(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 530 222**

(51) Int. CI.:

A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2009 E 09738284 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2276778**

(54) Título: **Factor neurotrófico MANF y usos del mismo**

(30) Prioridad:

30.04.2008 FI 20080326
13.05.2008 US 52757 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2015

(73) Titular/es:

HERANTIS PHARMA PLC (100.0%)
Viikinkaari 4
00790 Helsinki, FI

(72) Inventor/es:

SAARMA, MART;
LINDHOLM, PÄIVI;
VOUTILAINEN, MERJA;
PERÄNEN, JOHAN;
TUOMINEN, RAIMO;
AIRAVAARA, MIKKO;
LEPPÄNEN, VELI-MATTI;
LINDAHL, MARIA y
ANDRESSOO, JAAN-OLLE

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

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

Factor neurotrófico MANF y usos del mismo

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al campo del tratamiento de trastornos neuronales y más particularmente a factores de crecimiento para células neurales, especialmente para neuronas dopaminérgicas en el SNC (sistema nervioso central) y a genes de factores de crecimiento. La presente invención también se refiere a los campos de vectores de administración génica y de terapia génica.

Antecedentes de la invención

El factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF) se ha descrito como factor de supervivencia para neuronas dopaminérgicas *in vitro* (Petrova *et al.*, 2003; documento WO 01/19851; y documento WO 02/074956), pero se sabe poco de su expresión en tejidos de mamífero. Recientemente se caracterizó una proteína homóloga, el factor neurotrófico dopaminérgico conservado (CDNF), que protege y rescata neuronas dopaminérgicas *in vivo* (Lindholm *et al.*, 2007; documento WO 2007/068784; y documento WO 2007/068803). Las proteínas MANF y CDNF forman una familia evolutivamente conservada novedosa de factores neurotróficos.

Los factores neurotróficos son proteínas secretadas que fomentan la supervivencia neuronal y potencian la formación y el mantenimiento de conexiones neuronales en el sistema nervioso de vertebrados (Huang y Reichardt, 2001; Airaksinen y Saarma, 2002). El papel de los factores neurotróficos está bien caracterizado, principalmente en el sistema nervioso periférico (SNP). En los últimos años, también se ha acumulado una cantidad sustancial de conocimiento sobre la implicación de factores de crecimiento en la regulación del desarrollo y mantenimiento de poblaciones neuronales en el sistema nervioso central (SNC).

Los síntomas motores característicos de la enfermedad de Parkinson (EP) resultan de la degeneración gradual de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Varios factores de crecimiento pueden actuar como factores de supervivencia para neuronas dopaminérgicas (Krieglstein, 2004; Bespalov y Saarma, 2007), pero todavía se desconocen sus papeles en el desarrollo y mantenimiento de estas neuronas *in vivo*. El factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía (GDNF; Lin *et al.*, 1993) protege e incluso repara el sistema dopaminérgico en modelos de roedores y primates de EP (Hoffer *et al.*, 1994; Sauer *et al.*, 1995; Kearns y Gash, 1995; Tomac *et al.*, 1995; Gash *et al.*, 1996; Grondin *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados de ensayos clínicos con GDNF en pacientes con Parkinson han sido controvertidos, ya que se ha notificado o bien mejora clínica (Gill *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2005) o bien baja eficacia clínica (Lang *et al.*, 2006). Por tanto, está sumamente justificada la identificación y caracterización de nuevos factores que puedan ser neuroprotectores y soporten la neurorrestauración funcional.

Los ataques isquémicos y epilépticos, que están asociados con muerte neuronal, desencadenan cambios en la expresión de varios factores neurotróficos en el cerebro tales como la familia de GDNF (Kokaia *et al.*, 1999; Arvidsson *et al.*, 2001) y las neurotrofinas, por ejemplo, BDNF (Ernfors *et al.*, 1991; Lindvall *et al.*, 1992). Los cambios en los niveles de factores neurotróficos tras ataques cerebrales pueden regular la supervivencia celular, plasticidad sináptica, epileptogénesis y neurogénesis a partir de células madre neurales endógenas (Binder *et al.*, 2001; Gustafsson *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2003; Kuipers y Bramham, 2006; Schäbitz *et al.*, 2007). Por tanto, la modulación de niveles de factores neurotróficos puede ser de valor terapéutico en estados isquémicos y epilépticos.

Hace algunos años se describió un factor neurotrófico novedoso, el factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF; también conocido como rico en arginina, mutado, en tumores en estadio temprano; ARMET) como factor promotor de la supervivencia para neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo embrionario *in vitro* (Petrova *et al.*, 2003). El efecto promotor de la supervivencia observado de MANF era específico para neuronas dopaminérgicas, y no se detectaron efectos sobre neuronas serotoninérgicas o gabaérgicas (Petrova *et al.*, 2003). El presente grupo caracterizó recientemente un parálogo de MANF específico de vertebrados, denominado factor neurotrófico dopaminérgico conservado (CDNF). CDNF (similar a ARMET 1) protege y rescata neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo *in vivo* en un modelo de 6-OHDA de rata de enfermedad de Parkinson (Lindholm *et al.*, 2007). Las proteínas MANF y CDNF forman una nueva familia de factores evolutivamente conservados (Lindholm *et al.*, 2007). De manera importante, los efectos de MANF y CDNF sobre neuronas dopaminérgicas sugieren que estos factores pueden usarse en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos (Petrova *et al.*, 2003, Lindholm *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía faltan datos *in vivo* de MANF. Además, debe observarse que, basándose en secuencias de EST y genómicas de MANF, se concluyó que, al contrario que la secuencia notificada por Petrova *et al.* (2003), el documento WO 01/19851 y el documento WO 02/074956, el aminoácido 176 de MANF humano es arginina (R) en vez de prolina (P). A la luz de esto, parece que algunos de los trabajos anteriores relacionados con MANF se realizaron con un polipéptido de MANF que tiene una sustitución de aminoácido en la posición 176, y por tanto los resultados de estos experimentos no son relevantes para la presente invención (véase también el ejemplo 9).

El documento WO 2005/005471 da a conocer proteínas DG153 y DG177 secretadas por el páncreas en desarrollo y

se refiere al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades pancreáticas tales como diabetes y síndrome metabólico mediante el uso de la proteína DG153 o DG177. La secuencia de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2005/005471 que da a conocer la secuencia de aminoácidos de la proteína DG153 tiene una homología del 100% con secuencia de aminoácidos de MANF de SEQ ID NO: 2 en la presente solicitud.

El documento WO 02/079246 describe polipéptidos y composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer. La secuencia de SEQ ID NO: 13 del documento WO 02/079246 es idéntica a la secuencia de aminoácidos de MANF de SEQ ID NO: 2 en la presente solicitud. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 14 del documento WO 02/079246 es idéntica a la secuencia de aminoácidos de MANF de SEQ ID NO: 4 en la presente solicitud.

Chiocco *et al.* (Parkinsonism & related disorders, 2007, 13:321-328) y Zhou *et al.* (Neuroreport, 2006, 17:293-297) describen que puede usarse un polipéptido de MANF para el tratamiento de trastornos neurológicos tales como enfermedad de Parkinson, sin embargo, los artículos no dan a conocer ninguna secuencia de aminoácidos para el polipéptido de MANF.

El documento WO 2004/087874 da a conocer polipéptidos aislados novedosos, polinucleótidos aislados novedosos que codifican para los polipéptidos, y vectores virales para terapia génica que comprenden los polinucleótidos. La secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 195 en el documento WO 2004/087874 comprende la secuencia de ácido nucleico de MANF de SEQ ID NO: dada a conocer en la presente solicitud.

En esta invención, se caracteriza la distribución de proteína y ARNm de *Manf* en el cerebro en desarrollo y adulto y en tejidos no neuronales. También se descubrió el efecto de MANF en estados patológicos, tales como enfermedad de Parkinson, estado epiléptico e isquemia prosencefálica global (es decir accidente cerebrovascular).

Sumario de la invención

La invención se describe mediante las reivindicaciones.

Se describe una proteína factor neurotrófico, MANF, y una secuencia genética que codifica para la misma. Las moléculas de MANF, es decir los ácidos nucleicos de MANF y polipéptidos de MANF, serán útiles en el desarrollo de una variedad de productos terapéuticos y productos de diagnóstico útiles en el tratamiento, la profilaxis y/o el diagnóstico de estados dependientes de MANF. Las moléculas de MANF también son efectores útiles de neuronas primarias y centrales.

El polipéptido de MANF aislado o recombinante puede estar glicosilado de manera natural o puede comprender un patrón de glicosilación alterado dependiendo de las células a partir de las cuales se aísla o se sintetiza. Por ejemplo, si se produce por medios recombinantes en organismos procariotas, la molécula no estará glicosilada. La molécula puede ser una forma que se produce de manera natural, de longitud completa, o puede ser una forma truncada o derivatizada de otro modo. Polipéptidos de MANF particularmente importantes son el MANF humano de longitud completa con un péptido señal que tiene la longitud total de 179 aminoácidos y el MANF humano maduro sin el péptido señal que tiene la longitud total de 158 aminoácidos.

También se dan a conocer composiciones farmacéuticas de polipéptido de MANF opcionalmente formuladas. Las composiciones de polipéptido pueden comprender además un portador aceptable, tal como un portador hidrófilo, por ejemplo, farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son útiles en el tratamiento de estados dependientes de MANF.

También se describen un kit y reactivos para el diagnóstico de un trastorno dependiente de MANF en un mamífero. El kit comprende un reactivo que detecta la presencia o ausencia de una mutación en la secuencia de ácido nucleico que codifica para MANF, niveles elevados o disminuidos de polipéptido de MANF y/o anticuerpo frente a MANF. La presencia de la mutación o niveles anómalos de MANF es una indicación de que el mamífero padece el trastorno dependiente de MANF. El kit comprende además un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.

Además de lo anterior, se describen moléculas de ácido nucleico aisladas, vectores de expresión y células huésped que codifican para MANF que pueden usarse en la producción recombinante de MANF tal como se describe en el presente documento. Las moléculas de ácido nucleico aisladas y los vectores también son útiles para preparar animales transgénicos y para aplicaciones de terapia génica para tratar a pacientes con defectos relacionados con MANF.

Las moléculas de MANF serán útiles en el desarrollo de una variedad de aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico solas o en combinación con otras moléculas tales como CDNF o GDNF. Por tanto, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula de MANF o partes, fragmentos, derivados, homólogos o análogos de la misma junto con uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Además, se describen vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 1 o que tienen al menos aproximadamente el 15%, de manera más preferible aproximadamente el 40%, de manera incluso más

preferible aproximadamente el 60-79% o de manera incluso todavía más preferible aproximadamente el 80-95% de similitud con la misma y células huésped que comprenden los mismos. El ácido nucleico de MANF que codifica para el polipéptido de MANF maduro sin un péptido señal puede combinarse con un ácido nucleico que codifica para otro péptido señal para proporcionar un polipéptido de MANF de longitud completa con un péptido señal diferente del péptido señal de MANF nativo.

También se describe un animal no humano transgénico que tiene un gen de MANF alterado o un animal no humano transgénico que expresa un polinucleótido exógeno que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o un complemento de dicho polinucleótido.

Aunque en la práctica o las pruebas de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización y purificación de proteína MANF. *A*, Alineación de secuencias de aminoácidos de MANF y CDNF de organismos seleccionados. Se incluyen en recuadro ocho residuos de cisteína conservados con separación similar. El sitio de escisión de la secuencia señal determinado experimentalmente en MANF humano se indica mediante una flecha. Hs, *Homo sapiens;* Mm, *Mus musculus*; Xl, *Xenopus laevis*; Dr, *Danio rerio*; Ce, *Caenorhabditis elegans. B,* Ilustraciones esquemáticas de proteína MANF humana. Pre indica la secuencia señal. Se muestran cisteínas mediante barras negras, y se muestran números relativos de aminoácidos. *C*, Inmunotransferencia de tipo Western que muestra la secreción de proteína MANF humana nativa (masa molar calculada de 18 kDa) a partir de células HEK 293T transfectadas transitoriamente. Se aplicaron lisado celular (C) y medio de cultivo (M) sobre el 15% de SDS-PAGE, se sometieron a inmunotransferencia y se analizaron con anticuerpos frente a MANF. Se analizaron células transfectadas con ADNc de EGFP como control. *D*, Proteína MANF humana recombinante producida en *E. coli.* Se aplicó proteína sobre el 15% de SDS-PAGE y se tiñó con tinción de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, MANF purificado (2 μg). *E*, Proteína MANF humana recombinante con etiquetas de V5 y de His (masa molar calculada de 22 kDa) producida en células Sf9. Carril 1, marcador de peso molecular, carril 2, proteína MANF purificada (5 μg).

Figura 2. Expresión de proteína y ARNm de *Manf* en tejidos cerebrales y no neuronales. *A,* Análisis mediante transferencia de tipo Northern de la expresión de ARNm de *Manf* en tejidos de ratón adulto. Se detectó un único transcrito (tamaño aproximado de 1,1 kb). *B,* Análisis mediante RT-PCR de la expresión de ARNm de *Manf* en cerebro de ratón en desarrollo y en tejidos no neuronales de ratón adulto. *C*, Análisis mediante RT-PCR de transcritos de *Manf* en regiones de cerebro de ratón adulto; *D,* en mesencéfalo embrionario y posnatal de ratón. *E*, Análisis mediante RT-PCR de expresión de ARNm de *Manf* humano en regiones de cerebro adulto; *F*, en tejidos no neuronales adultos. *G*, Análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western de proteína MANF en tejidos de ratón adulto. Volvió a analizarse con sonda la inmunotransferencia con anticuerpos frente a actina. *H*, Los anticuerpos frente a MANF reconocen específicamente la proteína MANF mediante inmunotransferencia de tipo Western. Panel 1: anticuerpos frente a MANF incubados previamente con proteína MANF. Sólo se detectó una señal de MANF débil (una flecha) en los extractos de hígado y de testículos de ratón adulto. Panel 2: anticuerpos frente a MANF incubados previamente con proteína CDNF. MANF es claramente visible en los extractos de hígado y de testículos. E, día embrionario; P, día posnatal; M, marcador de peso molecular de ADN de 100 pb. Las muestras en *B-F* contienen niveles iguales de transcritos de *PPIA* o de *GAPDH*.

Figura 3. Análisis mediante hibridación *in situ* de la expresión de ARNm de *Manf* en el cerebro de ratón adulto (*A-I*), posnatal P10 (*J-L*) y posnatal P1 (*M-O*). *A-M,* Autorradiografías de campo oscuro de secciones coronales hibridadas con sonda de ARNc de *Manf* marcada con ^{35}S. *N*, Autorradiografía de campo claro que muestra granos de color plata de *Manf* en la corteza cerebral de cerebro de ratón P1. *O*, Sección paralela para (N) hibridada con sonda de ARNc sentido de control marcada con ^{35}S. Am, amígdala; AON, núcleo olfatorio anterior; BSTM, núcleo del lecho de la estría terminal; CA1 y CA3; capas piramidales en el hipocampo, CPu, putamen caudado; CTX, corteza cerebral; ChP, plexo coroideo; DG, circunvolución dentada; DM, núcleos hipotalámicos dorsomediales; Gr, capa granular; GrO, capa granular del bulbo olfatorio; Hc, hipocampo; Mi, capa de células mitrales del bulbo olfatorio; MM, núcleo mamilar medial; MPA, área preóptica medial; MPO, núcleo preóptico medial; MS, núcleo septal medial; MVe, núcleo vestibular medial; Pir, corteza piriforme; Pkj, capa de células de Purkinje de cerebelo; PVA, núcleos talámicos paraventriculares, anteriores; SN, sustancia negra; Th, tálamo; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial; 7N, núcleo facial. En (*A-G*), se muestran las distancias desde el bregma (mm). Barra de escala de 1 mm en (*A-M*); 50 μm en (*N-O*).

Figura 4. Localización celular de ARNm de *Manf* en el cerebro de ratón adulto mostrado en microfotografías de hibridación *in situ* de campo claro. *A*, Señal de *Manf* en la capa de células mitrales del bulbo olfatorio (Mi); B, capa IV de corteza cerebral (CTX). *C*, Sección hibridada con sonda de ARNc sentido de control marcada con ^{35}S. Se muestran células de la corteza cerebral como en (*B*). *D,* Señal de *Manf* en la corteza piriforme (Pir); *E*, putamen caudado (cuerpo estriado dorsal; CPu), *F*, núcleo talámico paraventricular (PVA), *G*, capa polimórfica de la circunvolución dentada (PoDG); *H,* capa CA1 del hipocampo; *I*, capa CA3 del hipocampo; *J*, región compacta de

sustancia negra (SNc); *K,* locus cerúleo (LC); *L,* núcleo reticular pontino, parte caudal (PnC). Barra de escala de 50 μm.

Figura 5. Localización inmunohistoquímica de proteína MANF en el cerebro y tejidos no neuronales de ratón adulto. Se visualizó anticuerpo frente a MANF con reacción con peroxidasa dando como resultado color marrón. Se contratiñeron secciones de cerebro con violeta de cresilo. *A*, Imagen de bajo aumento de la corteza retrosplenial (RSCTX). Se detectaron células positivas para MANF en las capas II-VI. *B, C,* Los anticuerpos frente a MANF reconocen específicamente la proteína MANF en inmunohistoquímica. *B*, Proteína MANF en la corteza cerebral (CTX; capa III). *C*, Los anticuerpos frente a MANF incubados previamente con proteína MANF no se unieron a células corticales. *D*, Marcaje de MANF en la región CA3 del hipocampo; *E*, capa polimórfica de circunvolución dentada (PoDG); *F*, putamen caudado (cuerpo estriado; CPu); y *G*, porción reticular de la sustancia negra (SNr). *H*, Imagen de bajo aumento que muestra la tinción de MANF en la sustancia negra. Parte compacta de la sustancia negra (SNc). *I*, Proteína MANF en las células de Purkinje del cerebelo (Pkj); *J*, médula espinal (SpC); *K,* plexo coroideo (*ChP*); *L,* glándula salival (SG). *M,* Microfotografía de campo oscuro que muestra la expresión de ARNm de *Manf* en túbulos seminíferos (ST) mediante hibridación *in situ*. *N,* Proteína MANF en túbulos seminíferos. *B,* C, y F criosecciones; *A, D, E, G* y *H-N,* secciones de parafina. Barra de escala de 100 μm en (*A-G*) e (*I-N*); 200 μm en (*H*).

Figura 6. Localización inmunohistoquímica de proteína MANF en cerebro de ratón en el día posnatal 1 (P1; *A-G*) y P10 (*H-N*). *A,* Se detectó una fuerte señal de MANF en la capa de células mitrales (Mi) del bulbo olfatorio (Olf). *B,* Marcaje de MANF en el putamen caudado (CPu); *C, D,* hipocampo (Hc); *E*, tálamo (Th); *F*, corteza cerebral (CTX); *G*, sustancia negra (SN) de cerebro de ratón P1. *H*, Marcaje de MANF en el hipocampo de cerebro de ratón P10. *I*, Señal de MANF en células de la región CA3 del hipocampo (CA3); *J,* tálamo; *K,* putamen caudado; *L,* sustancia negra de cerebro de ratón P10. *M, N,* Señal de inmunofluorescencia de MANF (*M*; verde) localizada conjuntamente con marcador neuronal NeuN (*N*, rojo) en las células de la corteza cerebral. Barra de escala de 500 μm en (*A-C*, *H*); 50 μm en (*D-G* e *I-N*).

Figura 7. Análisis mediante hibridación *in situ* de la expresión de ARNm de *Manf* en ratón embrionario a E12,5 (A-E) y E17 (*F*). *A,* Autorradiografía de emulsión de campo oscuro de una sección sagital de ratón embrionario E12,5. *B,* Imagen de campo claro correspondiente para (*A*) con estructuras anatómicas indicadas. *C*, Microfotografía de campo oscuro que muestra una señal de *Manf* en la parte superior de la corteza neopalial. *D,* Microfotografía de campo claro que muestra una señal de *Manf* en el plexo coroideo; y, *E*, cartílago primario de vertebras. *F*, Señal de Manf en glándula salival de ratón embrionario E17. Ca, cartílago primario de vertebras; ChP, plexo coroideo; DRG, ganglio de la raíz dorsal; Li, hígado; Mb/Po, unión mesencéfalo/puente troncoencefálico; NCTX, corteza neopalial; Str, cuerpo estriado, TG, ganglio trigémino, Uv, vasos umbilicales. Barra de escala de 1 mm en (*A, B*), 50 μm en (*C-F*).

Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de MANF en tejidos de ratón de día embrionario 14 (E14; *A-D*); E16 (*E-G*) o E17 (*H-O*). *A,* Señal de MANF en la corteza neopalial (NCTX; corteza cerebral futura); B, cuerpo estriado (eminencia ganglionar; GE); *C*, surco medio (MS); *D,* plexo coroideo (ChP). *E, F,* Tinción de MANF en sustancia negra en desarrollo (SN) en el mesencéfalo (MB). *G*, Tinción de tirosina hidroxilasa (TH) en una sección paralela de (F). *H*, Proteína MANF en el ganglio de la raíz dorsal (DRG); I, ganglio trigémino (TG); *J,* ganglio cervical superior (SCG); *K*, médula espinal (SpC); *L,* glándula salival; *M,* túbulos de glándulas serosas ubicadas en la cavidad nasal; *N,* páncreas; *O*, células en órgano vomeronasal. *A-G,* secciones de cerebro coronales; *H-M*, *O*, secciones de cabeza transversales; *N,* sección sagital de embrión completo. Barra de escala de 50 μm en *A- E*, *H-N*; 100 μm en *F, G;* 20 μm en *O*.

Figura 9. *A-E,* Niveles de ARNm de *Manf* en la capa de células granulares de la circunvolución dentada (*A*), núcleo reticular talámico (*B*), y cortezas parietal (*C*), piriforme (*D*) y retrosplenial (*E*) en diferentes puntos de tiempo tras estado epiléptico, medidos mediante análisis de imágenes informático de películas de rayos X. Los datos se expresan como medias ± E.E.M. *P<0,05 en comparación con control, ANOVA de un factor seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett. *F-I,* Fotomicrografías de campo claro de granos autorradiográficos sobre células teñidas con violeta de cresilo, que ilustran células granulares dentadas (*F* y *G*) y neuronas en la corteza piriforme (*H* e *I*) que expresan ARNm de *Manf* en condiciones de control (F y H) y a las 2 h (G) o 24 h (I) tras estado epiléptico (SE).

Figura 10. *A-C,* Niveles de ARNm de *Manf* en la capa de células granulares de la circunvolución dentada (*A*), capa de células piramidales CA1 (*B*) e hilo dentado (*C*) en diferentes momentos de reperfusión tras 10 min de isquemia prosencefálica global, medido mediante análisis de imágenes informático de películas de rayos X. Los datos se expresan como medias ± E.E.M. *P<0,05 en comparación con control, ANOVA de un factor seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Dunnett. (*D*, *E*) Fotomicrografías de campo claro de autorradiogramas que muestran el patrón de expresión génica de *Manf* en la formación de hipocampo en condiciones de control (*D*) y tras 10 min de isquemia prosencefálica global seguido por 24 h de reperfusión (*E*). DG, circunvolución dentada.

Figura 11. Plan experimental para un modelo experimental de enfermedad de Parkinson.

Figura 12. Estudios de respuesta a la dosis de MANF. A. Comportamiento de giro ipsilateral; B. Comportamiento de giro 2 semanas tras la lesión; C. Comportamiento de giro 4 semanas tras la lesión.

Figura 13. Estudios de respuesta a la dosis de MANF. A. Células positivas para TH 4 semanas tras la lesión; B. Densidad óptica en cuerpo estriado 4 semanas tras la lesión.

Figura 14. El efecto de infusión de MANF crónica.

Figura 15. El efecto de infusión de MANF crónica. A. Comportamiento de giro ipsilateral; B. Comportamiento de giro ipsilateral.

Figura 16. El efecto de infusión de MANF crónica. A. Infusiones crónicas de MANF, densidad óptica en cuerpo estriado; B. Células positivas para TH en SN 12 semanas tras la lesión.

Figura 17. Inmunohistoquímica de MANF y GDNF.

Figura 18. Estudios de difusión; tinción con anticuerpos anti-MANF 24 h tras MANF intraestrial.

Figura 19. Experimentos de transporte. Autorradiografía.

Figura 20. A. Radiactividad tras inyección de ^{125}I-MANF intraestrial; B. Radiactividad en cuerpo estriado.

Figura 21. A. Radiactividad en la corteza; B. Radiactividad en la corteza frontal.

Figura 22. Diagrama esquemático de los sitios de inyección y ligación.

Figura 23. Efecto de administración de MANF cortical local sobre el volumen de infarto. A: El volumen de infarto se redujo significativamente en ratas tratadas con MANF (P=0,032 para efecto del tratamiento, ANOVA de un factor). El volumen de infarto se mide a partir de los cuatro primeros cortes de cerebro comenzando desde la parte rostral del cerebro; n =15 con PBS; n=6 con 6 μg de MANF; n=8 con 12 μg de MANF, n=5 con 24 μg de MANF. B: En la columna derecha se muestran los efectos de PBS y 6 μg de MANF sobre el área de infarto por corte. El área de infarto se redujo significativamente en ratas tratadas con 6 μg de MANF en comparación con tratamiento con PBS (P=0,002 para efecto del tratamiento, ANOVA de dos factores).

Figura 24. Efecto de administración de MANF cortical local sobre el área de infarto máxima. El área de infarto se redujo significativamente en ratas tratadas con MANF (P=0,0035 para efecto del tratamiento, análisis de la varianza sobre los rangos de un factor de Kurskal-Wallis).

Figura 25. El tratamiento previo con MANF reduce el infarto cortical inducido por ligación de MCA y reperfusión. A, a la izquierda, rata tratada con PBS. B, a la derecha, rata tratada con 6 μg de MANF.

Figura 26. Efecto de MANF cortical local (2 μg/μl) sobre la actividad de TUNEL cortical. A: muestra los promedios de núcleos positivos para TUNEL contados a nivel de + 2,2 mm desde el bregma B: muestra los promedios de núcleos positivos para TUNEL contados a niveles de - 0,2 - 0,2 mm desde el bregma (n=3, P=0,0449, prueba de la t de Student). Las fotomicrografías por encima de los gráficos de barras muestran el nivel representativo de secciones contadas. C: Fotomicrografía del área cortical de una rata tratada con PBS. D: Fotomicrografía del área cortical de una rata tratada con MANF. Se contaron seis secciones de cada rata.

Figura 27. Un diagrama de cintas esquemático de la estructura de MANF. Los extremos N y C-terminales están marcados. Los puentes disulfuro están resaltados en amarillo y numerados 1-4 del extremo N al C-terminal.

Figura 28. Unión de MANF a lípidos seleccionados y sus combinaciones medida mediante fluorescencia de triptófano. KOdiAPC, 1-(palmitoil)-2-(5-ceto-6-octeno-dioil)fosfatidilcolina; PC, fosfocolina; PE, fosfoetanolamina; PGPC, 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina; POVPC, 1-palmitoil-2-(5'-oxo-valeroil)-sn-glicero-3-fosfocolina; SW, esfingomielina.

