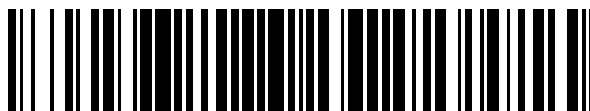


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 425**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01991880 .4**
96 Fecha de presentación: **21.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1355666**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Uso de moléculas de orientación repulsivas (RGM) y sus moduladores**

30 Prioridad:
22.12.2000 EP 00128356

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(100.0%)
Berlin, DE**

72 Inventor/es:
**MUELLER, BERNHARD, K.;
MONNIER, PHILIPPE, P.;
MACCHI, PAOLO;
BONHOEFFER, FRIEDRICH;
STAHL, BERND;
MANN, MATTHIAS y
ANDERSEN, JENS S.**

74 Agente/Representante:
CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 390 425 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 moléculas de orientación repulsivas (RGM) y sus moduladores.

La presente invención se relaciona con las realizaciones como se define en las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona el uso de un inhibidor como se define en las reivindicaciones de un polipéptido que tiene o comprende una secuencia de aminoácidos como se describe aquí o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la degeneración o lesión del tejido nervioso de vertebrados, asociado con convulsiones, asociado con trastornos angiogénicos o trastornos del sistema cardiovascular. Adicionalmente, la invención proporciona el uso de dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar o tratar el crecimiento del tumor o formación de metástasis de tumor o como un marcador de mastocitos.

El mecanismo más importante en la formación de sistemas nerviosos embrionarios es la orientación de axones y crecimiento de conos mediante indicaciones de orientación direccional (Goodman, *Annu. Rev. Neurosci.* 19 (1996), 341-77; Mueller, *Annu. Rev. Neurosci.* 22, (1999), 351-88). Un sistema modelo adecuado para estudiar este proceso de orientación es el sistema retinotectal de los vertebrados. En el embrión de pollo aproximadamente 2 millones de axones de células de ganglio retinales (RGC) dejan cada ojo y crecen hacia el techo óptico contralateral para formar un mapa preciso (Mey & Thanos, (1992); *J. Himforschung* 33, 673-702). Habiendo llegado en el polo anterior del techo óptico, los axones RGC comienzan a invadir su objetivo tectal para encontrar sus neuronas objetivo. El mapeo ocurre en tal forma, que los axones RGC de la retina nasal se proyectan hasta el techo posterior y los axones temporales hasta el techo anterior. A lo largo del eje dorso-ventral, los axones procedentes de la retina dorsal terminan en el techo ventral, mientras que aquellos de la retina ventral finalizan en el techo dorsal. Al final se forma un mapa topográfico preciso, cuando las relaciones vecinas en la retina se conservan en el techo, de tal manera que los axones de las células de ganglio vecinas en la retina hacen sinapsis con las neuronas tectales vecinas. Lo más importante para la formación de este mapa, son las indicaciones de orientación tectal clasificadas, leído mediante conos de crecimiento retinales que llevan los receptores correspondientes que también muestran una distribución clasificada (Sperry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50 (1963), 703-710; Bonhoeffer & Gierer, *Trends Neurosci.* 7 (1984) 378-381). Por lo tanto se determina la posición de cada cono de crecimiento retinal en el campo tectal por dos conjuntos de gradientes: gradientes receptores en axones retinales encarnados y conos de crecimiento y los gradientes de ligando en las células tectales (Gierer, *Development* 101 (1987), 479-489). La existencia de los ligandos tectales clasificados se ha postulado del trabajo anatómico, sin embargo su identificación prueba ser extremadamente difícil y solo se hace posible con el desarrollo de sistemas in vivo simples (Walter, *Development* 101 (1987), 685-96; Cox, *Neuron* 4 (1990), 31-7). En el ensayo de bandas los axones RGC crecen sobre una red de membranas, que consiste en alternar líneas de membranas tectales anterior (a) y posterior (p). En estas redes, los axones retinales temporales crecen en las membranas tectales anteriores y se rechazan por las líneas posteriores, mientras que los axones nasales no se distinguen entre los miembros a y p (Walter, *Development* 101 (1987), 685-96). También se observa la misma especificidad en el ensayo de colapso de cono de crecimiento (Raper & Kapfhammer, *Neuron* 4 (1990), 21-29), en donde el colapso de los conos de crecimiento retinal temporal después de la adición de vesículas de membrana tectales posteriores no reaccionan con las vesículas tectales anteriores y en donde los conos de crecimiento nasal son insensibles a cualquier tipo de vesículas (Cox, (1990), loc. cit.). En ambos sistemas de ensayo, el tratamiento de membranas tectales posteriores con la enzima fosfatidilinositol-fosfolipasa C específica (PI-PLC) que divide el anclaje lípido de proteínas ligadas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), retira su actividad de inducción-colapso y repulsión (Walter, *J. Physiol* 84 (1990), 104-10). Una de las primeras moléculas de orientación repulsiva identificadas en el sistema retinotectal de embriones de pollo es una glucoproteína de anclaje GPI con un peso molecular de 33/35 kDa (Stahl, *Neuron* 5 (1990), 735-43). Esta molécula de 33/35 kDa, denominada en adelante RGM (moléculas de orientación repulsivas), es activa en los ensayos de colapso y banda y se muestra que se expresa en un gradiente posterior alto-anterior bajo en la tecta embrionaria de pollos y ratas (Mueller, *Curr. Biol.* 6 (1996), 1497-502; Mueller, *Japan Scientific Societies Press* (1997), 215-229). Debido al comportamiento bioquímico anormal de RGM, no se puede obtener la secuencia de aminoácidos precisa. Se describe RGM como una molécula que es activa durante el desarrollo del vertebrado. De manera interesante, el RGM se regula por disminución en el techo embrionario del pollo después de E12 y en el techo embrionario de la rata después de P2 y desaparece completamente después de las etapas embrionarias (Müller (1992), Ph. D thesis University of Tübingen; Müller (1997) *Japan Scientific Societies*, 215-229). En 1996, Müller (loc. cit) ha mostrado que CALI (inactivación láser asistida por cromóforo) de RGM elimina la actividad orientadora repulsiva de las membranas tectales posteriores /RGM. Sin embargo, debido a la presencia de otras moléculas orientadoras, en particular de RAGS (señal orientadora de axón repulsiva) y ELF-1 (Ligando Eph de la familia 1), no siempre se detecta una eliminación completa de la orientación y se especula que el RGM actúa en concierto con RAGS (ahora denominado efrina-A5) y ELF-1 (efrina-A2). Se prevé adicionalmente que RGM puede ser un co-factor que potencia la actividad de RAGS y ELF-1 en eventos de orientación embrionaria. Esto se argumenta específicamente por B. K. Müller ("RGM, una molécula de orientación repulsiva, está implicada en la orientación de axón retinal in vivo", *TANIGUCHI SYMPOSIA ON BRAIN SCIENCES*, vol. 20, *Mol. Basis of Axon Growth & Nerve Pattern Form.*, 1997, p. 215 a 229) quien muestra adicionalmente que RGM, RAGS y ELF-1 se coexpresan en la capa tectal más superficial, comparte función similar in vitro pero son moléculas bioquímicamente diferentes. En 1980/81 el grupo de Aguayo encuentra que, cuando las neuronas periféricas se trasplantan/inyectan en el SNC lesionado del adulto, se induce el crecimiento

de axones de las neuronas del SNC (David, Science 214 (1981), 931-933). Por lo tanto, se especula que las neuronas del SNC aún tienen la capacidad de regeneración y/o excrecencia de neuritas, si se proporciona un ambiente adecuado. Adicionalmente, se especula que pueden existir los "inhibidores de regeneración de neuronas del SNC". En 1988, Caroni and Schwab (Neuron 1, 85-96) describe dos inhibidores de 35 kDa y 250 kDa, aislados de mielina del SNC de rata (NI-35 y NI-250; ver también Schnell, Nature 343 (1990) 269-272; Caroni, J.Cell Biol. 106 (1988), 1291-1288). En el 2000, el ADN que codifica NI-220/250 se deduce y el inhibidor potente correspondiente del crecimiento de neurita se denomina Nogo-A (Chen, Nature 403 (2000), 434-438. El Nogo unido a la membrana resultó ser un miembro de la familia reticulón (GrandPré, Nature 403 (2000), 439-444). Los factores adicionales que median la inhibición de la excrecencia neuronal se han aislado primero en saltamontes, y denominado "fasciclina IV" y finalmente "colapsina" en pollos. Estos inhibidores pertenecen a la así llamada familia semaforina. Se han reportado las semaforinas en un amplio rango de especies y se describen como proteínas de transmembrana (ver, inter alia, Kolodkin Cell 75 (1993) 1389-99, Püschel, Neuron 14 (1995), 941-948). Aún, también se muestra que no todas las semaforinas tienen actividad inhibitoria. Algunos miembros de dicha familia, por ejemplo semaforina E, actúan como una señal orientadora atractiva para los axones corticales (Bagnard, Development 125 (1998), 5043-5053). Un sistema adicional de la moléculas de orientación repulsivas es el sistema efrina-Eph. Las efrinas son ligandos de las quinasas del receptor Eph y están implicadas como marcas posicionales que pueden guiar el desarrollo de mapas topográficos neuronales (Flanagan, Ann. Rev. Neurosc. 21 (1998), 309-345). Las efrinas se agrupan en dos clases, las efrinas A que se ligan a la membrana mediante un anclaje glucosilfosfatidilinositol (anclaje GPI) y las efrinas B llevan un dominio de transmembrana (comité de nomenclatura Eph 1997). Se ha mostrado recientemente que dos miembros de las efrinas A, efrina-A2 y efrina-A5, expresadas en gradientes posteriores altos-anteriores bajos en el techo óptico, están implicados en la orientación repulsiva de los axones de célula de ganglio retinal in vitro e in vivo (ver, inter alia (Drescher, Cell 82 (1995), 359-70; Cheng, Cell 79 (1994), 157-168; Feldheim, Neuron 21 (1998), 563-74; Feldheim, Neuron 25 (2000), 563-74).

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína AL-1 y la utilidad de las proteínas AL-1 en la preparación de anticuerpos y antagonistas y en diagnosticar y tratar diversos trastornos neuronales y trastornos y afecciones asociadas con angiogenia se describen en la solicitud de patente publicada como WO 96/13518.

Considerando que el hecho de una pluralidad de trastornos fisiológicos o lesiones se relaciona con procesos de migración celular alterados, los problemas técnicos que subyacen a la presente invención son proporcionar medios y métodos para modificar el desarrollo alterado o procesos celulares (migración) que conducen a condiciones de enfermedad.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención se relaciona con el uso de un inhibidor como se define en las reivindicaciones de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs. 18, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la degeneración o lesión del tejido nervioso del vertebrado, asociado con convulsiones asociadas con trastornos angiogénicos o trastornos del sistema cardiovascular y asociadas con formación de tumor y crecimiento de tumor.

En el contexto de la presente invención, y como se documenta en los ejemplos adjuntos, se encuentra de manera sorprendente que la moléculas de orientación repulsivas (RGM) no solo se expresan durante el desarrollo de vertebrado sino se vuelven a expresar en el tejido del adulto, en particular en tejidos dañados de adulto. Sorprendentemente, entre otras cosas, se encuentra que el RGM se vuelve a expresar después del daño del tejido nervioso, después de eventos traumáticos o isquemias focales. La presente invención proporciona la secuencia de nucleótidos completa y/o de aminoácidos de RGM (ver, por ejemplo SEQ ID NO: 17 o 18 que describe la secuencia RGM de pollo o SEQ ID NO: 20 a 25 que describe los homólogos RGM humanos.). El RGM, como se ha señalado anteriormente, es una glucoproteína, ligada a membranas mediante un anclaje GPI. Dicho un anclaje GPI también lleva un epítipo determinante que reacciona en forma cruzada (CRD) y su parte de carbohidrato es capaz de unirse a lectina de maní. Como se documenta aquí, la proteína RGM es un potente inhibidor de crecimiento y puede afirmar la inhibición de crecimiento de neurita en concentraciones picomolares.

El término "modulador" como se emplea aquí se relaciona con "inhibidores" así como también "activadores" de la función RGM. Más preferiblemente dicha "modulación" es una inhibición, en donde dicha inhibición puede ser una inhibición parcial o completa.

El término "secuencia de aminoácidos" de la SEQ ID NO: 18, 20, 23 o 25 como se emplea aquí se relaciona con la secuencia de aminoácidos de RGM (las moléculas de orientación repulsivas) y se relaciona con el polipéptido RGM, de pollo o humano, respectivamente. En particular, las SEQ ID NOs: 20 y 21 describen el RGM1 humano. El RGM1 humano se ha localizado en el cromosoma 15. Adicionalmente, los RGM humanos comprenden RGM2 y RGM3. El RGM2 se describe en la SEQ ID NO: 23 (secuencia de aminoácidos) y se codifica por una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22. El RGM2 humano se ha localizado en el cromosoma 5. Adicionalmente, el RGM3 humano se muestra en la SEQ ID NO: 25 adjunta (secuencia de aminoácidos) y se codifica por una secuencia de nucleótidos como se describe en la SEQ ID NO: 24. El RGM3 humano se ubica en el cromosoma 1. Aún, como se discutirá aquí adelante, dicho término también se relaciona con homólogos RGM adicionales.

El término "(poli)péptido" significa, de acuerdo con la presente invención, un péptido, una proteína, o un (poli) péptido que abarca cadenas de aminoácidos de un longitud dada, en donde los residuos de aminoácidos se ligan por enlaces covalentes de péptido. Sin embargo, los imitadores de péptidos de dichas proteínas/(poli)péptidos RGM en donde los enlaces de aminoácidos y/o péptidos se han reemplazado por análogos funcionales también se abarcan por la invención. La presente invención no se restringe a RGM de humano, ratón o pollo y sus inhibidores sino también se relaciona con el uso de inhibidores de RGM o de RGM propiamente dicho (o fragmentos funcionales o derivados de los mismos) de otras especies. Debido a que la presente invención proporciona el uso de secuencias de aminoácidos/polipéptidos de RGM y sus inhibidores correspondientes y debido a que las secuencias de aminoácidos del RGM de humano y de pollo se describen aquí, el experto en la técnica se tiene formación para obtener las secuencias RGM de otras especies, como, inter alia, ratón, rata, cerdo, etc. Los métodos relevantes se conocen en la técnica y se pueden llevar a cabo mediante métodos estándar, que emplean, inter alia, cebadores degenerados y no degenerados en las técnicas PCR. Dichos métodos de biología molecular que se conocen bien en la técnica, por ejemplo, se describen en Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY (1989)) y Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates; y Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Adicionalmente, como se emplea en el contexto de la presente invención, el término "RGM", "modulador de RGM" e "inhibidor de RGM" también se relaciona con moléculas RGM (y sus inhibidores correspondientes) que son variantes u homólogos de las moléculas RGM (y sus inhibidores) como se describe aquí. "Homología" en este contexto se entiende que se refiere en este contexto a una identidad de secuencia de los RGM de por lo menos 70 %, preferiblemente más de 80 % y todavía más preferiblemente más de 90% en el nivel de aminoácidos. La presente invención, sin embargo, también comprende (poli)péptidos que se desvían de la secuencia de aminoácidos tipo natural de los RGM humano o de pollo como se describe aquí, en donde dicha desviación puede ser, por ejemplo, el resultado de las sustituciones, eliminaciones, adiciones, inserciones, duplicaciones, inversiones y/o recombinaciones de aminoácidos y/o nucleótidos solas o en combinación. Aquellas desviaciones pueden ocurrir en forma natural o se pueden producir por medio de técnicas de ADN recombinantes bien conocidas en el arte. El término "variación" como se emplea aquí también comprende "variantes alélicas". Estas variaciones alélicas pueden ser variantes alélicas que ocurren en forma natural, variantes de corte y empalme así como también variantes construidas genéticamente por ingeniería o producidas sintéticamente.

El término "polinucleótido" de acuerdo con la presente invención comprende codificar y, donde sea aplicable, no codificar las secuencias (como promotores, mejoradores etc.). Este comprende ADN, ARN así como también PNA. De acuerdo con la presente invención, el término "molécula de polinucleótido/ácido nucleico" también comprende cualquier derivado factible de un ácido nucleico en el que puede hibridar una sonda de ácido nucleico. Dicha sonda de ácido nucleico propiamente dicha puede ser un derivado de una molécula de ácido nucleico capaz de hibridar en dicha molécula de ácido nucleico o dicho derivado de la misma. El término "molécula de ácido nucleico" comprende adicionalmente péptidos de ácido nucleicos (PNA) que contienen análogos de ADN con enlaces de estructura principal de amida (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500). El término "molécula de ácido nucleico" que codifica un (poli)péptido RGM o un fragmento funcional/ derivado del mismo, en conexión con la presente invención, se define por (a) las secuencias de ácidos nucleicos específicas que codifican dichos (poli)péptidos especificados en la presente invención o (b) por las secuencias de ácido nucleicos que hibridan bajo condiciones exigentes a la hebra complementaria de la secuencia de nucleótidos de (a) y que codifica un (poli)péptido que se desvía del ácido nucleico de (a) por una o más sustituciones, eliminaciones, adicionales o inversiones de nucleótido y en donde la secuencia de nucleótidos muestra por lo menos 70 %, más preferiblemente por lo menos 80% de identidad con la secuencia de nucleótidos de dicho (poli)péptido RGM codificado que tiene una secuencia de aminoácidos como se definió aquí anteriormente y funciona como un RGM (o un fragmento funcional/ derivado del mismo).

El término "modulador" como se emplea aquí también comprende el término "inhibidores", como se mencionó aquí anteriormente.

El término "inhibidor de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 o un fragmento funcional o derivado del mismo, por lo tanto, no solo se relaciona con los inhibidores específicos de RGM de humano o de pollo sino que también se relaciona con inhibidores de RGM (o fragmentos funcionales o derivados de los mismos) de otras especies. Se describen aquí inhibidores útiles así como también se describen aquí adelante y en los ejemplos adjuntos.

