ile Gly Trp His Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala  
260 265 270  
Met Asn Phe Cys Ile Gly Gln Cys Pro Leu His Ile Ala Gly Met Pro  
275 280 285  
Gly Ile Ala Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala  
290 295 300  
Asn Thr Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr  
305 310 315 320  
Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile  
325 330 335  
Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser  
340 345 350

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 352 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 (C) FORMA DE LA CADENA:  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína
- (vi) PROCEDENCIA ORIGINAL:  
 (B) ORGANISMO: Ratón
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO. 4
- Met Ala Ser Ser Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Pro Thr Thr  
 1 5 10 15  
 Val Val Asn Pro Lys Thr Glu Gly Pro Cys Pro Ala Cys Trp Gly Ala  
 20 25 30  
 Ile Phe Asp Leu Glu Ser Gln Arg Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ala Lys  
 35 40 45  
 Lys Ser Ile Leu Asp Lys Leu His Leu Ser Gln Arg Pro Ile Leu Ser  
 50 55 60  
 Arg Pro Val Ser Arg Gly Ala Leu Lys Thr Ala Leu Gln Arg Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Pro Arg Arg Glu Thr Leu Leu Glu His Asp Gln Arg Gln Glu Glu  
 85 90 95  
 Tyr Glu Ile Ile Ser Phe Ala Asp Thr Asp Leu Ser Ser Ile Asn Gln  
 100 105 110  
 Thr Arg Leu Glu Phe His Phe Ser Gly Arg Met Ala Ser Gly Met Glu  
 115 120 125  
 Val Arg Gln Thr Arg Phe Met Phe Phe Val Gln Phe Pro His Asn Ala  
 130 135 140  
 Thr Gln Thr Met Asn Ile Arg Val Leu Val Leu Arg Pro Tyr Asp Thr  
 145 150 155 160  
 Asn Leu Thr Leu Thr Ser Gln Tyr Val Val Gln Val Asn Ala Ser Gly  
 165 170 175  
 Trp Tyr Gln Leu Leu Leu Gly Pro Glu Ala Gln Ala Ala Cys Ser Gln  
 180 185 190  
 Gly His Leu Thr Leu Glu Leu Val Pro Glu Ser Gln Val Ala His Ser  
 195 200 205  
 Ser Leu Ile Leu Gly Trp Phe Ser His Arg Pro Phe Val Ala Ala Gln  
 210 215 220  
 Val Arg Val Glu Gly Lys His Arg Val Arg Arg Arg Gly Ile Asp Cys  
 225 230 235 240  
 Gln Gly Gly Ser Arg Met Cys Cys Arg Gln Glu Phe Phe Val Asp Phe  
 245 250 255

ES 2 389 624 T3

Arg Glu Ile Gly Trp Asn Asp Trp Ile Ile Gln Pro Glu Gly Tyr Ala  
260 265 270

Met Asn Phe Cys Thr Gly Gln Cys Pro Leu His Val Ala Gly Met Pro  
275 280 285

Gly Ile Ser Ala Ser Phe His Thr Ala Val Leu Asn Leu Leu Lys Ala  
290 295 300

Asn Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Arg Gly Ser Cys Cys Val Pro Thr  
305 310 315 320

Ser Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp Ser Asn Ile  
325 330 335

Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Ser  
340 345 350

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Uso de MP52 biológicamente activa para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos o pérdidas de funciones nerviosas, provocadas por estados patológicos agudos o crónicos y/o para el tratamiento de situaciones neuropatológicas que son provocadas por la alteración del sistema nervioso, utilizándose en calidad de MP52 biológicamente activa
- (a) la porción madura y, eventualmente, otras porciones funcionales de la secuencia de proteínas mostrada en SEQ ID NO. 1;
- 10 (b) partes de la proteína madura que presentan esencialmente la misma actividad;
- (c) proteínas maduras con un extremo N modificado que presentan la misma actividad;
- (d) una proteína madura o partes de la misma, la cual, en virtud de su procedencia de otros vertebrados, presenta una variación en la secuencia de aminoácidos, pero conserva la misma actividad.
- 15 2.- Uso según la reivindicación 1, para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades en el ojo, en particular de la capa neuronal de la retina, de la córnea, del nervio óptico y/o de otros nervios del cerebro, y para uso en trasplantes de retina o de córnea.
- 20 3.- Uso según la reivindicación 1, para la producción de un medicamento para el tratamiento de estados patológicos agudos que fueron provocados por lesiones.
- 4.- Uso según la reivindicación 1, para la producción de un medicamento para el tratamiento de estados patológicos agudos, provocados por deficiencias cerebrovasculares, inflamatorias, infecciosas, metabólicas y/o influencias tóxicas, desarrollo de tumores y operaciones quirúrgicas.
- 25 5.- Uso según la reivindicación 1, para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.
- 30 6.- Uso según la reivindicación 1, para la producción de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, Alzheimer o enfermedad de Huntington.
- 7.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque se utiliza una proteína de fusión a base de MP52 biológicamente activa o partes de la misma y otra proteína de la superfamilia de las proteínas con "motivo de nudo cistina" o partes de la misma.
- 35 8.- Uso según la reivindicación 7, caracterizado porque se utiliza una proteína de fusión a base de MP52 y MP121 biológicamente activas o partes de las mismas.
- 40 9.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque en calidad de MP52 biológicamente activa se utiliza un heterodímero de una MP52 biológicamente activa y un monómero de otra proteína de la superfamilia de las proteínas con "motivo de nudo cistina".
- 45 10.- Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque en calidad de MP52 biológicamente activa se utiliza un heterodímero de una MP52 y MP121 biológicamente activas.
- 50 11.- Uso según una de las reivindicaciones 7 a 10, para la producción de un medicamento para el tratamiento o la prevención de enfermedades en el ojo, en particular de la capa neuronal de la retina, de la córnea, del nervio óptico y/o de otros nervios del cerebro y para uso en trasplantes de retina o córnea.
- 12.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque se añaden adicionalmente gangliósidos que aparecen de forma natural, sus derivados, sales o análogos sintéticos.
- 13.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque se añade adicionalmente una proteína de la superfamilia de las proteínas con "motivo de nudo cistina".
- 55 14.- Uso según una de las reivindicaciones 7, 9 ó 13, caracterizado porque en el caso de la proteína de la superfamilia con "motivo de nudo cistina" se trata de una proteína de la superfamilia de TGF- $\beta$ , familia de NGF/neurotrofina o familia de PDGF.

15.- Uso según la reivindicación 14, caracterizado porque se trata de proteínas de TGF- $\beta$ , BMP, activina, GDNF, NGF, BDNF, NT3 o NT4/5.

5 16.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado porque se administra adicionalmente un factor de crecimiento tal como FGF, EGF o factor de crecimiento glial.

17.- Uso según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque se administra por vía intracerebral, oral, mediante inyección, mediante inhalación, en forma de aplicación local externa.