Figura 29. CDNF marcado con ^{125}I (1) se une con alta afinidad a neuronas del hipocampo y corticales y esta unión se desplaza por un exceso molar de 200 veces de CDNF sin marcar (2), pero no por un exceso molar de 200 veces de MANF sin marcar (3).

Figura 30. Número de células positivas para TH en DIV 5. El n.º promedio de células positivas para TH en pocillos tratados con GDNF se fija como el 100%. Datos apilados de 3 experimentos independientes, p<0,000001 para GDNF (prueba de la t de Student homosedástica de dos factores), n.º total de neuronas positivas para TH analizadas por concentración de factor neurotrófico de 8000-16.000, las barras de error indican la DE. MANF no tenía ningún efecto promotor de la supervivencia estadísticamente significativo en neuronas positivas para TH a

todas las concentraciones investigadas.

Figura 31. Intensidad de fluorescencia de TH en DIV 5.

Intensidad de inmunofluorescencia de TH relativa tal como se mide a partir de todos los microislotes de los 3 experimentos anteriores. La intensidad promedio de células positivas para TH en pocillos tratados con GDNF se fija como el 100%. p<0,000001 para GDNF (prueba de la t de Student homosedástica de dos factores), las barras de error indican la DE. MANF no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo en los niveles de TH relativos a todas las concentraciones investigadas.

Descripción detallada de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

Se usó hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para caracterizar la expresión de MANF en ratón en desarrollo y adulto. La expresión de MANF era generalizada en el sistema nervioso y los tejidos no neuronales. En el cerebro, se detectaron niveles relativamente altos de proteína y ARNm de *Manf* en la corteza cerebral, el hipocampo y las células de Purkinje cerebelosas. Tras estado epiléptico, la expresión de ARNm de *Manf* aumentó de manera transitoria en la capa de células granulares dentadas, el hipocampo, el núcleo reticular talámico y en diversas zonas corticales. En cambio, tras isquemia prosencefálica global, los cambios en la expresión de *Manf* fueron generalizados en la formación de hipocampo y más restringidos en la corteza cerebral. La expresión generalizada de MANF junto con su naturaleza evolutivamente conservada y regulación por ataques cerebrales sugiere que tiene funciones importantes tanto en estados normales como patológicos en muchos tipos de tejidos.

También se mostró que MANF tiene un efecto neuroprotector en modelos de rata de EP y accidente cerebrovascular.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes definiciones se presentan por motivos de claridad.

“Aislado”, cuando se refiere a una molécula, se refiere a una molécula que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural y por tanto está alterada “por la acción del ser humano” con respecto a su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado puede ser parte de un vector o una composición de materia, o puede estar contenido dentro de una célula, y todavía estar “aislado” porque ese vector, esa composición de materia, o esa célula particular no es el entorno original del polinucleótido. El término “aislado” no se refiere a bibliotecas genómicas o de ADNc, preparaciones de ARNm o totales de células completas, preparaciones de ADN genómico (incluyendo las separadas mediante electroforesis y transferidas sobre transferencias), preparaciones de ADN genómico de células completas sometidas a cizalla u otras composiciones en las que la técnica no demuestra características distintivas de las secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, un “polinucleótido” se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para SEQ ID NO: 1 o un fragmento o variante de la misma, una secuencia de ácido nucleico contenida en SEQ ID NO: 3 o el complemento de la misma. Por ejemplo, el polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de longitud completa, incluyendo las secuencias no traducidas en 5’ y 3’, la región codificante, así como fragmentos, epítopos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. Además, tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido” se refiere a una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido tal como se describe en el presente documento tal como se define de manera amplia. Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” tal como se aplica a un ácido nucleico, puede tener habitualmente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, normalmente, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más normalmente, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente al menos de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos de aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, aún incluso más preferiblemente al menos de aproximadamente 300 a aproximadamente 400, y lo más preferiblemente, el fragmento de ácido nucleico tendrá más de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento” tal como se aplica a un polipéptido, puede tener habitualmente al menos aproximadamente siete aminoácidos contiguos, normalmente, al menos aproximadamente quince aminoácidos contiguos, más normalmente, al menos aproximadamente treinta aminoácidos contiguos, normalmente al menos aproximadamente cuarenta aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente cincuenta aminoácidos, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente sesenta aminoácidos y lo más preferiblemente, el fragmento peptídico tendrá más de aproximadamente setenta aminoácidos contiguos de longitud.

“Molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de ADN (por ejemplo ADNc o ADN genómico), moléculas de ARN

(por ejemplo, ARNm), análogos del ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente comprende ADN de cadena doble.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico aislado está libre de secuencias que flanquean de manera natural al ácido nucleico (es decir secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3'-terminales del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo a partir del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, moléculas de ADN de MANF aisladas pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de manera natural a la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula/tejido a partir del cual se deriva el ácido nucleico (por ejemplo, cerebro, corazón, hígado, bazo, etc.). Además, una molécula de ácido nucleico aislada, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de MANF, o un complemento de esta secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente, puede aislarse usando técnicas de biología molecular convencionales y la información de secuencia proporcionada. Usando la totalidad o una parte de una secuencia de ácido nucleico de MANF de interés como sonda de hibridación, pueden aislarse moléculas de MANF usando técnicas de hibridación y clonación convencionales (Ausubel *et al*, En Current protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, editores, 1989); Sambrook *et al*, citado anteriormente).

"Análogos" son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idéntica, al compuesto nativo pero se diferencian del mismo con respecto a determinados componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o de un origen evolutivamente diferente y pueden tener una actividad metabólica similar u opuesta en comparación con el tipo natural.

Los derivados y análogos pueden ser de longitud completa o de longitud distinta a la completa, si el derivado o análogo contiene un ácido nucleico o aminoácido modificado, tal como se describe a continuación. Los derivados o análogos de los ácidos nucleicos o las proteínas tal como se describen en el presente documento incluyen moléculas que comprende regiones que son sustancialmente homólogas a los ácidos nucleicos o las proteínas tal como se describen en el presente documento con una identidad de al menos aproximadamente el 70%, el 80% o el 95% (con una identidad preferida del 80-95%) a lo largo de una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de tamaño idéntico o en comparación con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza mediante un programa informático de homología conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico codificante puede hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica para las proteínas mencionadas anteriormente en condiciones rigurosas, de rigurosidad moderada o de baja rigurosidad (Ausubel *et al.*, citado anteriormente).

"Codificante" se refiere a la propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen o bien una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o bien una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de la misma. Por tanto, un gen codifica para una proteína si la transcripción y traducción de ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Puede hacerse referencia tanto a la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona habitualmente en listas de secuencias, como a la cadena no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, como que codifican para la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas y ARN pueden incluir intrones.

Una "región codificante" de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente, a la región codificante de una molécula de ARNm que se produce mediante transcripción del gen.

Una "región codificante" de una molécula de ARNm también consiste en los residuos de nucleótidos de la molécula de ARNm que se aparean con una región de anticodón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifican para un codón de terminación. Por tanto, la región codificante puede incluir residuos de nucleótidos correspondientes a residuos de aminoácido que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (por ejemplo, residuos de aminoácido en una secuencia señal de exportación de proteína).

Las "secuencias de control" son secuencias de ADN que permiten la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control procariotas incluyen

promotores, secuencias de operador y sitios de unión al ribosoma. Las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El “ácido nucleico operativamente unido” está operativamente unido cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, según la práctica convencional se usan ligadores o adaptadores oligonucleotídicos sintéticos.

Un “ADN genómico” es una cadena de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a un gen. A modo de ejemplo, tanto un fragmento de un cromosoma como un ADNc derivado mediante transcripción inversa de un ARNm de mamífero son ADN genómicos.

“Oligonucleótido” comprende una serie de residuos de nucleótidos unidos, oligonucleótido que tiene un número suficiente de bases de nucleótidos para usarse en una reacción PCR u otra aplicación. Una secuencia de oligonucleótido corto puede basarse en, o diseñarse a partir de, una secuencia genómica o de ADNc y se usa para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos comprenden partes de un ácido nucleico.

“Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido tal como se describe en el presente documento, pero que conserva propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son en conjunto estrechamente similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido tal como se describe en el presente documento.

“Rigurosidad”. Pueden obtenerse homólogos (es decir, ácidos nucleicos que codifican para moléculas de MANF derivadas de especies distintas del ser humano) u otras secuencias relacionadas (por ejemplo, parálogos) mediante hibridación de rigurosidad baja, moderada o alta con la totalidad o una parte de la secuencia humana particular como sonda usando métodos bien conocidos en la técnica para la hibridación y clonación de ácido nucleico.

La especificidad del ADN de cadena sencilla para hibridarse con fragmentos complementarios se determina mediante la “rigurosidad” de las condiciones de reacción. La rigurosidad de hibridación aumenta a medida que disminuye la tendencia a formar dúplex de ADN. En reacciones de hibridación de ácido nucleico, la rigurosidad puede elegirse para favorecer hibridaciones específicas (alta rigurosidad), lo cual puede usarse para identificar, por ejemplo, clones de longitud completa a partir de una biblioteca. Pueden usarse hibridaciones menos específicas (baja rigurosidad) para identificar moléculas de ADN relacionadas, pero no exactas (homólogas, pero no idénticas) o segmentos.

Los dúplex de ADN se estabilizan mediante: (1) el número de pares de bases complementarios, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración de sal (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción, y (5) la presencia de determinados disolventes orgánicos, tales como formamida que reduce la estabilidad del dúplex de ADN. En general, cuanto más larga es la sonda, mayor es la temperatura requerida para una hibridación apropiada. Un enfoque común es variar la temperatura: temperaturas relativas superiores dan como resultado condiciones de reacción más rigurosas. (Ausubel *et al.*, citado anteriormente) proporcionan una excelente explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación.

Hibridar en “condiciones rigurosas” describe protocolos de hibridación en los que secuencias de nucleótidos homólogas en al menos el 60% unas con otras permanecen hibridadas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5ºC menores que el punto de fusión térmica (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica definida, documento WO 01/70174, PCT/US01/0904330. Las “condiciones de baja rigurosidad” usan disoluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas que aquellas para rigurosidad moderada (Sambrook, citado anteriormente), de tal manera que un polinucleótido se hibridará con la totalidad, fragmentos, derivados o análogos de una secuencia diana de MANF diana. Un ejemplo no limitativo de condiciones de hibridación de baja rigurosidad son hibridación en formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 mg/ml, sulfato de dextrano al 10% (p/v) a 40ºC, seguido por uno o más lavados en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% a 50ºC. Se describen otras condiciones de baja rigurosidad, tales como aquellas para hibridaciones entre especies, en (Ausubel *et al.*, citado anteriormente; Kriegler MP (1990) Gene transfer and expression; a laboratory manual; Shilo y Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792 (1981)).

Pueden usarse técnicas de amplificación por PCR para amplificar MANF usando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, como molde y cebadores oligonucleotídicos apropiados. Tales ácidos nucleicos pueden clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Además, pueden prepararse oligonucleótidos correspondientes a secuencias de MANF mediante técnicas de síntesis convencionales, por

ejemplo, un sintetizador de ADN automatizado.

"Cebador" se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con un molde de polinucleótido designado y proporcionar un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis se produce cuando el cebador polinucleotídico se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, un molde de polinucleótido complementario, y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador es normalmente de cadena sencilla, pero puede ser de cadena doble.

Los cebadores son normalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y que se producen de manera natural son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario al molde con el que está diseñado para hibridarse para servir como sitio para la iniciación de la síntesis, pero no es necesario que refleje la secuencia exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica del cebador con el molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse, por ejemplo, con restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

Mediante el término "vector" tal como se usa en el presente documento, quiere decirse cualquier plásmido o virus que codifica para un ácido nucleico exógeno. También debe interpretarse que el término incluye compuestos distintos de plásmido y no virales que facilitan la transferencia del ácido nucleico al interior de viriones o células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina. El vector puede ser un vector viral que es adecuado como vehículo de administración para la administración del ácido nucleico que codifica para la proteína deseada, o mutante del mismo, a una célula, o el vector puede ser un vector no viral que es adecuado para el mismo fin. En la técnica se conocen bien ejemplos de vectores virales y no virales para la administración de ADN a células y tejidos y se describen, por ejemplo, en Ma *et al.* (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12744-12746). Los ejemplos de vectores virales incluyen un vector de virus vaccinia recombinante, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un virus adenoasociado recombinante y un virus de la viruela aviar recombinante (Cranage *et al.*, 1986, EMBO J. 5,3057-3063; solicitud de patente internacional n.º WO 94/17810, publicada el 18 de agosto de 1994; solicitud de patente internacional n.º WO 94/23744, publicada el 27 de octubre de 1994). Los ejemplos de vectores no virales incluyen liposomas, y derivados de poliamina de ADN.

Las "sondas" son secuencias de ácido nucleico de longitud variable, preferiblemente entre al menos aproximadamente 10 nucleótidos (nt), 100 nt, o muchos (por ejemplo, 6000 nt) dependiendo del uso específico. Las sondas se usan para detectar secuencias de ácido nucleico idénticas, similares o complementarias. Pueden obtenerse sondas de mayor longitud a partir de una fuente natural o recombinante, son altamente específicas, y se hibridan de manera mucho más lenta que sondas oligoméricas de menor longitud. Las sondas pueden ser de cadena sencilla o doble y diseñarse para tener especificidad en PCR, tecnologías de hibridación basadas en membrana, o tecnologías de tipo ELISA. Las sondas también se hibridarán con moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, permitiendo así aplicaciones inmediatas en mapeo de cromosomas, análisis de enlaces, identificación y/o tipificación de tejidos, y una variedad de métodos forenses y de diagnóstico tal como se describe en el presente documento.

Las sondas son oligonucleótidos sustancialmente purificados que se hibridarán en condiciones rigurosas con una secuencia de al menos, de manera óptima, 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ó 400 nucleótidos de cadena sentido consecutivos; o una secuencia de nucleótidos de cadena antisentido; o un mutante que se produce de manera natural de la secuencia de ADN de MANF de interés.

El ADN de MANF de secuencia nativa de longitud completa o parcial puede usarse para "extraer" secuencias similares (homólogas) (Ausubel *et al.*, citado anteriormente; Sambrook, citado anteriormente), tales como: (1) longitud completa o fragmentos de ADNc de MANF a partir de una biblioteca de ADNc de cualquier especie (por ejemplo ser humano, murina, felina, canina, bacteriana, viral, retroviral, levadura), (2) de células o tejidos, (3) variantes dentro de una especie, y (4) homólogos y variantes de otra especie. Para encontrar secuencias relacionadas que pueden codificar para genes relacionados, puede diseñarse la sonda para que codifique para secuencias únicas o secuencias degeneradas. Las secuencias también pueden ser secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de secuencia de MANF nativa.

Para detectar hibridaciones, las sondas se marcan usando, por ejemplo, radionúclidos tales como ^{32}P o ^{35}S, o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada con la sonda mediante sistemas de avidina-biotina. Se usan sondas marcadas para detectar ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria a la de MANF en bibliotecas de ADNc, ADN genómico o ARNm de una especie deseada. Tales sondas pueden usarse como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células o tejidos que expresan de manera incorrecta un MANF, tal como mediante medición de un nivel de un MANF en una muestra de células de un sujeto, por ejemplo, detectando niveles de ARNm de *Manf* o determinando si un MANF genómico se ha mutado o delecionado.

"Antisentido" se refiere particularmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN de cadena doble que codifica para una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante. Tal como se define en el presente documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN de cadena doble que codifica para una proteína. No es

necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la parte codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica para una proteína, secuencias reguladoras que controlan la expresión de las secuencias codificantes.

"Homólogos" son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de un gen particular que se derivan de especies diferentes.

Una "secuencia de ácido nucleico homóloga" o "secuencia de aminoácidos homóloga", o variaciones de la misma, se refiere a secuencias caracterizadas por una homología a nivel de nucleótidos o a nivel de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos homólogas codifican para aquellas secuencias que codifican para isoformas de MANF. Las isoformas pueden expresarse en tejidos diferentes del mismo organismo como resultado, por ejemplo, de corte y empalme alternativo de ARN. Alternativamente, diferentes genes pueden codificar para isoformas. En la memoria descriptiva, las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para un MANF de especies distintas de seres humanos, incluyendo vertebrados, y por tanto pueden incluir, por ejemplo, rana, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo y otros organismos. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen variaciones alélicas y mutaciones que se producen de manera natural de las secuencias de nucleótidos expuestas en el presente documento. Sin embargo, una secuencia de nucleótidos homóloga no incluye la secuencia de nucleótidos exacta que codifica para un MANF humano. Las secuencias de ácido nucleico homólogas incluyen aquellas secuencias de ácido nucleico que codifican para sustituciones de aminoácidos conservativas en una secuencia de MANF de interés, así como un polipéptido que presenta actividad biológica de MANF.

La "identidad de secuencia de ácido nucleico en porcentaje (%)" con respecto a un MANF se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en ese MANF particular, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr la máxima identidad de secuencia en porcentaje.

La alineación, para fines de determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico en %, puede lograrse de diversas maneras que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible para el público tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) o ClustalX. Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr una alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que están comparándose.

Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con el programa XBLAST (denominado "blastn" el sitio web del NCBI) o el programa "blastp" del NCBI, usando los siguientes parámetros: valor de expectativa 10,0, matriz de puntuación BLOSUM 62, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento.

Para obtener alineaciones con huecos para fines de comparación, puede usarse Gapped BLAST tal como se describe en Altschul *et al.* (1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Alternativamente, puede usarse PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda con iteraciones que detecta relaciones distantes entre moléculas y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Cuando se usan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

El "marco de lectura abierto" (ORF) de un gen de MANF codifica para MANF. Un ORF es una secuencia de nucleótidos que tiene comúnmente un codón de iniciación (ATG) y termina comúnmente con uno de los tres codones de "terminación" (TAA, TAG o TGA). Sin embargo, un ORF puede ser cualquier parte de una secuencia codificante que puede comprender o no un codón de iniciación y un codón de terminación. Para lograr una secuencia única, los ORF de MANF preferibles codifican para al menos 50 aminoácidos.

"Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están unidas entre sí de manera natural. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede incluirse en un vector adecuado, y el vector puede usarse para transformar una célula huésped adecuada.

Un polinucleótido recombinante también puede servir para una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.).

Un "polipéptido recombinante" es uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

"Polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácido, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas, y análogos sintéticos que no se producen de manera natural de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas, y análogos sintéticos que no se producen de manera natural de los mismos. Pueden sintetizarse

polipéptidos sintéticos, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado.

Por polipéptido de “etiqueta” quiere decirse cualquier proteína que, cuando se une mediante un enlace peptídico a una proteína de interés, puede usarse para localizar la proteína, para purificarla a partir de un extracto celular, para inmovilizarla para su uso en ensayos de unión, o para estudiar de otro modo sus propiedades y/o función biológicas. Una proteína quimérica (es decir, de fusión) que contiene un epítopo de “etiqueta” puede inmovilizarse en una resina a la que se une la etiqueta. Tales epítopos de etiqueta y resinas que se unen específicamente a los mismos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, epítopos de etiqueta que comprenden una pluralidad de residuos de histidina secuenciales (His6), lo cual permite el aislamiento de una proteína quimérica que comprende un epítopo de este tipo en níquel-ácido nitrilotriacético-agarosa, un epítopo de etiqueta de hemaglutinina (HA) que permite que una proteína quimérica que comprende tal epítopo se una a una matriz de afinidad de anticuerpo monoclonal anti-HA, un epítopo de etiqueta myc que permite que una proteína quimérica que comprende tal epítopo se una a una matriz de afinidad de anticuerpo monoclonal anti-myc, un epítopo de etiqueta de glutatión-S-transferasa, y un epítopo de etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP), que puede inducir unión entre una proteína que comprende tal epítopo y una columna de glutatión o maltosa-Sepharose, respectivamente. La producción de proteínas que comprenden tales epítopos de etiqueta se conoce bien en la técnica y se describe en tratados convencionales tales como Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Asimismo, anticuerpos frente al epítopo de etiqueta permiten la detección y localización de la proteína de fusión, por ejemplo, en inmunotransferencias de tipo Western, ensayos ELISA e inmunotinción de células.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas de cadena sencilla, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab’) y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, al contrario que preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo de obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567 (Cabilly *et al.*)). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al*, Nature 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, citado anteriormente; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab’, F(ab’) u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se sustituyen residuos de la región de entramado de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que se no encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de región de entramado o CDR importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, Nature, 332:323-329 (1988); y

Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo primatizado en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; pro-relaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento de hepatocitos; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores neurotróficos o factores de crecimiento nerviosos tales como NGF, NT-3, NT4, NT-6, BDNF, CNTF, GDNF, artemina, neurturina, persefina, AL-1 y otros ligandos de la familia del receptor eph; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes natural o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de citocinas de secuencia nativa. También se incluyen moléculas modificadas por ingeniería genética que regulan la actividad citocina tales como TrkA-IgG u otras quimeras receptoras solubles.

“Mamífero”, para fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Portadores, excipientes o estabilizadores “fisiológicamente aceptables” son los que no son tóxicos para la célula o el mamífero que está exponiéndose a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el portador fisiológicamente aceptable es una disolución de pH tamponado acuosa. Los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronics o polietilenglicol (PEG).

“Un polipéptido que tiene actividad biológica” se refiere a un polipéptido que muestra actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido tal como se describe en el presente documento, incluyendo formas maduras, tal como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que existe dependencia de la dosis, no es necesario que sea idéntica a la del polipéptido, sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en una actividad dada en comparación con el polipéptido tal como se describe en el presente documento (es decir, el polipéptido candidato mostrará actividad superior o actividad no más de aproximadamente 25 veces inferior y, preferiblemente, no más de aproximadamente diez veces inferior, y lo más preferiblemente, actividad no más de aproximadamente tres veces inferior con respecto al polipéptido tal como se describe en el presente documento).

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como también aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

Debido a la degeneración del código genético, un experto habitual en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de las moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia idéntica en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% a la secuencia de ácido nucleico del ADNc contenido en SEQ ID NO: 1 o fragmentos del mismo, codificarán para polipéptidos “que tienen actividad funcional”. De hecho, debido a que todas las variantes degeneradas de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos codifican para el mismo polipéptido, en muchos casos, esto le quedará claro al experto en la técnica. Se reconocerá además en la técnica que, para tales moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable también codificará para un polipéptido que tiene actividad funcional. Esto se debe a que el experto en la técnica conoce sustituciones de aminoácidos que o bien es menos probable, o bien no es probable, que afecten significativamente a la función de la proteína (por ejemplo sustituyendo un aminoácido alifático por un segundo aminoácido alifático), tal como se describe adicionalmente a continuación.

Por ejemplo, se proporcionan directrices referentes a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente

silenciosas en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", Science 247:1306-1310 (1990), en el que los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

La primera estrategia aprovecha la tolerancia de sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso evolutivo. Comparando secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. En cambio, las posiciones de aminoácido en las que se han tolerado sustituciones mediante selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. Por tanto, pueden modificarse posiciones que toleran sustitución de aminoácidos al tiempo que todavía se mantiene la actividad biológica de la proteína.

Además de variantes alélicas que se producen de manera natural de MANF, pueden introducirse cambios mediante mutación en secuencias de MANF que causan alteraciones en las secuencias de aminoácidos del polipéptido de MANF codificado. Pueden realizarse sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácido "no esenciales" en la secuencia de un polipéptido de MANF. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de las secuencias de MANF de tipo natural sin alterar su actividad biológica, mientras que se requiere un residuo de aminoácido "esencial" para tal actividad biológica. Por ejemplo, se predice que residuos de aminoácido que se conservan entre las moléculas de MANF son particularmente no adecuados para alteración. En la técnica se conocen bien aminoácidos para los que pueden realizarse sustituciones conservativas. En la tabla B, "sustituciones preferidas", se muestran sustituciones conservativas útiles. Las sustituciones conservativas mediante las cuales se sustituye un aminoácido de una clase por otro aminoácido del mismo tipo se encuentran dentro del alcance de esta memoria descriptiva siempre que la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto.

La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, pueden usarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por barrido de alanina (introducción de mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula). Véase Cunningham *et al.*, Science 244:1081-1085 (1989). Entonces pueden someterse a prueba las moléculas mutantes resultantes para determinar la actividad biológica. Además de sustituciones de aminoácidos conservativas (véase la tabla B a continuación), las variantes de la presente memoria descriptiva incluyen (i) sustituciones con uno o más de los residuos de aminoácido no conservados, en las que los residuos de aminoácido introducidos por sustitución pueden ser o no uno codificado por el código genético, o (ii) sustituciones con uno o más de los residuos de aminoácido que tienen un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol 896l), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de fusión con Fc de IgG, albúmina sérica (preferiblemente albúmina sérica humana) o un fragmento o variante de los mismos, o secuencia líder o secretora, o una secuencia que facilita la purificación. Se considera que tales polipéptidos variantes están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Tabla B. Sustituciones preferidas

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

Además, dentro de una población pueden existir polimorfismos de secuencia que cambian las secuencias de aminoácidos del MANF. Por ejemplo, la variación alélica entre individuos mostrará polimorfismo genético en MANF. Los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) que codifica para MANF, preferiblemente un MANF de vertebrados. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado normalmente una varianza del 1-5% en MANF. Todas y cada una de tales variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes en el MANF, que son el resultado de variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional del MANF, están dentro del alcance de la presente memoria descriptiva.

Además, se contemplan MANF de otras especies que tienen una secuencia de nucleótidos que se diferencia de la secuencia humana de MANF. Pueden aislarse moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogos de ADNc de MANF basándose en su homología con MANF usando sondas derivadas de ADNc para hibridarse con secuencias de MANF homólogas en condiciones rigurosas.

"Polinucleótido variante de MANF" o "secuencia de ácido nucleico variante de MANF" significa una molécula de ácido nucleico que codifica para un MANF activo que (1) tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80% con una secuencia de ácido nucleico que codifica para un MANF nativo de longitud completa, (2) un MANF nativo de longitud completa que carece del péptido señal, o (3) cualquier otro fragmento de un MANF de longitud completa. Habitualmente, un polinucleótido variante de MANF tendrá identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% y aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 99% con la secuencia de ácido nucleico que codifica para un MANF nativo de longitud completa. Un polinucleótido variante de MANF puede codificar para MANF nativo de longitud completa que carece del péptido señal con o sin la secuencia señal, o cualquier otro fragmento de un MANF de longitud completa. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

Habitualmente, los polinucleótidos variantes de MANF tienen al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, con frecuencia al menos aproximadamente 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 400 nucleótidos de longitud, con mayor frecuencia al menos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, o más.