El término "inhibidor" también comprende "moduladores" de los polipéptidos RGM y/o el RGM que codifica la molécula de ácido nucleico/gen. En el contexto de esta invención también se prevé que dicha "modulación" conduce, cuando se desea, a una activación de RGM.

El término "fragmento funcional o derivado del mismo" como se utiliza aquí y en relación con las moléculas RGM descritas aquí comprende fragmentos de las moléculas RGM definidas aquí que tienen una longitud de por lo menos 25, más preferiblemente por lo menos 50, más preferiblemente por lo menos 75, aún más preferiblemente por lo menos 100 aminoácidos. Los fragmentos funcionales de las moléculas RGM identificadas aquí o las moléculas RGM de otras especies (RGM homólogos) pueden estar comprendidos en las proteínas quiméricas y/o de fusión. Los

"fragmentos funcionales" comprenden los fragmentos RGM (o su molécula de ácido nucleico codificante) que son capaces de reemplazar las moléculas de longitud completa RGM en los ensayos correspondientes (como se describe aquí en los ejemplos adjuntos, por ejemplo ensayos de colapso y/o de banda) o pueden elucidar una respuesta inmune específica de anti-RGM y/o conducen a anticuerpos anti- RGM específicos. Un ejemplo de tal un "fragmento funcional" es, inter alia, el fragmento funcional de RGM de pollo descrito en la SEQ ID NO: 19. En el contexto de la presente invención, los polinucleótidos que codifican los fragmentos funcionales de RGM y/o sus derivados tienen preferiblemente por lo menos 15, más preferiblemente por lo menos 30, más preferiblemente por lo menos 90, más preferiblemente de por lo menos 150, más preferiblemente de por lo menos 300 nucleótidos. El término "derivados" significa en el contexto de su invención derivados de las moléculas RGM y/o sus moléculas de ácido nucleico codificantes y se refiere a los derivados naturales (con variantes alélicas) así como también derivados recombinantemente producidos/ variantes que pueden diferir de las moléculas RGM descritas aquí mediante por lo menos una modificación/mutación, por ejemplo por lo menos una eliminación, sustitución, adición, inversión o duplicación. El término "derivado" también comprende modificaciones químicas. El término "derivados" como se emplea aquí en el contexto de la molécula RGM también comprende moléculas solubles RGM que no comprenden ningún anclaje de membrana.

Como se mencionó aquí anteriormente, la presente invención proporciona el uso de un inhibidor, de moléculas RGM y/o sus polinucleótidos/molécula de ácido nucleicos codificantes correspondientes para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar diversos trastornos del sistema nervioso, trastornos angiogénicos o trastornos del sistema cardiovascular y cánceres de diferente etiología.

En una realización preferida, dichos trastornos del sistema nervioso comprenden degeneración o lesión del tejido nervioso del vertebrado, en particular enfermedades neurodegenerativas, lesiones de fibra nerviosa y trastornos relacionados con pérdidas de la fibra nerviosa.

Dichas enfermedades neurodegenerativas se pueden seleccionar del grupo que consiste de enfermedades neuronales motoras (MND), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis ocular progresiva, atrofia muscular progresiva, demencia relacionada con VIH y atrofia muscular espinal, Síndrome de Down, Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, Síndrome de Gerstmann-Straeussler, kuru, encefalopatía espongiiforme bovina, encefalopatía transmisible del visón, otras enfermedades priónicas desconocidas, atrofia de sistema múltiple, disautonomía familiar de Riley-Day, dichas lesiones de fibra nerviosa se pueden seleccionar del grupo que consiste de lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales relacionadas con presión intracraneal elevada, trauma, daño secundario debido a presión intracraneal elevada, infección, infarto, exposición a agentes tóxicos, síndromes paraneoplásicos y cáncer y en donde dichos trastornos relacionados con pérdidas de la fibra nerviosa se pueden seleccionar del grupo que consiste de parálisis de nervio facial, nervio medio, nervio cubital, nervio axilar, nervio torácico largo, nervio del radio y de otros nervios periféricos, y otras enfermedades adquiridas y no adquiridas del sistemas nervioso central y periférico (humano).

La médula espinal mencionada anteriormente y las lesiones cerebrales no solo comprenden lesiones traumáticas sino también se relacionan con lesiones provocadas por apoplejía, isquemia y similares. Se prevé en particular que los inhibidores como se define aquí adelante y que comprende, inter alia, los anticuerpos anti-RGM se emplean en la técnica médica para estimular el crecimiento de la fibra del nervio en individuos, en particular en vertebrados, más preferiblemente en humanos.

En una realización preferida de la presente invención, la invención proporciona el uso de un inhibidor a RGM para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos del sistema cardiovascular, en donde estos trastornos, por ejemplo, comprenden trastornos de barrera hematoencefálica, edema cerebral, daños cerebrales secundarios debido a presión intracraneal aumentada, infección, infarto, isquemia, hipoxia, hipoglicemia, exposición a agentes tóxicos, cáncer, síndromes paraneoplásicos.

Se prevé, sin estar limitado por la teoría, que los inhibidores RGM pueden estimular las neuronas que sobreviven para proyectar las fibras colaterales en el tejido de la enfermedad, por ejemplo el tejido isquémico.

Como se ilustra en los ejemplos adjuntos, el RGM se expresa localmente en el lado de la transección artificial del tejido de cerebro/ médula espinal en los animales de prueba (como ratas), por ejemplo, en la región penumbra que rodea un núcleo isquémico de un humano que sufre de isquemia focal en el contexto temporal. Adicionalmente, se documenta en los ejemplos adjuntos que el RGM, en forma sorprendente, se expresa en tejidos que han experimentado lesiones cerebrales traumáticas. La invención también se relaciona con el uso del polipéptido RGM o un fragmento funcional o derivado del mismo o el uso de un polinucleótido que los codifica (polipéptidos y polinucleótidos como se define aquí), en donde la enfermedad o afección descrita anteriormente asociada con convulsiones es epilepsia. Una epilepsia por lo tanto se caracteriza por una convulsión epiléptica como una convulsión o evento anormal transitorio experimentado por el sujeto, por ejemplo un paciente humano, debido a descarga paroxismal de neuronas (cerebrales). Las convulsiones epilépticas comprenden convulsiones tónicas, convulsiones tónico clónicas (gran mal), convulsiones mioclónicas, ausencia de convulsiones así como también convulsiones acinéticas. Todavía, también se comprenden en el contexto de esta invención las convulsiones

parciales simples, por ejemplo convulsiones Jacksonianas y convulsiones debido a trauma perinatal y/o anoxia fetal. Como se menciona aquí adelante, los usos descritos aquí se relacionan en particular a la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades/afecciones asociadas con el desarrollo aberrante de las fibras nerviosas, como epilepsia, ver también Routbort, Neuroscience 94 (1999), 755 - 765.

5 También se describe es que el modulador, preferiblemente el inhibidor de RGM (o de su fragmento funcional o derivado del mismo o de su molécula de ácido nucleico codificante) se utiliza para la preparación de una composición farmacéutica para la modificación de neovascularización. Dicha modificación puede comprender activación así como también estímulo. Se prevé en particular que dicha neovascularización se estimula y/o se activa en el tejido enfermo, como inter alia, tejido isquémico y/o infarto. Adicionalmente, se prevé que los inhibidores RGM
10 descritos aquí se pueden emplear en la regulación de la barrera de permeabilidad de sangre-cerebro.

Se prevé adicionalmente que dichos inhibidores de RGM se emplean en el alivio, prevención y/o inhibición de la evolución de formación de placa vascular (por ejemplo arterosclerosis) en enfermedades/trastornos cardiovascular, cerebro-vasculares y/o nefrovasculares.

15 Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de un inhibidor de RGM como se define aquí para la preparación de una composición farmacéutica para remielinización. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinantes del SNC, como esclerosis múltiple o de enfermedades desmielinantes como neuropatía periférica provocada por toxina difteria, Síndrome de Landry-Guillain-Barré, Síndrome de Elsberg, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y otras polineuropatías. Un inhibidor particular preferido de RGM en este contexto es un anticuerpo dirigido contra RGM, por ejemplo un
20 anticuerpo IgM. Se ha mostrado previamente que ciertos IgM se unen a oligodendrocitos y por lo tanto inducen remielinización. Los anticuerpos IgM contra RGM se conocen en la técnica y comprenden por ejemplo el F3D4 descrito en los ejemplos adjuntos.

Adicionalmente la invención proporciona el uso de un polipéptido RGM como se define aquí o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar
25 enfermedades o afecciones asociadas con la actividad de las células inmunes autorreactivas o con células inflamatorias sobre-activas. Más preferiblemente estas células son células T.

Adicionalmente, la presente invención se relaciona con el uso de un inhibidor como se define en las reivindicaciones de un polipéptido RGM como se define en las reivindicaciones o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para modificar y/o alterar el estado de diferenciación de los mastocitos neuronales y/o sus progenitores. Dichos
30 mastocitos se encuentran normalmente en las zonas subventriculares de las regiones cerebrales principales. Se sabe que los factores en el microambiente del cerebro influyen dramáticamente la diferenciación de los mastocitos no diferenciadas. Se asume que debido a la expresión característica del RGM en las capas subventriculares de muchas regiones cerebrales diferentes, esta molécula puede ser un marcador para los mastocitos. Adicionalmente, los inhibidores RGM, como anticuerpos pueden ser marcadores útiles para los
35 mastocitos. Es más importante en la biología de los mastocitos la comprensión de los factores que influyen su diferenciación. Por lo tanto se asume que los inhibidores RGM cambian el destino del desarrollo de estas células.

Como se documenta en los ejemplos adjuntos, el RGM no solo se expresa en el tejido isquémico sino también se expresa en el tejido de cicatriz que rodea las lesiones (cerebro).

40 El inhibidor de la molécula RGM (o su fragmento funcional o derivado) es un anticuerpo o un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o scFv del mismo, es un aptámero, es una molécula receptora específica todos capaces de unirse a un polipéptido RGM o con un fragmento funcional o derivado del mismo, o es una molécula de ácido nucleico específica que interactúa con un polinucleótido que codifica un RGM y/o el polipéptido como se define aquí.

El anticuerpo que se va a utilizar en el contexto de la presente invención puede ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. Las técnicas para la producción de anticuerpos se conocen bien en el arte y se describen, por ejemplo en Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor,
45 1988. La producción de anticuerpos anti-RGM específicos se conoce adicionalmente en la técnica (ver, por ejemplo Müller (1996) loc.cit.) o se describe en los ejemplos adjuntos. El término "anticuerpo" como se emplea aquí también comprende anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como también fragmentos de anticuerpo, como, inter alia, fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo o derivados comprenden adicionalmente los fragmentos F(ab')₂, Fv o scFv; ver, por ejemplo, Harlow and Lane, loc.cit. Se conocen en la técnica diversos procedimientos y se pueden utilizar para la producción de dichos anticuerpos y/o fragmentos, ver también ejemplos adjuntos. Así, los derivados (anticuerpo) se pueden producir mediante imitadores de péptido. Adicionalmente, las técnicas descritas para la producción de los anticuerpos de cadena sencilla (ver, inter alia, Patente Estadounidense 4,946,778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para los polipéptidos de esta invención.
50 También, se pueden utilizar animales transgénicos para expresar los anticuerpos humanizados para los polipéptidos de esta invención. Más preferiblemente, el anticuerpo que se va a utilizar en la invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo se puede emplear el anticuerpo F3D4 descrito en los ejemplos adjuntos cuando se desea

un IgM. La metodología general para producir, anticuerpos monoclonales se conoce bien y se ha descrito en, por ejemplo, Köhler and Milstein, *Nature* 256 (1975), 494-496 y se revisa en J.G.R. Hurrel, ed., "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", CRC Press Inc., Boca Raton, FL (1982), así como también se enseña por L. T. Mimms et al., *Virology* 176 (1990), 604-619.

- 5 Preferiblemente, dichos anticuerpos (o inhibidores) se dirigen contra los fragmentos funcionales del polipéptido RGM. Como se ha indicado anteriormente y como se documenta en los ejemplos adjuntos, dichos fragmentos funcionales son fácilmente deducibles para el experto en la técnica y, de forma correspondiente, se pueden producir anticuerpos relevantes (u otros inhibidores).

10 El "inhibidor" como se define aquí también puede ser un aptámero. En el contexto de la presente invención, el término "aptámero" comprende ácidos nucleicos tales como ARN, ssADN (ss = hebra sencilla), ARN modificado, ssADN modificado o los PNA que se unen a una pluralidad de secuencias objetivo tienen una alta especificidad y afinidad. Los aptámeros se conocen bien en la técnica y, inter alia, se describen en Famulok, *Curr. Op. Chem. Biol.* 2 (1998), 320-327. La preparación de aptámeros se conoce bien en la técnica y puede involucrar, inter alia, el uso de colecciones de ARN combinatoriales para identificar los sitios de unión (Gold, *Ann. Rev. Biochem.* 64 (1995), 763-797). Dichos otros receptores, por ejemplo, se pueden derivar de dicho anticuerpo etc. mediante imitadores de péptido.

15 Otras moléculas específicas "receptor" que pueden funcionar como inhibidores de los polipéptidos RGM también están comprendidas en esta invención. Dichos receptores específicos se pueden deducir por los métodos conocidos en la técnica y comprenden ensayos de unión y/o ensayos de interacción. Estos, inter alia, se pueden involucrar en los ensayos en el formato ELISA o formato FRET. Dicho "inhibidor" también pueden comprender los péptidos específicos que se unen a y/o interfieren con RGM. Adicionalmente, el "modulador" mencionado anteriormente, preferiblemente "inhibidor" puede funcionar en el nivel de expresión de gen RGM. Por lo tanto, el inhibidor puede ser una molécula de ácido nucleico (específica) que interactúa con un polinucleótido que codifica una molécula RGM (o un fragmento funcional o derivado del mismo.) Estos inhibidores por ejemplo, pueden comprender moléculas de ácido nucleico anticodificantes o ribozimas.

20 La molécula de ácido nucleico que codifica RGM (y como se describe aquí, por ejemplo, SEQ ID NO: 17) se puede emplear para construir los oligonucleótidos anticodificantes apropiados. Dichos oligonucleótidos anticodificantes son capaces de inhibir la función de los genes RGM tipo natural (o mutantes) y comprenden, preferiblemente, por lo menos 15 nucleótidos, más preferiblemente por lo menos 20 nucleótidos, aún más preferiblemente 30 nucleótidos y más preferiblemente por lo menos 40 nucleótidos.

25 Adicionalmente, también se prevén métodos de ribozima para uso en esta invención. Las ribozimas pueden dividir específicamente la molécula de ácido nucleico que codifica los RGM.

30 En el contexto de la presente invención las ribozimas comprenden, inter alia, ribozimas cabeza de martillo, ribozimas cabeza de martillo con secuencias de núcleo alteradas o desoxiribozimas (ver, por ejemplo, Santoro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), 4262) y pueden comprender las ribozimas naturales y seleccionadas in vitro y/o sintetizadas. Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención que son complementarias a las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas/(poli)péptidos regulan, provocan o contribuyen a la obesidad y/o que codifican un (poli)péptido de mamífero implicado en la regulación del peso corporal (ver aquí adelante) se pueden utilizar para la construcción de las ribozimas apropiadas (ver, por ejemplo, EP-B1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257) que dividen específicamente las moléculas de ácido nucleico de la invención. La selección de los sitios objetivo apropiados y las ribozimas correspondientes se pueden hacer como se describe por ejemplo en Steinecke, *Ribozymes, Methods in Cell Biology* 50, Galbraith, eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460.

35 Dicho "inhibidor" también puede comprender ARN de hebra doble, que conduce a interferencia de gen mediada por ARN (ver Sharp, *Genes and Dev.* 13 (1999), 139-141)

40 Los inhibidores potenciales adicionales de RGM se pueden encontrar y/o deducir mediante un ensayo de interacción y emplear los sistemas de lectura correspondientes. Estos se conocen en la técnica y comprenden, inter alia, dos columnas desplegables GST de detección híbridas (como se describe, inter alia, en EP-0 963 376, WO 98/25947, WO 00/02911), los ensayos de coprecipitación de los extractos celulares como se describe, inter alia, en Kasus-Jacobi, *Oncogene* 19 (2000), 2052-2059, sistemas "de trampa de interacción" (como se describe, inter alia, en US 6,004,746) clonación de expresión (por ejemplo lambda gtlI), exhibición de fago (como se describe, inter alia, en US 5,541,109), ensayos de unión in vitro y similares. Los métodos de ensayo de interacción adicionales y los sistemas de lectura correspondientes, inter alia, se describen en US 5,525,490, WO 99/51741, WO 00/17221, WO 00/14271 o WO 00/05410.

45 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar el uso de un polipéptido RGM y/o del polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs. 18, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que

codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con desarrollo colateral excesivo de las fibras nerviosas. La presente invención, por lo tanto, proporciona el uso médico de las proteínas RGM y/o fragmentos funcionales/derivados de los mismos o para el uso de polinucleótidos que codifican dichas proteínas RGM en condiciones en donde ocurre desarrollo colateral excesivo. Dichas afecciones comprenden, pero no se limitan a, epilepsia, dolor fantasma y dolor neuropático. Por ejemplo, McNamara (Nat. Suppl. 399 (1999), A15-A22) ha descrito que ocurre dicho desarrollo en ciertos tipos de epilepsia. La molécula de RGM, aislada en forma natural o producida recombinantemente, o sus fragmentos funcionales/derivados por lo tanto se pueden emplear como señales potentes "parada" para el crecimiento de fibras nerviosas. La factibilidad de dicho método se ha mostrado por Tanelian (Nat. Med. 3 (1997), 1398-1401) quien emplea una semaforina para la inhibición del crecimiento de fibras nerviosas.