**Fig. 1**

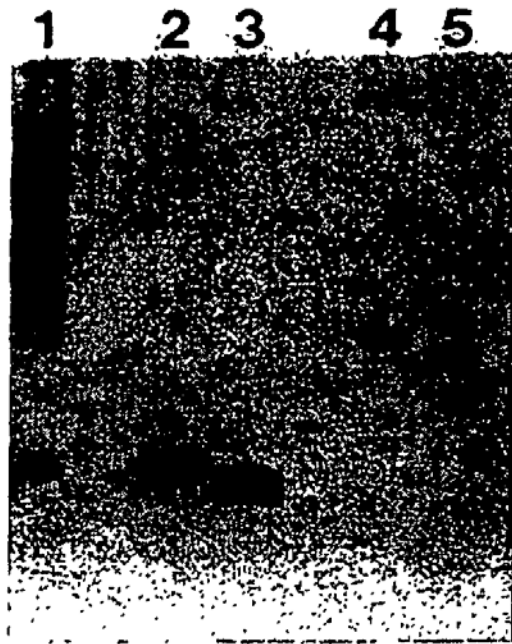


Fig. 2

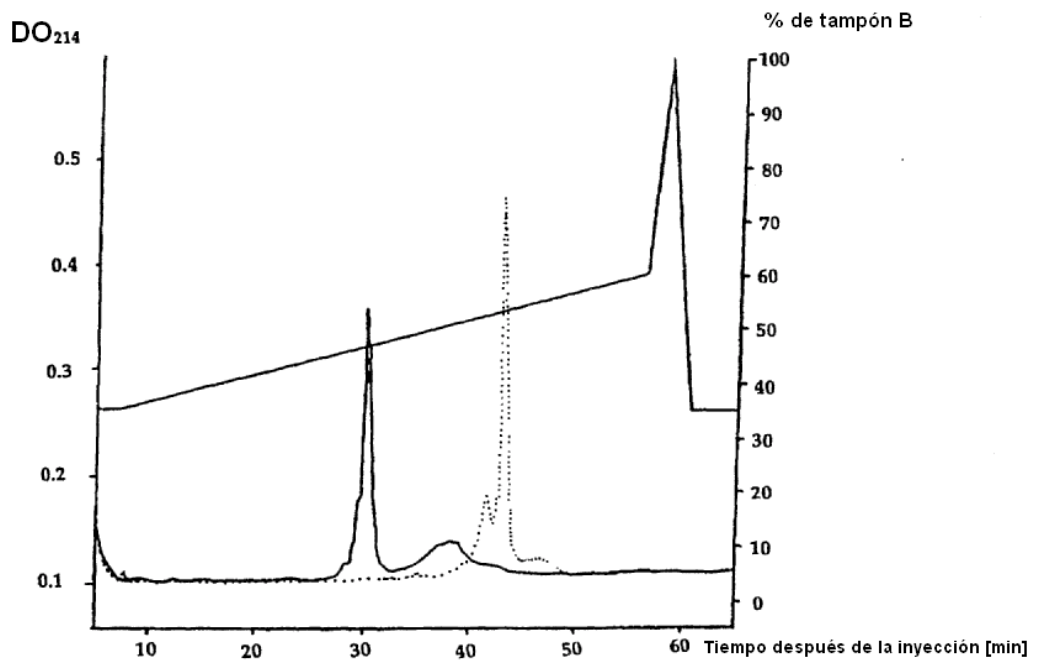
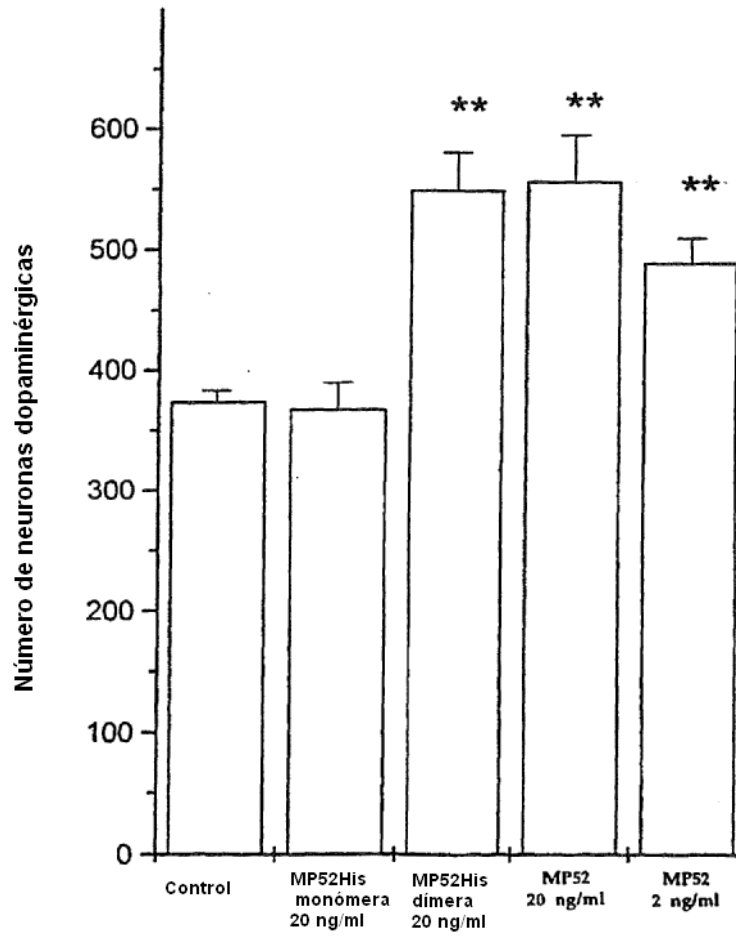