La estructura y secuencia del ADNc de MANF de mamífero que codifica para las secuencias de ratón y humana dadas a conocer en el presente documento, hace posible clonar secuencias génicas a partir de otros mamíferos que codifican para el MANF. Resulta de particular interés la capacidad para clonar las moléculas de MANF humano usando las secuencias dadas a conocer en el presente documento. El ADN que codifica para MANF puede obtenerse de cualquier biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que presenta el ARNm de *Manf* y lo expresa a un nivel detectable, tal como se muestra en el presente documento en los ejemplos. Por consiguiente, puede obtenerse convenientemente ADN de MANF a partir de una biblioteca de ADNc preparada, por ejemplo, a partir de hígado, cerebro, músculo, intestino y nervios periféricos fetales de mamífero. El gen que codifica para MANF también puede obtenerse de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas se examinan con sondas (tales como anticuerpos frente al MANF u oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El examen de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos convencionales tal como se describe en los capítulos 10-12 de Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) o alternativamente usando metodología de PCR tal como se describe en la sección 14 de Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos de MANF introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de MANF, o mediante síntesis del polipéptido de MANF deseado. Tales variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones especificadas de residuos dentro, o en uno o ambos de los extremos, de la secuencia de aminoácidos de un MANF que se produce de manera natural, tal como el MANF mostrado en SEQ ID NO: 2 y 4. Preferiblemente, estas variantes representan inserciones y/o sustituciones dentro, o en uno o ambos extremos, de la secuencia madura, y/o inserciones, sustituciones y/o deleciones especificadas dentro, o en uno o ambos extremos, de la secuencia señal del MANF. Se realiza cualquier combinación de inserción, sustitución y/o deleción

especificada para llegar al constructo final, siempre que el constructo final presente la actividad biológica deseada tal como se define en el presente documento.

Pueden realizarse variaciones en la secuencia nativa tal como se describió anteriormente usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas en la patente estadounidense n.º 5.364.934. Estas incluyen mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis por PCR.

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica para el MANF se inserta en un vector replicable para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. Hay muchos vectores disponibles. Los componentes de vector incluyen generalmente uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Los MANF pueden producirse de manera recombinante no sólo directamente, sino también como polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o el polipéptido maduro. Pueden crearse fácilmente proteínas de fusión usando métodos recombinantes. Puede fusionarse un ácido nucleico que codifica para MANF en marco con un ácido nucleico que no codifica para MANF, con el extremo N o COOH-terminal de MANF, o de manera interna. También pueden sintetizarse genes de fusión mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Una proteína de fusión de MANF puede incluir cualquier parte del MANF completo, incluyendo cualquier número de las partes biológicamente activas. Los polipéptidos de fusión son útiles en estudios de expresión, localización de células, bioensayos y purificación de MANF.

Alternativamente, también puede crearse fácilmente una proteína de fusión de MANF usando amplificación por PCR y cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (Ausubel *et al.*, citado anteriormente).

La secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de MANF que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que se reconoce y procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa de secuencia señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de MANF nativa, se sustituye la secuencia señal por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, o enterotoxina termoestable II. Para la secreción de levadura la secuencia señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, por el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes de factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces,* este último descrito en la patente estadounidense n.º 5010.182 expedida el 23 de abril de 1991), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *Candida albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990). En la expresión en células de mamífero, la secuencia señal nativa (por ejemplo, la presecuencia de MANF que normalmente dirige la secreción de MANF a partir de células humanas *in vivo*) es satisfactoria, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamífero, tales como secuencias señal de otros MANF de animales, y secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o una relacionada, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal de gD de herpes simple.

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está operativamente unido al ácido nucleico de MANF. La elección del vector viene dictada por el organismo o las células que están usándose y el destino deseado del vector. Los vectores pueden replicarse una vez en las células diana, o pueden ser vectores “suicidas”. En general, los vectores comprenden secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores, promotores y secuencias de terminación de la transcripción. La elección de estos elementos depende de los organismos en los que se usará el vector y se determinan fácilmente. Algunos de estos elementos pueden ser condicionales, tal como un promotor inducible o condicional que se “activa” cuando las condiciones son apropiadas.

Los vectores pueden dividirse en dos clases generales: los vectores de clonación son plásmidos o fagos replicantes con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula huésped apropiada, y en los que puede insertarse ADN foráneo; el ADN foráneo se replica y propaga como si fuera un componente del vector. Un vector de expresión (tal como un genoma de virus de plásmido, levadura o animal) se usa para introducir material genético foráneo en una célula o tejido huésped con el fin de transcribir y traducir el ADN foráneo. En vectores de expresión, el ADN introducido está operativamente unido a elementos, tales como promotores, que le indican a la célula huésped que transcriba el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, tales como promotores inducibles que controlan la transcripción génica en respuesta a factores específicos. Unir operativamente MANF o constructo antisentido a un promotor inducible puede controlar la expresión de MANF o fragmentos, o constructos antisentido. Los ejemplos de promotores inducibles clásicos incluyen aquellos que son sensibles a a-interferón, choque térmico, iones de metales pesados y esteroides tales como glucocorticoides (Kaufman RJ, Vectors Used for Expression in Mammalian Cells”, Methods in Enzymology, Gene Expression Technology, David V. Goeddel, ed., 1990, 185:487-511) y tetraciclina. Otros promotores inducibles deseables incluyen aquellos que no son endógenos

para las células en las que está introduciéndose el constructo, pero, sin embargo, son sensibles a aquellas células en las que se suministra de manera exógena el agente de inducción.

Los promotores son secuencias no traducidas ubicadas en sentido aguas arriba (5') con respecto al codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, tal como la secuencia de ácido nucleico de MANF, a la que están operativamente unidos. Tales promotores se dividen normalmente en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles aumentados de transcripción a partir de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de posibles células huésped. Estos promotores se unen operativamente a ADN que codifica para MANF retirando el promotor del ADN de fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia de promotor aislada en el vector. Tanto la secuencia de promotor de MANF nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión del ADN de MANF. Sin embargo, se prefieren promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos de MANF en comparación con el promotor de MANF nativo. Existen diversos promotores para su uso con células huésped procariotas, eucariotas, de levadura y de mamífero, conocidos por el experto en la técnica.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente a partir de las regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente en 3', de ADNc o ADN de eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica para MANF.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes indicados anteriormente emplea técnicas de ligación convencionales. Los fragmentos de ADN o plásmidos aislados se escinden, se ajustan a medida y vuelven a ligarse en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Son particularmente útiles los vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamífero de ADN que codifica para MANF. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que puede replicarse eficazmente en una célula huésped, de tal manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión, Sambrook *et al.*, citado anteriormente, págs. 16.17 – 16.22. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión y una célula huésped adecuados, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADN clonados, así como el examen rápido de tales polipéptidos para determinar propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. Por tanto, los sistemas de expresión transitoria son particularmente útiles para fines de identificar análogos y variantes de MANF que son biológicamente activos.

La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario.

Véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editores (1973). Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 77:4216 (1980)); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); y células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34);

Se transfectan células huésped y preferiblemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de MANF y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas.

Transfección se refiere a la captación de un vector de expresión mediante una célula huésped tanto si se expresa realmente alguna secuencia codificante como si no. El experto habitual en la técnica conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo, electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce generalmente cuando se produce cualquier indicación de la acción de este vector dentro de la célula huésped.

Transformación significa introducir ADN en un organismo de modo que el ADN pueda replicarse, o bien como elemento extracromosómico o bien mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. Generalmente se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, citado anteriormente, o la electroporación, para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales.

Se han descrito aspectos generales de transformaciones en sistemas huésped de células de mamífero en la patente estadounidense n.º 4.399.216 expedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo

normalmente según el método de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir ADN en células, tal como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina, etc. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de MANF se cultivan en medios adecuados tal como se describe de manera general en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. En general, pueden encontrarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células de mamífero en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

Puede medirse la amplificación y/o expresión génicas en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia de tipo Southern convencional, transferencia de tipo Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Pueden empelarse diversos marcadores, lo más comúnmente radioisótopos, particularmente ^{32}P. Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas, tales como usar nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido o anticuerpos que reconocen dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Con técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, normalmente mediante deshidratación y fijación, seguido por reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, en las que los marcadores son habitualmente detectables de manera visual, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes y marcadores luminiscentes. Se describe una técnica de tinción particularmente sensible por Hsu *et al.*, Am. J. Clin. Path., 75:734-738 (1980).

PRODUCCIÓN RECOMBINANTE

Cuando se produce MANF en una célula recombinante distinta de una de origen humano, el MANF está completamente libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar MANF de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas en cuanto a MANF. Como primera etapa, el medio de cultivo o lisado puede centrifugarse para eliminar residuos celulares particulados. Entonces puede purificarse MANF de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes con los siguientes procedimientos, que son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice; cromatoenfoque; inmunoafinidad; resinas de unión a etiqueta de epítopo; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG.

Variantes de MANF en las que se han delecionado, insertado o sustituido residuos se recuperan de la misma manera que MANF de secuencia nativa, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial en las propiedades ocasionado por la variación. Pueden emplearse resinas de inmunoafinidad, tales como una resina monoclonal anti-MANF, para absorber la variante de MANF uniéndola a al menos un epítopo restante.

Pueden someterse a ensayo variantes tal como se enseña en el presente documento. Un cambio en el carácter inmunológico de la molécula de MANF, tal como afinidad por un anticuerpo dado, puede medirse mediante un inmunoensayo de tipo competitivo. Otras posibles modificaciones de propiedades de proteínas o polipéptidos tales como estabilidad redox o térmica, hidrofobicidad, propensión a degradación proteolítica, o la tendencia a agregarse con portadores o para dar multímeros, se someten a ensayo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Esta memoria descriptiva abarca polipéptidos quiméricos que comprenden MANF fusionado con un polipéptido heterólogo. Un MANF quimérico es un tipo de variante de MANF tal como se define en el presente documento. El polipéptido quimérico comprende preferiblemente una fusión del MANF con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítopo al que puede unirse selectivamente una molécula o anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítopo se proporciona generalmente en el extremo amino o carboxilo-terminal del MANF. Tales formas etiquetadas con epítopo del MANF son deseables, ya que la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado contra el polipéptido de etiqueta. Además, proporcionar la etiqueta de epítopo permite purificar fácilmente el MANF mediante purificación por afinidad usando el anticuerpo anti-etiqueta. A continuación en el presente documento se describen técnicas de purificación por afinidad y ensayos de diagnóstico que implican anticuerpos.

En la técnica se conocen bien polipéptidos de etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen el polipéptido de etiqueta de HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)); la etiqueta de c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 frente a la misma (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su

anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)). Se han dado a conocer otros polipéptidos de etiqueta. Los ejemplos incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)); el péptido de epítopo de KT3 (Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)); un péptido de epítopo de alfa-tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)); y la etiqueta peptídica de proteína de gen de T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)). Una vez seleccionado el polipéptido de etiqueta, puede generarse un anticuerpo frente al mismo usando las técnicas dadas a conocer en el presente documento. Se prefiere una etiqueta de secuencia de poli-histidina C-terminal. Las secuencias de poli-histidina permiten el aislamiento de la proteína marcada con etiqueta mediante cromatografía de Ni-NTA tal como se describe (Lindsay *et al.* Neuron 17:571-574 (1996)), por ejemplo.

Los métodos generales adecuados para la construcción y producción de MANF marcado con etiqueta de epítopo son los mismos que los dados a conocer anteriormente en el presente documento.

MANF marcado con etiqueta de epítopo puede purificarse convenientemente mediante cromatografía de afinidad usando el anticuerpo anti-etiqueta. La matriz a la que se fija el anticuerpo de afinidad es con la mayor frecuencia agarosa, pero hay otras matrices disponibles (por ejemplo vidrio de poros controlados o poli(estireno-divinilbenceno)). El MANF marcado con etiqueta de epítopo puede eluirse de la columna de afinidad variando el pH o la fuerza iónica del tampón o añadiendo agentes caotrópicos, por ejemplo.

En la técnica se conocen quimeras construidas a partir de una secuencia de MANF unida a una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina apropiada (inmunoadhesinas). Las inmunoadhesinas notificadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2936-2940 (1987)); CD4* (Capon *et al.*, Nature 337: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, Nature, 339: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, DNA Cell Biol USA, 9: 347-353 (1990); Byrn *et al.*, Nature, 344: 667-670 (1990)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, Eur. J. Immunol., 27: 2883-2886 (1991); Peppel *et al.*, J. Exp. Med., 174:1483-1489 (1991)); y receptor alfa* de IgE (Ridgway *et al.*, J. Cell. Biol., 115: abstr. 1448 (1991)), en el que el asterisco (*) indica que el receptor es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas.

El diseño de inmunoadhesina más sencillo y más directo combina la(s) región/regiones de unión de la proteína "adhesina" con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. De manera habitual, cuando se preparan las quimeras de MANF-inmunoglobulina, se fusionará ácido nucleico que codifica para el MANF en el extremo C-terminal con ácido nucleico que codifica para el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo también son posibles fusiones N-terminales.

Normalmente, en tales fusiones, el polipéptido quimérico codificado conservará al menos dominios bisagra y CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se preparan fusiones con el extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal con respecto a CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios particulares y pueden seleccionarse con el fin de optimizar las características de actividad biológica, secreción o unión de las quimeras de MANF-inmunoglobulina.

La elección de la línea de células huésped para la expresión de inmunoadhesinas de MANF depende principalmente del vector de expresión. Otra consideración es la cantidad de proteína que se requiere. Con frecuencia pueden producirse cantidades de miligramos mediante transfecciones transitorias usando, por ejemplo, método de fosfato de calcio o DEAE-dextrano (Aruffo *et al.*, Cell, 61:1303-1313 (1990); Zettmeissl *et al.*, ADN Cell Biol. US, 9:347-353 (1990)). Si se desean cantidades mayores de proteína, la inmunoadhesina puede expresarse tras la transfección estable de una línea de células huésped, por ejemplo, introduciendo los vectores de expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica para dihidrofolato reductasa.

MANF PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO

En las enfermedades neurodegenerativas mueren neuronas. En la enfermedad de Parkinson las neuronas dopaminérgicas cerebrales degeneran de la manera más predominante en la sustancia negra. Se ha identificado un factor neurotrófico dopaminérgico conservado novedoso, MANF, como factor de supervivencia para neuronas dopaminérgicas. Se describe un vector viral (por ejemplo vector de VAA y lentivirus) que expresa MANF humano recombinante. Administrando MANF, por ejemplo mediante un vector de virus que expresa proteínas MANF, al cuerpo estriado de rata antes y después de la inyección de 6-OHDA en el cuerpo estriado de las ratas, es posible proteger y reparar eficazmente el sistema dopaminérgico en el modelo de rata de enfermedad de Parkinson.

La proteína MANF y ácido nucleico de MANF encuentran uso terapéutico *ex vivo* o *in vivo* para la administración a un mamífero, particularmente seres humanos, en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la actividad de MANF o que se benefician de la sensibilidad a MANF. Se prefieren particularmente trastornos neurológicos, preferiblemente trastornos del sistema nervioso central, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia e isquemia prosencefálica global (es decir, accidente cerebrovascular).

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden proteína MANF, fragmento peptídico o derivado en un portador farmacológico adecuado. La proteína MANF, el fragmento peptídico o la variante pueden administrarse de manera sistémica o local. De manera aplicable a los métodos enseñados en el presente documento, la proteína MANF puede administrarse opcionalmente antes de, después de, o preferiblemente de manera concomitante con (o en complejo con) CDNF, GDNF o fosfolípidos, tales como 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina.

Una enfermedad o trastorno médico se considera que es una lesión nerviosa si la supervivencia o función de las células nerviosas y/o sus prolongaciones axonales se ve comprometida. Tal lesión nerviosa se produce como resultado de estados incluyendo (a) lesión física, que provoca la degeneración de las prolongaciones axonales y/o cuerpos de células nerviosas cerca del sitio de la lesión; (b) isquemia, tal como accidente cerebrovascular; (c) exposición a neurotoxinas, tales como agentes quimioterápicos contra el cáncer y el SIDA tales como cisplatino y didesoxicitidina (ddC), respectivamente; (d) enfermedades metabólicas crónicas, tales como diabetes o disfunción renal; y (e) enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), que provocan la degeneración de poblaciones neuronales específicas. Los estados que implican lesión nerviosa incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular, polineuropatía diabética, neuropatía tóxica y daño físico al sistema nervioso tal como el provocado por lesión física en el cerebro y la médula espinal o lesiones por aplastamiento o corte del brazo y la mano u otras partes del organismo, incluyendo cese temporal o permanente de flujo sanguíneo a partes del sistema nervioso, tal como en el accidente cerebrovascular.

Se contempla que MANF puede emplearse para tratar neuropatía, y especialmente neuropatía periférica. “Neuropatía periférica” se refiere a un trastorno que afecta al sistema nervioso periférico, manifestado con la mayor frecuencia como una o una combinación de disfunción motora, sensorial, sensorimotora o de neuronas autónomas. La amplia variedad de morfologías mostradas por neuropatías periféricas pueden atribuirse cada una de manera única a un número igualmente amplio de causas. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden adquirirse genéticamente, pueden resultar de una enfermedad sistémica o pueden inducirse por un agente tóxico. Los ejemplos incluyen neuropatía periférica diabética, neuropatía sensorimotora distal o neuropatías autónomas tales como motilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías asociadas con enfermedad sistémica incluyen síndrome postpolio o neuropatía asociada al SIDA; los ejemplos de neuropatías hereditarias incluyen enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, enfermedad de Tangier, enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry y síndrome de Dejerine-Sottas; y los ejemplos de neuropatías provocadas por un agente tóxico incluyen aquellas provocadas por tratamiento con un agente quimioterápico tal como vincristina, cisplatino, metotrexato o 3’-azido-3’-desoxitimidina. De manera correspondiente, se esperará que antagonistas de neurotrimina tengan utilidad en enfermedades caracterizadas por una actividad neuronal excesiva.

La enfermedad de Alzheimer está marcada por una neurodegeneración extendida en el cerebro que incluye una pérdida potenciada de las neuronas colinérgicas que residen en el prosencéfalo basal. La pérdida de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal contribuye a déficits cognitivos y de memoria espacial en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Gilmor *et al.*, 1999; Lehericy *et al.* 1993). La restauración y modulación de la función colinérgica en pacientes con enfermedad de Alzheimer es un tratamiento candidato para la enfermedad (Sramek y Cutler, 1999; Mufson *et al.*, 1998). Otros tipos de células neurales también pueden estar implicados en la enfermedad.

Un paciente que padece enfermedad de Parkinson puede tratarse con los signos más tempranos de síntomas de la enfermedad, tales como función motora alterada o función cognitiva alterada, con el fin de detener la progresión de la neurodegeneración. También se contempla que se administren las células cultivadas con MANF a individuos en estadios tardíos de la enfermedad para ralentizar la progresión del daño del sistema nervioso.

También se contempla que la administración del producto de MANF en combinación con un agente neuroterápico comúnmente usado para tratar la enfermedad de Parkinson creará un sinergismo de los dos tratamientos, provocando así una marcada mejora en pacientes que reciben la terapia de combinación en comparación con individuos que sólo reciben una única terapia.

Pramipexol (Mirapex) y levodopa son medicamentos eficaces para tratar síntomas motores de estadio inicial de la enfermedad de Parkinson (EP). Estudios *in vitro* y con animales sugieren que pramipexol puede proteger y que levodopa puede o bien proteger o bien dañar neuronas dopaminérgicas. La generación de neuroimágenes ofrece la posibilidad de un biomarcador objetivo de degeneración de neuronas dopaminérgicas en pacientes con EP. También se usa coenzima Q10, un neurotransmisor que se expresa a niveles bajos en pacientes con enfermedad de Parkinson, para el tratamiento de EP. Puede combinarse levodopa con otro fármaco tal como carbidopa para ayudar a aliviar los efectos secundarios de L-dopa. Otros medicamentos usados para tratar la enfermedad de Parkinson, o bien como agentes solos o bien en combinación, son Sinemet, selegilina (comercializada como Eldepryl) que pueden ofrecer algo de alivio de síntomas de enfermedad de Parkinson tempranos. Amantadina (Symmetrel) es un fármaco antiviral que también proporciona un efecto contra la enfermedad de Parkinson, y se usa con frecuencia

para ampliar la “ventana terapéutica” de levodopa cuando se usa en combinación con Sinemet.

Se contempla que el tratamiento con MANF antes de, después de, o simultáneamente con, cualquiera de los agentes neuroterápicos anteriores potenciará el efecto del agente neuroterápico, reduciendo así la cantidad de agente requerida por un individuo y reduciendo los efectos secundarios no deseados producidos por dosis múltiples o grandes de agente neuroterápico.

También se contemplan específicamente manipulaciones genéticas para lograr la modulación de la expresión o actividad de la proteína. Por ejemplo, cuando se contempla la administración de proteínas, también se contempla la administración de un vector de terapia génica para provocar que la proteína de interés se produzca *in vivo*. Cuando se contempla la inhibición de proteínas (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos o inhibidores de moléculas pequeñas), se contempla la inhibición de la expresión de proteínas *in vivo* mediante técnicas genéticas, tales como técnicas de desactivación o terapia antisentido.

Puede usarse cualquier vector adecuado para introducir un transgén de interés en un animal. Los vectores a modo de ejemplo que se han descrito en la bibliografía incluyen vectores retrovirales deficientes para la replicación, incluyendo vectores lentivirales [Kim *et al.*, J. Virol., 72(1): 811-816 (1998); Kingsman & Johnson, Scrip Magazine, octubre de 1998, págs. 43-46]; adenovirales (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.824.544; la patente estadounidense n.º 5.707.618; la patente estadounidense n.º 5.792.453; la patente estadounidense n.º 5.693.509; la patente estadounidense n.º 5.670.488; la patente estadounidense n.º 5.585.362; Quantin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2581-2584 (1992); Stratford-Perricadet *et al.*, J. Clin. Invest., 90: 626-630 (1992); y Rosenfeld *et al.*, Cell, 68: 143-155 (1992)), retrovirales (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.888.502; la patente estadounidense n.º 5.830.725; la patente estadounidense n.º 5.770.414; la patente estadounidense n.º 5.686.278; la patente estadounidense n.º 4.861.719), de virus adenoasociados (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.474.935; la patente estadounidense n.º 5.139.941; la patente estadounidense n.º 5.622.856; la patente estadounidense n.º 5.658.776; la patente estadounidense n.º 5.773.289; la patente estadounidense n.º 5.789.390; la patente estadounidense n.º 5.834.441; la patente estadounidense n.º 5.863.541; la patente estadounidense n.º 5.851.521; la patente estadounidense n.º 5.252.479; Gnatenko *et al.*, J. Investig. Med., 45: 87-98 (1997)), un híbrido de adenovirus-virus adenoasociado (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.856.152) o un virus vaccinia o un herpesvirus (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.879.934; la patente estadounidense n.º 5.849.571; la patente estadounidense n.º 5.830.727; la patente estadounidense n.º 5.661.033; la patente estadounidense n.º 5.328.688); transferencia génica mediada por Lipofectin (BRL); vectores liposomales [véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.631.237 (Liposomes comprising Sendai virus proteins)]; y combinaciones de los mismos. Se prefieren vectores adenovirales deficientes para la replicación, vectores de virus adenoasociados y lentivirus.

Los polinucleótidos preferidos incluyen un promotor adecuado y una secuencia de poliadenilación para promover la expresión en el tejido diana de interés. Para muchas aplicaciones, los promotores/potenciadores adecuados para expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, promotor/potenciador de citomegalovirus [Lehner *et al.*, J. Clin. Microbiol., 29:2494-2502 (1991); Boshart *et al.*, Cell, 41:521-530 (1985)]; promotor de virus del sarcoma de Rous [Davis *et al.*, Hum. Gene Ther., 4:151 (1993)]; promotor del virus de simio 40, repetición terminal larga (LTR) de retrovirus, promotor de queratina 14 y promotor de cadena pesada de α-miosina.

En aplicaciones de terapia génica, se introducen genes en células con el fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo para la sustitución de un gen defectuoso. “Terapia génica” incluye tanto terapia génica convencional en la que se logra un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Pueden usarse ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de determinados genes *in vivo*. Ya se ha mostrado que pueden importarse oligonucleótidos antisentido cortos al interior de células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares provocadas por su captación restringida por parte de la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:41434146 (1986)). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere al interior de células en cultivo *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* en las células del huésped previsto. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas (Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190 (1982); Fraley, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352 (1979); Felgner, Sci. Am., 276(6):102-6 (1997); Felgner, Hum. Gene Ther., 7(15):1791-3, (1996)), electroporación (Tur-Kaspa, *et al.*, Mol. Cell Biol., 6:716-718, (1986); Potter, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, (1984)), microinyección directa (Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099 (1985)), fusión de células, DEAE-dextrano (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190 (1985)), el método de precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467 (1973); Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7:2745-2752, (1987); Rippe, *et al.*, Mol. Cell Biol., 10:689-695 (1990)), sonicación celular (Fechheimer, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467 (1987)), bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572 (1990)). Las técnicas de transferencia génica *in vivo*

actualmente preferidas incluyen transfección con vectores virales (normalmente retrovirales) y transfección mediada por proteínas de la cubierta viral-liposomas (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology, 11:205-210 (1993)). En algunas situaciones es deseable proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente que selecciona como diana las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para la selección como diana y/o para facilitar la captación, por ejemplo proteínas de la cápsida o fragmentos de las mismas trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en los ciclos, y proteínas que seleccionan como diana una ubicación intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptores se describe, por ejemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos actualmente conocidos de marcaje génico y terapia génica véase Anderson *et al.*, Science, 256:808-813 (1992).

El constructo de expresión (o de hecho los péptidos comentados anteriormente) puede atraparse en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de disolución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autorreorganización antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, "In Liver Diseases, Targeted Diagnosis And Therapy Using Specific Receptors And Ligands", Wu, G., Wu, C., ed., New York: Marcel Dekker, págs. 87-104 (1991)). La adición de ADN a liposomas catiónicos provoca una transición topológica de liposomas a glóbulos condensados líquido-cristalinos ópticamente birrefringentes (Radler, *et al.*, Science, 275(5301):810-4, (1997)). Estos complejos de ADN-lípidos son posibles vectores no virales para su uso en terapia y administración génica.

También se contemplan diversos enfoques comerciales que implican tecnología de "lipofección". El liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha mostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposoma (Kaneda, *et al.*, Science, 243:375-378 (1989)). El liposoma puede complejarse o emplearse junto con proteínas cromosómicas distintas de histonas nucleares (HMG-1) (Kato, *et al.*, J. Biol. Chem., 266:3361-3364 (1991)). El liposoma puede complejarse o emplearse tanto junto con VHJ como con HMG-1. Tales constructos de expresión se han empleado satisfactoriamente en la transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo.*

Otros sistemas de administración de vectores que pueden emplearse para administrar un ácido nucleico que codifica para un gen terapéutico al interior de células incluyen vehículos de administración mediados por receptores. Estos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas mediante endocitosis mediada por receptores en casi todas las células eucariotas. Debido a la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, la administración puede ser altamente específica (Wu y Wu (1993), citado anteriormente).

El constructo de expresión puede consistir simplemente en plásmidos o ADN recombinante desnudo. La transferencia del constructo puede realizarse mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente que permeabilizan física o químicamente la membrana celular. Esto es aplicable particularmente para la transferencia *in vitro,* sin embargo, también puede aplicarse para su uso *in vivo*. Dubensky, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7529-7533 (1984) inyectaron satisfactoriamente ADN de poliomavirus en forma de precipitados de $CaPO_4$ en hígado y bazo de ratones adultos y recién nacidos, demostrando replicación viral activa e infección aguda. Benvenisty y Neshif, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9551-9555 (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con $CaPO_4$ da como resultado la expresión de los genes transfectados.