En todavía otra realización, la presente invención proporciona el uso de RGM y/o de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar o tratar tumor el crecimiento o formación de metástasis de tumor.

El RGM (aislado en forma natural o recombinantemente producido) y/o los fragmentos funcionales del mismo se pueden emplear para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos neoplásicos, en particular de trastornos relacionados con migración de tumor (célula), metástasis y/o invasión de tumor. Adicionalmente, se prevé que el RGM inhibe la neovascularización indeseada. Dicha neovascularización, como un trastorno angiogénico durante eventos neoplásicos, se debe evitar con el fin de limitar, inter alia, el crecimiento del tumor. Los conos de crecimiento de las neuronas y células de tumor (invasivas) secretan un cóctel de proteasas (uPA, tPA, MNP, etc.) con el fin de degradar la matriz extracelular. Adicionalmente, los mecanismos similares para adhesión y migración (célula) se emplean mediante estos sistemas celulares. El RGM y/o sus fragmentos funcionales se pueden emplear para estimular activamente el retiro de lamelipodios de células neoplásicas y/o para inducir su colapso. Como se demuestra en los ejemplos adjuntos el RGM también influencia el comportamiento del crecimiento de tumor, es decir es capaz de influenciar negativamente el crecimiento del tumor.

Adicionalmente la invención proporciona el uso de un polipéptido RGM como se define aquí o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la actividad de las células inmunes autorreactivas o con células inflamatorias sobre-activas. Más preferiblemente estas células son células T.

En todavía otra realización, la invención proporciona el uso de un polipéptido RGM que tiene o comprende, inter alia, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs. 18, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de procesos de inflamación y/o alergias, para la curación de heridas o para la supresión/alivio de formación de cicatrices. Se forma tejido de cicatriz mediante las células invasoras, de manera más importante mediante fibroblastos y/o neurogliocitos. La migración y adhesión de estas células se requieren para llegar al lado de la lesión. El RGM o un fragmento activo/derivado pueden evitar la acumulación de estas células en el lado de la lesión, evitando o disminuyendo por lo tanto la formación de cicatrices. Las células de reacción inflamatorias migran a la región inflamada y RGM o su fragmento activo/ derivado evitan o reducen la migración de estas células en el lado de la inflamación, evitando por lo tanto reacciones inflamatorias sobre-activas.

En el contexto de la presente invención, el término "composición farmacéutica" también comprende opcionalmente adicionalmente un portador y/o diluyente y/o excipiente aceptable. La composición farmacéutica de la presente invención puede ser particularmente útil para evitar y/o tratar trastornos patológicos en los vertebrados, como humanos. Dichos trastornos patológicos comprenden, pero no se limitan a, trastornos neurológicos, neurodegenerativos y/o neoplásicos así como también trastornos asociados con convulsiones, por ejemplo epilepsia. Estos trastornos comprenden, inter alia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (FALS/SALS), isquemia, apoplejía, epilepsia, demencia por SIDA y cáncer. La composición farmacéutica también se puede utilizar para propósitos profilácticos. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas reguladas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Las composiciones que comprenden dichos portadores se pueden formular mediante métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar mediante diferentes formas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial. Sin embargo, también se prevé que las composiciones farmacéuticas se aplican directamente al tejido nervioso. El régimen de dosificación se determina por el médico que atiende y los factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, salud general, edad, sexo, el compuesto particular que se va a administrar, el tiempo y la ruta de administración, y otros fármacos se administran concurrentemente. La material farmacéuticamente activa puede estar presente preferiblemente, inter alia, en cantidades entre 1 ng y 1000 mg por dosis, más preferiblemente en cantidades de 1 ng a 100 mg sin embargo, las dosis por encima o por debajo de este

- rango de ejemplo se prevén, considerando especialmente los factores mencionados anteriormente. Si el régimen es una infusión continua, también puede estar en el rango de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. La evolución se puede supervisar por evaluación periódica. Las composiciones de la invención se pueden administrar localmente o sistémicamente. La administración será de manera general parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente. Las composiciones de la invención también se pueden administrar directamente al sitio objetivo, por ejemplo, mediante suministro biolístico a un sitio objetivo interno o externo o por catéter en el sitio de una arteria. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, soluciones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/ acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medio regulado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Adicionalmente, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes adicionales, dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica. Dichos agentes pueden ser fármacos que actúan en el sistema nervioso central así como también en las terminales nerviosas sensoras no mielinadas, pequeñas (como en la piel), las neuronas del sistema nervioso periférico del tracto digestivo, etc.
- 5
- 10
- 15
- 20 Se entiende que la composición farmacéutica como se define aquí puede comprender moléculas de ácido nucleico que codifican los RGM (y/o fragmentos funcionales o derivados de los mismos) o inhibidores RGM correspondientes o se definen aquí. Como se mencionó aquí anteriormente, dichos inhibidores comprenden, pero no se limitan a, anticuerpos, aptámero, péptidos que interactúan con RGM así como también inhibidores que interactúan con los polinucleótidos que codifican RGM.
- 25 De acuerdo con lo anterior, la presente invención también proporciona un método para tratar, evitar y/o aliviar trastornos y afecciones patológicas como se define aquí, por lo que dicho método comprende administrar a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento una composición farmacéutica/medicamento como se define aquí. Preferiblemente, dicho sujeto es un humano.
- 30 Las moléculas de ácido nucleico pueden ser particularmente útiles en métodos de terapia de gen y pueden comprender ADN, ARN así como también PNA. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden estar comprendidas en vectores adecuados, inter alia, vectores de expresión de gen. Dicho vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado por ejemplo convencionalmente en ingeniería genética, y puede comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permite la selección de dicho vector en una célula anfitriona adecuada y bajo condiciones adecuadas.
- 35 Adicionalmente, los vectores, adicionalmente a las secuencias de ácido nucleico que codifican RGM o sus inhibidores correspondientes, pueden comprender los elementos de control de expresión, que permite la expresión apropiada de las regiones codificantes en células anfitrionas o tejidos adecuados. Dichos elementos de control se conocen por el artesano y pueden incluir un promotor, codón de inicio de traducción, sitio de inserción y traducción para introducir un inserto dentro del vector. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la invención se liga operativamente a dichas secuencias de control de expresión que permiten expresión en células (eucarióticas). Particularmente se prefieren en este contexto las secuencias de control que permiten la expresión correcta en las células neuronales y/o células derivadas de tejido nervioso.
- 40
- 45 Los elementos de control que aseguran la expresión en las células eucarióticas se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Como se mencionó anteriormente, estos comprenden usualmente las secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente las señales poli-A aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir mejoradores transcripcionales así como también mejoradores traduccionales, y/o regiones promotoras heterólogas o asociadas en forma natural. Posiblemente los elementos reguladores que permiten la expresión en por ejemplo células anfitrionas de mamífero comprenden el promotor de quinasa timidina CMV- HSV, SV40, promotor RSV (virus de sarcoma Rous), promotor del factor 1α de elongación humano, mejorador CMV, promotor quinasa CaM o mejorador SV40. Para la expresión por ejemplo en el tejido nervioso y/o células derivadas del mismo, se conocen bien en la técnica diversas secuencias reguladoras, como la secuencia promotora mínima del neurofilamento L humano (Charron, J. Biol. Chem 270 (1995), 25739-25745). A pesar que los elementos son responsables para el inicio de la transcripción dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de transcripción, tales como sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli- A, en la dirección 3' del polinucleótido. En este contexto, los vectores de expresión adecuados se conocen en la técnica tales como el vector de expresión pcDV de cADN 10okayama-Berg (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-VitroGene, como se utiliza, inter alia en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), además de las moléculas de ácido nucleico definidas aquí, el vector puede comprender adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican las señales de secreción. Dichas secuencias se conocen bien por el experto en la técnica. Adicionalmente, dependiendo del sistema de expresión que
- 55
- 60

las utiliza secuencias líderes capaces de dirigir la proteína/(poli) péptido a un compartimiento celular se puede agregar a la secuencia codificante de las moléculas de ácido nucleico de la invención y se conocen bien en la técnica. Las secuencias líderes se ensamblan en fase apropiada con las secuencias de traducción, inicio y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida, o una parte de la misma. Como se mencionó aquí anteriormente, dicho vector también puede ser, además de un vector de expresión, un vector de modificación genética y/o transferencia de gen. La terapia de gen, que se basa en introducir genes terapéuticos en células mediante técnicas ex-vivo o in-vivo es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia de gen. Los vectores adecuados, sistemas de vector y métodos para terapia de gen in-vitro o in-vivo se describen en la literatura y se conocen por el experto en la técnica; ver, por ejemplo, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640 Verma, *Nature* 389 (1997), 239-242 WO 94/29469, WO 97/00957, US 5,580,859, US 5,899,666 o US 4,394,448 y referencias citadas allí. En particular, dichos vectores y/o sistemas de suministro de gen también se describen en métodos de terapia de gen en tejido neurológico/células (ver, inter alia Blömer, *J. Virology* 71 (1997) 6641-6649) o en el hipotálamo (ver, inter alia, Geddes, *Front Neuroendocrinol.* 20 (1999), 296-316 o Geddes, *Nat. Med.* 3 (1997), 1402-1404). Las construcciones de terapia de gen adecuadas adicionales para uso en células neurológicas/tejidos se conocen en la técnica, por ejemplo en Meier (1999), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1099-1110. Las moléculas de ácido nucleico y los vectores de la invención se pueden diseñar para la introducción directa o para introducción por medio de liposomas, vectores víricos (por ejemplo adenovíricos, retrovíricos), electroporación, sistemas de suministro balísticos (por ejemplo pistola de genes) u otros sistemas de suministro en la célula. Adicionalmente, se puede utilizar un sistema baculovírico como el sistema de expresión eucariótico para las moléculas de ácido nucleico descritas aquí.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares como se utilizan aquí significa que obtienen de manera general un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de evitar completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de curar parcialmente o completamente una enfermedad y/o efecto adverso atribuido a la enfermedad. El término "tratamiento" como se utiliza aquí cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano, e incluye: (a) evitar que la enfermedad ocurra en un sujeto que se puede predisponer a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir contrarrestar su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad, es decir provocar la regresión de la enfermedad.

En todavía otra realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido (RGM) y/o un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido como un marcador de mastocitos. Debido a que se prevé que los mastocitos así como también sus células progenitoras no diferenciadas expresan RGM, el RGM y/o sus fragmentos funcionales o derivados se pueden emplear para influenciar el patrón de diferenciación/ diferenciación de dichos mastocitos.

Adicionalmente se prevé que los anticuerpos dirigidos contra los RGM, en particular dirigidos contra los polipéptidos descritos aquí o que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 se pueden emplear para influenciar la diferenciación de mastocitos (neuronales) y células progenitoras (neuronales). Se prefiere particularmente que dichos anticuerpos (así como también otros inhibidores RGM y/o moléculas de unión a RGM) se empleen para marcar selectivamente los mastocitos. Por lo tanto estos reactivos se pueden emplear como marcadores para los mastocitos. También se prevé que los péptidos o derivados se emplean en dicho propósito.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, el polipéptido y/o fragmento del mismo que comprende o tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en las SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 y/o es una molécula RGM que se va a utilizar de acuerdo con la invención es una molécula soluble es decir no es una molécula unida a membrana. Como se muestra en Davis (1994), *Science* 266, 816-819 las efrinas, en particular A-efrinas, no son activas en forma monomérica, soluble. En contraste, los RGM solubles son activos y pueden funcionar sin ningún RGM de adhesión de membrana, en contraste a las efrinas, es capaz de autoformación de los dímeros y/o de la formación de agregados mayores. La invención también proporciona el uso de una molécula RGM y/o un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 o de un fragmento funcional o derivado del mismo o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido o un fragmento o un derivado para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar, evitar y/o tratar trastornos homeostáticos y/o de hemorragia y/o daño vascular. Se prevé, sin estar limitado por la teoría, que los RGM, debido a su homología estructural al factor von-Willebrand (vWF), se deben emplear en el tratamiento de dichos trastornos/enfermedades. Adicionalmente, se prevé que el RGM puede interactuar con un factor von-Willebrand y que dicha molécula, por lo tanto, influencia la actividad de vWF. Adicionalmente, los inhibidores como se define aquí se deben emplear en trastornos cuando las células inmunes invaden el cerebro, como esclerosis múltiple, encefalomielitis diseminada.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo o un aptámero capaz de unirse a un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 20, 23 o 25 o de una molécula de ácidos nucleicos capaz de interactuar con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una

composición diagnóstica para detectar trastornos neurológicos y/o neurodegenerativos o disposiciones de los mismos.

5 La composición diagnóstica se puede utilizar, inter alia, para métodos para determinar la expresión de los ácido nucleicos que codifican los polipéptidos RGM al detectar, inter alia, la presencia del mRNA correspondiente que comprende el aislamiento del ARN de una célula, que pone en contacto el ARN así obtenido con una sonda de ácido nucleico como se describió anteriormente bajo condiciones de hibridación, y detectar la presencia de los mRNA que hibridan la sonda.

10 Adicionalmente, se pueden detectar las mutaciones y/o alteraciones correspondientes. Adicionalmente, se pueden detectar los (poli) péptidos RGM con los métodos conocidos en la técnica, que comprenden, inter alia, métodos inmunológicos, como, ELISA o Western blot.

15 La composición diagnóstica de la invención se puede utilizar, inter alia, en detectar la prevalencia, el inicio o la evolución de una enfermedad relacionada con la expresión aberrante de un polipéptido RGM. De acuerdo con lo anterior, se puede utilizar la composición diagnóstica de la invención, inter alia, para evaluar la prevalencia, el inicio y/o el estado de la enfermedad de trastornos neurológicos, neurodegenerativos y/o inflamatorios, como se definió aquí anteriormente. También se contempla que los anticuerpos anti-RGM, aptámeros etc. y composiciones que comprenden dichos anticuerpos, aptámeros, etc. pueden ser útiles en discriminar las etapas de una enfermedad.

20 La composición diagnóstica comprende opcionalmente medios adecuados para la detección. Las moléculas de ácido nucleico, vectores, anticuerpos, (poli) péptidos, descritos anteriormente son, por ejemplo, adecuados para uso en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unir a un portador de fase sólida. Ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, cloruro polivinílico, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrano, nylon, amilosas, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas, y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los portadores de fase sólida se conocen por aquellos expertos en la técnica y pueden comprender glóbulos de poliestireno, glóbulos de látex, glóbulos magnéticos, partículas de metal coloides, vidrio y/o chips de silicio y superficies, tiras de nitrocelulosa, membranas, láminas, duracitos y las paredes de los pozos de una bandeja de reacción, tubos plásticos u otros tubos de prueba. Los métodos adecuados para inmovilizar las moléculas de ácido nucleico, vectores, anfitriones, anticuerpos, (poli) péptidos, proteínas de fusión etc. en fases sólidas incluyen pero no se limitan a interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. Ejemplos de inmunoensayos que pueden utilizar dichos compuestos de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Los ensayos de detección comúnmente utilizados pueden comprender métodos radioisotópicos o no radioisotópicos. Ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA), ensayo tipo sandwich (ensayo inmunométrico) y el ensayo Northern o Southern blot. Adicionalmente, estos métodos de detección comprenden, inter alia, IRMA (Inmuno Ensayo Radioinmunométrico), EIA (Inmuno Ensayo de Enzima), ELISA (Inmuno Ensayo Ligado a Enzima), FIA (Inmuno Ensayo Fluorescente), y CLIA (Inmuno Ensayo Quimioluminiscente). Adicionalmente, los compuestos diagnósticos de la presente invención se pueden emplear en técnicas como ensayos FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia).

40 Las secuencias de ácido nucleicos que codifican los RGM de otras especies así como también variantes de RGM son fácilmente deducibles de la información proporcionada aquí. Estas secuencias de ácidos nucleicos son particularmente útiles, como se señaló aquí anteriormente, en configuración médica y/o diagnóstica, pero también proporcionan importantes herramientas de investigación. Estas herramientas se pueden emplear, inter alia, para la generación de animales transgénicos que sobreexpresan o suprimen los RGM o en donde el gen RGM se inactiva y/o se elimina. Adicionalmente, dichas secuencias se pueden emplear para detectar y/o elucidar los patrones de interacción RGM y/o las moléculas unidas a y/o interferidas con los RGM.

Las Figuras muestran:

45 Figura 1: Fracciones de proteína RGM inducen el colapso de conos de crecimiento RGC. Las proteínas de membrana solubilizadas de cerebros de pollo E9/E10 se cargan en dos columnas de intercambio de ión diferentes, una columna de intercambio de anión DEAE y una columna de intercambio de catión. El RGM se eluye de la columna de intercambio de catión en una concentración NaCl de 200 - 400 mM en dos fracciones de 1 ml (4 +5) se incorpora en vesículas de lecitina y las vesículas de lecitina se utilizan en experimentos de colapso con conos de crecimiento RGC. Las fracciones que contienen RGM (4 + 5, flechas), pero no las fracciones libres de RGM inducen colapso extensivo (>90 %) de conos de crecimiento RGC. Ni la efrina-A5 ni la efrina-A2 se pueden detectar con anticuerpos específicos, en fracciones RGM. Los axones RGC y conos de crecimiento en laminina se tiñen con Alexa-Phalloidin. Se incuban western blot de dos geles dimensionales con el anticuerpo monoclonal F3D4, y se tiñen posteriormente mediante una proteína completa, teñido con tinte india.

55 Figura 2: Análisis de gen bidimensional comparativo de proteínas tectales y secuencias RGM.

5 A: Se enriquecen las membranas de tecta de pollo anterior y posterior E9/10 y se tratan con regulador (C) o con PIPLC (E), para retirar las proteínas de anclaje GPI. El RGM putativo (flecha en Anterior-E + Posterior-E), una proteína básica de división PI-PLC con un peso molecular de 33 kDa, se corta y se utiliza para espectrometría de masa tándem de nanoelectrorrociado. Se tiñen dos geles bidimensionales con plata. No se observa diferencia anterior-posterior del candidato RGM en estos geles, esto es probablemente debido a la presencia de las otras dos proteínas en la mancha seleccionada. B: Secuencias de péptido RGM deducidas.