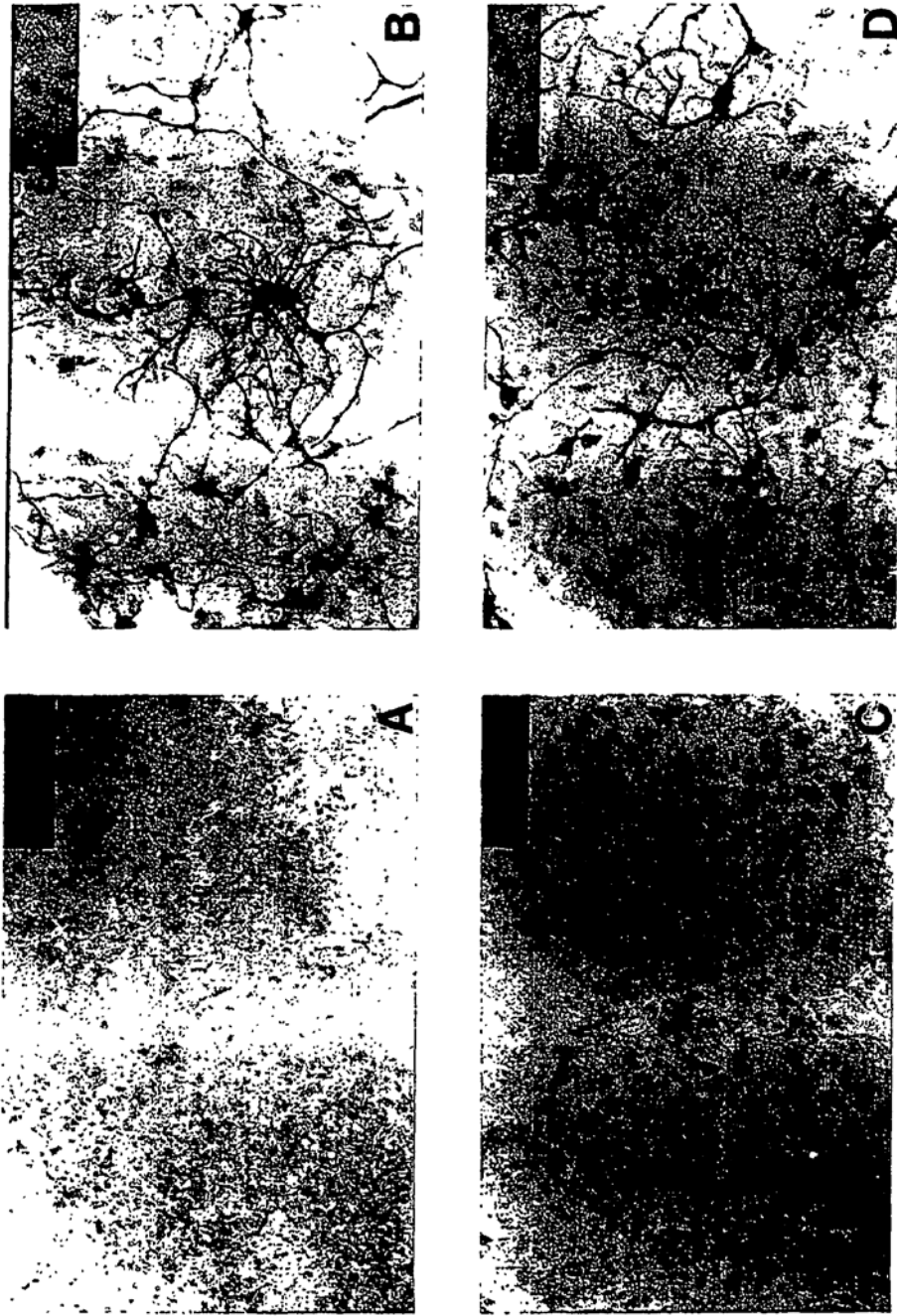


Fig. 3





**Fig. 4**



Fig. 4

# Fig. 5

1 2 3 4 5



**Fig. 6**