La transferencia de un constructo de expresión de ADN desnudo al interior de células puede implicar bombardeo con partículas. Este método depende de la capacidad para acelerar microproyectiles recubiertos con ADN hasta una alta velocidad permitiéndoles perforar membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein, *et al.*, Nature, 327:70-73 (1987)). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo de este tipo se basa en una descarga de alta tensión para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87:9568-9572 (1990)). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como perlas de tungsteno u oro.

Los expertos en la técnica saben cómo aplicar la administración génica a situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para vectores virales, generalmente se preparará una disolución madre de vector viral. Dependiendo del tipo de virus y el título que puede alcanzarse, se administrarán 1×10^4, 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8, 1×10^9, 1×10^{10}, 1×10^{11} ó 1×10^{12} partículas infecciosas al paciente. Pueden extrapolarse cifras similares para formulaciones de liposomas u otras no virales comparando eficacias de captación relativa. La formulación como composición farmacéuticamente aceptable se comenta a continuación.

Se contemplan diversas vías para diversos tipos de células. Para prácticamente cualquier tipo de célula, tejido u órgano, se contempla la administración sistémica. Puede adoptarse una variedad de enfoques directos, locales y regionales. Por ejemplo, puede inyectarse el vector de expresión o la proteína directamente en la célula, tejido u

órgano.

En una terapia génica *ex vivo*, se retiran células del paciente y se mantienen fuera del organismo durante al menos algún periodo de tiempo. Durante este periodo, se administra una terapia, tras lo cual se reintroducen las células en el paciente.

También se proporcionan antagonistas de activación de MANF (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes, ácido nucleico antisentido frente a MANF). Se contempla la administración de antagonista de MANF a un mamífero que tiene niveles aumentados o excesivos de activación de MANF endógeno, preferiblemente en la situación en la que tales niveles aumentados de MANF conducen a un trastorno patológico.

Vectores virales que expresan MANF

La estrategia para transferir genes al interior de células diana *in vivo* incluye las siguientes etapas básicas: (1) selección de un transgén o transgenes apropiados cuya expresión se correlaciona con una enfermedad o disfunción del SNC; (2) selección y desarrollo de vectores adecuados y eficaces para la transferencia génica; (3) demostración de que se producen la transducción *in vivo* de células diana y la expresión del transgén de manera estable y eficaz; (4) demostración de que el procedimiento de terapia génica *in vivo* no provoca ningún efecto perjudicial grave; y (5) demostración de un efecto fenotípico deseado en el animal huésped.

Aunque pueden usarse otros vectores, los vectores preferidos para su uso son vectores virales y no virales. El vector seleccionado debe cumplir los siguientes criterios: 1) el vector debe poder infectar células seleccionadas como diana y por tanto deben seleccionarse vectores virales que tienen una variedad de huéspedes apropiada; 2) el gen transfectado debe poder persistir y expresarse en una célula durante un periodo de tiempo prolongado (sin provocar muerte celular) para el mantenimiento y la expresión estables en la célula; y 3) el vector debe causar poco daño a células diana, si es que causa alguno.

Dado que las células cerebrales de mamífero adulto no se dividen, el vector de expresión recombinante elegido debe poder transfectar y expresarse en células que no se dividen. En la actualidad, los vectores que se sabe que tienen esta capacidad incluyen virus ADN tales como adenovirus, virus adenoasociados (VAA) y determinados virus ARN tales como lentivirus basados en VIH, virus de inmunodeficiencia felina (VIF) y virus de inmunodeficiencia equina (VIE). Otros vectores con esta capacidad incluyen virus del herpes simple (VHS). Sin embargo, algunos de estos virus (por ejemplo, VAA y VHS) pueden producir toxicidad y/o inmunogenicidad. Recientemente, se ha desarrollado recientemente un sistema de vector lentiviral basado en VIH que, como otros retrovirus, puede insertar un transgén en el núcleo de células huésped (potenciando la estabilidad de la expresión) pero que, al contrario que otros retrovirus, puede realizar la inserción en el núcleo de células que no se dividen. Se ha mostrado que los vectores lentivirales transfectan de manera estable células cerebrales tras inyección directa, y expresan de manera estable un transgén foráneo sin patogénesis detectable producida por proteínas virales (véase, Naldini, *et al.*, Science, 272:263-267 (1996)). Siguiendo las enseñanzas de los investigadores que construyeron por primera vez el vector retroviral de VIH-1, los expertos habituales en la técnica podrán construir vectores lentivirales (para una referencia más general referente a la construcción de retrovirus, véanse, por ejemplo, Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W. Freeman Co. (NY 1990) y Murray, E J, ed., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press (NJ 1991)).

El uso de vectores de VAA recombinantes es eficaz; su infección es de duración relativamente larga y generalmente no es tóxica, a menos que se recombine un transgén tóxico en los mismos. VAA es un parvovirus dependiente de virus cooperador que consiste en un genoma de ADN de cadena sencilla de 4,7 kb rodeado por una cubierta de proteína icosaédrica sin envuelta, sencilla. Aproximadamente el 85% de la población humana adulta es seropositiva para VAA. No obstante, no se ha asociado ninguna patología con la infección por VAA. VAA depende de adenovirus o herpesvirus como virus cooperador para establecer una infección productiva por VAA. En ausencia de virus cooperador, el genoma de VAA también se amplifica en respuesta a exposición tóxica (irradiación UV, exposición a hidroxiurea). Si no hay ninguna exposición tóxica o virus cooperador, el VAA de tipo natural se integra en el cromosoma humano 19 de manera específica del sitio. Esto se ve impulsado por proteínas Rep de VAA que median en la formación de un complejo VAA-cromosoma en el sitio de integración cromosómica. La mayor parte del genoma viral (el 96%) puede eliminarse, dejando sólo las dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pares de bases (pb) para el empaquetamiento y la integración del genoma viral. En la técnica se han desarrollado técnicas para la propagación eficaz de VAA recombinante, VAAr: el uso de mini-plásmidos de genoma adenoviral, plásmidos que codifican para funciones de empaquetamiento de VAA y funciones cooperadoras de adenovirus en plásmidos individuales. Además, los métodos de VAAr para el aislamiento de VAAr altamente purificados son relativamente directos y rápidos de emprender, como lo es la titulación de disoluciones madre de VAAr. Para rastrear la expresión de transgenes mediada por VAAr con frecuencia se usa la proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente de 238 aminoácidos bien caracterizada, en una disposición bicistrónica en VAAr. También se ha identificado la expresión selectiva y específica de transferencia génica mediada por VAAr mediante diferentes promotores. Se usa un sistema libre de virus cooperador de VAA comercialmente disponible (Invitrogen) para construir los presentes VAA recombinantes. Se clona MANF en vectores/plásmidos del sistema de VAA usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

La construcción de vectores para la expresión recombinante de factores de crecimiento del sistema nervioso puede lograrse usando técnicas convencionales que no requieren una explicación detallada para un experto habitual en la técnica. En el presente documento se exponen datos específicos para la construcción del vector de VAA. Para una revisión adicional, los expertos en la técnica pueden consultar Maniatis *et al.*, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982).

En resumen, la construcción de vectores de expresión recombinantes emplea técnicas de ligación convencionales. Para un análisis para confirmar las secuencias correctas en vectores construidos, pueden usarse las mezclas de ligación para transformar una célula huésped y seleccionarse transformantes satisfactorios mediante resistencia a antibióticos cuando sea apropiado. Se preparan vectores a partir de los transformantes, se analizan mediante restricción y/o se secuencian, por ejemplo, mediante el método de Messing, *et al.*, (Nucleic Acids Res., 9:309, 1981), el método de Maxam, *et al.*, (Methods in Enzymology, 65:499, 1980), u otros métodos adecuados que conocerán los expertos en la técnica. Se realiza una separación por tamaños de fragmentos escindidos usando electroforesis en gel convencional tal como se describe, por ejemplo, por Maniatis, *et al.*, (Molecular Cloning, págs. 133-134, 1982).

La expresión de un gen (MANF) se controla a niveles de transcripción, traducción o postraducción. La iniciación de la transcripción es un evento temprano y crítico en la expresión génica. Esto depende de las secuencias promotora y potenciadora y se ve influida por factores celulares específicos que interaccionan con estas secuencias. La unidad transcripcional de muchos genes procariotas consiste en el promotor y en algunos casos elementos potenciadores o reguladores (Banerji *et al.*, Cell 27:299 (1981); Corden *et al.*, Science 209:1406 (1980); y Breathnach y Chambon, Ann. Rev. Biochem. 50:349 (1981)). Para retrovirus, los elementos de control implicados en la replicación del genoma retroviral residen en la repetición terminal larga (LTR) (Weiss *et al.*, eds., The molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, (NY 1982)). Las LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (VLM) y del virus del sarcoma de Rous (VSR) contienen secuencias promotoras y potenciadoras (Jolly *et al.*, Nucleic Acids Res. 11:1855 (1983); Capecchi *et al.*, En: Enchancer and eukaryotic gene expression, Gulzman and Shenk, eds., págs. 101-102, Cold Spring Harbor Laboratories (NY 1991)). Otros promotores potentes incluyen los derivados de citomegalovirus (CMV) y otros promotores virales de tipo natural.

Un enfoque alternativo para cambiar la expresión de MANF es cambiar la región previa (secuencia señal) de la proteína por una secuencia señal equivalente de una proteína que se sabe que se expresa en altas cantidades, tal como la cadena pesada de inmunoglobulina. Alternativamente, la secuencia señal de MANF puede cambiarse por la de una proteína que se sabe que se expresa en el tejido u órgano diana apropiado. Asimismo, variantes de deleción o inserción de MANF pueden expresarse más eficazmente y ser más estables que la proteína MANF nativa.

Se encuentran métodos de preparación y uso de VAAr y administración de VAAr a diversas células *in vivo* en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.720.720; 6.027.931; 6.071.889; documento WO 99/61066. Hay diferentes serotipos de VAA disponibles, y muestran tropismo tisular. Por tanto, el uso del serotipo preciso depende de en qué tejido debe transducirse.

Con respecto a métodos para la expresión de transgenes satisfactoria, localizada, a largo plazo y no tóxica en el sistema nervioso usando virus adenoasociado (VAA) y promotores seleccionados, se hace referencia a Klein *et al*, 1998, Experimental Neurology 150:183 194, “Neuron-Specific Transduction in the Rat Septohippocampal or Nigrostriatal Pathway by Recombinant Adeno-associated Virus Vectors”.

Con respecto a un método de terapia génica usando VAA recombinante con persistencia significativa mediante expresión estable de los factores neurotróficos NGF, GDNF, BDNF, y efectos terapéuticos neuroquímicamente cuantificables resultantes, se hace referencia a Klein *et al*, Neuroscience 90:815 821, “Long-term Actions of Vector-derived Nerve Growth Factor or Brain-derived Neurotrophic Factor on Choline Acetyltransferase and Trk Receptor Levels in the Adult Rat Basal Forebrain”.

Un parámetro importante adicional es la dosificación de MANF que debe administrarse al interior del tejido diana. La dosificación unitaria se refiere de manera general a MANF/ml de la composición de MANF. Para vectores virales, la concentración de MANF puede definirse mediante el número de partículas virales/ml de composición neurotrófica. De manera óptima, para la administración de MANF usando un vector de expresión viral, cada dosificación unitaria de MANF comprenderá de 2,5 a 25 ul de composición de MANF, en la que la composición incluye vector de expresión viral en fluido farmacéuticamente aceptable y proporciona desde 10^{10} hasta 10^{15} partículas virales que expresan MANF por ml de composición de MANF. Tales altos títulos son particularmente útiles para VAA. Para lentivirus, el título es normalmente inferior, de desde 10^{8} hasta 10^{10} unidades de transducción por ml (UT/ml).

OTRAS INDICACIONES MÉDICAS

Adicción

La drogadicción puede considerarse una forma patológica de plasticidad neuronal reflejada por cambios de larga duración o permanentes en el comportamiento tanto de seres humanos como de animales de experimentación. De

hecho, según las opiniones más recientes, las drogas toman el control de los mecanismos implicados en las formas mejor conocidas de plasticidad neuronal: aprendizaje y memoria. Los factores neurotróficos regulan la plasticidad neuronal. Uno de ellos, el factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía (GDNF) que señaliza a través del complejo de GFRa1/receptor RET, parece tener un papel en los efectos de larga duración/persistentes de las drogas, y por tanto, puede desempeñar un papel crucial en la regulación de la drogadicción. Los factores neurotróficos de la familia de GDNF tienen efectos sobre los cambios plásticos que se producen durante el transcurso de la exposición repetida a drogas (cocaína, morfina, anfetamina, alcohol). Dado que MANF tiene efectos prominentes sobre el sistema dopaminérgico, se concluye que el factor neurotrófico novedoso, MANF, puede tener efectos protectores y puede usarse para el tratamiento de la drogadicción (cocaína, morfina, anfetamina, alcohol).

COMPOSICIONES Y FORMULACIONES FARMACÉUTICAS Y TERAPÉUTICAS

Las moléculas de ácido nucleico de MANF, los polipéptidos de MANF y los Ac anti-MANF (compuestos activos), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas.

Tales composiciones de MANF se preparan para su almacenamiento mezclando una proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980)), en forma de torta liofilizada o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronics o polietilenglicol (PEG).

La proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpos frente al mismo también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente.

La vía de administración de la proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo es de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, las vías expuestas anteriormente para indicaciones específicas, así como las vías generales de inyección o infusión por medios intravenosos, intraperitoneales, intracerebrales, intramusculares, intraoculares, intraarteriales o intralesionales, o sistemas de liberación sostenida tal como se indican a continuación. La proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo se administra de manera continua mediante infusión o mediante inyección en bolo. Generalmente, cuando el trastorno lo permite, debe formularse y dosificarse la proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo para su administración específica del sitio. La administración puede ser continua o periódica. La administración puede lograrse mediante una bomba implantable de flujo constante o programable o mediante inyecciones periódicas. Las moléculas de ácido nucleico pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Pueden administrarse vectores de terapia génica a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, administración local (Nabel y Nabel, patente estadounidense n.º 5.328.470, 1994), o mediante inyección estereotáctica (Chen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057 (1994)). La preparación farmacéutica de un vector de terapia génica puede incluir un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se embebe el vehículo de administración génica.

Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles tal como se describe por Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919, documento EP 58.481), o etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer *et al.*, citado anteriormente).

Las composiciones de MANF de liberación sostenida también incluyen proteínas, moléculas de ácido nucleico de MANF o anticuerpos frente al mismo atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen proteínas, moléculas de ácido nucleico de MANF o anticuerpos frente al mismo se preparan mediante métodos conocidos per se: Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:40304034 (1980);

documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; patentes estadounidenses n.os 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. De manera habitual, los liposomas son del tipo unilaminar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido en lípidos es mayor de aproximadamente el 30% en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima con proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo.

Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de exposición a la humedad a 37ºC, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Los dispositivos de membrana implantables, semipermeables, son útiles como medios para administrar fármacos en determinadas circunstancias. Por ejemplo, pueden encapsularse células que secretan MANF soluble, quimeras o anticuerpos, y pueden implantarse tales dispositivos en un paciente. Por ejemplo, en el cerebro de pacientes que padecen enfermedad de Parkinson. Véanse, la patente estadounidense n.º 4.892.538 de Aebischer *et al.*; patente estadounidense n.º 5.011.472 de Aebischer *et al.*; patente estadounidense n.º 5.106.627 de Aebischer *et al.*; solicitud PCT WO 91/10425; solicitud PCT WO 91/10470; Winn *et al.*, Exper. Neurology, 113:322-329 (1991); Aebischer *et al.*, Exper Neurology, 111:269-275 (1991); y Tresco *et al.*, ASAIO, 38:17-23 (1992).

Por consiguiente, también se describe un método para prevenir o tratar el daño a un nervio o daño a otras células sensibles a MANF, que comprende implantar células que secretan MANF, sus agonistas o antagonistas según se requiera para el estado particular, en el organismo de pacientes que lo necesitan. Finalmente, se describe un dispositivo para prevenir o tratar lesión nerviosa o daño a otras células tal como se enseña en el presente documento mediante implantación en un paciente que comprende una membrana semipermeable, y una célula que secreta MANF (o sus agonistas o antagonistas según se requiera para el estado particular) encapsulada dentro de dicha membrana y siendo dicha membrana permeable para MANF (o sus agonistas o antagonistas) e impermeable para factores del paciente perjudiciales para las células. Las propias células del paciente, transformadas para producir MANF *ex vivo*, pueden implantarse directamente en el paciente, opcionalmente sin tal encapsulación. La metodología para la encapsulación en membrana de células vivas resulta familiar para los expertos habituales en la técnica, y la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden lograrse sin experimentación.

Por tanto, se describe un método para prevenir o tratar lesión nerviosa implantando células en el organismo de un paciente que lo necesita, o bien seleccionándose las células por su capacidad natural para generar, o bien modificándose por ingeniería genética para secretar, MANF o anticuerpo frente a MANF. Preferiblemente, el MANF o anticuerpo secretado es MANF maduro humano, soluble, cuando el paciente es un ser humano. Los implantes son preferiblemente no inmunogénicos y/o previenen que el sistema inmunitario reconozca células implantadas inmunogénicas. Para la administración al SNC, una ubicación preferida para el implante es el líquido cefalorraquídeo de la médula espinal.

Una cantidad eficaz de proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo que va a emplearse de manera terapéutica dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y el estado del paciente. Por consiguiente, será necesario que el terapeuta titule la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Normalmente, el médico administrará la proteína MANF o anticuerpo hasta que se alcance una dosificación que logra el efecto deseado. Una dosificación diaria típica para el tratamiento sistémico puede oscilar entre aproximadamente 1 microgramo/kg y 10 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Como proposición general alternativa, la proteína, molécula de ácido nucleico de MANF o anticuerpo frente al mismo se formula y administra al sitio o tejido diana a una dosificación que puede establecer en el tejido un nivel de MANF que es eficaz, pero no excesivamente tóxico. Esta concentración intratisular debe mantenerse si es posible mediante infusión continua, liberación sostenida, aplicación tópica, implante de células que expresan MANF, o inyección a frecuencias determinadas empíricamente. La evolución de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

La eficacia de polinucleótidos de MANF administrados de manera viral o administrados de manera no viral puede someterse a prueba en cualquiera de varios modelos animales de enfermedad de Parkinson, conocidos en la técnica. Por ejemplo, los modelos animales de enfermedad de Parkinson más ampliamente usados replican la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas habitualmente mediante administración de toxinas. La inyección unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la sustancia negra de ratones o ratas da como resultado pérdida neuronal en el cuerpo estriado ipsilateral y la parte compacta de la sustancia negra con pocos cambios en el hemisferio contralateral. De manera similar, la neurotoxicidad inducida por metanfetamina da como resultado

neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas y los expertos en la técnica consideran que está estrechamente alineada con el estado humano. La eficacia de un agente terapéutico puede evaluarse mediante el desenlace del comportamiento usando el comportamiento de giro inducido por apomorfina.

Otro modelo de enfermedad de Parkinson se construye usando la neurotoxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Se administra MPTP a mamíferos, tales como ratones, ratas y monos. La administración de MPTP a monos da como resultado no sólo la pérdida de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas en la parte compacta de la sustancia negra y el cuerpo estriado, sino también manifestaciones de comportamiento similares a las observadas en pacientes humanos con enfermedad de Parkinson, tales como acinesia y postura rígida. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.362.319.

Al contrario que los modelos animales de enfermedad de Parkinson descritos anteriormente, están disponibles varias variedades consanguíneas de ratones que demuestran una disminución gradual de los números de células dopaminérgicas. Por ejemplo, se ha generado un ratón con déficit de receptor D2 mediante recombinación homóloga cuyas características de comportamiento se parecen a las de pacientes que padecen enfermedad de Parkinson. Fitzgerald *et al.* (1993) Brain Res. 608:247-258. Un segundo ejemplo es el ratón mutante tambaleante que muestra una disminución de los números de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas a lo largo del tiempo de hasta el 40%. Verina *et al.* (1997) Exp. Brain Res. 113:5-12; Adelbrecht *et al.* (1996) Mol. Brain Res. 43:291-300; Mitsumoto *et al.* (1994) Science 265:1107-1110.

Los presentes ejemplos usaron el modelo de EP parcial de Sauer y Oertel (Sauer y Oertel, Neuroscience (1994) 59:401-415). En este modelo, la inyección intraestrial de 6-OHDA induce degeneración retrógrada progresiva de neuronas DA que comienza entre 1 y 2 semanas tras la formación de la lesión y continúa a lo largo de 8 a 16 semanas. El agotamiento continuado de neuronas DA puede ser más similar al proceso patológico de EP y más apropiado como modelo animal para el estudio terapéutico que el modelo completo, que se construye destruyendo el haz prosencefálico medial, provocando así una degeneración más rápida de neuronas DA. En los experimentos detallados a continuación, las ratas habían mostrado déficits de comportamiento constantes antes de la inyección del vector. Generalmente se supone que la aparición de giros inducidos por apomorfina representan un agotamiento del ~90% del contenido en dopamina de la estría (Hudson *et al.*, Brain Res. (1993) 626:167-174). Sin embargo, estudios en modelos animales y pacientes con EP han indicado que puede haber más neuronas DA supervivientes que lo que sugieren los niveles de dopamina (Javoy-Agid *et al.*, Neuroscience (1990) 38:245-253; Feamley y Lees, Brain (1991) 114:2283-2301; Schulzer *et al.*, Brain (1994) 117:509-516). En el modelo usado en el presente documento, el número de neuronas positivas para CTB en el lado con lesión del SN era del 28,9% del valor contralateral a las 4 semanas tras la lesión. Esto concuerda con estudios previos usando marcaje retrógrado con Fluoro-gold (FG) que demostraron el 28,8% (35 días tras la lesión) (Kozlowski *et al.*, Exp. Neurol. (2000) 166:1 15) o el 34% (4 semanas tras la lesión) (Sauer y Oertel, Neuroscience (1994) 59:401-415) de células positivas para FG en el SN con lesión. Además, la mayoría de las neuronas marcadas con CTB eran positivas para TH, lo que sugiere que parte de la proyección nigroestrial permanecía intacta en el momento de inyección del vector de VAA. Sin limitarse a ninguna teoría particular, estas partes restantes de proyecciones nigroestriales intactas y neuronas DA pueden servir como sustrato para la regeneración y recuperación funcional tras la administración de genes de MANF.

Se han descrito modelos animales de otras enfermedades neurodegenerativas y son útiles para evaluar la eficacia terapéutica de polinucleótidos de MANF administrados por virus en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos además de EP. Por ejemplo, Martin *et al.* (1995) Brain Res. 683:172-178 describen un modelo animal de epilepsia, Matheson *et al.* (1997) NeuroReport 8:1739-1742 y Oppenheim *et al.* (1995) Nature 373:344-346 describen modelos de neurodegeneración que resulta de traumatismo físico, y Sagot *et al.* (1996) J. Neurosci. 16:2335-2341 describen un modelo de degeneración de neuronas motoras en animales.

DIAGNÓSTICOS

También se describen kits de diagnóstico o pronóstico para su uso en la detección de la presencia de MANF o variante alélica del mismo en una muestra biológica. El kit proporciona medios para el diagnóstico de estados dependientes de MANF tal como se describió anteriormente en el presente documento o para evaluar la predisposición de un individuo a estados mediados por variación o disfunción de MANF. El kit puede comprender un compuesto marcado que puede detectar polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo ARNm) de MANF en una muestra biológica. El kit también puede comprender cebadores o sondas de ácido nucleico que pueden hibridarse específicamente con al menos parte de un gen de MANF o variante alélica del mismo. El kit puede envasarse en un recipiente adecuado y contiene preferiblemente instrucciones para el uso del kit.

PURIFICACIÓN DE RECEPTOR

El MANF o análogo de MANF puede usarse para la purificación por afinidad del receptor que se une al MANF. MANF es un ligando preferido para purificación. En resumen, esta técnica implica: (a) poner en contacto una fuente de receptores de MANF con un MANF inmovilizado en condiciones mediante las cuales el receptor de MANF que va a purificarse se adsorbe selectivamente sobre el MANF inmovilizado; (b) lavar el MANF inmovilizado y su soporte

para eliminar material no adsorbido; y (c) eluir las moléculas de receptor de MANF del MANF inmovilizado al que están adsorbidas con un tampón de elución. En una purificación por afinidad particularmente preferida, se fija covalentemente MANF a una resina o matriz inerte y porosa (por ejemplo, agarosa que se hace reaccionar con bromuro de cianógeno). Se prefiere especialmente una inmunoadhesina de MANF inmovilizada sobre una columna de proteína A. Entonces se hace pasar una disolución que contiene receptor de MANF a través del material cromatográfico. El receptor de MANF se adsorbe sobre la columna y posteriormente se libera cambiando las condiciones de elución (por ejemplo cambiando el pH o la fuerza iónica).

La técnica preferida para identificar moléculas que se unen al MANF usa un MANF quimérico (por ejemplo, MANF marcado con etiqueta de epítopo o inmunoadhesina de MANF) fijado a una fase sólida, tal como el pocillo de una placa de ensayo. Puede medirse la unión de las moléculas candidatas, que están opcionalmente marcadas (por ejemplo, radiomarcadas), al MANF inmovilizado.

PRODUCCIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

Pueden usarse ácidos nucleicos que codifican para MANF, preferiblemente de especies no humanas, tales como proteína murina o de rata, para generar o bien animales transgénicos o bien animales “deficientes” que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el examen de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón) es un animal que tiene células que contienen un transgén, transgén que se introdujo en el animal o un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, embrionario. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. El ADNc humano y/o de ratón que codifica para MANF, o una secuencia apropiada del mismo, puede usarse para clonar ADN genómico que codifica para MANF según técnicas establecidas y usarse las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica para MANF. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, se seleccionarán como diana células particulares para la incorporación de transgén de MANF con potenciadores específicos de tejido, lo que puede dar como resultado un efecto de tratamiento deseado. Pueden usarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica para MANF introducido en la línea germinal del animal en un estadio embrionario para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica para MANF. Tales animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos que se piensa que confieren protección, por ejemplo, frente a enfermedades relacionadas con MANF. Se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida de la enfermedad, en comparación con animales no tratados que portan el transgén, indicará una posible intervención terapéutica para la enfermedad.

Ahora está bien establecido que los transgenes se expresan más eficazmente si contienen intrones en el extremo 5’, y si son intrones que se producen de manera natural (Brinster *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836-840 (1988); Yokode *et al.*, Science 250:1273-1275 (1990)).

La descendencia transgénica se identifica demostrando la incorporación del transgén microinyectado en sus genomas, preferiblemente preparando ADN a partir de secciones cortas de la cola y analizando mediante transferencia de tipo Southern para determinar la presencia del transgén (“análisis por transferencia de la cola”). Una sonda preferida es un segmento de un constructo de fusión de transgén que está presente de manera única en el transgén y no en el genoma del ratón. Alternativamente, la sustitución de una secuencia natural de codones en el transgén por una secuencia diferente que todavía codifica para el mismo péptido proporciona una región única identificable en el análisis de ADN y ARN. Se crían ratones “fundadores” transgénicos identificados de esta manera con ratones normales para proporcionar heterocigotos, que se someten a retrocruzamiento para crear una línea de ratones transgénicos. Se examinan los análisis por transferencia de la cola de cada ratón de cada generación hasta que se establece la variedad y es homocigótica. Cada ratón fundador satisfactoriamente creado y su variedad varían de otras variedades en cuanto a la ubicación y el número de copias de transgenes insertados en el genoma del ratón, y por tanto tienen niveles de expresión de transgén ampliamente variables. Se sacrifican animales seleccionados de cada línea establecida a los 2 meses de edad y se analiza la expresión del transgén mediante transferencia de tipo Northern de ARN de hígado, músculo, grasa, riñón, cerebro, pulmón, corazón, bazo, gónada, glándula suprarrenal e intestino.