Figura 3: Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de RGM.

A. Secuencia de nucleótidos de RGM.

10 B. Secuencia de aminoácidos de los péptidos RGM derivados de microsecuenciamiento se resaltan en negrilla y los péptidos utilizados para elaborar los anticuerpos policlonales se subrayan. Los sitios de N-glucosilación potencial y un tripéptido RGD, el sitio de adhesión celular potencial se subrayan por asteriscos.

C. Vista esquemática de la proteína RGM. Los dominios hidrófobos están presentes en el terminal N- y C- de la proteína. Los epítomos de los dos anticuerpos anti-RGM policlonales se demarcan.

Figura 4: El anticuerpo RGM policlonal y monoclonal reconoce la misma proteína 33 kDa.

15 A. El anticuerpo anti-RGM1 se une a una proteína de 33 kDa positiva a CRD de anclaje GPI (determinante que reacciona en forma cruzada). Transferencia izquierda: un anticuerpo anti-CRD se une a una proteína de 33 kDa, abundante baja (flecha), presente en la fracción E (sobrenadante PI-PLC) pero no la fracción C (sobrenadante de control). Transferencia derecha: Teñido Anti-RGM1 de una proteína de 33 kDa de anclaje GPI en un western blot con sobrenadante de E9/E10 membranas de cerebro de pollo.

20 B. El antígeno de 33 kDa de anclaje GPI del anticuerpo anti-RGM1 es más abundante en las membranas tectales posteriores (pos.) que en las anteriores (ant.). Transferencia izquierda: el suero preinmune de conejo no se une a ninguna proteína en *western blots* con la proteína de sobrenadante PI-PLC desde el techo anterior y posterior. Transferencia derecha: Unión de Anti-RGM1 a una proteína de 33 kDa. E = Sobrenadante PI-PLC de las membranas tectales, C = sobrenadantes de control de las membranas tectales.

25 C. Anti-RGM1 y F3D4 reconocen los mismos antígenos en las membranas tectales. Transferencia izquierda: teñido F3D4 de proteínas de membrana tectal. Se reconocen una banda doble a 33 kDa (flecha inferior) y una banda fuertemente visible a 35 kDa (flecha superior). Transferencia derecha: el teñido anti-RGM1, revela el mismo patrón de teñido con antígenos de 33 y 35 kDa (flechas). Contrario a la fracción de membrana, en donde se observan 3
30 bandas de proteína diferentes, solo se detecta una banda en la mayor parte de western blot con sobrenadantes PI-PLC. Para la detección en los western blot, se utiliza un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, secundario y se utiliza NBT (nitro tetrazolio azul) y BCIP (bromocloroindolil fosfato) para la reacción de color.

Figura 5: La sonda anticodificante RGM hibrida a un mRNA con expresión gradual a lo largo del eje anterior - posterior. A, B: Se expresa RGM-mRNA en un gradiente periventricular en el techo de un embrión de pollo E9. En una capa más superficial (flechas), el RGM también se expresa pero en un nivel mucho menor. El polo tectal anterior está a la derecha, el posterior a la izquierda. C,D: No se detecta tinción con la sonda codificante RGM, en secciones
35 crioestáticas paralelas de la tecta de pollos E9. El polo anterior tectal está a la derecha, el posterior a la izquierda.

Figura 6: RGM recombinante induce el colapso de conos de crecimiento retinales.

40 A: Se cultivan axones RGC en cubreobjetos recubiertos con laminina y se agrega RGM recombinante purificado de afinidad en una concentración final de 10ng/ml. Se colapsan más de 90 % de conos de crecimiento retinales temporal.

B: Conexos, las fracciones libres de RGM de purificación de afinidad no inducen colapsos de conos de crecimiento temporales. Los sobrenadantes de las células cos-7 transfectadas con un plásmido vacío, no poseen ninguna actividad que induce colapso (datos no mostrados). En A y B, los axones retinales y conos de crecimiento se tiñen con Alexa-Phalloidin de teñido F-actina.

45 Figura 7: RGM recombinante orienta los axones retinales temporales en el ensayo de banda.

A, B: Los axones retinales temporales evitan bandas que contienen RGM (demarcadas con globos fluorescentes rojos). Se utilizan membranas de RGM – transfectadas con células cos-7 (marcados con globos) y las membranas tectales anteriores para preparar redes con bandas.

C, D: Los axones retinales temporales no muestran ninguna reacción de evación, cuando se utilizan las membranas de células cos-7, transfectadas con un plásmido vacío (globos rojos). En A - D, las redes de membrana de bandas se recubren adicionalmente con laminina para mejorar el crecimiento de axón retinal de acuerdo con un protocolo previo (Monschau et al. 1997).

5 **Figura 8: Tinción RGM en endotelio de cerebro (humano).**

Se detecta inmunoreactividad dRGM en células de músculo liso endoteliales y vasculares (SMC), ambas, en cerebros de control no alterados neuropatológicos, saludables y cerebros lesionados, lo que sugiere una función constitutiva, fisiológica en la homeostasis vascular.

10 **Figura 9: Expresión RGM en una lesión de un humano que ha muerto debido a lesión cerebral severa (1-2 horas después de su muerte).** La expresión RGM en células infiltradas del sistema inmune. La regulación por aumento de la expresión celular RGM se correlaciona con el curso de tiempo y la aparición de leucocitos infiltrados y la activación de microglía /macrófagos después de lesión (Stoll et al., 1998). Después de lesión (hasta 2.5 días), se encuentra inmunoreactividad RGM en leucocitos de origen granulocítico, monocítico y linfocítico en recipientes dentro del tejido isquémico. Paralelo a la formación de edema, hasta 1-7 días, se encuentran células RGM positivas se encuentra extravasación al exterior de las paredes vasculares en el parénquima isquémico lesionado focal. En las regiones perivasculares, las células RGM positivas forman grupos en los espacios Virchow-Robin del día 1-7, las cuales decrecieron posteriormente. Estas células peri-vasculares, también denominadas como células adventicias o periteliales son característicamente células inmunitarias alertas (Kato and Walz, 2000; Streit et al., 1999).

Fig. 10: expresión RGM en una lesión cerebral (humana).

20 Con tiempo aumentado después de lesión cerebral, la mayoría de cambios destacables corresponden a áreas de inicio de la formación de cicatrices. En estas áreas, las láminas RGM positivas extracelulares bien definidas y los fibroblastoides RGM positivos y las células astrocíticas reactivas se condensan visibles adyacentes a la zona límite. Estas láminas RGM positivas aumentan en magnitud y se extienden regionales durante el tiempo.

Los Ejemplos ilustran la invención.

25 **Ejemplo I: Microsecuenciamiento de un candidato RGM**

30 Para separar el RGM de las A-efrinas, se emplea una combinación de dos columnas de intercambio de ión diferentes. RGM, en contraste a las efrinas A, se une a un intercambiador de catión fuerte y se eluye en una concentración de sal de 200 - 400 mM NaCl. Después de la incorporación de RGM en vesículas de lecitina, se observa actividad que induce colapso fuerte en las fracciones RGM (fracciones 4+5, Figura 1) pero no en las fracciones libres de RGM vecinas (fracción 6, Figura 1). Ni la efrina A5 ni la efrina A2 están presentes en estas fracciones, proporcionando por lo tanto que la función RGM no requiere la presencia de las efrinas A.

35 Para obtener las secuencias de péptido de RGM, el microsecuenciamiento de todas las proteínas, (se lleva a cabo dividido a partir de la membrana mediante tratamiento con la enzima PI-PLC y que tiene un peso molecular de 30 - 35 kDa y un punto isoelectrónico entre 7 y 9). Para este objetivo, las membranas anterior y posterior de la tecta embrionaria de pollo (E9/10) se preparan con algunas modificaciones como se describió previamente (Walter, Development 101, (1987), 685-96) y los glóbulos de membrana se someten a tratamiento con la enzima PI-PLC (fracción E) o regulador solo (fracción C). En particular, las membranas de tecta embrionaria de pollo (E9/10) se preparan con algunas modificaciones como se describió previamente (Walter et al., 1987). Todas las etapas se realizan a 4° C. Se aísla la tecta de 100 embriones de pollo y se divide en tres partes iguales de longitud a lo largo del eje anterior-posterior. Las partes tectales medias se desechan y las partes anterior y posterior se trabajan en forma separada. Las membranas se lavan con PBS que contiene los inhibidores de proteasa y se centrifugan. Los sedimentos de membrana tectal se resuspenden en regulador de trietanolamina y se tratan con la enzima PI-PLC (50 mU Boehringer Mannheim/ Roche Diagnostics GmbH), para retirar las proteínas de anclaje de glucosilfosfatidilinositol (anclaje GPI) de las membranas. No se agrega PI-PLC a las otras fracciones de membrana tectal anterior y posterior, las fracciones de control (C). Las fracciones de enzima (E) y control (C) se incuban a 37° C durante 1.5 horas y las suspensiones de membrana se centrifugan a 400.000 xg en un rotor Beckmann TLA 100.3. Se recolectan los sobrenadantes y se determinan sus concentraciones de proteína (Bradford 1976, modificado por Zor y Selinger, 1996). Los sobrenadantes se precipitan con 10% de ácido tricloroacético enfriado en hielo, se centrifugan y los glóbulos de proteína se lavan con etanol-éter (1:1 v/v) y se solubilizan en regulador de muestra (8.5 M urea, 5 % de β-mercaptoetanol, 2.5 % de amfolitos pH 3-10, 2 % de NP 40). Se cargan las fracciones E y fracciones C en geles bidimensionales, y después de proteínas candidatas de tefido plata en las fracciones E (Figura 2A, fecha) se cortan y se someten a digestión trípica en gel y ionización de nanoelectrorrociado (Wilm, Nature 379 (1996), 466-9).

En detalle, dicho electroforesis en gel 2D y el análisis de secuencia de proteína se lleva a cabo como se bosqueja aquí adelante:

5 las proteínas tectales se resuspenden en regulador de muestra, se separan utilizando electroforesis en gel bidimensional. Se carga 20 µg de proteína tectal en cada gel. Se realiza electroforesis de gradiente de pH sin equilibrio (NEPHGE) seguido por SDS-PAGE en la segunda dimensión como se describe por Boxberg (1988). Después de SDS PAGE, los geles se tiñen mediante protocolo de tinción plata modificado de Heukeshoven and Demick (Heukeshoven & Demick, Electrophoresis 9, (1988), 372-375).

10 Las proteínas teñidas con plata en los geles 2D, con un punto isoeléctrico básico y un peso molecular de 33/35 kDa, presente en la fracción E tratada con PI-PLC pero no en la fracción C, se cortan utilizando un bisturí estéril y afilado. Se hace microsecuenciamiento utilizando la técnica de espectrometría de masa de nano-electrorrociado en tándem como se describió previamente (Wilm et al., 1996). Las manchas de proteína se digieren en gel mediante tripsina y los péptidos resultantes se adsorben y se eluyen en forma de etapas en la fuente de electrorrociado para análisis espectral de masa. Se realiza nanoelectrorrociado en un espectrómetro de masa API III (Perkin-Elmer) como se describe por Wilm and Mann (Wilm & Mann, Anal. Chem. 68 (1996), 1-8). Después de seleccionar un péptido iónizado de la mezcla de péptido, el péptido se fragmenta y los fragmentos de péptido se analizan. El microsecuenciamiento espectrométrico de masa de los péptidos ionizados de la mancha marcada por las flechas en la figura 2, produce diez péptidos diferentes, con longitudes de 5 - 14 aminoácidos como se muestra en la Figura 2B; (la mancha seleccionada en la SEQ ID NOs, está presente en los sobrenadantes anterior y posterior PI-PLC en niveles similares. El RGM es sin embargo más abundante en membranas tectales posteriores que en membranas anteriores y la desaparición de la diferencia ap en los geles 2D se provoca de manera similar por dos proteínas diferentes no relacionadas con RGM y está presente en la mancha seleccionada.

Ejemplo II: Clonación del Gen RGM

25 Se utilizan tres de las diez secuencias de péptido (SEQ ID NOs 1 a 10) obtenidas en espectrometría de masa de nanoelectrorrociado en tándem para la síntesis de cebadores de oligonucleótido degenerados y se realizan experimentos PCR como sigue: Se utilizan tres de las diez secuencias de péptido obtenidas mediante espectrometría de masa de nanoelectrorrociado en tándem para la síntesis de cebadores de oligonucleótido degenerados y sus secuencias complementarias.

P1F: 5'-ATGCC(AGCT)GA(AG)GA(AG)GT(AGCT)GT(AGCT)-3' (SEQ ID NO:11)

P1R: 5'-TT(AGCT)AC(AGCT)AC(CT)TC(CT)TC(AGCT)GGCAT-3' (SEQ ID NO:12)

30 P2F: 5'-GA(CT)AC(AGCT)TT(CT)CA(AG)AC(AGCT)TG(CT)AA-3' (SEQ ID NO:13)

P2R: 5'-TT(AG)CA(AGCT)GT(CT)TG(AG)AA(AGCT)GT(AG)TC-3' (SEQ ID NO:14)

P3F: 5'-AA(CT)CA(AG)CA(AG)(CT)T(AGCT)GA(CT)TT(CT)CA-3' (SEQ ID NO:15)

P3R: 5'-TG(AG)AA(AG)TC(AGCT)A(AG)(CT)TG(CT)TG(AG)TT-3' (SEQ ID NO:16)

35 Se utilizan cebadores de hexámero aleatorios y de transcriptasa de virus inverso de murino Moloney para sintetizar el cADN de hebra sencilla de ARN total de tectum de pollos E9. Se agregan combinaciones de cebadores delantero (F) e inverso (R) al cADN y se hace amplificación PCR utilizando polimerasa Taq. Se utilizan las siguientes condiciones PCR: una etapa de desnaturalización inicial a 95° C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 95° C durante 40 s, 50° C durante 1 min, 72° C durante 2 min. Se clonan los productos PCR en el vector T pGEM (Promega) y se secuencian cuatro clones positivos utilizando el secuenciador que expresa ALF (Pharmacia). La secuencia produce un ORF, que contiene la mayor parte de las secuencias de péptido obtenidas mediante microsecuenciamiento. Se utiliza el fragmento 459 bp para detectar una colección de cADN para obtener la secuencia de longitud completa y para análisis adicional tal como hibridación in situ Northern blot. Los productos PCR se cargan en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y se obtiene y se clona un producto PCR de 459 bp de longitud, en el vector T pGEM. Después de secuenciamiento, se encuentra que la mayor parte de las 45 secuencias de péptidos en el producto PCR, confirma que se amplifica el candidato correcto. Se utiliza el fragmento 459 bp para detectar una colección de cADN de cerebro de pollo E14. Los clones positivos contienen un inserto de aproximadamente 4 kb y el secuenciamiento confirma la presencia del fragmento 459 bp y las secuencias en la dirección 3' adicionales, que incluyen un codón de parada. Se obtienen secuencias en la dirección 5' al realizar 5'-RACE. En detalle, se utiliza la sonda 459 bp para detectar 500.000 placas de una colección de cerebro de pollo E14, clonada en el vector λ Zap. Después de dos rondas de detección, se aíslan ocho placas únicas y se clonan los insertos relacionados en el vector Bluescript utilizando el equipo de incisión rápido (Stratagene). Los clones positivos, analizados mediante digestiones de restricción, contienen un inserto de aproximadamente 4 kb y el secuenciamiento confirma la presencia del fragmento 459 bp y las secuencias en la dirección 3' adicionales, que

incluyen un codón de parada. Para obtener la secuencia de la región en la dirección 5' del fragmento 459 bp, se realiza un 5'-RACE de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el equipo RACE de Boehringer Mannheim y ARN total de tecta de pollo E9. Se amplifica una banda de 700 bp, se purifica, se clona en el vector T pGEM, y se secuencian 5 clones positivos. La secuencia tiene un ORF con dos metioninas que podrían actuar como sitios de inicio potenciales. La secuencia de longitud completa de RGM se confirma independientemente varias veces. Para experimentos in situ y Northern blot, se clona el fragmento 459 bp en el vector Bluescript KS (Stratagene) y se producen sondas anti-codificantes y codificantes al utilizar las polimerasas SP6 y T7, respectivamente. Este 5'-RACE produce un ORF con dos metioninas, sitios de inicio potencial. El ORF completo de RGM tiene 1302 nucleótidos de longitud y codifica una proteína que consiste de 434 aminoácidos (Figura 3A; SEQ ID NO: 17). Están presentes dos dominios hidrófobos en el terminal N y el terminal C, respectivamente (Figura 3B; SEQ ID NO: 18), y dos algoritmos diferentes sugieren que el dominio hidrófobo de terminal N codifica un péptido de señal (mejor sitio de división predicho: a aa 29), el dominio de terminal C, un dominio de anclaje GPI (mejor sitio de división predicho: a aa 406). El RGM no tiene homología significativa en cualquier otra proteína, presente en las bases de datos y no lleva ningún dominio o motivo específico, excepto un motivo de triaminoácido, el sitio RGD, un sitio de adhesión celular potencial (Ruoslahti, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12 (1996), 697-715). Los resultados preliminares sugieren que este sitio es dispensable para la función RGM. Los anticuerpos policlonales, llamados anti-RGM1 (contra aas: 276 - 293) y anti-RGM2 (contra aas: 110 - 130), se elevan contra dos péptidos de la molécula recombinante RGM, reconocen una molécula de 33 kDa de anclaje GPI, que está presente en niveles mayores en los sobrenadantes PI-PLC de la membrana tectal posterior que en el anterior (Fig. 4A). En las fracciones de membrana por lo menos aparecen tres bandas de proteína, una banda doble a 33 kDa y una banda sencilla a 35 kDa. Estas bandas de proteína se reconocen por el anticuerpo policlonal anti-RGM1 y el anticuerpo monoclonal F3D4 (Müller (1996), loc. cit) (Figura 4B). Ambos anticuerpos muestran patrones de tinte idénticos en experimentos western blot y de inmunoprecipitación con anti-RGM que resulta en el derribo de una proteína positiva F3D4, de anclaje GPI. Estos resultados prueban, que los antígenos del anticuerpo monoclonal F3D4 y del anticuerpo policlonal anti-RGM1 son idénticos. El RGM es el primer miembro de una nueva clase de moléculas orientadas de axón, que no comparten homología de secuencia con efrinas, netrinas, semaforinas y cualesquier otras moléculas orientadas de axón.