PRODUCCIÓN DE ANIMALES “DEFICIENTES”

Alternativamente, los homólogos no humanos de MANF pueden usarse para construir un animal “deficiente” en MANF, es decir, que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica para MANF, como resultado de recombinación homóloga entre el gen de MANF endógeno y un ADN de MANF genómico alterado introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc de MANF murino para clonar ADN de MANF genómico según técnicas establecidas. Puede delecionarse una parte del ADN de MANF genómico o sustituirse por otro gen, tal como un gen que codifica para un marcador seleccionable que puede usarse para monitorizar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (en los extremos tanto 5’ como 3’) en el vector (véase por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante

electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno (véase por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69:915 (1992)). Entonces se inyectan las células seleccionadas en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón) para formar quimeras de agregación (véase por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152). Entonces puede implantarse un embrión quimérico en un animal adoptivo hembra pseudoembarazado adecuado y se lleva el embrión a término para crear un animal "deficiente". La progenie que alberga el ADN recombinado de manera homóloga en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga. Los animales deficientes pueden caracterizarse por su capacidad para imitar defectos y trastornos neurológicos humanos.

EQUIVALENTES

Aunque se han dado a conocer en detalle realizaciones particulares en el presente documento, esto se ha hecho a modo de ejemplo únicamente con fines de ilustración, y no se pretende que sea limitativo con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas a continuación. Se cree que la elección de material de partida de ácido nucleico, clon de interés, o tipo de biblioteca es una cuestión rutinaria para un experto habitual en la técnica con conocimiento de las realizaciones descritas en el presente documento.

Habiendo descrito de manera general la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Clonación y análisis de expresión mediante RT-PCR. Se clonó ADNc de *MANF* de longitud completa de ser humano y de ratón mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa). Se obtuvieron ARN humanos de tejidos periféricos y de cerebro total de Clontech (Mountain View, CA). Se aislaron ARN de regiones de cerebro humano post-mórtem y ARN totales de ratón usando reactivo RNAwiz de Ambion (Applied Biosystems, Austin, TX). Se sintetizaron ADNc de primera hebra con transcriptasa inversa Superscript^{II} (Invitrogen, Carlsbad, CA) según las recomendaciones del fabricante usando ARN total cebado con oligo(dT) (5 μg) o ARN con poli(A)$^+$ (1 μg) de diferentes tejidos como molde. Los cebadores usados para PCR fueron

hMANF-ATG2, 5'-ACCATGTGGGCCACGCAGGGGCT-3' y *hMANF*-stop-del, 5'-CAAATCGGTCGGTGCACTGGCTG-3' (para MANF humano);

mManf-ATG, 5'-ACCATGTGGGCTACGCGCGGGCT-3' y m*Manf*-stop-del, 5'-CAGATCAGTCCGTGCGCTGGCTG-3' (para *Manf* de ratón).

Se realizaron reacciones PCR para *MANF* humano y de ratón usando un sistema de PCR de alta fidelidad Expand™ (Roche Molecular Biochemicals, Basilea, Suiza), según las instrucciones del fabricante en un volumen de reacción de 25 μl y con 1/20 de la reacción de transcriptasa inversa como molde. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94ºC (2 min); 15 ciclos de 94ºC (30 s), 60ºC (30 s), 72ºC (30 s) y 20 ciclos adicionales con un tiempo de extensión de 30 s + 5 s/ciclo. Se resolvieron los productos de PCR amplificados en gel de agarosa al 1,2%. Se clonaron los productos de PCR en pCRII (Invitrogen) y se secuenciaron.

Expresión transitoria de proteínas. Se transfectaron transitoriamente células COS-7 o HEK 293T con MANF humano en pcDNA3.1-V5-His (Invitrogen) o con pEGFP-C1 (Clontech) tal como se describe (Lindholm *et al.*, 2007). Se resolvieron muestras de proteínas de células y sobrenadantes de cultivo con electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE), y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos policlonales de conejo anti-MANF (1:1000) y método de detección por quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham, Buckinghamshire, R.U.). Para la secuenciación amino-terminal y el análisis de masa, se usó cromatografía de afinidad de Ni (véase a continuación) para purificar proteína MANF recombinante con etiquetas de V5 e His carboxi-terminales secretadas por células COS-7 transfectadas de manera transitoria.

Producción de proteínas en células Sf9. Se clonó un ADNc que codifica para MANF en vector pMIB (sistema InsectSelect; Invitrogen) con etiquetas de V5 e His carboxi-terminales, y se estableció una línea de células Sf9 policlonales estables que secretaba proteína MANF según las instrucciones del fabricante. Se purificó MANF a partir del sobrenadante de cultivo usando cromatografía de afinidad de Ni. Se ajustó el sobrenadante a pH 7,4 con PBS que contenía imidazol 5 mM y se incubó con resina Chelating Sepharose Fast Flow cargada con Ni^{2+} (Amersham) durante 1 h a +4ºC. Se lavó la matriz con KCl 0,3 M en PBS, y se eluyó la proteína con imidazol 0,5 M en PBS, pH 7,4. Se concentró la muestra con dispositivos Centricon YM-10 (Millipore, Billerica, MA). Se usó cromatografía de intercambio catiónico para la purificación adicional. Se diluyó la muestra en tampón fosfato de Na 40 mM, pH 6,0, y

se aplicó a una columna Resource S (1 ml, Amersham). Se eluyó proteína MANF con un gradiente de NaCl 0-1 M en tampón fosfato de Na 40 mM, pH 7,5. Se concentró MANF, y se cambió simultáneamente el tampón por PBS.

Producción de proteínas en E. coli. Se clonó el marco de lectura abierto de *MANF*, excluyendo la región que codifica para el péptido señal, en un vector basado en *T7lac* que contenía una fusión de etiqueta de His (Peränen *et al.*, 1996; Peränen y Furuhjelm, 2001). Se transformó el vector en células Origami B (Novagen, Darmstadt, Alemania), y se expresó la proteína en presencia de IPTG durante 3 h a 37ºC. Se lisaron las células en tampón A (Tris HCl 20 mM, pH 8,0, Triton X-100 al 0,5%, PMSF 0,4 mM) mediante sonicación. Se añadieron NaCl e imidazol hasta una concentración final de 0,5 M y 0,02 M respectivamente. Tras centrifugación (15.000xg, 15 min a 4ºC) se hizo pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 μM. Se purificó la proteína MANF mediante el kit HisTrap según el fabricante (GE Healthcare, Buckinghamshire, R.U.). Tras la purificación se cambió el tampón de la proteína eluída (tampón fosfato 20 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM) mediante una columna PD-10. Se escindió la etiqueta de His mediante AcTEV (Invitrogen), y se hicieron pasar los productos escindidos a través de la columna HiTrap Chelating para deshacerse de la etiqueta, y se obtuvo el MANF escindido en el flujo a través. Finalmente se hizo pasar MANF a través de una columna HiTrap Q para deshacerse de pequeños contaminantes de AcTEV y etiqueta de His. Entonces se concentró MANF mediante un dispositivo de filtro Amicon Ultra-4 (Millipore), y se cambió simultáneamente el tampón por PBS. Se almacenaron alícuotas de MANF a -80ºC.

Secuenciación N-terminal y espectrometría de masas. Se purificaron proteínas MANF producidas en células COS-7, *E. coli* o Sf9 y se aplicaron a cromatografía de fase inversa en una columna 1 x 20 mm TSKgel TMS250 (C1, 10 μm, 250 Å, TosoHaas, Tokio, Japón). Se realizó la elución con un gradiente lineal de acetonitrilo (el 0-100% en 60 min) en ácido trifluoroacético al 0,1% usando una velocidad de flujo de 50 μl/min. Se recogieron proteínas MANF y se sometieron a análisis de secuencia amino-terminal en un secuenciador Procise 494A (Perkin Elmer, Waltham, MA). Para la espectrometría de masas por electropulverización, se usó un instrumento Q-TOF (Micromass Ltd., Manchester, R.U.) calibrado de manera externa e interna con mioglobina de caballo (16952,0 Da). Tras la digestión con tripsina, se realizó un análisis de huella de masa de péptidos con un espectrómetro de masas Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF) tal como se describe (Poutanen *et al.*, 2001).

Hibridación de tipo Northern. Se generó sonda de ADN de *Manf* de ratón mediante cebado al azar con el sistema Rediprime II y Redivue dCTP-^{32}P (Amersham). Se eliminó la radiactividad no unida con columna Illustra NICK (GE Healthcare). Se diluyó la sonda de *Manf* marcada en tampón de hibridación (formamida al 50%, 5 x SSC, 1x solución de Denhardt, SDS al 0,3%, ADN de esperma de arenque 100 μg/ml) a una actividad de 2,5 x 10^6 cpm/ml y se hibridó con una transferencia de tejido de ratón de MTN (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) a 42ºC durante la noche. Tras la hibridación, se lavó la transferencia con 2 x SSC, SDS al 0,1% a 65ºC. Se detectó la señal de hibridación usando una placa de obtención de imágenes BAS-III (Fujifilm, Tokio, Japón) junto con un sistema de obtención de imágenes BAS-1500 y el software TINA.

Hibridación in situ y análisis de imágenes. Se usó ADNc de longitud completa que codificaba para *Manf* de ratón (n.º de registro de GenBank NM_029103, nucleótidos 41-577) en pCRII para preparar sondas de ARNc antisentido y sentido de control. Se linealizó el plásmido con enzimas seleccionadas, y se sintetizaron sondas mediante transcripción *in vitro* usando UTP marcado con ^{35}S (Amersham) y sistema de transcripción *in vitro* de SP6 o T7 (Promega, Madison, WI). Se analizaron secciones coronales (14 μm) de cerebro de ratones NMRI posnatales (P1, P10) y adultos congeladas recientes, o secciones en parafina de ratón embrionario (8 μm) mediante hibridación *in situ* tal como se describió anteriormente (Reeben *et al.*, 1998). Las temperaturas de hibridación y de lavado fueron de 52ºC y 65ºC para alta rigurosidad, respectivamente. Se sumergieron las secciones en emulsión NTB-2 (Kodak Nordic, Upplands Väsby, Suecia), se revelaron tras 5 días y se contratiñeron con hematoxilina. Se obtuvieron imágenes de campo oscuro y de campo claro con un microscopio Olympus BX61 (Olympus, Tokio, Japón) y software AnalySIS. Se usó Adobe Photoshop para el procesamiento de imágenes. Para estudios de SE e isquemia, se congelaron cerebros sobre nieve carbónica en polvo, y se prepararon secciones coronales de 12 μm de grosor en criostato. Se realizó hibridación *in situ* tal como se describió anteriormente. Se realizó el análisis de densidades ópticas mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ Image 1.34 (procesamiento y análisis en Java desarrollado en los National Institutes of Health). Se usaron niveles de gris para patrones en la calibración polinomial de tercer grado para obtener valores equivalentes de radiactividad tisular (nCi/g).

Producción y especificidad de anticuerpos. Se usó MANF purificado de *E. coli* para la inmunización de dos conejos tal como se describió anteriormente (Peränen y Furuhjelm, 2001). Se purificó el antisuero por afinidad usando MANF recombinante acoplado a perlas de CNBr-Sepharose (Amersham) (Peränen y Furuhjelm, 2001). Se evaluó la especificidad de anticuerpos frente a MANF purificados por afinidad en inmunotransferencia de tipo Western e inmunohistoquímica preincubando el anticuerpo purificado por afinidad con MANF recombinante. Para la inmunotransferencia de tipo Western, se preincubaron anticuerpos frente a MANF (1:1000 en leche desnatada al 5%, Tween 20 al 0,1% en TBS) con MANF humano (20 μg/ml) o proteína CDNF de ratón (20 μg/ml), respectivamente, a +4ºC durante la noche antes de aplicarse sobre inmunotransferencias de tipo Western. Para la inmunohistoquímica, se preincubaron anticuerpos frente a MANF con proteína MANF humana (2 μg/ml) en suero de cabra normal al 3%, Triton X-100 al 0,2% en PBS durante la noche antes de aplicarse sobre secciones histológicas.

Extractos de proteína tisular. Se prepararon extractos de proteína de muestras de tejido congeladas frescas recogidas de ratones NMRI o C57BL/6 adultos tal como se describió anteriormente (Lindholm *et al.*, 2007). Se resolvieron las muestras en SDS-PAGE al 15%, se sometieron a transferencia y se analizaron con anticuerpos de conejo anti-MANF (1:1000) o de ratón anti-actina AC-40 (1:1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Inmunohistoquímica. Se sometieron ratones NMRI adultos a perfusión transcardíaca con paraformaldehído al 4% (PFA). Se disecaron los cerebros, se fijaron posteriormente durante la noche con PFA al 4% a +4ºC, se deshidrataron en series ascendentes de etanol, se clarificaron en xileno, se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones de 8 μm en el plano coronal o sagital. Se fijaron cerebros disecados de ratones posnatales (P1, P10), cabezas embrionarias de ratón disecadas (E17) o embriones de ratón completos (E13, 17) con PFA al 4% durante la noche a +4ºC. Se fijaron cerebros disecados de ratones embrionarios (E14, E16) con PFA al 4% durante 4 h a +4ºC. Se cortaron en secciones cerebros embrionarios y posnatales en el plano coronal, cabezas embrionarias en el plano transversal y embriones completos en el plano sagital, respectivamente. Para la recuperación de antígenos, se sometieron secciones desparafinizadas a microondas en tampón citrato en ebullición, pH 6,0, durante 10 min. Se tiñeron las secciones con anticuerpos anti-MANF (1:100) usando el kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y 3,3'-diaminobencidina (DAB). Se contratiñeron secciones de cerebro adulto con violeta de cresilo.

Inducción de isquemia prosencefálica global. Se realizaron los procedimientos en los experimentos de isquemia y estado epiléptico (véase a continuación) según directrices nacionales y los aprobó el Comité Ético de Malmö-Lund para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Se alojaron veinte ratas Wistar macho (Taconic M&B A/S), que pesaban de 280 a 290 g en el momento del ataque isquémico, en condiciones de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad con acceso a voluntad a comida y agua. Tras ayunar durante la noche, se anestesiaron los animales mediante inhalación de halotano al 3,5%, se intubaron y después se les sometió a ventilación artificial con halotano al 1-2% en N_2O:O_2 (70:30). Se canularon la arteria y la vena de la cola para extraer muestras de sangre y registrar la tensión arterial, y para la infusión de fármaco, respectivamente. Se usó un termómetro colocado en el recto para medir la temperatura corporal, que se mantuvo a aproximadamente 37ºC mediante una almohadilla de calentamiento. Se aislaron las arterias carótidas comunes. Entonces se administraron cincuenta UI de heparina, se redujo la concentración de halotano hasta el 0,5%, y se realizó la infusión de bromuro de vecuronio (Organon Teknika B.V., Boxtel, Holanda) por vía intravenosa a 2 mg/h como relajante muscular. Siguió un periodo de estado estacionario de 30 min durante el cual se monitorizaron los parámetros fisiológicos y el electroencefalograma (EEG). Se indujo isquemia mediante oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes combinado con hipotensión (tensión arterial de 40-50 mm de Hg) lograda mediante extracción de sangre de la vena yugular (Smith *et al.*, 1984). Se restauró la circulación tras 10 min mediante reinfusión de sangre y eliminación de las pinzas oclusivas. En el periodo de recirculación inmediata, se administró bicarbonato de sodio (0,5 ml por vía intravenosa, 50 mg/ml) para prevenir la acidosis sistémica. Se decapitaron los animales a las 2 y 24 h y 1 semana tras la reperfusión (n=4 para cada grupo). Se trataron animales sometidos a operación simulada (n=6) de manera idéntica, pero no se ocluyeron las arterias carótidas comunes.

Inducción de estado epiléptico. Se anestesiaron veinticuatro ratas Sprague-Dawley (B&K Universal, Estocolmo, Suecia), que pesaban 220-250 g al comienzo de los experimentos, con halotano y se les implantó un electrodo de estimulación y de registro de acero inoxidable, aislado, retorcido (Plastics One, Roanoke, VA) de manera unilateral en la región CA1-CA3 del hipocampo ventral (coordenadas: 4,8 mm caudal y 5,2 mm lateral con respecto al bregma, 6,3 mm ventral con respecto a la duramadre, barra para dientes a -3,3 mm). Diez días tras la implantación del electrodo, se sometieron 18 ratas a estado epiléptico (SE) inducido eléctricamente tal como se describió originalmente por (Lothman *et al.*, 1989). Las ratas recibieron 1 h de estimulación por encima del umbral que consistía en trenes de 10 s de pulsos de onda cuadrada bifásica de 1 ms a una frecuencia de 50 Hz. Se interrumpió la estimulación cada 10 min durante 1 min para permitir el registro de EEG y la medición de posdescargas (MacLab; AD Systems, Hastings, R.U.). Tras terminar la estimulación, todas las ratas mostraron actividad de EEG de hipocampo ictal continua, autosostenida, que estaba asociada con gravedad variable de las convulsiones conductuales motoras, clasificadas como ataques parciales y generalizados (Racine, 1972). Tanto las convulsiones conductuales como la actividad de EEG ictal se detuvieron en todas las ratas tratadas con pentobarbital (40 mg/kg i.p.) a las 2 h tras el inicio de la estimulación. Se decapitaron los animales a las 2 y 24 h y 1 semana tras el final de SE. Se distribuyeron aleatoriamente animales con perfil de SE focal y generalizado (Mohapel *et al.*, 2004) entre los grupos. Los animales de control no se estimularon eléctricamente, pero por lo demás se trataron de la misma manera que los de experimentación.

Análisis estadístico. Se realizaron comparaciones usando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor seguido por prueba de Bonferroni-Dunn de comparaciones múltiples a posteriori. Los datos se presentan como medias ± EEM, y las diferencias se consideran significativas a $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software StatView, versión 5.0.1 (Abacus Concepts, Berkeley, CA).

Resultados

MANF es una proteína secretada con puentes disulfuro intramoleculares

Se clonó ADNc longitud completa que codifica para MANF humano y de ratón a partir de hígado y cerebro, respectivamente, mediante RT-PCR. Basándose en el análisis de secuencia, la secuencia de aminoácidos de MANF humano (n.º de registro de SwissProt P55145) era homóloga en un 98% con proteína MANF de ratón (n.º de registro de GenBank NP_083379), en un 82% con *Xenopus laevis* (n.º de registro de Genbank AAH82888), en un 72% con proteína MANF de pez cebra *Danio rerio* (n.º de registro de GenBank AAI24317) y en un 50% con proteína MANF de *Caenorhabditis elegans* (n.º de registro de GenBank NP_500273), respectivamente (figura 1A, tabla 1). Es importante observar que las secuencias de MANF humano (ARMET) presentadas a GenBank (por ejemplo, n.º de registro AAI13589) todavía contienen partes de la región rica en arginina, que aparentemente no se traduce *in vivo* (Petrova *et al.*, 2003).

Con el fin de verificar que MANF es una proteína secretada, se subclonó un ADNc que codifica para MANF humano en un vector de expresión en mamíferos y se transfectó transitoriamente en células HEK293T de riñón embrionario humano. Basándose en análisis de inmunotransferencia de tipo Western, se secretó satisfactoriamente MANF humano nativo a partir de las células (figura 1C). De manera conforme con eso, MANF también se secretó a partir de células COS-7 de riñón de mono verde africano, MN1 híbridas de motoneurona embrionaria de ratón y Neuro 2A de neuroblastoma humano (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares con células transfectadas con ADNc de *Manf* de ratón (datos no mostrados). A continuación, se purificó por afinidad la proteína MANF humana recombinante que contenía etiquetas de V5 e His carboxi-terminales (hMANF-V5-His) del medio de cultivo de células COS-7 transfectadas transitoriamente y se sometió a secuenciación amino-terminal y análisis de espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ESI-EM). Se determinó que la secuencia amino-terminal de MANF humano era LRPGDXEVXI..., lo cual verificó un sitio de escisión de péptido señal tras el aminoácido 21 (alanina; figura 1A). Las posiciones X en la secuencia determinada corresponden a residuos de cisteína en la secuencia de MANF y no pueden detectarse mediante degradación de Edman a partir de la muestra no alquilada. Tras la escisión de la secuencia señal, el MANF humano nativo, maduro, consiste en 158 aminoácidos (figura 1B). En la espectrometría de masas con electropulverización, hMANF-V5-His secretado a partir de células COS-7 dio una masa de 23194,0 Da, lo cual es 4 Da menor que la masa promedio (23198,0 Da) calculada a partir de la secuencia de aminoácidos. Esto sugiere la presencia de dos puentes disulfuro en la proteína y también indica que MANF secretado a partir de células COS-7 no estaba glicosilado.

Se usó un sistema de expresión en *E. coli* para producir proteína MANF humana recombinante en cantidades superiores (figura 1D). La masa molecular de esta proteína, determinada mediante ESI-EM, era 8 Da menor que la masa calculada a partir de la secuencia de aminoácidos, lo que sugiere la presencia de cuatro puentes disulfuro intramoleculares. También se creó una línea de células de insecto Sf9 transfectada de manera estable con un ADNc que codifica para MANF humano con etiquetas de V5 e His carboxi-terminales (figura 1E). El análisis de ESI-EM de la proteína MANF secretada a partir de células Sf9 sugirió que esta proteína tenía cuatro puentes disulfuro intramoleculares y no estaba glicosilada. También se sometieron las proteínas MANF purificadas, tras SDS-PAGE, a identificación mediante digestión en gel y análisis de huella de masa de péptidos mediante EM de MALDI-TOF.

Distribución extendida de ARNm de *Manf en el cerebro y tejidos no neuronales de ratón y ser humano*

En primer lugar, se usó hibridación de tipo Northern y RT-PCR para analizar la expresión de ARNm de *Manf* en tejidos de ratón en desarrollo y adulto (figuras 2A-D). El análisis de tipo Northern reveló expresión diferencial de un único transcrito de *Manf* de 1,1 kb (figura 2A) en tejidos de ratón adulto. Se detectaron altos niveles de ARNm de *Manf* en el hígado y los testículos de ratón adulto en comparación con bajos niveles de *Manf* en el cerebro, pulmón y músculo esquelético. También se detectó ARNm de *Manf* en el riñón, corazón y bazo. Según la hibridación de tipo Northern, el análisis mediante RT-PCR detectó altos niveles de transcritos de *Manf* en el hígado y los testículos de ratón adulto, y bajos niveles en el músculo esquelético (figura 2B). En el cerebro, se encontró expresión de *Manf* en todos los estadios embrionarios y posnatales estudiados (figura 2B), y en todas las regiones de cerebro adultas analizadas, incluyendo el cuerpo estriado y mesencéfalo (figura 2C) y en mesencéfalo en desarrollo (figura 2D). También se estudió la expresión de transcritos de *MANF* en regiones de cerebro humano adulto (figura 2E) y en varios tejidos no neuronales adultos (figura 2F) mediante RT-PCR. Se detectó ARNm de *Manf* humano en todos los tejidos analizados, lo cual se pareció a la expresión de transcritos de *Manf* observados en tejidos de ratón.

A continuación, se prepararon anticuerpos policlonales generados contra MANF humano y se estudió la expresión de proteína MANF en tejidos de ratón mediante inmunotransferencia de tipo Western. Según los datos de expresión de ARNm obtenidos, se detectaron altos niveles de proteína MANF en el hígado, los testículos y la glándula salival adultos (figura 2G). Los anticuerpos frente a MANF reconocieron específicamente MANF pero no la proteína CDNF homóloga en extractos de tejido de ratón adulto (figura 2H), lo cual confirmó la especificidad de anticuerpos frente a MANF.

Se usó análisis mediante hibridación *in situ* para estudiar la localización celular de ARNm de *Manf* en cerebro de ratón adulto y posnatal (figuras 3, 4). En el adulto, se detectó una distribución extendida de transcritos de *Manf* (figura 3A-I). Gránulos de color plata que indican la expresión de *Manf* se colocalizaron principalmente con núcleos neuronales de color claro, que se identificaron mediante contratinción con hematoxilina en comparación con núcleos más pequeños, teñidos con color más oscuro, de las células de la glía (figura 4). En el bulbo olfatorio, se detectaron altos niveles de ARNm de *Manf* en el núcleo olfatorio anterior y la capa de células mitrales (figuras 3A, 4A). En la

corteza cerebral, la expresión de ARNm de *Manf* fue relativamente alta a lo largo de las capas corticales II-VI (figura 3B, 4B). Sólo podían verse unos pocos granos de color plata de fondo en las células corticales hibridadas con la sonda de ARNc sentido de control (figura 4C), lo cual confirmó la especificidad de la señal de hibridación. También se detectó expresión de *Manf* abundante en la corteza piriforme (figuras 3C, 4D). En el cuerpo estriado dorsal (putamen caudado), se detectó un nivel moderado señal de ARNm de *Manf* (figuras 3B, 4E). En el tálamo, se detectó una fuerte señal de hibridación de *Manf* en el núcleo paraventricular y en el núcleo del lecho de la estría terminal (figuras 3C, 4F). En el hipocampo, se localizó una fuerte señal específica para *Manf* en las regiones CA1-CA3 piramidales y en la capa granular y polimorfa de la circunvolución dentada (figuras 3D-F, 4G-I), y era especialmente intensa en la región piramidal CA3 (figura 4I). En la zona preóptica y el hipotálamo, se observó expresión de ARNm de *Manf* en varios núcleos, incluyendo núcleo preóptico (figura 3C), núcleos dorsomedial y ventromedial (figura 3D), y en el núcleo mamilar medial (figura 3E). Se detectó un nivel intermedio de señal de *Manf* en la sustancia negra (figuras 3F, 4J). Células de Purkinje cerebelosas expresaron fuertemente ARNm de *Manf* (figura 3G, H). En el puente troncoencefálico y la médula, se expresó ARNm de *Manf* en varias regiones, incluyendo el núcleo vestibular medial y el núcleo facial (figura 3G), el locus cerúleo (figura 4K) y el núcleo reticular pontino (figura 4L). Además, se detectaron altos niveles de transcritos de *Manf* en las células no neuronales del plexo coroideo (figura 3C). De manera parecida a los resultados obtenidos a partir del adulto, también se detectó una señal de hibridación *in situ* de *Manf* extendida en el cerebro de ratones posnatales en el día 1 (P1; figura 3M-O) y P10 (figura 3J-L). Se localizaron niveles especialmente altos de ARNm de *Manf* en la formación del hipocampo (figura 3K-L, M). La señal de *Manf* también era relativamente abundante en la corteza cerebral (figura 3J, M, N). La señal de hibridación detectada era específica para transcritos de *Manf,* dado que sólo se detectó una débil señal de fondo en secciones hibridadas con sonda de ARNc sentido de control (figura 3O).

Localización inmunohistoquímica de proteína MANF en tejidos de ratón adulto y posnatal

Se usó inmunohistoquímica para estudiar la localización celular de la proteína MANF en el cerebro y en tejidos no neuronales seleccionados de ratón adulto. Se detectó una distribución extendida de MANF (figura 5), que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos mediante análisis por RT-PCR e hibridación *in situ* de tejidos de ratón adulto. En el cerebro de ratón adulto, se encontró proteína MANF en varias regiones (figura 5A-K), y principalmente en células de morfología neuronal. En la corteza cerebral, se observó expresión de MANF relativamente fuerte en las capas corticales II-VI (figura 5A, B). Las células grandes, especialmente de tipo piramidal, en la capa III tenían un intenso marcaje (figura 5B). Se evaluó la especificidad de anticuerpos frente a MANF preincubando los anticuerpos con proteína MANF antes de la aplicación sobre secciones tisulares. Dado que esta preincubación eliminó el marcaje de MANF de células corticales (figura 5C), se concluyó que los anticuerpos frente a MANF reconocían específicamente proteína MANF en secciones tisulares. En el hipocampo, se detectó proteína MANF en neuronas de las regiones piramidales CA1-CA3 (figura 5D) y en la circunvolución dentada (figura 5E). En el cuerpo estriado, se observó una tinción de MANF clara pero débil (figura 5F). En la sustancia negra, se detectaron células positivas para MANF dispersadas principalmente en la zona de la porción reticular (figura 5G, H). Se detectó marcaje de MANF especialmente fuerte en las células de Purkinje del cerebelo (figura 5I). De manera notable, se localizó proteína MANF no sólo en los cuerpos de células de Purkinje sino también en las dendritas que se extienden hasta la capa molecular (figura 5I). También se observó un fuerte marcaje de MANF en células localizadas en la médula espinal (figura 5J), y células no neuronales del plexo coroideo (figura 5K). En los tejidos periféricos estudiados, el marcaje de MANF era intenso en túbulos serosos de la glándula salival (figura 5L). En los testículos, se detectaron ARNm y proteína de *Manf* en túbulos seminíferos mediante hibridación *in situ* (figura 5M) e inmunohistoquímica (figura 5N), respectivamente. Se encontró proteína MANF principalmente en espermatocitos tempranos (figura 5N).

También se estudió la localización de proteína MANF en secciones de cerebro de ratón posnatal P1 y P10 (figura 6). La expresión de proteína MANF detectada fue bastante similar y coincidía bien con el patrón de expresión observado en el cerebro adulto. A P1, el marcaje de MANF era intenso en la capa de células mitrales del bulbo olfatorio (figura 6A). Varias regiones de cerebro presentaron tinción positiva para MANF, incluyendo el cuerpo estriado (figura 6B), hipocampo (figura 6C, D), tálamo (figura 6E), corteza cerebral (figura 6F) y sustancia negra (figura 6G). A P10, se detectó una señal de MANF relativamente fuerte en el hipocampo y el tálamo (figura 6H, I, J), en contraste con la señal débil observada en el cuerpo estriado (figura 6K). En la SN de cerebro de ratón P10, se localizó tinción de MANF principalmente en células de la zona de la porción reticulada (figura 6L). Se colocalizó proteína MANF con marcador neuronal NeuN en células de corteza cerebral P10 (figura 6M, N), lo que indica que MANF se expresaba principalmente en neuronas.

La expresión de Manf comienza pronto en el desarrollo embrionario de ratón

Se estudió la expresión de proteína y ARNm de *Manf* en tejidos de ratón embrionario usando hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. El análisis mediante hibridación *in situ* de secciones de embriones de ratón E12,5 reveló una amplia expresión de transcritos de *Manf* en el cerebro. Se detectó una expresión de ARNm de *Manf* prominente en la parte superior de la corteza neopalial (figura 7A-C). También se detectaron transcritos de *Manf* en el mesencéfalo y cuerpo estriado embrionarios, aunque el nivel de expresión era relativamente bajo. Células no neuronales del plexo coroideo en los ventrículos laterales expresaron altos niveles de *Manf* (figura 7D). En el SNP de embriones E12,5, se detectó expresión de *Manf* a un nivel relativamente bajo en ganglios de la raíz dorsal y trigeminales. Fuera del sistema nervioso, se detectó una alta señal específica para *Manf* en los primordios cartilaginosos de la cabeza y

vertebras (figura 7E). Los niveles de ARNm de *Manf* también eran altos en el hígado y en vasos umbilicales (figura 7A, B). Se detectó marcaje específico para *Manf* a un nivel relativamente bajo en muchos órganos en desarrollo de embriones de ratones E12,5, incluyendo el pulmón, el metanefros y el intestino. Según los datos de ratón E12,5, también se detectó expresión extendida de ARNm de *Manf* en embriones de ratón E15 (datos no mostrados). Se observó una robusta expresión de ARNm de *Manf* en la glándula salival de embriones de ratón E17 (figura 7F). Mediante análisis inmunohistoquímico, se detectó proteína MANF a niveles relativamente altos en la parte superior de la corteza neopalial de embriones de ratón E14 (figura 8A). En el cuerpo estriado (eminencia ganglionar), la señal de MANF era baja (figura 8B). Se detectó una intensa tinción de MANF en el surco medio (figura 8C). De manera similar al adulto, se detectaron altos niveles de proteína MANF en el plexo coroideo de cerebro embrionario E14 (figura 8D). En el mesencéfalo de embriones de ratón E16, se detectó proteína MANF en la sustancia negra en desarrollo, aunque la señal era bastante moderada (figura 8E, F). La SN en desarrollo en secciones de cerebro embrionario se identificó mediante tinción con tirosina hidroxilasa de secciones paralelas a las usadas para la tinción de MANF (figura 8G). En el SNP, se detectó proteína MANF en DRG, SCG y ganglios trigeminales de ratón embrionario E17 (figura 8H-J). En la capa del manto de la médula espinal, la señal de MANF era relativamente baja, aunque también se encontraron algunas células fuertemente positivas (figura 8K). En los tejidos no neuronales de embriones de ratón E17, se detectó una abundante expresión de MANF en la glándula submandibular (figura 8L) y en túbulos serosos ubicados en la cavidad nasal (figura 8M). También se detectaron altos niveles de proteína MANF en el páncreas de embriones de ratón E17 (figura 8N). De manera interesante, se detectaron células fuertemente positivas para MANF en el órgano vomeronasal (figura 8O), y en varias células epiteliales, incluyendo el epitelio olfatorio. Según el análisis mediante hibridación *in situ*, se detectó proteína MANF en el hígado y en los primordios cartilaginosos de vertebras de embriones de ratón E13 (no mostrado). Los datos de hibridación *in situ* y datos inmunohistoquímicos obtenidos concordantes mostraron una extensa distribución de la expresión ARNm y proteína de *Manf*, respectivamente, en tejidos de ratón embrionario.

Los niveles de ARNm de *Manf se regulan de manera diferente tras ataques cerebrales isquémicos y epilépticos*

Finalmente se exploró si los estados patológicos que afectan al cerebro de rata adulta pueden conducir a cambios en la expresión génica de *Manf*. Tras 2 h de SE inducido eléctricamente, los cambios en los niveles de ARNm de *Manf* en la formación del hipocampo estaban confinados a la capa de células granulares dentadas (figura 9). A las 2 h tras el ataque, se encontró un aumento significativo en esta zona (hasta el 171% del control), pero el nivel de ARNm de *Manf* disminuyó a las 24 h y 1 semana tras el ataque (figura 9A). Se detectaron aumentos transitorios de la expresión de ARNm de *Manf* a las 2 ó 24 h tras SE en el núcleo reticular talámico (hasta el 170% del control; figura 9B) y en varias zonas corticales, incluyendo corteza piriforme, retrosplenial y parietal (hasta el 160, el 175 y el 136% del control, respectivamente; figura 9C-E). En cambio, en animales sometidos a 10 min de isquemia prosencefálica global, los cambios de la expresión génica de *Manf* estaban más extendidos en la formación del hipocampo al tiempo que estaban restringidos en la corteza cerebral (figura 10). Se detectaron aumentos transitorios de los niveles de ARNm de *Manf* a las 24 h tras el ataque en la capa de células granulares de la circunvolución dentada y el hilo así como en la región CA1 (hasta el 157, el 137 y el 151% del control, respectivamente; figura 10A-C). No se detectaron cambios en el núcleo reticular talámico o en las zonas corticales excepto por un aumento transitorio de la expresión de ARNm de *Manf* a las 2 h en la corteza retrosplenial (hasta el 136% del control). Tras ambos ataques, la expresión fue principalmente neuronal en todas las estructuras examinadas. A 1 semana tras SE e isquemia, el nivel de ARNm de *Manf* no difirió del valor de control en ninguna zona analizada.

Discusión

Los factores neurotróficos, incluyendo ligandos de la familia de GDNF y neurotrofinas, tienen papeles esenciales en el desarrollo, el mantenimiento y la función del sistema nervioso de vertebrados (Huang y Reichardt, 2001; Airaksinen y Saarma, 2002). Los factores neurotróficos promueven la supervivencia de neuronas durante periodos de desarrollo de muerte celular programada (PCD) y regulan la densidad de la inervación objetivo. Sin embargo, todavía se entiende poco cómo regulan los factores tróficos el desarrollo y el mantenimiento del sistema nervioso *in vivo,* especialmente del SNC.

Se descubrió el factor neurotrófico novedoso, MANF, como factor promotor de la supervivencia para neuronas dopaminérgicas embrionarias *in vitro* (Petrova *et al.*, 2003). Recientemente se identificó CDNF, el segundo miembro de la familia de factores neurotróficos de MANF/CDNF. CDNF protege y rescata las neuronas dopaminérgicas de rata adulta *in vivo* en un modelo de EP de 6-OHDA (Lindholm *et al.*, 2007). Las funciones tróficas de MANF y CDNF sobre neuronas dopaminérgicas sugieren que pueden ser beneficiosos para el tratamiento de EP (Petrova *et al.*, 2003; Lindholm *et al.*, 2007). De manera interesante, los invertebrados, incluyendo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster,* también tienen un gen homólogo para *MANF*/*CDNF* (Petrova *et al.*, 2003, Lindholm *et al.*, 2007). Las moscas *Drosophila* deficientes para MANF mueren en embriones que muestran una grave degeneración de axones dopaminérgicos y una drástica disminución en el nivel de dopamina (M. Palgi, R. Lindstrom, J. Peränen, T. P. Piepponen, M. Saarma, y T. I. Heino, observaciones no publicadas). Por tanto, las proteínas de la familia de MANF/CDNF representan la primera familia evolutivamente conservada de factores neurotróficos que también tiene actividades neurotróficas en los invertebrados.

Basándose en secuencias de EST y genómicas, se concluyó que, al contrario que la secuencia notificada por

Petrova *et al.* (2003), el aminoácido 176 de MANF humano es arginina (R) en lugar de prolina (P). Esto está de acuerdo con la secuencia de ARMET humano (MANF) notificada por Mizobuchi *et al.* (2007). Según Mizobuchi *et al.* (2007) ARMET (MANF) es una proteína residente en el retículo endoplasmático (ER). Sin embargo, se detectaron proteínas MANF humanas y de ratón en los medios de cultivo de células transfectadas transitoriamente, lo cual muestra que MANF no reside únicamente en el ER sino que también se secreta a partir de las células. Tras la escisión de la secuencia señal determinada de 21 aminoácidos, la proteína MANF humana madura, secretada, consiste en 158 aminoácidos (véase la figura 1A, B), incluyendo ocho residuos de cisteína conservados en MANF y proteínas CDNF (Petrova *et al.*, 2003; Lindholm *et al.*, 2007; Mizobuchi *et al.*, 2007). Basándose en análisis de ESI-EM, los ocho residuos de cisteína formaban cuatro enlaces disulfuro intramoleculares en MANF humano expresado en células de insecto o *E.coli,* respectivamente, lo cual estaba de acuerdo con una notificación anterior que indicaba que era probable que ARMET (MANF) tuviera cuatro enlaces disulfuro intramoleculares (Mizobuchi *et al.*, 2007). De manera interesante, según Petrova *et al.* (2003) la proteína MANF humana sobreexpresada en células HEK293 estaba sialidada. Sin embargo, esto contrasta con las presentes observaciones, dado que MANF humano secretado a partir de células COS-7 transfectadas transitoriamente no estaba glicosilado ni modificado de manera postraduccional. Es posible que la modificación postraduccional de MANF humano difiera dependiendo de la célula huésped usada para la sobreexpresión de proteína.

Se sabe poco sobre la expresión de proteína y ARNm de *Manf* en los tejidos en desarrollo, adultos y en estados patológicos. Recientemente Mizobuchi *et al.* (2007) notificaron la expresión de ARN, de *Armet (Manf)* en varios tejidos de ratón adulto mediante hibridación de tipo Northern, y mostraron proteína ARMET (MANF) en los testículos y el páncreas de ratón adulto mediante inmunohistoquímica. En el presente estudio, se caracterizó la expresión de proteína y ARNm de *Manf* de ratón en cerebro posnatal y adulto y en tejidos embrionarios en desarrollo, lo cual no se había estudiado anteriormente.

Basándose en los presentes análisis mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos, proteína y ARNm de *Manf* se expresaban ampliamente en el sistema nervioso y tejidos no neuronales de ratón. Según resultados obtenidos a partir de ratón, también se detectó ARNm de *Manf* en diversas regiones del cerebro y tejidos no neuronales de ser humano adulto. En el ratón, la expresión de *Manf* comenzó de manera temprana en el desarrollo embrionario, lo que sugiere que MANF tiene una función importante no sólo en el sistema nervioso, sino también en varios otros tipos de tejidos. En el cerebro, se detectaron niveles relativamente altos de proteína y ARNm de *Manf* en corteza cerebral adulta y posnatal, en la que la señal de MANF se localizó principalmente en neuronas. De manera conforme con eso, la corteza neopalial de ratones embrionarios expresó proteína y ARNm de *Manf* en cantidades relativamente altas. En la formación del hipocampo de cerebro adulto y posnatal, los niveles de MANF detectados también fueron altos. Los datos obtenidos mediante análisis de hibridación *in situ* de la expresión de *Manf* en cerebro de ratón adulto estuvieron de acuerdo con los datos de expresión de ARNm de *Armet* mostrados en el Allen Brain Atlas (www.brainatlas.org/aba/). De manera interesante, los patrones de expresión de proteína MANF y CDNF (Lindholm *et al.*, 2007) fueron similares en el cerebro de ratón adulto. Se detectaron niveles relativamente altos de CDNF (Lindholm *et al.*, 2007) en las neuronas corticales, el hipocampo y en las células de Purkinje cerebelosas, que también expresaron altos niveles de MANF.

Durante el desarrollo, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra alargan sus axones hasta el cuerpo estriado en el que se forman contactos sinápticos. Estos contactos se cortan de manera posnatal en un periodo de muerte celular apoptótica de dos fases, que tiene su máximo a P2 y P14 en la rata (Oo y Burke, 1997). Sin embargo, todavía se desconocen los factores neurotróficos que regulan este proceso apoptótico *in vivo* (Burke, 2003). Se detectaron proteína y ARNm de *Manf* en el mesencéfalo y cuerpo estriado de cerebro de ratones posnatales P1 y P10 y también en el adulto, lo que sugiere que MANF, de manera similar a CDNF (Lindholm *et al.*, 2007), puede participar en el desarrollo de contactos dopaminérgicos. La expresión de GDNF es alta en el cuerpo estriado posnatal en el momento de PCD (Schaar *et al.*, 1993; Strömberg *et al.*, 1993), lo cual respalda la idea de GDNF como factor de supervivencia derivado de diana para neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, los ratones deficientes para GDNF, que mueren al nacer, no tienen defectos en el sistema dopaminérgico (Airaksinen y Saarma, 2002). Además, la ablación de receptor RET de GDNF (Reorganizado durante la Transfección) de neuronas dopaminérgicas no tiene ningún efecto vital sobre su desarrollo (Kramer *et al.*, 2007). Estos datos sugieren que otros factores distintos de GDNF tienen un papel en el desarrollo embrionario de neuronas dopaminérgicas. Se detectaron proteína y ARNm de *Manf* en el mesencéfalo de ratón embrionario, lo que sugiere que MANF puede ser uno de esos factores.

/*/*

Se investigaron los cambios de la expresión de ARNm de *Manf* en dos estados patológicos experimentales en la rata, es decir, tras 2 h de SE eléctricamente inducido y 10 min de isquemia prosencefálica global, respectivamente. Este ataque epiléptico da lugar a daño neuronal en el hilo dentado y las regiones CA1 y CA3 (Jakubs *et al.*, 2006). El modelo de isquemia global reproduce las consecuencias de parada cardiaca u oclusión de arterias coronarias, y provoca la muerte selectiva de poblaciones neuronales vulnerables tales como neuronas piramidales CA1 del hipocampo (Kokaia y Lindvall, 2003). Estos hallazgos proporcionan la primera evidencia de que los niveles de ARNm de *Manf* se ven influidos por estados patológicos en el cerebro adulto y se regulan de manera diferente tras ataques epilépticos e isquémicos. Tras SE, la expresión de ARNm de *Manf* se elevó de manera transitoria en la capa de células granulares dentadas, núcleo reticular talámico, y zonas corticales. La isquemia prosencefálica global dio lugar a aumentos transitorios en la expresión de *Manf*, que estuvieron más extendidos en la formación de hipocampo

y restringidos en la corteza cerebral. El patrón diferente de cambios en los niveles de ARNm de *Manf* tras epilepsia e isquemia refleja lo más probablemente las características específicas de los ataques. Quedan por esclarecer las consecuencias funcionales de los cambios inducidos por el ataque en la expresión de ARNm de *Manf* y las supuestas alteraciones correspondientes en los niveles de proteína. Sin embargo, los altos niveles basales de ARNm de *Manf* y los cambios génicos rápidos y dinámicos en la formación de hipocampo tras dos ataques asociados con muerte neuronal muestran que MANF puede regular la supervivencia neuronal y la plasticidad sináptica y celular de manera similar a lo que se ha mostrado, por ejemplo, para las neurotrofinas. Por tanto, puede usarse MANF en el tratamiento de estados isquémicos y epilépticos.

Se detectó expresión de proteína y ARNm de *Manf*, de manera similar a la de CDNF (Lindholm *et al.*, 2007), en varios tejidos no neuronales de ratón embrionario y adulto. Un amplio patrón de expresión no resulta poco habitual para factores neurotróficos. GDNF, por ejemplo, se expresa en muchas regiones del cerebro (Arenas *et al.*, 1995; Springer *et al.*, 1994) y en órganos periféricos (Trupp *et al.*, 1995; Suvanto *et al.*, 1996), y tiene un papel fundamental en el desarrollo del riñón y la espermatogénesis (Airaksinen y Saarma, 2002). Se encontró proteína y ARNm de *Manf* especialmente abundantes en tejidos y células secretoras de ratón, incluyendo el plexo coroideo embrionario y adulto, la glándula salival y el páncreas embrionario. Un informe anterior (Mizobuchi *et al.*, 2007) indica que ARMET (MANF) puede ser una proteína del ER inducible por estrés con funciones de chaperona. La función de chaperona sugerida de MANF puede ser importante especialmente en tejidos y órganos secretores. Estos datos muestran claramente que MANF es una proteína secretora que se expresa ampliamente en el cerebro. En línea con eso, MANF promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas.

Todavía se desconocen el receptor de MANF y sus mecanismos de señalización. La amplia expresión de MANF detectada en el sistema nervioso y tejidos no neuronales sugiere que MANF, además de su papel como factor neurotrófico, tiene funciones importantes adicionales en muchos tipos de tejidos.

EJEMPLO 2

Procedimientos experimentales

Animales

En todos los experimentos, se usaron ratas Wistar macho adultas (Harlan), que pesaban 250-280 g al comienzo del experimento. Se alojaron las ratas en grupos de tres a cuatro ratas en un ciclo de 12:12 h de luz:oscuridad a una temperatura ambiental de 22ºC. Había agua corriente y comida para ratas (Altromin 1324, Chr. Petersen A/S) disponibles a voluntad. El uso de animales de experimentación lo aprobó el Comité de Experimentos con Animales de la Universidad de Helsinki, y el veterinario jefe de la Junta Administrativa del Condado (autorizaciones HY 17-03 y HY 1406).

Inyecciones intraestriales de factores neurotróficos y 6-OHDA

En los estudios de neuroprotección, se realizó cirugía estereotáctica en dos sesiones (Kearns *et al* 1997) usando anestesia con isoflurano (al 4,5% durante la inducción y al 3% durante la cirugía). Se colocaron los animales en un estereotáctico (Stoelting, IL, EE.UU.). Se expuso el cráneo y se realizaron orificios con taladro usando una fresa dental de alta velocidad. Se llevaron a cabo inyecciones usando una microjeringa Hamilton de 10 μl a una velocidad de 1 μl/min. Al terminarse cada inyección, se mantuvo la aguja en su sitio durante 2 minutos para minimizar el flujo de retorno de la disolución. A todos los animales de control se les administraron 4 μl de PBS o ácido cítrico 10 mM en el cuerpo estriado izquierdo usando coordenadas con respecto a la bregma y la duramadre (A/P +1,0, L/M +2,7, D/V - 5) según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson 1986). Los animales tratados con factor trófico recibieron o bien 3, 10 ó 30 ug de hMANF o bien 10 μg de GDNF humano recombinante (Amgen Inc, CA, EE.UU.) en 4 μl de tampón administrado al cuerpo estriado. Tras la inyección del vehículo o del factor trófico, se dejó que se recuperaran los animales de la anestesia en jaulas individuales hasta la segunda cirugía. Seis horas después, todos los animales se sometieron a 8 ug/4 ul de 6-hidroxidopamina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.; calculado como base libre, disuelta en solución salina helada con ácido ascórbico al 0,02%) en el cuerpo estriado izquierdo. Antes de las inyecciones de 6-hidroxi-dopamina, se administró desipramina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.; 15 mg/kg, i.p., 1 ml/kg) para prevenir la captación de 6-hidroxidopamina en terminaciones de nervios noradrenérgicos, y por tanto proteger esas terminaciones nerviosas frente a la destrucción.

El estudio de propiedades neuroprotectoras de MANF consistió en los siguientes grupos: PBS + 6-OHDA intraestrial, GDNF (10 ug)+ 6-OHDA intraestrial y MANF (3, 10 ó 30 ug) + 6-OHDA intraestrial.

En los estudios del efecto neurorrestaurativo de infusiones crónicas de MANF humano recombinante, los animales recibieron una lesión por 6-OHDA intraestrial en dos sitios de manera unilateral (10 ug por sitio, dosis total de 6-OHDA de 20 ug). A las dos semanas tras la lesión, se sometió un grupo de ratas (grupo de control de lesión) a perfusión. A todos los demás animales se les implantó una minibomba osmótica para recibir una infusión crónica de MANF (1,5, 3 ó 4,5 ug/24 h), GDNF (3 ug/24 h) o la disolución de vehículo durante 2 semanas. A las 12 semanas

tras la lesión, se sometieron las ratas a perfusión y se procesaron sus cerebros para determinar la inmunohistoquímica de TH.

Análisis del comportamiento

Comportamiento de giro. Se llevaron a cabo pruebas de comportamiento tal como se describió anteriormente (Ungerstedt y Arbuthnott 1970, Lindholm *et al* 2007). En los estudios de neuroprotección, se midió el comportamiento de giro a las 2 y 4 semanas y en los estudios de neurorrestauración se monitorizaron las ratas antes de la implantación de la minibomba y tras la lesión (4, 6, 8, 10 ó 12 semanas tras la lesión) para determinar su comportamiento de giro tras la lesión. Se monitorizó la actividad de giro inducida por fármaco de las ratas en cuencos de rotámetros automáticos (Colbourn Instruments). Una vez que se dejó que se habituaran las ratas a la cámara de prueba durante 30 min, se administró D-anfetamina (University Pharmacy, Helsinki, Finlandia; 2,5 mg/kg i.p.). Se registró el número de giros completos (360º) en el sentido de las agujas del reloj y en el sentido contrario a las agujas del reloj durante un periodo de 2 h. Se calcularon los giros ipsilaterales netos con respecto a la lesión restando los giros hacia la izquierda de los giros hacia la derecha. Se repitieron las pruebas a las 4 semanas tras la lesión, respectivamente.

Histología

Perfusión y procesamiento de tejidos. A las 4 semanas tras la lesión (estudios de neuroprotección) o a las 2 ó 12 semanas tras la lesión (estudios de neurorrestauración), se anestesiaron las ratas con una sobredosis de pentobarbital sódico (90 mg/kg, i.p., Orion Pharma, Finlandia) y se sometieron a perfusión intracardiaca con solución salina tamponada con fosfato (PBS) seguido por paraformaldehído al 4% en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Se extirparon los cerebros, se fijaron posteriormente durante 4 h y se almacenaron en tampón fosfato de sodio que contenía sacarosa al 20% a 4ºC. Se cortaron secciones congeladas coronales en serie de 40 μm en un microtomo deslizante.

Inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa

Se recogieron seis conjuntos de secciones en disolución crioprotectora (PB 0,5 M, glicerol al 30% y etilenglicol al 30%) y se almacenaron a -20ºC hasta el procesamiento inmunohistoquímico. Se procesaron secciones que flotaban libremente para determinar la inmunohistoquímica de TH. Tras tres aclarados en PBS, se extinguió la actividad peroxidasa endógena durante 5 minutos en H_2O_2 al 3%/metanol al 10%/PBS. Tras 3 aclarados en PBS, se preincubaron las secciones con suero de caballo normal (NHS)/Triton X-100 al 0,3% en PBS con el fin de bloquear la tinción no específica. Posteriormente se incubaron secciones durante la noche a temperatura ambiente con una dilución 1:2000 de anticuerpo de ratón biotinilado anti-TH (Chemicon, Temecula, CA). Esto fue seguido por incubaciones con dilución 1:200 de anticuerpo de caballo biotinilado anti-ratón (Vector, BA2001) y por incubación en el complejo de avidina-biotina peroxidasa usando el kit Elite ABC Vectastain (Vector Laboratories). Se visualizaron las reacciones usando DAB como cromógeno.

Análisis morfológico

Recuentos de células de la SN. Se usó el método de fraccionador óptico para estimar el número de células positivas para TH en SNpc, West *et al.* 1991; Mouton *et al.* 2002. Se analizó toda la SNpc con la plataforma Stereo Investigator (MicroBrightField, Alemania) acoplada a un microscopio Olympus BX51. De cada animal, se seleccionaron 3 secciones de la parte central de la SNpc, en las que estaba presente el núcleo terminal medial (MTN) (nivel A/P -5,3), para el análisis cuantitativo tal como se describió por Sauer *et al* 1995. Cada espacio de referencia se delineó a baja potencia (4x), y se contaron las células usando un objetivo de alto aumento (60x, inmersión en aceite). Se expresaron los números de células como el número medio/sección. Se contaron las células usando el método de fraccionador óptico en combinación con el principio de disector y reglas de recuento imparciales.