La secuencia RGM humana correspondiente (SEQ ID NO: 20) se puede deducir mediante detección en la base de datos de genoma humano con la secuencia RGM de pollo deducida.

Ejemplo III: mARN RGM se expresa en un gradiente en el techo óptico

Para analizar la expresión de RGM-mARN en el techo óptico, se utiliza una sonda anticodificante RGM en experimentos de hibridación in situ en secciones crioestáticas de tecta de pollo E9. Se observa tinte más fuerte en la capa periventricular, que rodea el ventrículo tectal y la intensidad del tinte es mucho más fuerte en el techo posterior que en el techo anterior (Fig. 5A, B). Los cuerpos celulares de neuroglíocitos radiales se ubican en la capa periventricular y el patrón de tinción confirma los datos previos utilizando el anticuerpo monoclonal F3D4, cuando se observa el tinte de "glial endfeet" y de cuerpos neuroglíocitos (Mueller; (1996), loc. cit.; Mueller, (1997), loc. cit.). En una capa más superficial, se detecta una tinción más débil con la sonda anticodificante RGM pero una expresión diferencial entre los polos tectales anterior y posterior es fuerte para detectar en esta capa. En estas neuronas tectales de capa son RGM positivas. Esto es en línea con la expresión de RGM mediante una subpoblación de neuronas tectales. En general, el patrón de tinción con la sonda anticodificante RGM es muy similar al patrón de expresión de efrina-A5 con ambos mensajes se encuentra en una capa periventricular y en una capa tectal más superficial. No se detecta tinción con la sonda codificante RGM. En northern blot con ARN tectal, la sonda anticodificante RGM marca dos transcritos a 5.5 y 6.1 kb. Ambos mensajes se regulan por disminución en E14 con el mensaje más pequeño que no es muy detectable y el transcritos más grande que está claramente presente, pero a niveles menores. El RGM es activo en ensayos in vitro y muestra una expresión gradual en el techo óptico de los vertebrados. Con base en los datos Southern blot se asume que existen por lo menos dos miembros de la familia adicionales que pueden tener actividad orientada similar. (ver Figura 11)

Ejemplo IV: RGM Recombinante es Activo en Ensayo de Colapso y Banda

Para analizar la función del RGM recombinante, se utiliza cADN RGM de longitud completa para transfectar células cos-7 con un procedimiento de lipofección. El cADN RGM de longitud completa se clona en el sitio KpnI del vector de expresión pTriEx-1 (Novagen). Se transfectan las células cos-7 con el plásmido pTriEx-1 que contiene cADN RGM o con el plásmido vacío utilizando el reactivo de transfección Superfect (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se agrega mezcla de ADN-Superfect a células Cos-7 que crecen en platos de 10 cm. Se retira el medio 2 horas después, las células se lavan con PBS y se cultivan durante 48 horas adicionales en medio fresco. Se recolecta el medio acondicionado, que escurre de una columna de afinidad RGM y las fracciones que contienen RGM y se utilizan directamente las fracciones de control libres de RGM en experimentos de ensayo de colapso. Para experimentos de ensayo de banda, se lavan las células Cos-7 transfectadas con RGM y las células transfectadas de plásmido vacío con PBS y se cosechan utilizando una espátula de goma en la presencia de regulador de homogenización que contiene inhibidores de proteasa. El medio acondicionado de células cos-7 transfectadas con el plásmido RGM-pTriEx-1 se recolecta y escurre de una columna de anticuerpo anti-RGM1. Se evalúan las fracciones eluidas con un ensayo dot blot rápido y sensible y se agregan fracciones RGM positivas a los axones retinales que

crecen en un sustrato de laminina. En una concentración final de 10 ng/ml, el RGM soluble induce colapso de 90 % de conos de crecimiento RGC temporales (Figura 6A). Las fracciones libres de RGM o los sobrenadantes condicionados y concentrados vecinos de células cos-7 transfectadas con el plásmido vacío no poseen ninguna actividad que induce colapso (Fig. 6B). El RGM recombinante que es activo en forma soluble, es una diferencia fuerte entre RGM y las efrinas A y sugiere una función para un mecanismo quimiotrópico, en el establecimiento del mapa retinotectal. Para la preparación de redes de membrana de bandas, se utilizan las membranas de RGM- o células simultáneamente transfectadas. Las redes consisten de las líneas alternas de membranas de las células cos-7 simuladamente transfectadas y de células transfectadas RGM se ofrecen a los axones RGC temporales y nasales. Para mejorar la actividad que estimula la pobre excrecencia de las membranas cos-7, se agregan las membranas tectales anteriores o laminina. Se preparan el ensayo de colapso y los ensayos de banda y se emplean como sigue: Se realiza el ensayo de colapso como se describe (Cox, (1990), loc. cit.; Wahl, J. Cell Biol. 149(2) (2000), 263-70). Se agrega 5 µl de la fracción RGM positiva del sobrenadante RGM-cos o el sobrenadante de las células cos de control o las fracciones libres de RGM, a los cultivos retinales. Se fijan cultivos una hora después al agregar cuidadosamente 1 ml de fijador (4% de paraformaldehído, 0.33 M sacarosa, pH 7.4). 4 - 12 horas después, se lavan los cultivos y se tiñen mediante Alexa-Phalloidin (Molecular Probes), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se almacenan cultivos reñidos en un ordenador utilizando una cámara CCD y las imágenes se analizan con el software de formación de imágenes de análisis SIS. Se realizan experimentos de ensayo de banda como se describió previamente por Walter et al. (1987). Las redes de membrana consisten de las líneas de las membranas tectales anteriores mezcladas con las membranas de células cos transfectadas con RGM (relación: 1:1), que alterna con las líneas que consisten de las membranas anteriores mezcladas con las membranas de las células cos transfectadas de plásmido vacío (relación 1: 1). En un protocolo alternativo, las redes de membrana que consisten de líneas alternas de membranas de células cos transfectadas RGM y de membranas cos de control, se incuban durante 2 horas a 37° C con 20 µg/ml de laminina (Becton-Dickinson). Ante de uso, las rede se lavan con regulador de Hank (2x). En estas redes, los axones temporales RGC, pero no los axones nasales, muestran un comportamiento de evasión repulsivo claro, que crece en bandas de membrana libres de RGM (Fig. 7 A - D). Estos resultados demuestran, que la proteína recombinante no solo es activa en colapso sino también en ensayos de bandas. El RGM comparte con las efrinas A2 y A5 de anclaje GPI, la expresión gradual y la actividad funcional en dos sistemas in vitro diferentes. Su actividad es sin embargo diferente de las dos efrinas A en otros aspectos. La especificidad de su actividad no se restringe a axones temporales y conos de crecimiento. Los axones nasales y conos de crecimiento también reaccionan, pero en concentraciones RGM mayores. Esto está en línea con las observaciones previas, que los axones retinales temporales reaccionan más fuertemente con RGM que los axones nasales retinales (Stahl, (1990), loc.cit). Para la efrina A5, se ha observado una ligera diferencia en la sensibilidad de los axones temporales y nasales retinales, esta diferencia sin embargo no se pronuncia tanto como con RGM (Drescher, Cell 82 (1995), 359-70). A pesar de la dependencia de concentración más fuerte de la función RGM, otra diferencia crucial es que RGM, en contraste a efrina A5 y efrina A2, parece ser activa en forma soluble y evidentemente no requiere agregación para estimular su receptor retinal actualmente desconocido. Estos resultados in vitro destacan la diferencia entre las efrinas y RGM. En el ensayo de banda, la inactivación de RGM utilizando el anticuerpo monoclonal F3D4 y el método de inactivación láser asistido por cromóforo (CALI), resulta en la neutralización completa de las actividades orientadas repulsivas de las membranas posteriores tectales en más de 50 % de los experimentos (Mueller, (1996), loc. cit.). Sin embargo el F3D4 no se une a efrina A2 ni a efrina A5 (Mueller, (1997), loc. cit.) y por lo tanto se sugiere que las efrinas A y RGM interactúan algunas veces en dominios de membrana especiales en los que están vinculados por sus anclajes GPI. Dicha una colocalización puede explicar el resultado, de que la inactivación de RGM conduce adicionalmente a la inactivación de la efrina A2 y efrina A5 y puede explicar la neutralización completa observada en los experimentos de ensayo de banda (Mueller, (1996), loc. cit.). La relación funcional de RGM con efrina A2 y efrina A5 y la función in vivo de RGM necesita ser dirigida, debido especialmente a se ha mostrado que ambas efrinas son determinantes moleculares importantes para la formación del mapa topográfico en los vertebrados (Nakamoto, Cell 86 (1996), 755-66; Frisen, Neuron 20 (1998), 235-43; Feldheim, Neuron 21 (1998), 563-74; Picker. Development 126 (1999), 2967-78; Feldheim, Neuron 25 (2000), 563-74; Brown, Cell 102 (2000), 77-88). Sin embargo existen evidencias de dos vertebrados, que sugieren que otros factores, a pesar de las efrinas, se requieren para la formación del mapa retinotectal. La eliminación del gen efrina A2 o el gen efrina A5 en ratones, resulta en fenotipos mapeados con algunos axones retinales que forman las zonas de terminación ectópicas en el colículo superior (SC), el homólogo de mamífero del techo óptico, y con axones nasales retinales que sobrepasan el SC y terminan en el colículo inferior. En ratones efrina-A2^{-/-}, los axones temporales muestran errores de mapeo con zonas de terminación ectópicas, pero los axones nasales no muestran ningún error de mapeo en contraste con los ratones efrina A5^{-/-} que tienen defectos en el mapeo topográfico de los axones nasales pero no temporales (Frisen. (1998), loc.cit.; Feldheim, (2000), loc. cit.). La eliminación de ambos genes por lo tanto debe resultar en un mapeo mucho más disturbio de los axones nasales y retinales temporales a lo largo del eje anterior-posterior del SC. Esto se observa actualmente en homocigotos de efrina-A2^{-/-} A5^{-/-} de mutante doble pero aún estaba presente un sesgo topográfico de los axones nasales y temporales, con la mayoría de axones temporales y nasales retinales confinados con sus mitades tectales anterior y posterior, respectivamente (Feldheim, (2000), loc. cit.; Goodhill, Neuron 25 (2000), 501-3). Estos resultados indican una función del RGM como uno de los factores adicionales requeridos para mapeo a lo largo del eje anterior-posterior. Dicha función se soporta por la alta expresión posterior y la baja expresión anterior gradual en esta molécula en el SC de mamíferos (Mueller, (1997), loc. cit.). El pez cebra mutante acerebella (ace) es mutante en *fgf8* y carece de la región límite del mesencéfalo-prosencéfalo y el cerebelo (Reifers, Development 125 (1998), 2381-95; Picker, (1999), loc. cit.). Como un resultado el techo es mucho más pequeño en los mutantes ace que en los tipo natural y los niveles de expresión de todas las

tres efrinas Z de pez cebra que se cambian con la efrina A2 y efrina A5a aún se expresan en niveles anteriores y bajos en la tecta ace y con efrina A5b se elimina completamente (Picker et al., 1999). En la tecta mutante de ace, el mapeo de los exones retinales a lo largo del eje anterior-posterior es normal en el techo dorsal y no se pierde completamente en el techo ventral, lo que sugiere el involucramiento de otras indicaciones de orientación gradual, no afectados seriamente por la mutación *fgf8* en los mutantes de pez cebra ace (Picker et al., 1999). Se afecta el patrón dorsoventral en los mutantes de pez cebra ace y los ratones transgénicos de dobles efrina A2^{-/-} A5^{-/-}. El RGM, con su expresión gradual a lo largo del eje anterior-posterior del techo y su capacidad de funcionar en una forma secretada y acoplada a membrana, es un factor importante para la formación del mapa topográfico.

Ejemplo V:

10 Materiales y métodos

1. Pacientes

Se incluyen 21 cerebros de pacientes con historia clínica y diagnóstico neuropatológicamente confirmado de infartos cerebrales focales y 25 cerebros de pacientes con lesión cerebral traumática en este estudio. Se deriva el tejido cerebral infartado de un banco actualizado de cerebros con apoplejía y trauma (Tabla 1, 2) reportado previamente (Postler et al., 1997, Beschomer et al., 2000). La obtención de tejidos de muestra se realiza de acuerdo con las directrices éticas de la Universidad de Tuebingen. Los pacientes con estado inmune alterado debido a terapia inmunosupresora o meningitis/encefalitis se excluyen de este estudio. Como controles, los resultados se comparan con tejido de las áreas correspondientes de 4 cerebros no isquémicos normales descritos previamente (Schwab et al., 2000). Además de los datos del paciente, se utiliza tinción con hematoxilina-eosina (HE), luxol fast blue (LFB) y hierro (Fe) para la evaluación de las características histológicas típicas definidas como indicación estándar de infarto (Kalimo et al., 1996) y trauma (Graham y Gennarelli, 1996).

2 Inmunohistoquímica

Después de fijación de formaldehído y la incorporación de parafina, se hierven dos secciones de 2 µm rehidratadas (en un horno de microondas de 600W) siete veces durante 5 min en regulador de citrato (2,1 g de citrato de sodio/litro, pH 7,4). Se inhibe la peroxidasa endógena con 1 % de H₂O₂ en metanol (1:10; 15 min). Las secciones se incuban con 10 % de suero de porcino normal (Biochrom, Berlín, FRG) para bloquear la unión no específica de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos policlonales monoespecíficos dirigidos contra RGM se diluyen (1:10) en 1 % de BSA (albúmina de suero bovino) TBS (solución de sal balanceada con Tris, que contiene 0.025 M Tris, 0.15 M NaCl) y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Se detecta la unión específica de los anticuerpos con un fragmento de anticuerpo F(ab) IgG anticonejo de porcino biotinilado secundario 1:400 durante 30 min (DAKO, Hamburg, FRG), seguido por incubación con un complejo de estreptavidina-biotina conjugado con peroxidasa (DAKO, Hamburg, FRG). La enzima se visualiza con diaminobenzidina como un cromógeno (Fluka, Neu-Ulm, FRG). Las secciones se contratiñen con Hemalaun de Mayer. Los controles negativos de las secciones se incuban en la ausencia del anticuerpo primario. Se confirma la especificidad del anticuerpo policlonal RGM mediante inhibición de teñido utilizando tejido cerebral isquémico humano después de pre-incubación durante 3h en hielo con acceso del péptido cognato RGM.

3. Experimentos de Marca Doble

En los experimentos de marca doble, primero se marca un antígeno específico de activación o de tipo celular utilizando el procedimiento ABC en combinación con conjugados de fosfatasa alcalina. Los antígenos específicos se marcan con anticuerpos contra GFAP (proteína ácida fibrilar de neuroglíocito, monoclonal, Boehringer Mannheim, Alemania, 1:100) para detectar los astrocitos, MBP (proteína básica mielina, policlonal, oligodendrocitos, Dako, 1:500) y CD68 (Dako, 1:100) para identificación microglía/macrófago. Se detectan microglía/macrófagos activados con anticuerpos dirigidos contra HLA-DR, -DP, -DQ (MHC clase II, DAKO, Glostrup, Dinamarca, 1:100) o MRP-8 (8-5C2, BMA, Augst, Suiza, 1:100) (Postler et al., 1997). Se clasifican las subpoblaciones linfocíticas con anticuerpos monoclonales contra CD4 (linfocitos auxiliares T, 1:10, Dako) y CD8 (linfocitos citotóxicos/supresores T, 1:500, Dako) y CD20 (marcador de células B, 1:200, Dako). Con el fin de detectar las estructuras de lámina basal extracelulares en recipientes y durante la formación de cicatrices se utilizan anticuerpos de laminina de ratón (1:500, Chemicon) y anticuerpos de fibronectina de conejo (1:100, Dako) para detectar el depósito de matriz. Adicionalmente, con el fin de caracterizar la repuesta de proliferación celular, las secciones se incuban con los anticuerpos monoclonales de PCNA específico de fase S (que prolifera el antígeno nuclear celular, 1:100, Dako). En resumen, los cortes se desparafinizan, se irradian en un horno de microondas para la recuperación del antígeno y se incuban sin suero de porcino específico como se describió anteriormente. Se logra la visualización al agregar anticuerpos secundarios biotinilados (1:400) durante 30 min y complejo ABC conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:400 en TBS-BSA durante 30 min. Consecutivamente, los cortes se revelan con solución de sustrato de cromógeno de sal BB Fast-Blue que produce un producto de reacción azul. Entre los experimentos de marca doble, los cortes se irradian en un microondas durante 5 min en regulador de citrato. Luego se inmunodetecta RGM como se describió anteriormente.

4. Evaluación y análisis estadístico

Los datos se calculan por medio de las células marcadas (MLC, \pm SEM) de las zonas límite o las áreas remotas de la misma sección de tejido y se comparan con cerebros de control normales utilizando la prueba t de Student no pareada de dos colas. Se definen las zonas límite como áreas peri-lesionales adyacentes al núcleo necrótico desarrollado que demarca la región de daño principal. Las células RGM+ se cuentan en diez campos de alta potencia (HPF, x 200 de magnificación con una rejilla de pieza-ojo que representa 0.25 mm²).