Mediciones de la densidad de fibra estriada. Se determinaron las densidades ópticas (DO) de las fibras positivas para TH en el cuerpo estriado a partir de tres secciones estriales coronales de cada rata. Se cortaron una cada seis secciones entre AP +1,6 y AP +0,20 en un microtomo de congelación y se procesaron para determinar la inmunohistoquímica de TH. Se tomaron imágenes digitalizadas de cuerpos estriados teñidos con TH con una cámara digital Optronics y una mesa de iluminación constante, y se midieron las densidades de fibra usando el software Image Pro-Plus TM (versión 3.0.1, Media Cybernetics). Se realizó el análisis de DO en condiciones ciegas con portaobjetos con códigos. Los datos se presentan como porcentaje del lado intacto que se definió como el 100%.

Preparación de factores neurotróficos marcados con ^{125}I

Se yodaron GDNF (1,5 μg), MANF (1,0 μg) y CDNF (1,0 ug) con NA^{125}I usando el método de lactoperoxidasa. Se disolvió el factor neurotrófico en cuestión en 30 ul de tampón fosfato 0,25 M, pH 7,5, y se mezcló con ^{125}I-Na (1 mCi= 37 mBq, Amersham Biosciences, R.U.). Se inició la reacción mediante adición de lactoperoxidasa 50 ug/ml y H_2O_2,

10 ul cada uno. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min y se detuvo la reacción mediante adición de 3 volúmenes de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía NaI 0-1 M, NaCl 0,42 M y 25 ul de BSA al 2,5%. Se separaron yodo libre y factor de crecimiento yodado usando columnas Sephadex G-25 (PD10, Amersham Biosciences, R.U.). Para el equilibrado y la elución de la columna se usó tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5. Se concentraron los factores de crecimiento yodados usando columnas YM-10 Centricon (Millipore).

Inyecciones intraestriales de ^{125}I-factor neurotrófico

Se inyectó directamente una cantidad de 6 μl de proteína radiomarcada más vehículo o proteína radiomarcada más agente de competencia frío en el cuerpo estriado usando las mismas coordenadas estereotácticas que en los estudios de neuroprotección. Se sometieron las ratas a perfusión transcardíaca 24 horas después. Se usaron partes del tejido nervioso central para el recuento γ y se cortó el resto en secciones para autorradiografía.

Análisis autorradiográfico de la distribución de ^{125}I-factor neurotrófico

Se sometieron ratas que recibieron inyección intraestrial de ^{125}I-MANF, ^{125}I-CDNF o ^{125}I-GDNF a perfusión 24 horas tras inyecciones estereotácticas. Se superpusieron secciones de parafina coronales (7 μm) frente a película de autorradiografía (Kodak Biomax MS) durante 4 semanas.

Autorradiografía de emulsión

Se sumergieron secciones de parafina coronales (7 um) de cuerpo estriado, corteza frontal y sustancia negra en emulsión (emulsión de autorradiografía de Kodak) y se expusieron durante 4 semanas. Se revelaron los portaobjetos y se contratiñeron con hematoxilina (J. T. Baker).

Cuantificación de ^{125}I-factor neurotrófico en tejidos de sistema nervioso neutros tras inyecciones intraestriales

La cantidad de factor neurotrófico administrado por vía intraestrial en diferentes estructuras del cerebro se determinó tras las perfusiones. Se extirpó el cerebro del cráneo y se disecaron el hipocampo, la sustancia negra, el cuerpo estriado y la corteza y se pesó el tejido húmedo. Se cuantificó la radiactividad del tejido durante 1 min en un contador gamma. Los resultados se expresan como CPM/mg de peso húmedo.

Análisis estadístico

Se analizaron los resultados usando ANOVA de un factor seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey/Kramer. Se usó un ANOVA de un factor para medidas repetidas seguido por prueba de comparaciones múltiples a posteriori de Tukey/Kramer para los resultados de estudios del comportamiento. Los resultados se expresan como media ± E.E.M. Los resultados se consideraron significativos a $P < 0,05$.

Resultados

Se llevaron a cabo experimentos del comportamiento y diferentes análisis morfológicos (recuento de células positivas para tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia negra y análisis de inmunorreactividad frente a TH estrial) con el fin de estudiar el efecto de MANF intraestrial en un modelo de EP de rata.

Se investigó el perfil de transporte de MANF y CDNF basándose en la detección por autorradiografía y por recuento γ de factores tróficos marcados con ^{125}I y mediante el estudio de la difusión y el transporte de proteínas no marcadas.

ESTUDIOS DE NEUROPROTECCIÓN USANDO UNA ÚNICA INYECCIÓN DE DOSIS GRADUADAS DE MANF

Comportamiento de giro inducido por anfetamina

En estudios de neuroprotección se estudiaron los efectos de una única inyección de MANF en un modelo experimental de enfermedad de Parkinson. Se administró MANF a 3 doses diferentes (3, 10 ó 30 μg) 6 horas antes de la inyección intraestrial de 6-OHDA. Con el fin de estudiar si las lesiones eran satisfactorias, se realizaron experimentos del comportamiento a las 2 y 4 semanas tras la lesión, y se llevaron a cabo análisis morfológicos inmediatamente tras los experimentos del comportamiento (figura 11, plan experimental).

En estudios de neuroprotección se estudiaron los efectos de una única inyección de MANF en un modelo experimental de enfermedad de Parkinson, descrito en detalle anteriormente (Lindholm *et al* 2007). Se comparó el efecto neuroprotector con el de GDNF. Se administró MANF (3, 10 ó 30 μg/cuerpo estriado), GDNF (10 ug) o vehículo 6 horas antes de la neurotoxina (8 μg de 6-OHDA) de manera unilateral en el cuerpo estriado. En ratas tratadas con vehículo y con 6-OHDA, la anfetamina indujo un fuerte comportamiento de giro ipsilateral tanto a las 2 como a las 4 semanas tras la lesión, indicando destrucción de nervios dopaminérgicos. MANF previno la

degeneración de nervios dopaminérgicos inducida por 6-OHDA de una manera dependiente de la dosis con forma de campana. A las 2 semanas tras la lesión la diferencia entre ratas tratadas previamente con MANF y ratas control no era significativa (figura 12 A). MANF redujo el giro inducido por anfetamina (2,5 mg/kg, i.p.) en comparación con el grupo de control a las 4 semanas tras la lesión y los efectos fueron más pronunciados que a las 2 semanas tras la lesión pero no hubo diferencias estadísticas entre los grupos. Hubo diferencias en el comportamiento de giro entre ratas tratadas con el MANF con mutación puntual (176P), 10 μg, y las ratas tratadas con la proteína MANF correcta. Cuando se analizaron datos de experimentos de giro usando ANOVA para medidas repetidas, todas las concentraciones de MANF y también el control positivo, GDNF 10 ug/cuerpo estriado, se diferenciaron significativamente del grupo de control a las 2 y 4 semanas tras la lesión, siendo 10 ug de MANF la dosis más eficaz sometida a prueba ($p<0,01$, figuras 12B y C).

Protección de neuronas dopaminérgicas positivas para TH en la parte compacta de la sustancia negra

Para confirmar el grado de la lesión, se llevaron a cabo análisis morfológicos de secciones teñidas con tirosina hidroxilasa de sustancia negra de rata. La inyección intraestrial de 6-OHDA (8 ug) dio como resultado una reducción de aproximadamente el 34% en las neuronas positivas para TH en la SN. La inyección unilateral de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratas previamente tratadas con o bien 3, 10 ó 30 μg de MANF o bien 10 ug de GDNF provocó una pérdida de aproximadamente el 19%, 14%, 28% o 12% de cuerpos de células positivas para TH en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc), respectivamente, cuando se midieron 4 semanas tras los tratamientos (figura 13 A). No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. La inyección unilateral de 6-OHDA en el cuerpo estriado de ratas previamente tratadas con 10 μg de MANF con mutación puntual (176P) provocó una pérdida de aproximadamente el 20% de cuerpos de células positivas para TH en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc).

Inmunorreactividad positiva para TH en STR

Se evaluó adicionalmente la denervación provocada por 6-OHDA intraestrial midiendo la densidad óptica (DO) de fibras positivas para TH en el cuerpo estriado. En estos análisis se observó una tendencia similar a la de recuentos de células de la SN. 10 ug de MANF fue la dosis más eficaz sometida a prueba en la protección de fibras TH+ (pérdida del 26% de DO) pero no se diferenció estadísticamente del grupo de control (pérdida del 36% de DO). Ni 3, 30 ug de MANF ni GDNF mostraron ninguna diferencia estadística en comparación con el grupo de control (pérdida del 32%, 37% o 32% de DO) (figura 13C).

ESTUDIOS NEURORRESTAURATIVOS USANDO INFUSIÓN CRÓNICA DE DOSIS GRADUADAS DE MANF

Se estudió el efecto de infusión crónica de MANF en un modelo neurorrestaurativo (figura 14). Todos los animales recibieron una lesión por 6-OHDA intraestrial en dos sitios de manera unilateral (10 ug por sitio, dosis total de 6-OHDA de 20 ug). A las dos semanas tras la lesión, se sometió un grupo de ratas (grupo de control de lesión) a perfusión. A todos los demás animales se les implantó una minibomba osmótica para recibir una infusión crónica de MANF (1,5, 3 ó 4,5 ug/24 h), GDNF (3 ug/24 h) o la disolución de vehículo durante 2 semanas. Se monitorizaron los animales antes de la implantación de la minibomba y tras la lesión (4, 6, 8, 10 ó 12 semanas tras la lesión) para determinar su comportamiento de giro. A las 12 semanas tras la lesión se sometieron las ratas a perfusión y se procesaron sus cerebros para determinar la inmunohistoquímica de TH. MANF (1,5 y 4,5 ug/24 h) y GDNF (3 ug/24 h) intraestriales pudieron restaurar la función dopaminérgica (figuras 15A, B). La administración de GDNF previno la degeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y la pérdida de fibras inmunorreactivas frente a TH en el cuerpo estriado. Los datos de análisis mediante IHC en 3 grupos de tratamiento con MANF diferentes (1,5, 3 ó 4,5 ug/24 h) no se correlacionaron bien con los datos de comportamiento debido al pequeño número de animales en el grupo de tratamiento (n=4-6) (figuras 16A, B).

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN

Se estudió la difusión de MANF y GDNF sin marcar inyectando MANF o GDNF recombinantes humanos sin marcar en el cuerpo estriado y se localizó la molécula usando inmunohistoquímica.

Se detectó la inyección de 10 ug de MANF o GDNF en 4 ul en el cuerpo estriado 24 horas y 3 días después (figuras 17 y 18). Tras 24 h, se mostró que la tinción de MANF se distribuía a lo largo de todo el cuerpo estriado. También había tinción de MANF presente en la corteza frontal. La tinción de MANF se correlacionó bien con estudios de distribución realizados con proteína MANF yodada (figuras 19, 20 y 21).

ESTUDIOS DE TRANSPORTE USANDO FACTORES DE CRECIMIENTO YODADOS (MANF, CDNF Y GDNF)

También se investigó el transporte de factores tróficos novedosos. Se inyectaron factores tróficos yodados (^{125}I-MANF, ^{125}I-CDNF y ^{125}I-GDNF) en el cuerpo estriado izquierdo según las coordenadas en el atlas de cerebro de rata (Paxinos y Watson 1997). Se sometieron las ratas a perfusión 24 horas después. Se realizaron experimentos de transporte basándose en la detección autorradiográfica y de recuento γ de factores tróficos marcados con ^{125}I en secciones de cerebro. Tras la inyección de ^{125}I-MANF, la autorradiografía reveló un marcaje en el cuerpo estriado

ipsilateral y en la corteza, pero no en la sustancia negra (figura 19). El marcaje tras la inyección de ^{125}I-CDNF o ^{125}I-GDNF se produjo en una película de autorradiografía en secciones corticales y estriales ipsilaterales, así como en la sección de SN (figura 19).

Para verificar los resultados de los experimentos de autorradiografía, también se cuantificó la distribución de factores tróficos novedosos en la SN y la zona cortical. Tal como se muestra en la figura 20a, la radiactividad tras la inyección de ^{125}I-MANF intraestrial estaba a niveles de fondo en la SN. Tras la inyección de ^{125}I-CDNF o ^{125}I-CDNF y citocromo c, había mucha más radiactividad en la SN ipsilateral que tras la inyección de ^{125}I-MANF. Se encontró una cantidad significativa de radiactividad en la zona de SN ipsilateral cuando se inyectó ^{125}I-CDNF (o ^{125}I-GDNF y citocromo c) en el cuerpo estriado. La radiactividad medida tras inyecciones de ^{125}I-GDNF y citocromo c y tras inyecciones de ^{125}I-CDNF fue de un tercio de la radiactividad tras inyecciones de ^{125}I-GDNF. Cuando se expresaron los resultados como porcentaje de radiactividad en el cuerpo estriado (figura 20b), la radiactividad tras la inyección de ^{125}I-GDNF fue del 1,5% y tras la inyección de ^{125}I-CDNF fue del 1,9%.

Se analizó cuidadosamente la cantidad de radiactividad en la zona cortical. Había dos veces más radiactividad en muestras corticales tras la inyección de ^{125}I-MANF intraestrial que tras inyecciones de ^{125}I-GDNF o ^{125}I-CDNF (figura 21a). Dado que era posible que parte de la radiactividad en la muestra de tejido cortical podía originarse del cuerpo estriado, también se investigó la radiactividad de una muestra de corteza frontal pura (sin ningún tejido del cuerpo estriado). Cuando se midió la radiactividad de la zona cortical frontal, había 5 veces más radiactividad tras la inyección de ^{125}I-MANF en comparación con la radiactividad tras la inyección de ^{125}I-GDNF y 3 veces más radiactividad tras la inyección de ^{125}I-CDNF (figura 21b). Estudios sobre la distribución de factores tróficos yodados en cerebro de rata revelaron que MANF se comportaba de manera diferente de CDNF y GDNF. MANF se transportaba a la corteza frontal pero no a la SN mientras que GDNF y CDNF se transportaban a la SN tras inyección intraestrial.

Lo más probablemente, MANF se transporta mediante neuronas glutamatérgicas o mediante otras neuronas que se proyectan al interior de la corteza. Esto puede ser una parte importante en la acción farmacológica de MANF.

EJEMPLO 3

Material y métodos

Animales y fármacos

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho adultas (250-350 g). Se usó proteína MANF recombinante y PBS como vehículo. En el primer conjunto de experimentos, se dividieron los animales en 4 grupos: (1) PBS; (2) MANF 1 μg/μl: (3) MANF 2 μg/μl; (4) MANF 4 μg/μl, y se usaron estas ratas para estudiar los efectos neuroprotectores de proteína MANF sobre el volumen de infarto. En el segundo conjunto de experimentos, se dividieron las ratas en 2 grupos: (1) PBS; (2) MANF 2 μg/μl. Se usaron estas ratas para estudiar si MANF tiene actividad anti-apoptótica.

Inyecciones intracerebral y ligación de MCA

Se realizó ligación de la arteria cerebral media (MCA) derecha y las carótidas comunes (CCA) bilaterales con métodos anteriormente descritos (Chen *et al.*, 1986). En resumen, se anestesiaron las ratas con hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.). Se identificaron las CCA bilaterales y se aislaron mediante una incisión cervical en la línea media ventral. Se fijaron las ratas a un aparato estereotáctico y se realizó una craneotomía en el hemisferio derecho. Se administró proteína MANF recombinante (0, 6, 12, 24 μg) o vehículo por vía intracraneal en tres sitios corticales (figura 22). Se inyectaron dos microlitros de disolución de MANF (1, 2 ó 4 μg/μl) o PBS y se dejó que difundieran durante cinco minutos antes de retirar la aguja (figura 25). Tras la última inyección se ligó la arteria derecha (MCA) con una sutura 10-0 y se ligaron las carótidas comunes (CCA) bilaterales con pinzas arteriales no traumáticas durante 60 minutos. Tras sesenta minutos de isquemia se retiró la sutura alrededor de la arteria MCA y las pinzas arteriales en las arterias CCA. Tras recuperarse de la anestesia, se devolvieron las ratas a su jaula.

Tinción con TTC

Se usó tinción con cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC) para estudiar el volumen de infarto en el cerebro. Se sacrificaron los animales 48 horas después. Se extirparon los cerebros y se cortaron en secciones coronales de 2 mm de grosor. Se tiñeron los cortes con disolución de TTC al 2% durante quince minutos. Se midió el área de infarto en cada corte con un escáner digital y programas Imagetools (University of Texas Health Sciences Center). Se obtuvo el volumen de infarto en cada animal a partir del producto de grosor de corte promedio (2 mm) y la suma de los áreas de infarto en todas los cortes de cerebro examinados.

Tinción TUNEL y análisis

Se decapitaron las ratas 24 horas tras la isquemia. Se extirparon los cerebros, se congelaron con isopentano y se

cortaron en secciones (25 μm) en un criostato. Se montaron las secciones en portaobjetos de microscopio, se secaron al aire, después se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a 4ºC. Se realizó un procedimiento convencional de marcaje de extremos cortados por dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) para secciones de tejido congeladas, con modificaciones minoritarias (kit de detección de muerte celular *in situ*, POD, Roche Applied Science). En resumen, se aclararon secciones montadas en portaobjetos en Triton X-100 al 0,5% en tampón fosfato 0,1 M durante 20 minutos a 80ºC. Se aclararon secciones tres veces con tampón fosfato 0,1 M. Para marcar núcleos dañados, se añadieron 100 μl de mezcla de reacción TUNEL sobre cada muestra seguido por una incubación de 60 minutos a 37ºC en una cámara humidificada. Se llevaron a cabo procedimientos para controles tal como se describe en el manual del fabricante. Se aclararon la secciones tres veces con tampón fosfato 0,1 M, se aclararon con H_2O, se secaron al aire y se cubrieron con cubreobjetos. Se adquirieron imágenes histológicas usando una cámara Infinity3, microscopio NIKON 80i y software QCapture Pro 5.0. Se cuantificó la densidad de píxeles de núcleos positivos para TUNEL a partir de seis secciones de cada zona de cerebro y se calculó el promedio usando software NIS Elements 2.3.

Resultados

La administración de MANF redujo significativamente el infarto cerebral

Se encontró que la administración de MANF redujo significativamente el infarto cerebral (figura 23, columna izquierda, P=0,032, efecto del tratamiento, ANOVA de un factor). El volumen de infarto fue significativamente menor en los cuatro primeros cortes de cerebro de las ratas tratadas con MANF en comparación con animales tratados con vehículo (PBS = 88±9, 6 μg de MANF = 45±13 mm, 12 μg de MAN 58 ± 6, 24 μg de MANF 67 ± 45 mm^3). Además, se encontró que el área del mayor infarto en un corte era mayor en ratas tratadas con PBS (16,8 ±1,1 mm^2) en comparación con ratas tratadas con MANF (figura 24, 6 μg de MANF = 8,9±2,2 mm^2; 12 μg de MANF 11,7 ± 2,0 mm^2; 24 μg de MANF 14,3 ± 2,0 mm^2, P = 0,0035, análisis de varianza sobre rangos de un factor de Kurskal-Wallis).

El tratamiento previo con MANF redujo la actividad de TUNEL localmente

Se encontró que la actividad de TUNEL, medida mediante densidad de píxeles, era similar en una zona cortical rostral entre ratas tratadas con PBS y con MANF 2 μg/μl. A un nivel de +2,2 desde el bregma los promedios fueron: PBS = 494 ± 152, MANF = 534 ± 70 (figura 26A). Sin embargo a un nivel de -0,2 - 0,2 mm desde el bregma se encontró que MANF 2 μg/μl reducía significativamente la actividad de TUNEL (figura 26B, PBS = 764 ± 60, MANF = 322 ± 141). Dado que el nivel contado en la figura 26B es el mismo nivel al que se administraron las inyecciones de MANF locales, estos datos muestran que la actividad anti-apoptótica de MANF es local.

Conclusiones

La administración de MANF antes del accidente cerebrovascular redujo significativamente el volumen de infarto provocado por ligación de MCA

La administración de MANF antes del accidente cerebrovascular redujo significativamente el área de infarto máxima provocada por ligación de MCA

La administración local de 12 μg de MANF redujo la actividad de TUNEL en zonas de cerebro corticales

En conjunto, estos resultados muestran que MANF tiene efectos neuroprotectores frente a isquemia que pueden estar relacionados con su actividad anti-apoptótica.

EJEMPLO 4

Cristalización de MANF y determinación de la estructura

Se usó cristalografía de rayos X para estudiar la estructura de MANF a una resolución casi atómica. Para la cristalización, se concentró la proteína purificada y se cambió el tampón de proteína por HEPES 10 mM, pH 7,0 complementado con NaCl 100 mM, cóctel de inhibidores de proteasa P8840 al 0,01% (v/v) (Sigma) y NaN_3 al 0,01%. Se examinaron las condiciones de cristalización usando la técnica de gota sentada, difusión de vapor por la instalación de cristalización robótica de Helsinki (Helsinki, Finlandia). Normalmente se obtuvieron cristales de aguja de MANF en el plazo de 1 a 2 semanas a 4ºC sobre una disolución de cristalización de PEG 8000 al 12-18% (p/v). Las gotas finales se prepararon mezclando manualmente 1-2 μl de la disolución de cristalización y 1-2 μl de la disolución de proteína a 10-20 mg/ml. Los cristales pertenecen al grupo espacial $P6_1$ (a, b = 96,15 A, c = 34,94 A) con una molécula por unidad asimétrica. Se prepararon derivados de Hg empapando los cristales en las aguas madre complementadas con acetato de CH_3Hg saturado.

Para la recogida de datos a -180ºC, se recogieron cristales en tampón crioprotector que contenía glicerol al 14% y se

sometieron a congelación ultrarrápida en nitrógeno líquido. Se recogieron datos de difracción de rayos X de MANF nativo, SAD de azufre y derivado de Hg, respectivamente, en líneas de haz ID 14-1, ID 23-1 e ID 14-3 en la instalación European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Francia. Se integraron los datos y se ajustaron a escala con software XDS (Kabsch, 1993). Se llevaron a cabo la reducción de datos, asignación de R libre, y todas las manipulaciones de datos adicionales con la serie de programas CCP4 (CCP4, 1994). Se determinó la estructura de MANF inicial usando las diferencias anómalas e isomorfas del derivado de Hg a una resolución de 4 A.

Sin embargo, la estructura de MANF final se determinó mediante sustitución molecular usando el programa MOLREP (Vagin y Teplyakov, 2000) con CDNF-ΔC (Parkash *et al.,* manuscrito) como modelo de búsqueda. Se usaron los datos de SAD de azufre para localizar los puentes disulfuro. Se llevó a cabo el refinamiento de la estructura de MANF a una resolución de 2,8 Å hasta un factor R cristalográfico del 18,8% y un R_{libre} del 21,4%. Se obtuvo a la calidad de la estructura usando PROCHECK (Laskowski *et al.,* 1993) y el análisis de gráfico de Ramachandran del modelo final refinado no mostró residuos en las regiones no aprobadas.

La estructura de MANF reveló una proteína de dos dominios con una topología todo alfa (figura 27). El dominio N-terminal comprende una estructura de hoja plegada que muestra homología con proteínas de tipo saposina (SAPLIP). El dominio N-terminal está estabilizado con tres puentes disulfuro como en SAPLIP. El extremo C-terminal de MANF lleva un grupo de unión aparentemente flexible y un dominio de hélice alfa más pequeño con otro puente disulfuro. La estructura cristalina de MANF proporciona información a nivel atómico para estudiar la función en detalle.

EJEMPLO 5

Interacciones MANF-lípido

Método

Se realizaron preparación de vesículas y mediciones de fluorescencia de triptófano esencialmente tal como se describe (Zhao y Kinnunen, 2002).

Las saposinas son una familia creciente de proteínas con una amplia variedad de funciones, todas las cuales parecen interaccionar con membranas o lípidos. La homología con proteínas de tipo saposina (SAPLIP) sugiere que MANF y CDNF también podrían interaccionar con lípidos de membrana. En las pruebas preliminares se encontró que MANF y CDNF se unen con afinidad relativamente alta a fosfolípidos, tales como 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosfocolina. De manera interesante, MANF y CDNF se unen tanto a lípidos normales como oxidados. Parece que ambas proteínas se unen a lípidos oxidados en la superficie de contacto de membrana. Tras la unión, la conformación de MANF y CDNF cambia y puede producirse agregación o agrupación de proteínas en la superficie de contacto de membrana. Resulta de gran interés descubrir tanto la estructura del complejo MANF-lípido, así como el papel biológico de esta interacción.

Por tanto, se usa resonancia magnética nuclear (RMN) para estudiar los cambios conformacionales tras la unión de la proteína a lípidos oxidados. Usando mutagénesis dirigida al sitio y ensayos de unión a lípido se identifican los sitios de unión a lípido de MANF. Dado que varias SAPLIP son proteínas diméricas, se aborda si la interacción con lípidos conduce a la dimerización de MANF. Los lípidos pueden estimular la dimerización de MANF y CDNF y de ese modo regular su actividad biológica. Para ello, se somete a prueba el papel de fosfolípidos en la activación de MANF usando los ensayos de supervivencia con neuronas DA.

EJEMPLO 6

Métodos

Yodación de MANF

Se tomó 1,0 μg de MANF en 1 μl y se añadieron 30 μl de tampón fosfato 250 mM, pH 7,5, después se añadió 1 mCi de ^{125}INa (10 μl), después se añadieron 10 μl de disolución de lactoperoxidasa 50 μg/ml y después se añadieron 10 μl de H_2O_2 a 10 min y otros 10 μl (diluido 1:1.000). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se detuvo la reacción mediante adición de 3 volúmenes del tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía NaI 0,1 M y NaCl 0,42 M, después se añadieron 25 μl de BSA al 2,5% y se cargaron en la columna Sephadex G-25 (PD10, Amersham), 10 ml. Se equilibró la columna y se eluyó con el tampón fosfato 0,1 M, pH 7,5, que contenía BSA al 1%. El MANF marcado comenzó a eluir a los 3,0 ml.

Se recogieron 6-8 fracciones de 1 ml y se contaron las fracciones de modo que se llevaron 2 μl de cada fracción al contador gamma. La fracción 4 contiene MANF y se recogió. Se concentró 1 ml de MANF1 en YM10 y se contaron en 2 μl, 250.000 cpm. Concentración a 13.000 rpm, durante 50 min a 50ºC. El volumen final del MANF concentrado

fue de aproximadamente 130 μl-150 μl.

Resultados

Estos datos indican que neuronas DA, de hipocampo y corticales se unen específicamente a MANF y CDNF marcados con ^{125}I. En ensayos de competencia, un exceso de MANF sin marcar no puede desplazar CDNF marcado con ^{125}I, lo que demuestra claramente que CDNF y MANF se unen a receptores diferentes (figura 29). El hecho de que CDNF se transporta de manera retrógrada desde el cuerpo estriado de rata hasta la sustancia negra, mientras que MANF no, respalda adicionalmente la idea de que CDNF y MANF se unen a receptores diferentes.

EJEMPLO 7

Efecto neurorrestaurativo sinérgico de MANF y GDNF

Se estudia el efecto neurorrestaurativo sinérgico de MANF y GDNF en un modelo experimental de enfermedad de Parkinson. Se administran inyecciones intraestriales combinadas de MANF (10 ug) y GDNF (10 ug) cuatro semanas tras 6-OHDA intraestrial con el fin de determinar si MANF y GDNF rescatan neuronas dopaminérgicas mediante mecanismos diferentes.