Resultados

Se evalúan 21 cerebros de pacientes con infartos cerebrales focales (FCI), 25 cerebros con lesión cerebral traumática (TBI) y 4 cerebros de control para la expresión de la proteína RGM mediante inmunohistoquímica.

1. Cerebros de control no alterados neuropatológicos, saludables

En los cerebros de control sin alteraciones neuropatológicas, se detecta la inmunoreactividad RGM en las fibras de materia blanca, oligodendrocitos, el pericario de algunas neuronas y las células RGM+ también se detectan en el plexo coroide (Fig. 8) y el epéndimo. Solo se detectan células únicas en los espacios peri-vasculares. Adicionalmente, algunas células de músculo liso y se marcan pocas células endoteliales pero no astrocitos.

2. Isquemia cerebral focal (FCI)

Si se analiza el número y se altera la distribución de las células que expresan RGM después de infartos cerebrales. Los resultados sugieren, que la expresión RGM se asocia con lesión. La expresión celular RGM se confina a las neuronas, pocos astrocitos reactivos e invaden los leucocitos. Con la madurez de las lesiones, se encuentra que los componentes de láminas extracelulares positivas de RGM en la cicatriz constituida. Las células RGM positivas acumuladas en la materia blanca infartada, áreas hemorrágicas, núcleo de infarto y áreas peri-infartales, respectivamente. Utilizando la prueba t de student, un número significativamente mayor ($P < 0.0001$) de células RGM+ se detecta en áreas peri-infartales (MLC=24, SEM=1.1) que en áreas remotas (MLC=2, SEM=0.2) o tejido de control (MLC=6, SEM=0.8). Las áreas peri-infartadas descritas morfológicamente son parte de la penumbra fisiológica definida. En estas áreas el número de células positivas RGM se acumulan ya hasta el día 1 ($p < 0.0001$, MLC=31.93, SEM=2.3) alcanzan su máximo de 1.5-2.5 días (MLC=34, SEM=3.2) después de infarto y permanece elevado hasta varias semanas y meses de supervivencia (MLC=11, SEM=1.4). Después de daño isquémico (hasta 2.5 días), la inmunoreactividad RGM es la predominancia encontrada en las neuronas y leucocitos de origen granulocítico, monocítico y linfocítico en los recipientes dentro del tejido isquémico. Paralelo a la formación de edema, hasta 1-7 días, se encuentran células RGM positivas de extravasación al exterior de las paredes vasculares en la parénquima lesionada por isquemia focal. En las regiones perivasculares, las células RGM positivas forman grupos en los espacios Virchow- Robin del día 1-7, que decrecen posteriormente. Estas células peri-vasculares, también denominadas con células adventicias o periteliales son característicamente células inmunitarias alertas (Kato and Walz, 2000; Streit et al., 1999). Con la madurez de la lesión, del día 3 en adelante, se observa la expresión lesional de RGM mediante pocos astrocitos reactivos. En las últimas etapas, se detectan depósitos RGM extracelulares que surgen 1 semana después de infarto, que constituyen las neo-láminas localizadas en áreas de inicio de formación de cicatrices. Estas láminas RGM positivas de crecen en magnitud y se extienden en la región con el tiempo. Con la reorganización del tejido de la lesión, también se observan microglía/macrófagos de RGM positivos fagocíticos de RGM positivos cargados con lípidos, "espumosos". La regulación por aumento de la expresión RGM celular se correlaciona con el curso de tiempo y la aparición de leucocitos infiltrados y la activación de microglía/macrófagos después de lesión (Stoll et al., 1998). Mientras que la regulación por aumento de la expresión extracelular RGM se correlaciona con el curso de tiempo y la aparición de la cicatriz después de lesión. En pocos casos (< 5% de los núcleos contrafeñidos) algunos astrocitos reactivos se restringen al núcleo de lesión demarcado también se expresan RGM.

3. Lesión cerebral traumática

En pacientes quienes mueren después de TBI, de acuerdo con la evaluación inmunohistológica de infarto cerebral (FCI) revela la expresión RGM nuclear, citoplásmica y membranosa celular temprana por los leucocitos, pocos astrocitos reactivos y neuronas con tinte fuerte de su pericario, dendritos y axones (Fig. 9). Durante el tiempo observado post TBI, dentro del núcleo necrótico y la acumulación de parénquima peri-necrótico límite de células RGM positivas ($p < 0.0001$) se detecta en las zonas límite (MLC=22, SEM=0.7) comparado con las áreas remotas (MLC=1, SEM=0.1) y los controles de cerebro normales (MLC=5.8, SEM=0.8). Luego de TBI, los números de células RGM positivas surgió durante las primeras 24 horas ($p < 0.0001$) cuando los números de células RGM positivas alcanzan niveles máximos (MLC=29, SEM=0.9) y se reducen posteriormente. Con el aumento en el tiempo después de TBI, la mayor parte de cambios destacables corresponden a las áreas de inicio de formación de cicatrices (Fig. 10). En estas áreas, son visibles las láminas RGM positivas extracelulares bien definidas que se condensan adyacentes a la zona límite. También se detecta la inmunoreactividad RGM en las células de músculo liso

endoteliales y vasculares (SMC) pero no se observan diferencias significativas entre los cerebros de control y lesionados.

Las referencias como se menciona en los ejemplos aquí anteriormente:

Beschomer, Acta Neuropathol. 100 (2000), 377-384

5 Graham, "Greenfield's Neuropathology." D.I. Graham y P.L. Lantos (eds), 6th. Edn., Edward Arnold, London (1996), pps. 197-248

Kalimo, Greenfield's Neuropathology 6th. Edn. Arnold, London Sydney Auckland (1996), pp 315-381.

Kato, Brain Pathol., 10 (2000), 137-143.

Postler, Glia 19 (1997), 27-34.

10 Schwab, Acta Neuropathol. 99 (2000), 609-614.

Stoll, Prog. Neurobiol. 56 (1998), 149-171. Streit, Prog. Neurobiol. 57 (1999), 563-581.

Ejemplo VI: Cambio del comportamiento de crecimiento de tumor en ratones

Las células de hibridoma que secretan el anticuerpo monoclonal F3D4 específico de RGM se inyectan en el peritoneo de los ratones, se ceban con aceite mineral. Normalmente las células de hibridoma continúan dividiéndose en el peritoneo y las células de hibridoma secretan grandes cantidades de anticuerpo, lo que resulta en la formación de tumores ascíticos grandes. Los ratones que reciben células de hibridoma que producen F3D4 no desarrollan tumores ascíticos en la cavidad peritoneal, pero desarrolla tumores adherentes, sólidos. El anticuerpo monoclonal F3D4 resulta en un cambio del fenotipo de las células de hibridoma tumorigénicas de un estado no adherente, menos invasivo a un estado adherente invasivo. El enmascaramiento del RGM endógeno mediante los anticuerpos secretados de las células de hibridoma, permite la adhesión e invasión de estas células neoplásicas y es responsable de este resultado:

Ejemplo VII: Detección de un fragmento funcional RGM

Se clona el RGM en el vector pTriEx y el vector se corta dentro del lado poliligador y dentro de la secuencia RGM utilizando SacI en la primera etapa. Después de ligación de ambos extremos el vector que contiene RGM se corta en la segunda etapa con StuI dentro de la secuencia RGM y en el poliligador con PmlI. Después del ligado de ambos extremos, el vector con los fragmentos RGM más cortos se transfecta en células COS7. Los lisados celulares de estas células COS se purifican utilizando una columna de afinidad anti-RGM1 y se utilizan fracciones que contienen RGM en experimentos de ensayo de colapso. Un fragmento como se describe en la SEQ ID NO: 19 es activo en dichos ensayos.

Ejemplo VIII: Detección de los RGM adicionales

Se utiliza una base de datos de ordenador públicamente disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, USA) para identificar los genes humanos homólogos a RGM de pollo, que emplean la información y los datos ilustrados en los ejemplos aquí anteriormente. Una estrategia de búsqueda con base en el algoritmo Blast (NCBI) resulta en tres genes humanos ubicados en los cromosomas 1, 5 y 15. Los contiguos correspondientes son NT_021932.5 (RGM3), NT_029283.2 (RGM2) y NT_010370.5 (RGM1), respectivamente. Las secuencias de cADN para RGM 1, 2 y 3 se derivan de estas secuencias genómicas al omitir los intrones y fusionar los exones restantes.

Se ilustran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes para el RGM2 humano en las SEQ ID NOs: 22 y 23 adjuntas. Se muestran las secuencias RGM3 humanas en las SEQ ID NOs: 24 y 25.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Uso de RGM y sus moduladores

<130> E 2006 PCT

<140>

<141>

<150> 00 12 8356.3

<151> 2000-12-22

5 <160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 1

Tyr Leu Gly Thr Thr Leu Val Val Arg
1 5

15 <210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 2

Thr Phe Thr Asp Thr Phe Gln
1 5

<210> 3

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 3

Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val Glu Asp Arg
 1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 4

Leu Thr Leu Leu Phe Lys
 1 5

10 <210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 5

Thr Phe Thr Asp Thr Phe Gln Thr Cys Lys
 1 5 10

<210> 6

<211> 14

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 6

25 Gly Cys Pro Leu Asn Gln Gln Leu Asp Phe Gln Thr Met Arg
 1 5 10

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 7

Ala Glu Met Asp Glu
1 5

5 <210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 8

Pro Glu Ala Phe Thr Tyr Glu
1 5

<210> 9

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 9

His Leu Glu Tyr Arg
1 5

20

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 10

Gln Gly Leu Tyr Leu
1 5

<210> 11

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 11

atgccagctg aaggaaggta gctgtagct 29

<210> 12

<211> 31

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 12

15 ttagctacag ctaccttctc tcagctggca t 31

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 13

gactacagct ttctcaagac agcttgctaa 30

<210> 14

25 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

30 <400> 14

ttagcaagct gtcttgagaa agctgtagtc 30

<210> 15

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 15

aactcaagca agcttagctg actttctca 29

<210> 16

10 <211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

15 <400> 16

tgagaaagtc agctaagctt gcttgagtt 29

<210> 17

<211> 1302

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: sintética

<400> 17

ES 2 390 425 T3

atgggtatgg ggagaggggc aggatccaca gccctgggac ttttccaaat cctccctgtc 60
 ttctctgtca tcttccctcc agtgacgtct ccatgcaaga tcctcaagtg caactctgag 120
 ttctgggcgg ccacgtcggg ttcgaccac ctgggcgag aggaaacccc ggagttctgc 180
 acggcgttgc ggcctacgc gcaactgcacc cgcgcaccg cccgcacctg cagggggggac 240
 ctggcctacc actcggcctg gcatggcata gacgatctca tgggtgaaca caactgctcc 300

aaggatggcc ccacgtccca gccccgcctc cggacattgc cccccgggga cagccaggag 360
 cgctctgaca gccccgaaat ctgccactac gagaagagct ttcacaaaaca ctccggcagct 420
 cccaactaca ccaactgtgg gctcttcggg gacccccacc tcaggacttt cacggacacc 480
 ttccagacct gcaagtgca aggggcttg ccgctcatag acaataacta cctgaacgtc 540
 caggtcacca acacgccggg gctgcctggc tcctcagcca ccgccaccag caagctcacc 600
 atcatcttca agagcttcca ggaatgcgtg gagcagaaag tgtaccaggc agagatggac 660
 gagctccctg ctgcctttgc tgatggctcc aagaacggcg gcgacaagca cggagccaac 720
 agcctgaaga tcaccgagaa ggtgtcgggc cagcacatcg agatccaggc caagtacatt 780
 ggcaccacca tcgtggtgag gcaggtgggc cgctacctca ccttcgccgt gcgtatgccg 840
 gaggaggtgg tcaacgctgt ggaggaccgg gacagtcagg gcctctacct gtgectccgg 900
 ggttgtccgc tcaaccaaca gattgacttc cagactttcc gcttggctca ggcgctgag 960
 ggccgtgctc gcaggaagg gcccagcttg ccggccccc ctgaggcctt cacttacgag 1020
 tcggccactg ccaagtgcag gaaaagctg cccgtagagg acctctactt ccagtcctgc 1080
 gtctttgacc tcctgactac gggggatgtc aacttcatgc tggctgctta ttacgctttt 1140
 gaggacgtga agatgcttca ctccaacaaa gacaaactgc acctctatga aaggacacgg 1200
 gccctagccc cgggcaatgc agctccctcg gagcatccct gggccctccc tgcctctgtg 1260
 gtagcaactg tgagtttgag tcagtgttgg ttgggtttgt ta 1302

<210> 18

<211> 434

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 18

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

ES 2 390 425 T3

	180		185		190										
Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Ile	Ile	Phe	Lys	Ser	Phe	Gln	Glu
	195						200					205			
Cys	Val	Glu	Gln	Lys	Val	Tyr	Gln	Ala	Glu	Met	Asp	Glu	Leu	Pro	Ala
	210					215					220				
Ala	Phe	Ala	Asp	Gly	Ser	Lys	Asn	Gly	Gly	Asp	Lys	His	Gly	Ala	Asn
225					230					235					240
Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Glu	Lys	Val	Ser	Gly	Gln	His	Ile	Glu	Ile	Gln
				245					250					255	
Ala	Lys	Tyr	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	Val	Val	Arg	Gln	Val	Gly	Arg	Tyr
			260					265						270	
Leu	Thr	Phe	Ala	Val	Arg	Met	Pro	Glu	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Val	Glu
		275					280						285		
Asp	Arg	Asp	Ser	Gln	Gly	Leu	Tyr	Leu	Cys	Leu	Arg	Gly	Cys	Pro	Leu
	290					295						300			
Asn	Gln	Gln	Ile	Asp	Phe	Gln	Thr	Phe	Arg	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Glu
305					310					315					320
Gly	Arg	Ala	Arg	Arg	Lys	Gly	Pro	Ser	Leu	Pro	Ala	Pro	Pro	Glu	Ala
					325				330					335	
Phe	Thr	Tyr	Glu	Ser	Ala	Thr	Ala	Lys	Cys	Arg	Glu	Lys	Leu	Pro	Val
			340					345						350	
Glu	Asp	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Cys	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Thr	Thr	Gly
		355					360						365		
Asp	Val	Asn	Phe	Met	Leu	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Ala	Phe	Glu	Asp	Val	Lys
	370					375					380				
Met	Leu	His	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Leu	His	Leu	Tyr	Glu	Arg	Thr	Arg
385					390						395				400
Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Ser	Glu	His	Pro	Trp	Ala	Leu
				405					410					415	
Pro	Ala	Leu	Trp	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Trp	Leu	Gly
			420					425						430	

Leu Leu

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Gallus gallus

<400> 19

Glu	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Ala	Asp	Gly	Ser	Lys	Asn	Gly	Gly	Asp	Lys
1				5					10					15	

ES 2 390 425 T3

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

<210> 20

<211> 434

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

ES 2 390 425 T3

Arg Phe Gln Thr Cys Lys Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
 165 170 175

Asn Tyr Leu Asn Val Gln Val Thr Asn Thr Pro Val Leu Pro Gly Ser
 180 185 190

Ala Ala Thr Ala Thr Ser Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Phe Gln
 195 200 205

Glu Cys Val Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Met Asp Glu Leu Pro
 210 215 220

Ala Ala Phe Val Asp Gly Ser Lys Asn Gly Gly Asp Lys His Gly Ala
 225 230 235 240

Asn Ser Leu Lys Ile Thr Glu Lys Val Ser Gly Gln His Val Glu Ile
 245 250 255

Gln Ala Lys Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Val Val Arg Gln Val Gly Arg
 260 265 270

Tyr Leu Thr Phe Ala Val Arg Met Pro Glu Glu Val Val Asn Ala Val
 275 280 285

Glu Asp Trp Asp Ser Gln Gly Leu Tyr Leu Cys Leu Arg Gly Cys Pro
 290 295 300

Leu Asn Gln Gln Ile Asp Phe Gln Ala Phe His Thr Asn Ala Glu Gly
 305 310 315 320

Thr Gly Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Pro Ala Pro Thr Ala Pro
 325 330 335

Glu Thr Phe Pro Tyr Glu Thr Ala Val Ala Lys Cys Lys Glu Lys Leu
 340 345 350

Pro Val Glu Asp Leu Tyr Tyr Gln Ala Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr
 355 360 365

Thr Gly Asp Val Asn Phe Thr Leu Ala Ala Tyr Tyr Ala Leu Glu Asp
 370 375 380

Val Lys Met Leu His Ser Asn Lys Asp Lys Leu His Leu Tyr Glu Arg
 385 390 395 400

Thr Arg Asp Leu Pro Gly Arg Ala Ala Ala Gly Leu Pro Leu Ala Pro
 405 410 415

Arg Pro Leu Leu Gly Ala Leu Val Pro Leu Leu Ala Leu Leu Pro Val
 420 425 430

Phe Cys

<210> 21

<211> 1305

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 390 425 T3

```

atgggtatgg ggagaggggc aggacgttca gccctgggat tctggccgac cctcgccttc 60
cttctctgca gcttccccgc agccacctcc ccgtgcaaga tcctcaagtg caactctgag 120
ttctggagcg ccacgtcggg cagccacgcc ccagcctcag acgacacccc cgagttctgt 180
gcagccttgc gcagctacgc cctgtgcacg cggcggacgg cccgcacctg ccggggtgac 240
ctggcctacc actcggccgt ccatggcata gaggacctca tgagccagca caactgctcc 300
aaggatggcc ccacctcgca gccacgcctg cgcacgctcc caccggccgg agacagccag 360
gagcgtcgg acagccccga gatctgccat tacgagaaga gctttcacia gcactcggcc 420
acccccaaat acacgcactg tggcctcttc ggggaccoc acctcaggac tttcaccgac 480
cgcttccaga cctgcaaggc gcagggcgcc tggccgctca tcgacaataa ttacctgaac 540
gtgcaagtc ccaacacgcc tgtgctgccc ggctcagcgg ccaactgccac cagcaagctc 600
accatcatct tcaagaactt ccaggagtgt gtggaccaga aggtgtacca ggctgagatg 660
gacgagctcc agggcgcctt cgtggatggc tctaagaacg gtggggacaa gcacggggcc 720
aacagcctga agatcactga gaagggttca ggccagcacg tggagatcca ggccaagtac 780
atcgccacca ccatcgtggt gcgccagggt ggcgctacc tgacctttgc cgtccgcatg 840
ccagaggaag tggtaaatgc tgtggaggac tgggacagcc agggctctca cctctgcctg 900
cggggtgccc ccctcaacca cagatcgac ttcaggcctt tccacaccaa tgctgagggc 960
accggtgccc gcaggctggc agccgccagc cctgcaccca cagccccga gaccttcca 1020
tacgagacag ccgtggccaa gtgcaaggag aagctgcccg tggaggacct gtactaccag 1080
gcctgcctct tcgacctcct caccacgggc gacgtgaact tcacactggc cgctactac 1140
gcgttgagg atgtcaagat gctccactcc aacaaagaca aactgcacct gtatgagagg 1200
actcgggacc tgccaggeag ggcggctgcg gggctgcccc tggcccccg gccctcctg 1260
ggcgcctcgc tcccgcctcct ggccctgctc cctgtgttct gctag 1305

```

<210> 22

<211> 1314

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

```

atgggcttga gagcagcacc ttccagcgcc gccgctgccc ccgcccagggt tgagcagcgc 60
cgcagccccc ggctctgccc cccgcccgtg gagctgtgct tgctgctgct gttcagcctc 120
gggctgctcc acgcagggtga ctgccaacag ccagcccaat gtcgaatcca gaaatgcacc 180
acggacttgc tgtccctgac ttctcacctg aactctgccc ttgacggctt tgactctgag 240
ttttgcaagg ccttgcctgc ctatgctggc tgcaaccagc gaacttcaaa agcctgccgt 300
ggcaacctgg tataccattc tgccgtgttg ggtatcagtg acctcatgag ccagaggaat 360
tgttccaagg atggaccoc atcctctacc aaccccgaag tgacccatga tccttgcaac 420
tatcacagcc acgctggagc cagggaacac aggagagggg accagaaccc tcccagttac 480
ctttttgtg gcttgtttgg agatcctcac ctcaagaact tcaaggataa cttccaaaca 540
tgcaaaagtag aaggggcctg gccactcata gataataatt atctttcagt tcaagtgaca 600
aacgtacctg tggctccctg atccagtgct actgctacaa ataagatcac tattatcttc 660
aaagcccacc atgagtgtac agatcagaaa gtctaccaag ctgtgacaga tgacctgccc 720
gccgcctttg tggatggcac caccagtggg ggggacagcg atgccaagag cctgctgata 780
gtggaagggt agagtggcca ctatgtggag atgcacgccc gctatatagg gaccacagtg 840
tttgtgcggc aggtgggtcg ctacctgacc cttgccatcc gtatgctgga agacctggcc 900
atgtcctacg aggagagcca ggacctgcag ctgtgcgtga acggctgccc cctgagtga 960
cgcatcgatg acgggcaggg ccagggtgct gccatcctgg gacacagcct gcctcgcacc 1020
tccttggtgc aggcctggcc tggctacaca ctggagactg ccaactctca atgcatgag 1080
aagatgccag tgaaggacat ctatttccag tcctgtgtct tcgacctgct caccactggt 1140
gatgccaact ttactgccgc agcccacagt gccttgagg atgtggaggc cctgcacca 1200
aggaagaaac gctggcacat tttcccagc agtggcaatg ggactccccg tggaggcagt 1260
gatttgtctg tcagctagag actcacctgc ttgatcctta tcgtgttttt gtag 1314

```

<210> 23

<211> 437

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 390 425 T3

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

Val Glu Gln Arg Arg Ser Pro Gly Leu Cys Pro Pro Pro Leu Glu Leu
20 25 30

Leu Leu Leu Leu Leu Phe Ser Leu Gly Leu Leu His Ala Gly Asp Cys
35 40 45

Gln Gln Pro Ala Gln Cys Arg Ile Gln Lys Cys Thr Thr Asp Phe Val
50 55 60

Ser Leu Thr Ser His Leu Asn Ser Ala Val Asp Gly Phe Asp Ser Glu
65 70 75 80

Phe Cys Lys Ala Leu Arg Ala Tyr Ala Gly Cys Thr Gln Arg Thr Ser
85 90 95

Lys Ala Cys Arg Gly Asn Leu Val Tyr His Ser Ala Val Leu Gly Ile
100 105 110

Ser Asp Leu Met Ser Gln Arg Asn Cys Ser Lys Asp Gly Pro Thr Ser
115 120 125

Ser Thr Asn Pro Glu Val Thr His Asp Pro Cys Asn Tyr His Ser His
130 135 140

Ala Gly Ala Arg Glu His Arg Arg Gly Asp Gln Asn Pro Pro Ser Tyr
145 150 155 160

Leu Phe Cys Gly Leu Phe Gly Asp Pro His Leu Arg Thr Phe Lys Asp
165 170 175

Asn Phe Gln Thr Cys Lys Val Glu Gly Ala Trp Pro Leu Ile Asp Asn
180 185 190

Asn Tyr Leu Ser Val Gln Val Thr Asn Val Pro Val Val Pro Gly Ser
195 200 205

Ser Ala Thr Ala Thr Asn Lys Ile Thr Ile Ile Phe Lys Ala His His
210 215 220

Glu Cys Thr Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Val Thr Asp Asp Leu Pro
225 230 235 240

Ala Ala Phe Val Asp Gly Thr Thr Ser Gly Gly Asp Ser Asp Ala Lys
245 250 255

Ser Leu Arg Ile Val Glu Arg Glu Ser Gly His Tyr Val Glu Met His
260 265 270

Ala Arg Tyr Ile Gly Thr Thr Val Phe Val Arg Gln Val Gly Arg Tyr
275 280 285

Leu Thr Leu Ala Ile Arg Met Pro Glu Asp Leu Ala Met Ser Tyr Glu
290 295 300

ES 2 390 425 T3

Glu Ser Gln Asp Leu Gln Leu Cys Val Asn Gly Cys Pro Leu Ser Glu
 305 310 315 320
 Arg Ile Asp Asp Gly Gln Gly Gln Val Ser Ala Ile Leu Gly His Ser
 325 330 335
 Leu Pro Arg Thr Ser Leu Val Gln Ala Trp Pro Gly Tyr Thr Leu Glu
 340 345 350
 Thr Ala Asn Thr Gln Cys His Glu Lys Met Pro Val Lys Asp Ile Tyr
 355 360 365
 Phe Gln Ser Cys Val Phe Asp Leu Leu Thr Thr Gly Asp Ala Asn Phe
 370 375 380
 Thr Ala Ala Ala His Ser Ala Leu Glu Asp Val Glu Ala Leu His Pro
 385 390 395 400
 Arg Lys Glu Arg Trp His Ile Phe Pro Ser Ser Gly Asn Gly Thr Pro
 405 410 415
 Arg Gly Gly Ser Asp Leu Ser Val Ser Leu Gly Leu Thr Cys Leu Ile
 420 425 430
 Leu Ile Val Phe Leu
 435

<210> 24

<211> 1272

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

atggggccagt cccctagctc caggctctcc catggcagtc ccccaactct aagcactctc 60
actctcctgc tgcctcctcg tggacatgct cattctcaat gcaagatcct ccgctgcaat 120
gctgagtaac tatcgtccac tctgagcctt agaggtaggg gttcatcagg agcacttcga 180
ggaggaggag gaggaggccg gggtagggg gtgggctctg gcggcctctg tcgagccctc 240
cgctcctatg cgctctgcac tcggcgccac gcccgcacct gccgcgggga cctcgccctc 300
cattcggcgg tacatggcat cgaagacctg atgatccagc acaactgctc ccgccagggc 360
cctacagccc ctccccgcc ccggggcccc gcccttcag gcgcgggctc cggcctccct 420
gccccggacc cttgtgacta tgaaggccgg ttttcccggc tgcattgctg tccccggggg 480
ttcttgcaat gcgcttcctt cggggacccc catgtgcgca gcttccacca tcactttcac 540
acatgccgtg tccaaggagc ttggcctcta ctggataatg acttctcttt tgtccaagcc 600
accagctccc ccatggcgtt gggggccaac gctaccgcca cccggaagct caccatcata 660
ttaaagaaca tgcaggaatg cattgatcag aagggtatc aggctgaggt ggataatctt 720
cctgtagcct ttgaagatgg ttctatcaat ggaggtgacc gacctggggg atccagtttg 780
tcgattcaaa ctgctaacc tcgggaacct gtggagatcc aagctgccta cattggcaca 840
actataatca ttcggcagac agctgggcag ctctccttct ccatcaagg agcagaggat 900
gtggccatgg cctctcagc tgaacaggac ctgcagctct gtgtggggg gtgccctcca 960
agtcagcgac tctctcgatc agagcgcaat cgtaggggag ctataacat tgatactgcc 1020
agacggctgt gcaaggaagg gcttccagtg gaagatgctt acttccattc ctgtgtcttt 1080
gatgttttaa tttctgggta tcccacttt accgtggcag ctcaggcagc actggaggat 1140
gccccagcct tcctgccaga cttagagaag ctgcatctct tcccctcaga tgctgggggt 1200
cctctttcct cagcaaccct cttagctcca ctctttctg ggcctttgt tctgtggctt 1260
tgcattcagt aa 1272
    
```

<210> 25

<211> 423

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

ES 2 390 425 T3

Met Gly Gln Ser Pro Ser Pro Arg Ser Ser His Gly Ser Pro Pro Thr
1 5 10 15

Leu Ser Thr Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Cys Gly His Ala His Ser
20 25 30

Gln Cys Lys Ile Leu Arg Cys Asn Ala Glu Tyr Val Ser Ser Thr Leu
35 40 45

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

Gly Gly Arg Gly Gly Gly Val Gly Ser Gly Gly Leu Cys Arg Ala Leu
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ala Leu Cys Thr Arg Arg Thr Ala Arg Thr Cys Arg Gly
85 90 95

Asp Leu Ala Phe His Ser Ala Val His Gly Ile Glu Asp Leu Met Ile
100 105 110

Gln His Asn Cys Ser Arg Gln Gly Pro Thr Ala Pro Pro Pro Arg
115 120 125

Gly Pro Ala Leu Pro Gly Ala Gly Ser Gly Leu Pro Ala Pro Asp Pro
130 135 140

Cys Asp Tyr Glu Gly Arg Phe Ser Arg Leu His Gly Arg Pro Pro Gly
145 150 155 160

Phe Leu His Cys Ala Ser Phe Gly Asp Pro His Val Arg Ser Phe His
165 170 175

His His Phe His Thr Cys Arg Val Gln Gly Ala Trp Pro Leu Leu Asp
180 185 190

Asn Asp Phe Leu Phe Val Gln Ala Thr Ser Ser Pro Met Ala Leu Gly
195 200 205

Ala Asn Ala Thr Ala Thr Arg Lys Leu Thr Ile Ile Phe Lys Asn Met
210 215 220

Gln Glu Cys Ile Asp Gln Lys Val Tyr Gln Ala Glu Val Asp Asn Leu
225 230 235 240

Pro Val Ala Phe Glu Asp Gly Ser Ile Asn Gly Gly Asp Arg Pro Gly
245 250 255

Gly Ser Ser Leu Ser Ile Gln Thr Ala Asn Pro Gly Asn His Val Glu
260 265 270

Ile Gln Ala Ala Tyr Ile Gly Thr Thr Ile Ile Ile Arg Gln Thr Ala
275 280 285

ES 2 390 425 T3

Gly Gln Leu Ser Phe Ser Ile Lys Val Ala Glu Asp Val Ala Met Ala
 290 295 300
 Phe Ser Ala Glu Gln Asp Leu Gln Leu Cys Val Gly Gly Cys Pro Pro
 305 310 315 320
 Ser Gln Arg Leu Ser Arg Ser Glu Arg Asn Arg Arg Gly Ala Ile Thr
 325 330 335
 Ile Asp Thr Ala Arg Arg Leu Cys Lys Glu Gly Leu Pro Val Glu Asp
 340 345 350
 Ala Tyr Phe His Ser Cys Val Phe Asp Val Leu Ile Ser Gly Asp Pro
 355 360 365
 Asn Phe Thr Val Ala Ala Gln Ala Ala Leu Glu Asp Ala Arg Ala Phe
 370 375 380
 Leu Pro Asp Leu Glu Lys Leu His Leu Phe Pro Ser Asp Ala Gly Val
 385 390 395 400
 Pro Leu Ser Ser Ala Thr Leu Leu Ala Pro Leu Leu Ser Gly Leu Phe
 405 410 415
 Val Leu Trp Leu Cys Ile Gln
 420

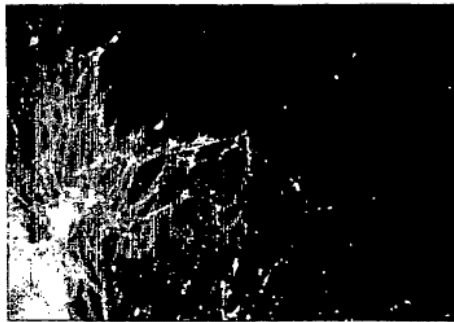
REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la degeneración o lesión del tejido nervioso del vertebrado, asociado con convulsiones, asociado con trastornos angiogénicos o trastornos del sistema cardiovascular, en donde dicho inhibidor es un anticuerpo o un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o scFv del mismo, o un aptámero, todos capaces de unirse a un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, 20, 23 o 25, o es una molécula de ácido nucleico específica que interactúa con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde dichas enfermedades o afecciones asociadas con la degeneración o lesión del tejido nervioso del vertebrado se seleccionan del grupo que consiste de enfermedades neurodegenerativas, lesiones de fibra nerviosa y trastornos relacionados con pérdidas de la fibra nerviosa.
3. El uso de la reivindicación 2, en donde dicha enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste de enfermedades neuronales motoras (MND), ALS, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis ocular progresiva, atrofia muscular progresiva, demencia relacionada con VIH y atrofia muscular espinal, Síndrome de Down, Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Creutzfeldt - Jacob, Síndrome de Gerstmann-Straeussler, kuru, Encefalopatía espongiiforme bovina, encefalopatía transmisible del visón, atrofia de sistema múltiple, disautonomía familiar de Riley-Day en donde dichas lesiones de fibra nerviosa se seleccionan del grupo que consiste de lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales relacionadas con presión intracraneal elevada, trauma, daño secundario debido a presión intracraneal aumentada, infección, infarto, exposición a agentes tóxicos, síndromes paraneoplásicos y cáncer y en donde dichos trastornos relacionados con pérdidas de la fibra nerviosa se seleccionan del grupo que consiste de parálisis de nervio facial, nervio medio, nervio cubital, nervio axilar, nervio torácico largo, nervio del radio y de otros nervios periféricos.
4. El uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad o afección asociada con convulsiones es epilepsia.
5. El uso de la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad o afecciones asociadas con trastornos angiogénicos se seleccionan del grupo que consiste de trastornos isquémicos, infarto, trastornos que conducen a la evolución de formación de placa vascular en trastornos cardio-vasculares, cerebrovasculares y/o nefro-vasculares o trastornos aquí se ha regulado la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.
6. El uso de la reivindicación 1, en donde dichos trastornos del sistema cardiovascular comprenden trastornos de barrera hematoencefálica, edema cerebral, daños cerebrales secundarios debido a presión intracraneal aumentada, infección, infarto, isquemia, hipoxia, hipoglicemia, exposición a agentes tóxicos, cáncer, o síndromes paraneoplásicos.
7. Uso de un inhibidor de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para remielinización, en donde dicho inhibidor es un anticuerpo o un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o scFv del mismo, o un aptámero, todos capaces de unirse a un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, 20, 23 o 25, o es una molécula de ácido nucleico específica que interactúa con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.
8. Uso de un inhibidor de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para modificar y/o alterar la diferenciación de mastocitos neuronales y/o sus progenitores, en donde dicho inhibidor es un anticuerpo o un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o scFv del mismo, o un aptámero, todos capaces de unirse a un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, 20, 23 o 25, o es una molécula de ácido nucleico específica que interactúa con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.
9. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con desarrollo colateral excesivo de las fibras nerviosas.
10. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar o tratar tumor el crecimiento o formación de metástasis de tumor.

11. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para evitar, aliviar o tratar enfermedades o afecciones asociadas con la actividad de las células inmunes autorreactivas o con células inflamatorias sobrereactivas.
- 5 12. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de procesos de inflamación y/o alergias, para la curación de heridas o para la supresión/alivio de formación de cicatrices.
- 10 13. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido como un marcador de mastocitos.
14. Uso de un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs 18, 19, 20, 23 o 25 o de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición farmacéutica para aliviar, evitar y/o tratar trastornos hemorrágicos y/o homeostáticos y/o daño vascular.
15. El uso de de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en donde dicho polipéptido es soluble.
- 15 16. Uso de un anticuerpo o un aptámero capaz de unirse a un polipéptido que tiene o comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18, 19, 20, 23 o 25, o una molécula de ácido nucleico específica que interactúa con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para la preparación de una composición diagnóstica para detectar las disposiciones o trastornos neurológicos, neurodegenerativos de la misma.

Fig.1a

Las fracciones RGM inducen colapso de cono de crecimiento



Fracción 4

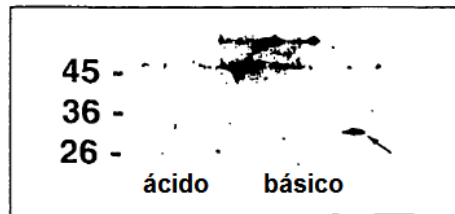


Fig.1b



Fracción 5

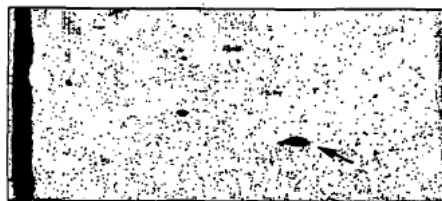
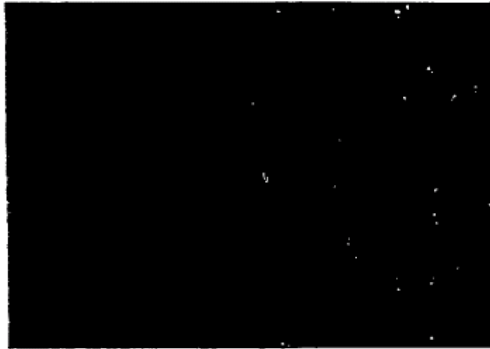


Fig.1c



Fracción 6

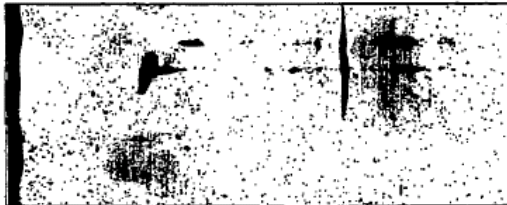
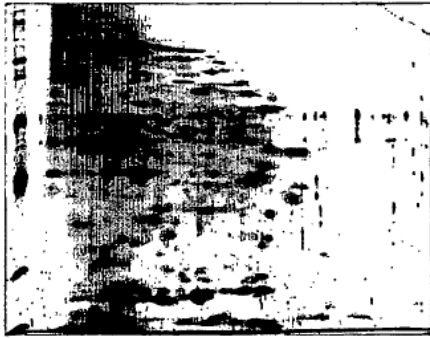
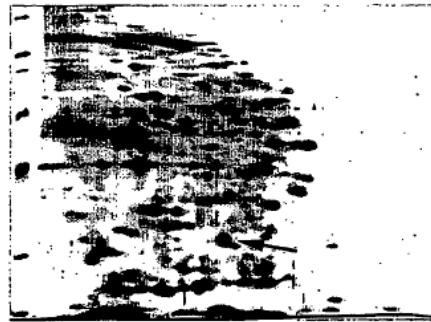


Fig.2a

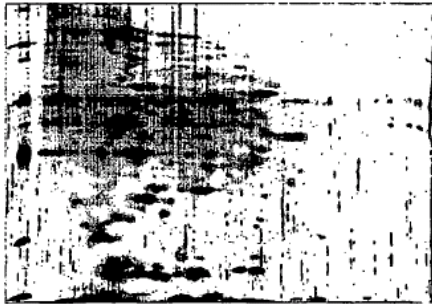
Anterior - Control (C)



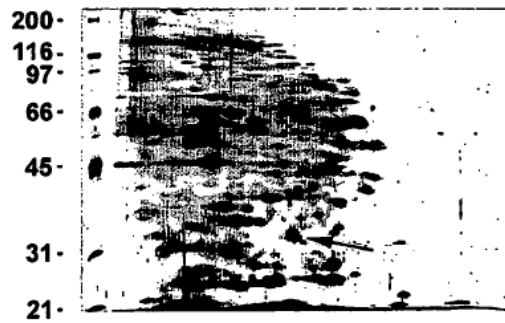
Anterior - PI-PLC (E)



Posterior - C



Posterior - E



iP 3 → 10

Fig.2b

Secuencias de Péptido RGM

YLGTTLVVR	(SEQ ID NO: 1)
TFTDTFQ	(SEQ ID NO: 2)
MPEEVNAVEDR	(SEQ ID NO: 3)
LTLLEK	(SEQ ID NO: 4)
TFTDTFQTCK	(SEQ ID NO: 5)
(GC)PLNQQLDFQTMR	(SEQ ID NO: 6)
AEMDE	(SEQ ID NO: 7)
PEAFTYE	(SEQ ID NO: 8)
HLEYR	(SEQ ID NO: 9)
QGLYL	(SEQ ID NO:10)

Fig.3

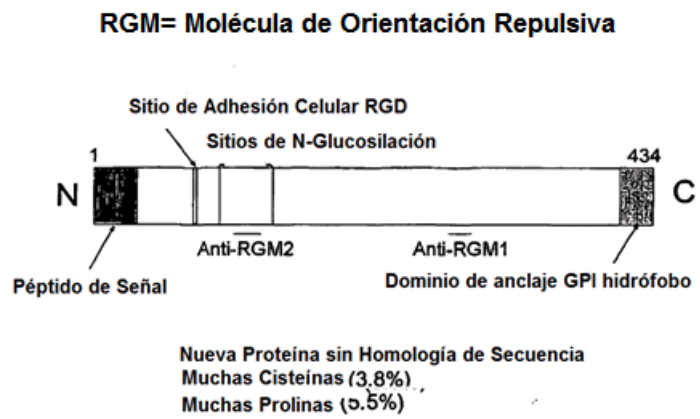


Fig.4

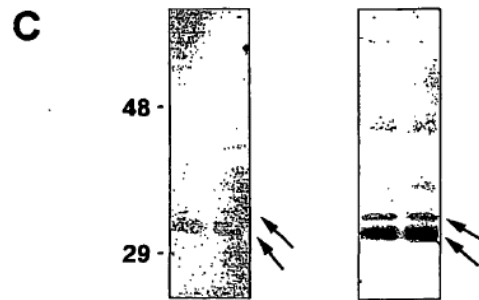
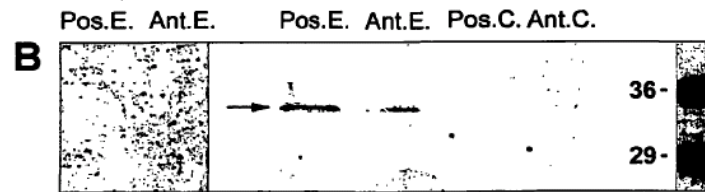
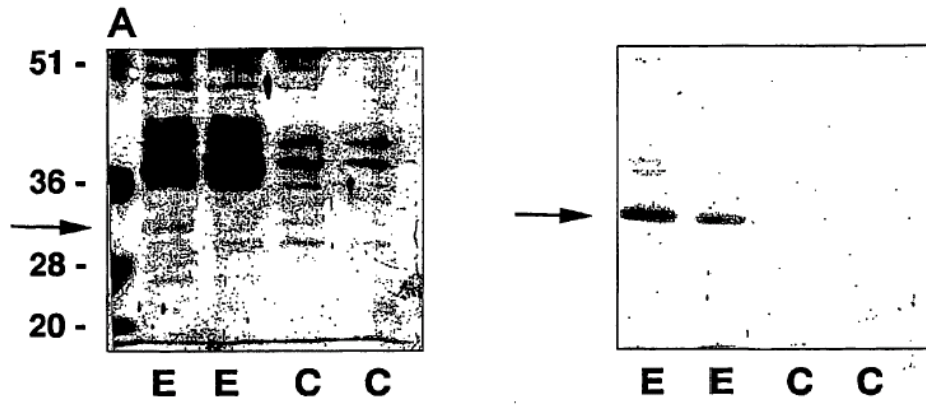


Fig.5

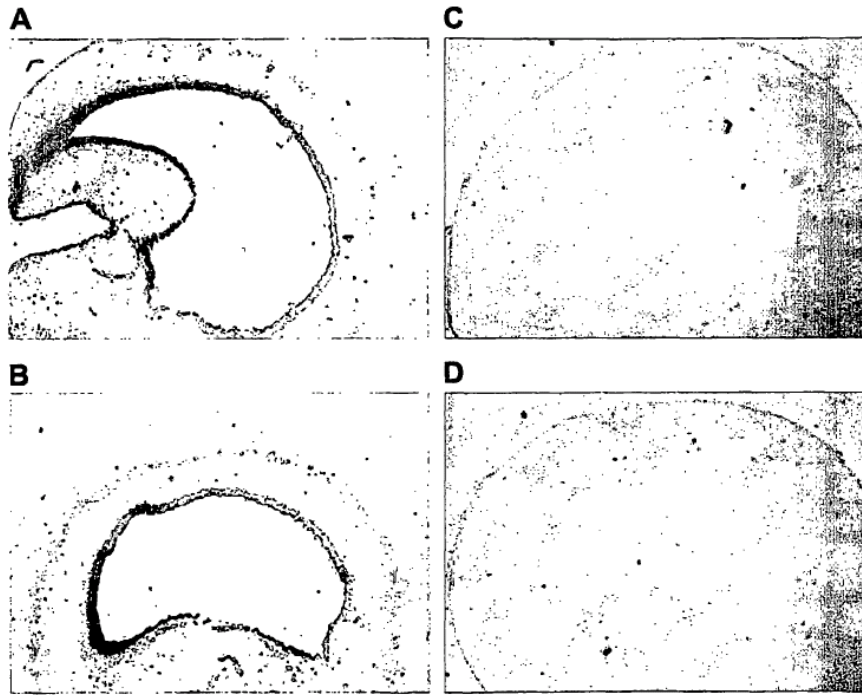
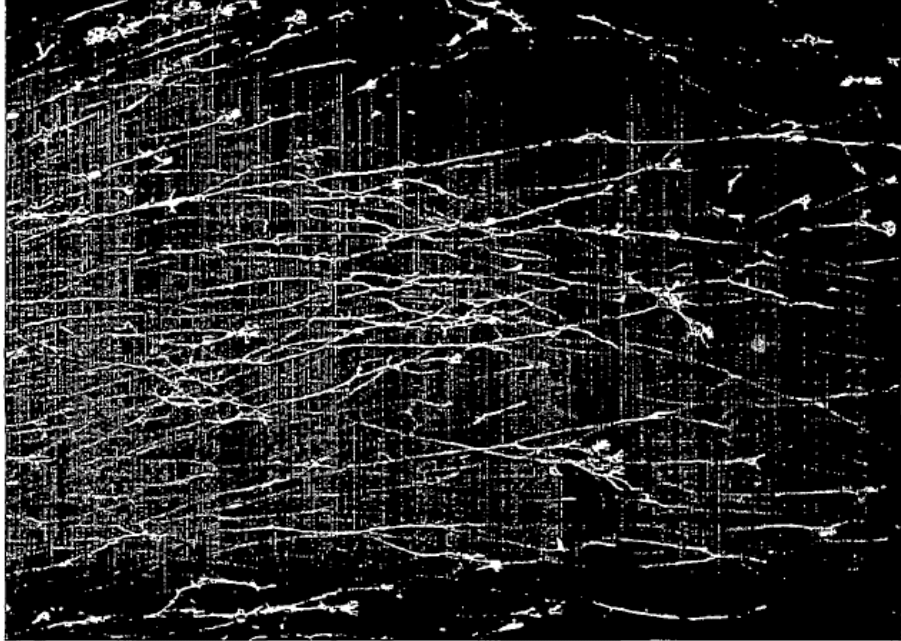


Fig.6

A



B

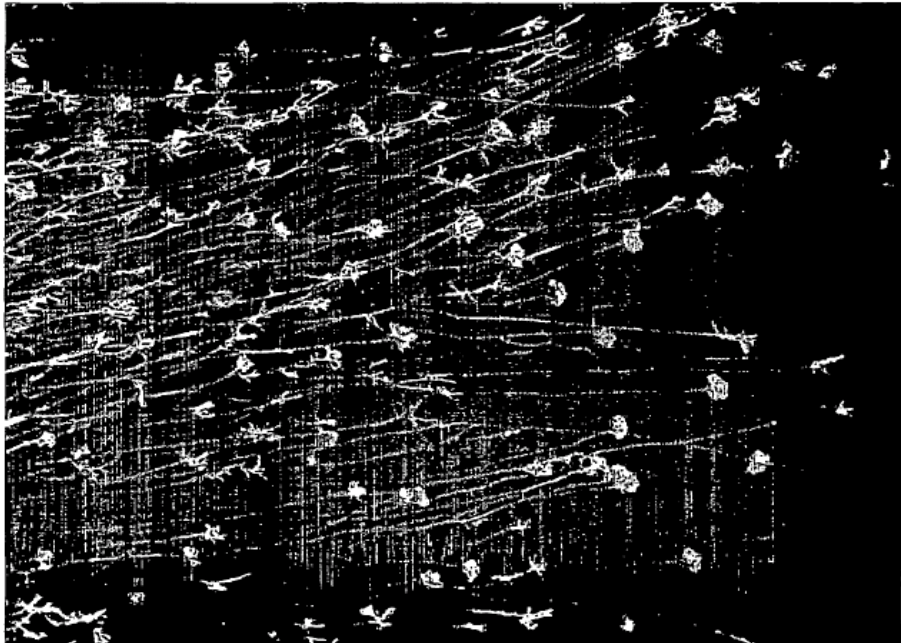


Fig.7

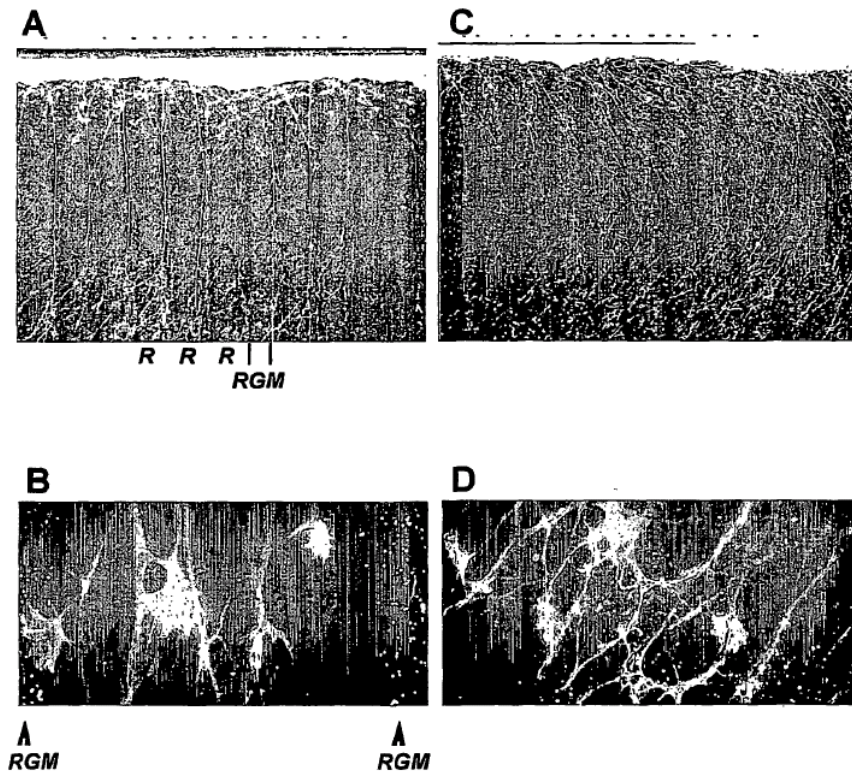


Fig.8

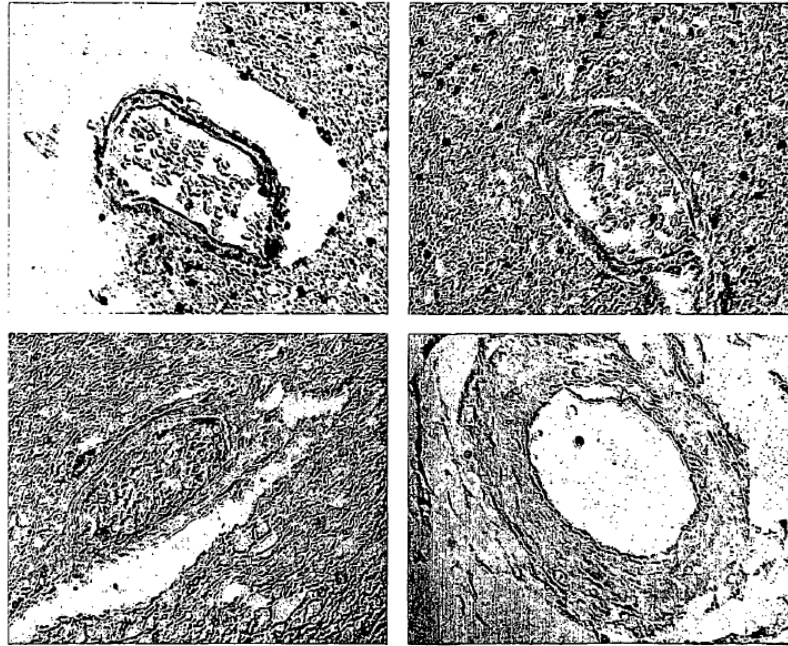


Fig.9

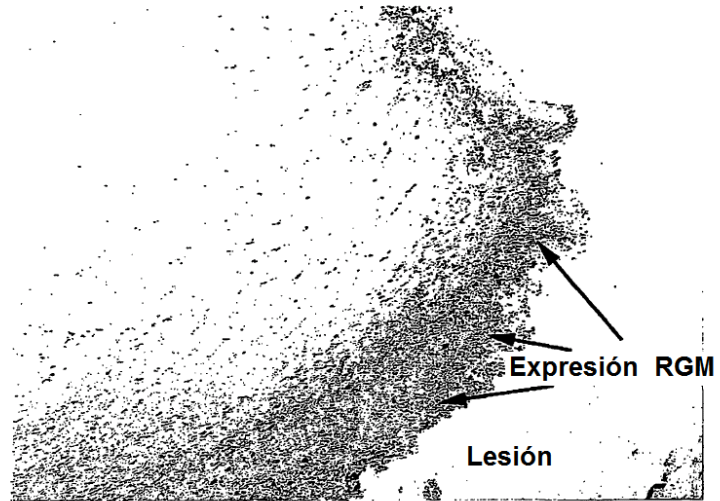


Fig.10