Se estudia la actividad neurorrestaurativa de MANF y GDNF inyectándoles a los animales de manera unilateral, en el cuerpo estriado, 6-OHDA (20 μg/4 μl) y cuatro semanas después, en la misma ubicación, MANF (10 μg en 4 μl de PBS), GDNF (10 μg en 4 μl de PBS), MANF + GDNF (10 ug de cada uno en 4 ul de PBS) o vehículo (controles).

Se usa D-anfetamina (2,5 mg/kg i.p.) para inducir actividad de giro en ratas con lesión unilateral de nervios dopaminérgicos nigroestriales. Se llevan a cabo pruebas de comportamiento 1 semana antes (es decir, 3 semanas después de la inyección de 6-OHDA) y 2, 4, 6, y 8 semanas después de la inyección de los factores tróficos. Tras los experimentos de comportamiento, se anestesian las ratas y se someten a perfusión transcardíaca y se procesan sus cerebros para la inmunohistoquímica.

EJEMPLO 8

Efecto neurorrestaurativo sinérgico de MANF y GDNF

Se estudió la actividad promotora de la supervivencia de CDNF para neuronas DA usando un modelo de EP de lesión por 6-OHDA unilateral de rata en dos paradigmas: neuroprotector y neurorrestaurativo, y estos resultados muestran que CDNF también tiene un efecto neurorrestaurativo muy potente en el modelo de EP de rata (Lindholm *et al.*, 2007). Sin embargo, en comparación con factores neurotróficos individuales, la combinación de CDNF y MANF puede ser más eficaz en el tratamiento de EP. De hecho, se encontró que MANF y CDNF se unen a receptores diferentes. Puede suceder que MANF y CDNF activen rutas de señalización completamente diferentes de las de GDNF. MANF y CDNF pueden tener efectos antiinflamatorios que pueden ser importantes en el tratamiento de EP. Basándose en eso, se plantea la hipótesis de que MANF/CDNF y GDNF pueden potenciarse entre sí o incluso tener efectos aditivos en modelos de EP.

Modelo neurorrestaurativo de EP

En resumen, las ratas reciben 20 μg de 6-OHDA por vía intraestrial y 4 semanas después se inyecta una mezcla de GDNF, MANF y CDNF, 10 μg cada uno, en diferentes combinaciones, en el cuerpo estriado. Estudios de comportamiento van seguidos por análisis estereológicos del número de neuronas y densidad de fibras tal como se describe (Lindholm *et al.*, 2007; Mijatovic *et al.*, 2007). Las ratas de control reciben MANF, CDNF o GDNF solos.

EJEMPLO 9

Materiales y métodos

Cultivos in vitro de neuronas dopaminérgicas y el ensayo de supervivencia

Se aislaron células a partir de partes inferiores de mesencéfalo disecado de ratón NMRI E12,5 tal como se describió anteriormente (Jordan *et al.*, 1997). Se sembraron en placa 25.000 células por 7 mm^2 de microislotes recubiertos con poli-ornitina en las placas de 4 pocillos y se añadieron proteínas sometidas a prueba 30 min tras la siembra en placas. Cada experimento incluyó 4-8 repeticiones independientes por concentración de proteína y 14 controles negativos independientes (tampón de PBS). Se fijaron las células y se tiñeron para determinar la inmunorreactividad frente a TH usando protocolos convencionales. Se obtuvieron imágenes del microislote completo usando microscopio Leica M2FL III, se contó el número de células positivas para TH viables por microislote usando software ImagePro 6.0 y se midió la señal de inmunoflourescencia de TH total a partir de todos los microislotes usando software Adobe Photoshop. Se contaron microislotes al azar manualmente para verificar los datos generados por el

software. Además, se sometió a prueba el impacto de diferentes paradigmas de cultivo de TH sobre el desenlace de los experimentos de supervivencia de MANF: se sometieron a prueba los efectos de las densidades de siembra en placa de células sobre diferentes matrices (poli-lisina frente a poli-ornitina recubiertas con diferentes concentraciones de laminina), se comparó el aislamiento mecánico y enzimático de neuronas y se sometieron a ensayo diferentes longitudes de cebado de suero (FBS) de los cultivos neuronales. Todos los experimentos proporcionaron resultados similares, es decir, GDNF actúa como un potente factor neurotrófico para las neuronas dopaminérgicas, mientras que MANF no. Las figuras 30 y 31 presentan datos de 3 experimentos independientes. Dentro de cada experimento, GDNF potenció significativamente la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas ($p<0,01$) mientras que MANF no. Los datos se presentan como % del valor promedio del control positivo (GDNF 10 ng/ml). Para GDNF, $p<0,000001$ (prueba de la t de Student homosedástica de dos factores).

Resultados

Se sometió a prueba la posible actividad promotora de la supervivencia de proteína MANF humana recombinante purificada en cultivos primarios de neuronas de mesencéfalo de ratones E12,5. Dado que se sabe que el desenlace de experimentos de supervivencia con cultivos dopaminérgicos primarios es altamente variable y los protocolos convencionales para evaluar los efectos de supervivencia en cultivos dopaminérgicos primarios incluyen procedimientos de recuento visuales propensos a errores de campos microscópicos seleccionados al azar que también pueden sesgar la interpretación de los datos, se desarrolló un método de cuantificación digitalizado ciego para comparar las propiedades de supervivencia de MANF y GDNF *in vitro*. Al contrario que GDNF, que según resultados previos promueve fuertemente la supervivencia y la expresión de TH en células dopaminérgicas, MANF no tenía ningún efecto estadísticamente significativo (figuras 30, 31). Al contrario que la respuesta frente a GDNF, las neuronas dopaminérgicas no mostraron ninguna excrecencia de neuritas potenciada tras el tratamiento con MANF. Se obtuvieron resultados similares con proteína MANF recombinante mutada (176P) producida en los presentes laboratorios. Esto contrasta con los datos dados a conocer por Petrova *et al.* (2003).

Tabla 1

Identidad de aminoácidos (%)* de proteínas MANF y CDNF entre organismos seleccionados.

	MANF de *H. s.*	CDNF de *H. s.*	MANF de *M. m.*	MANF de *X. l.*	MANF de *D. r.*
CDNF de *H. s.*	59				
MANF de *M. m.*	98	59			
MANF de *X. l.*	82	57	82		
MANF de *D. r.*	72	55	72	78	
MANF de *C. e.*	50	46	50	51	49

*Secuencias señal omitidas. *H. s., Homo sapiens; M. m., Mus musculus; X. l., Xenopus laevis; D. r., Danio rerio; C. e., Caenorhabditis elegans.*

Referencias

Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat Rev Neurosci 3:383-394.

Arenas E, Trupp M, Åkerud P, Ibáñez CF (1995) GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. Neuron 15:1465-1473.

Arvidsson A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Saarma M, Lindvall O (2001) Stroke induces widespread changes of gene expression for glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. Neuroscience 106:27-41.

Bespalov MM, Saarma M (2007) GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. Trends Pharmacol Sci 28:68-74.

Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE (2001) BDNF and epilepsy: too much of a good thing? Trends Neurosci 24:47-53.

Burke RE (2003) Postnatal developmental programmed cell death in dopamine neurons. Ann N Y Acad Sci 991:69-79.

CCP4 (1994) Programs for protein crystallography. Acta Cryst. D50:760-763.

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. 1986. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. Stroke 17(4):738-743.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature 380:252-255.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. Nat Med 9:589-595.

Grondin R, Zhang Z, Yi A, Cass WA, Maswood N, Andersen AH, Elsberry DD, Klein MC, Gerhardt GA, Gash DM (2002) Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. Brain 125:2191-201.

Gustafsson E, Lindvall O, Kokaia Z (2003) Intraventricular infusion of TrkB-Fc fusion protein promotes ischemia-induced neurogenesis in adult rat dentate gyrus. Stroke 34:2710-2715.

Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. Neuron 7:165-176.

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. Neurosci Lett 182:107-111.

Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24:677-736.

Jakubs K, Nanobashvili A, Bonde S, Ekdahl CT, Kokaia Z, Kokaia M, Lindvall O (2006) Environment matters: synaptic properties of neurons born in the epileptic adult brain develop to reduce excitability. Neuron 52:1047-1059.

Jin G, Omori N, Li F, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K (2003) Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals. Neurol Res 25:249-253.

Jordan J, Böttner M, Schluesener HJ, Unsicker K, Krieglstein K. (1997) Bone morphogenetic proteins: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implications of astroglial cells. Eur J Neurosci. 9:1699-1709.

Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. J. Appl. Crystallogr. 26, 795-800.

Kearns CM, Gash DM (1995) GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine in vivo. Brain Res 672:104-111.

Kokaia Z, Airaksinen MS, Nanobashvili A, Larsson E, Kujamäki E, Lindvall O, Saarma M (1999) GDNF family ligands and receptors are differentially regulated after brain insults in the rat. Eur J Neurosci 11:1202-1216.

Kokaia Z, Lindvall O (2003). Neurogenesis after ischaemic brain insults. Curr Opin Neurobiol 13: 127-132.

Kramer ER, Aron L, Ramakers GM, Seitz S, Zhuang X, Beyer K, Smidt MP, Klein R (2007) Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. PLoS Biol 5:e39 doi:10.1371.

Krieglstein K (2004) Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. Cell Tissue Res 318:73-80.

Kuipers SD, Bramham CR (2006) Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. Curr Opin Drug Discov Devel 9:580-586.

Lang AE et al. (2006) Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. Ann Neurol 59:459-466.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., S., M. D. & M., T. J. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. 26, 283-291.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 260:1130-1132.

Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. Nature 448:73-77.

Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, Persson H (1992) Differential regulation of mRNAs

for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. Proc Natl Acad Sci USA 89:648-652.

Lothman EW, Bertram EH, Bekenstein JW, Perlin JB (1989) Self-sustaining limbic status epilepticus induced by continuous hippocampal stimulation: electrographic and behavioral characteristics. Epilepsy Res 3: 107-119.

Mijatovic J, Airavaara M, Planken A, Auvinen P, Raasmaja A, Piepponen TP, Costantini F, Ahtee L, Saarma M. (2007). Constitutive Ret activity in knock-in multiple endocrine neoplasia type B mice induces profound elevation of brain dopamine concentration via enhanced synthesis and increases the number of TH-positive cells in the substantia nigra. J Neurosci. 27:4799-809.

Mizobuchi N, Hoseki J, Kubota H, Toyokuni S, Nozaki J, Naitoh M, Koizumi A, Nagata K (2007) ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. Cell Struct Funct 32:41-50.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S. & Dodson, E. J. (1999). Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. Acta Crystallog. sect. D 55, 247-255.

Oo TF, Burke RE (1997) The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. Brain Res Dev Brain Res 98:191-196.

Patel NK, Bunnage M, Plaha P, Svendsen CN, Heywood P, Gill SS (2005) Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. Ann Neurol 57:298-302.

Petrova PS, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW (2003) MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. J Mol Neurosci 20:173-187.

Peränen J, Furuhjelm J (2001) Expression, purification and properties of Rab8 function in actin cortical skeleton organization and polarized transport. Methods Enzymol 329:188-196.

Peränen J, Rikkonen M, Hyvönen M, Kääriäinen L (1996) T7 vectors with a modified T7lac promoter for expression of proteins in Escherichia coli. Anal Biochem 236:371-373.

Poutanen M, Salusjärvi L, Ruohonen L, Penttilä M, Kalkkinen N (2001) Use of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass mapping and nanospray liquidchromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry sequence tag analysis for high sensitivity identification of yeast proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis. Rapid Commun Mass Spectrom 15:1685-1692.

Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32: 281-294.

Reeben M, Laurikainen A, Hiltunen JO, Castrén E and Saarma M (1997) The messenger RNAs for both glial cell line-derived neurotrophic factor receptors, c-RET and GDNFRα, are induced in the rat brain in response to kainite-induced excitation. Neuroscience 83:151-159.

Sauer H, Rosenblad C, Björklund A (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. Proc Natl Acad Sci USA 92:8935-8939.

Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB (1993) Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. Exp Neurol 124:368-371.

Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. Stroke 38:2165-2172.

Smith ML, Auer RN, Siesjö BK (1984) The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. Acta Neuropathol 64:319-332.

Springer JE, Mu X, Bergmann LW, Trojanowski JQ (1994) Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. Exp Neurol 127:167-170.

Strömberg I, Björklund L, Johansson M, Tomac A, Collins F, Olson L, Hoffer B, Humpel C (1993) Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. Exp Neurol 124:401-412.

Suvanto P, Hiltunen JO, Arumäe U, Moshnyakov M, Sariola H, Sainio K, Saarma M (1996) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by in situ hybridization. Eur J Neurosci 8:816-822.

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. Nature 373:335-339.

Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. J Cell Biol 130:137-148.

Vagin, A. and Teplyakov, A. (2000) An approach to multi-copy search in molecular replacement. Acta Cryst., D56 1622-4 (2000)

Zhao H., Kinnunen P. K. (2002). Binding of the antimicrobial peptide temporin L to liposomes assessed by Trp fluorescence. J. Biol. Chem. 277:25170-25177.

Lista de secuencias

<110> Licentia Oy

<120> Factor neurotrófico MANF y usos del mismo

<130> 47380

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 540
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(540)
<223>

<400> 1

```
atg tgg gcc acg cag ggg ctg gcg gtg gcg ctg gct ctg agc gtg ctg       48
Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Ser Val Leu
1               5                  10                  15

ccg ggc agc cgg gcg ctg cgg ccg ggc gac tgc gaa gtt tgt att tct       96
Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser
            20                  25                  30

tat ctg gga aga ttt tac cag gac ctc aaa gac aga gat gtc aca ttc      144
Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe
        35                  40                  45

tca cca gcc act att gaa aac gaa ctt ata aag ttc tgc cgg gaa gca      192
Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala
    50                  55                  60

aga ggc aaa gag aat cgg ttg tgc tac tat atc ggg gcc aca gat gat      240
Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp
65                  70                  75                  80

gca gcc acc aaa atc atc aat gag gta tca aag cct ctg gcc cac cac      288
Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His
                85                  90                  95
```

```
atc cct gtg gag aag atc tgt gag aag ctt aag aag aag gac agc cag      336
Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln
            100                 105                 110

ata tgt gag ctt aag tat gac aag cag atc gac ctg agc aca gtg gac      384
Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp
        115                 120                 125

ctg aag aag ctc cga gtt aaa gag ctg aag aag att ctg gat gac tgg      432
Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp
    130                 135                 140

ggg gag aca tgc aaa ggc tgt gca gaa aag tct gac tac atc cgg aag      480
Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys
145                 150                 155                 160

ata aat gaa ctg atg cct aaa tat gcc ccc aag gca gcc agt gca cgg      528
Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg
                165                 170                 175

acc gat ttg tag                                                     540
Thr Asp Leu
```

<210> 2
<211> 179
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Ser Val Leu
1               5                   10                  15

Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe
        35                  40                  45

Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala
    50                  55                  60

Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp
65                  70                  75                  80

Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His
                85                  90                  95

Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln
            100                 105                 110

Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp
        115                 120                 125

Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp
    130                 135                 140

Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys
145                 150                 155                 160

Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg
                165                 170                 175

Thr Asp Leu
```

<210> 3
<211> 477

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(477)
<223>

<400> 3

```
ctg cgg ccg ggc gac tgc gaa gtt tgt att tct tat ctg gga aga ttt       48
Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe
1               5                  10                  15

tac cag gac ctc aaa gac aga gat gtc aca ttc tca cca gcc act att       96
Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile
            20                  25                  30

gaa aac gaa ctt ata aag ttc tgc cgg gaa gca aga ggc aaa gag aat      144
Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn
        35                  40                  45

cgg ttg tgc tac tat atc ggg gcc aca gat gat gca gcc acc aaa atc      192
Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile
    50                  55                  60

atc aat gag gta tca aag cct ctg gcc cac cac atc cct gtg gag aag      240
Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys
65                  70                  75                  80

atc tgt gag aag ctt aag aag aag gac agc cag ata tgt gag ctt aag      288
Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys
                85                  90                  95

tat gac aag cag atc gac ctg agc aca gtg gac ctg aag aag ctc cga      336
Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg
            100                 105                 110

gtt aaa gag ctg aag aag att ctg gat gac tgg ggg gag aca tgc aaa      384
Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys
        115                 120                 125

ggc tgt gca gaa aag tct gac tac atc cgg aag ata aat gaa ctg atg      432
Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met
    130                 135                 140

cct aaa tat gcc ccc aag gca gcc agt gca cgg acc gat ttg tag          477
Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg Thr Asp Leu
145                 150                 155
```

<210> 4
<211> 158
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

```
Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser Tyr Leu Gly Arg Phe
1               5                  10                  15

Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe Ser Pro Ala Thr Ile
            20                  25                  30

Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala Arg Gly Lys Glu Asn
        35                  40                  45

Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp Ala Ala Thr Lys Ile
    50                  55                  60

Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His Ile Pro Val Glu Lys
65                  70                  75                  80

Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln Ile Cys Glu Leu Lys
                85                  90                  95

Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp Leu Lys Lys Leu Arg
            100                 105                 110

Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp Gly Glu Thr Cys Lys
        115                 120                 125

Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys Ile Asn Glu Leu Met
    130                 135                 140

Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg Thr Asp Leu
145                 150                 155
```

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótido que comprende una secuencia de promotor que puede dirigir la expresión de un polipéptido operativamente unido en una célula de mamífero, comprendiendo dicho polipéptido un polipéptido de MANF tal como se expone en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o lesión cerebral isquémica.

2. Vector según la reivindicación 1, seleccionándose el vector del grupo que consiste en VIH, VIS, VIF, VAIE, VAA, adenovirus, retrovirus, herpesvirus.

3. Vector según la reivindicación 2, en el que el vector es un vector de lentivirus.

4. Composición farmacéutica que comprende el vector según la reivindicación 1 y uno o más adyuvantes, excipientes, portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o lesión cerebral isquémica.

5. Polipéptido de MANF aislado y purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o lesión cerebral isquémica.

6. Uso de un animal no humano transgénico, que contiene un gen de MANF humano que codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 como transgén, como animal de prueba para reactivos que posiblemente confieren protección frente a enfermedades seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson y lesión cerebral isquémica.

7. Composición farmacéutica que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 para uso en el tratamiento de enfermedad de Parkinson o lesión cerebral isquémica, y que comprende además CDNF, GDNF o fosfolípidos.

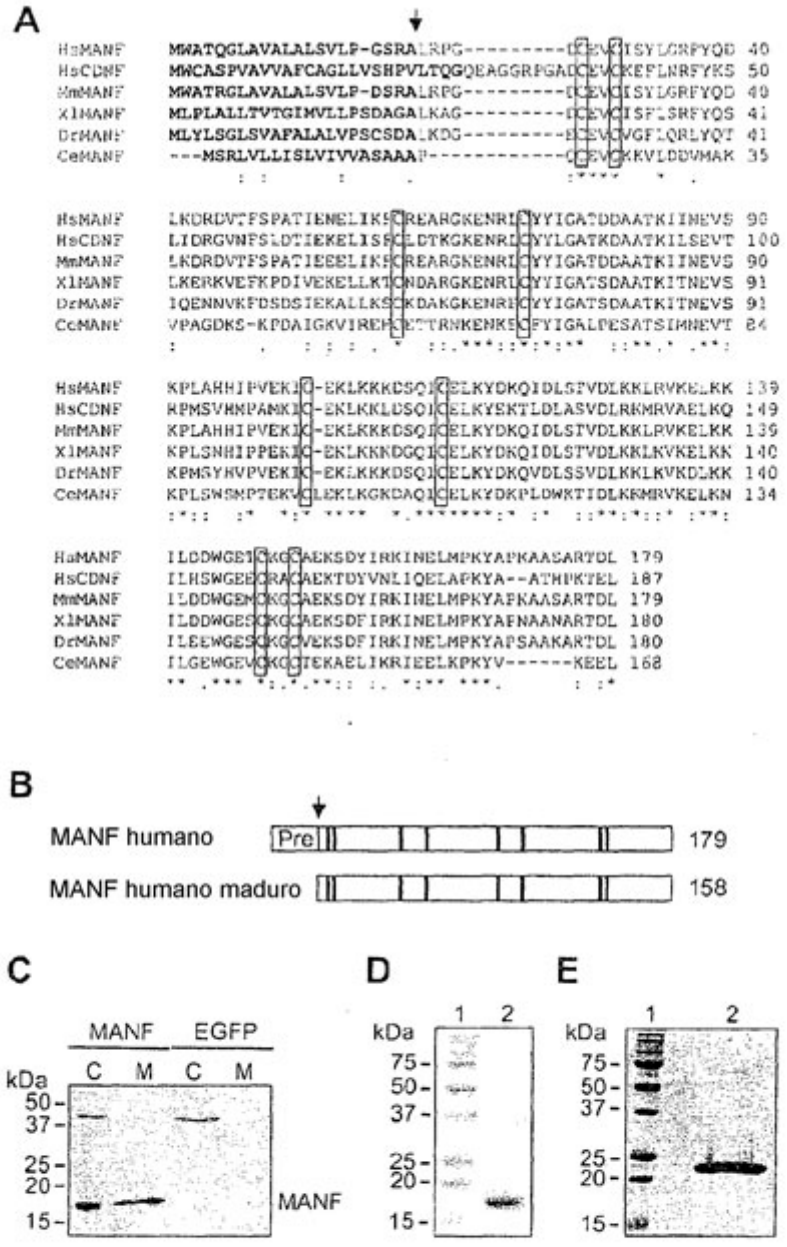

A
HsMANF
HsCDNF
MmMANF
XlMANF
DrMANF
CeMANF
B
MANF humano
Pre
179
MANF humano maduro
158
C
MANF
EGFP
C M C M
kDa
50
37
25
20
15
MANF
D
1 2
kDa
75
50
37
25
20
15
E
1 2
kDa
75
50
37
25
20
15

Figura 1.

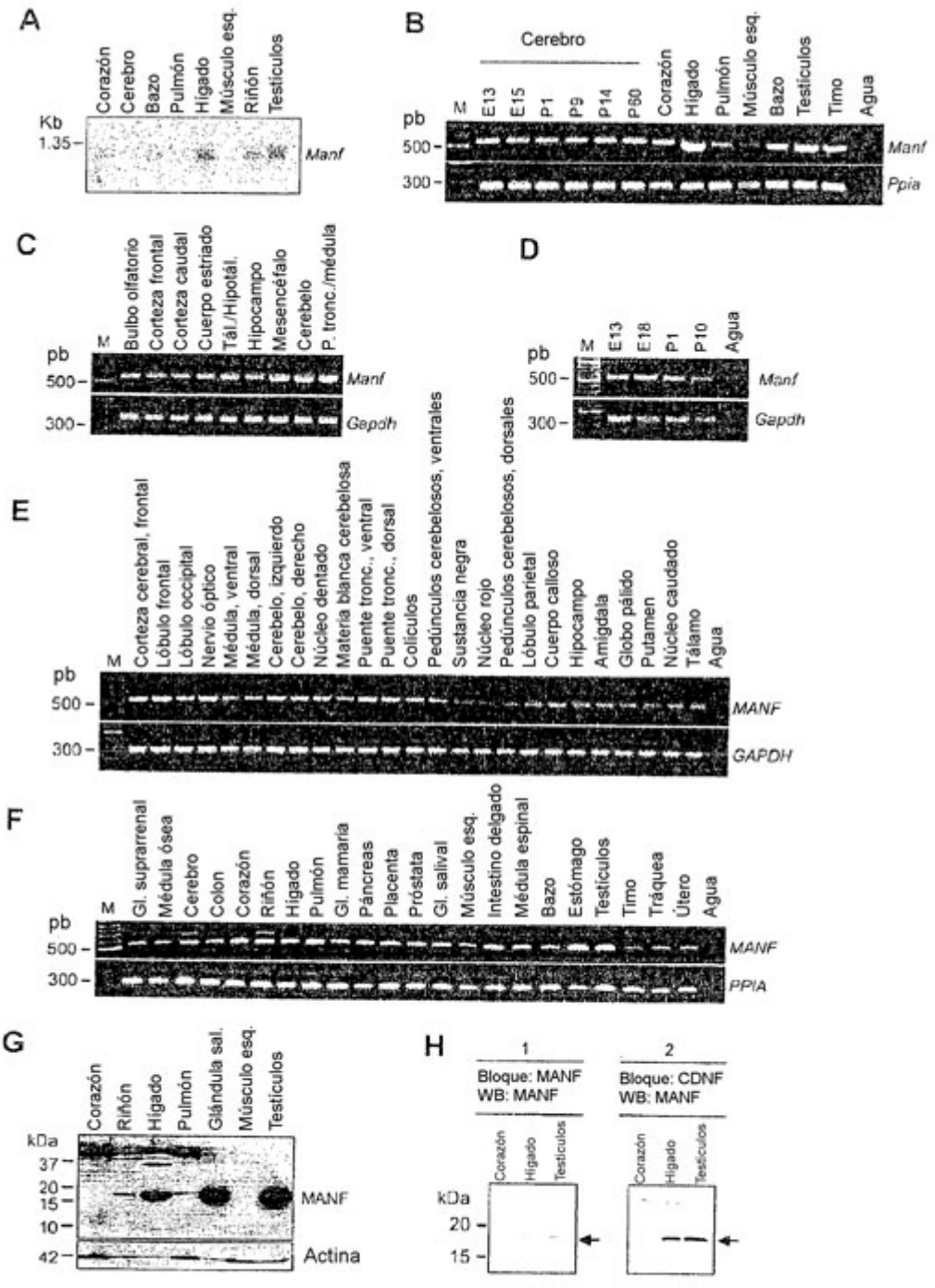

A
Corazón
Cerebro
Bazo
Pulmón
Hígado
Músculo esq.
Riñón
Testículos
Kb
1.35
Manf
B
Cerebro
M
E13
E15
P1
P9
P14
P60
Corazón
Hígado
Pulmón
Músculo esq.
Bazo
Testículos
Timo
Agua
pb
500
300
Manf
Ppia
C
M
Bulbo olfatorio
Corteza frontal
Corteza caudal
Cuerpo estriado
Tál./Hipotál.
Hipocampo
Mesencéfalo
Cerebelo
P. tronc./médula
pb
500
300
Manf
Gapdh
D
M
E13
E18
P1
P10
Agua
pb
500
300
Manf
Gapdh
E
M
Corteza cerebral, frontal
Lóbulo frontal
Lóbulo occipital
Nervio óptico
Médula, ventral
Médula, dorsal
Cerebelo, izquierdo
Cerebelo, derecho
Núcleo dentado
Materia blanca cerebelosa
Puente tronc., ventral
Puente tronc., dorsal
Colículos
Pedúnculos cerebelosos, ventrales
Sustancia negra
Núcleo rojo
Pedúnculos cerebelosos, dorsales
Lóbulo parietal
Cuerpo calloso
Hipocampo
Amígdala
Globo pálido
Putamen
Núcleo caudado
Tálamo
Agua
pb
500
300
MANF
GAPDH
F
M
Gl. suprarrenal
Médula ósea
Cerebro
Colon
Corazón
Riñón
Hígado
Pulmón
Gl. mamaria
Páncreas
Placenta
Próstata
Gl. salival
Músculo esq.
Intestino delgado
Médula espinal
Bazo
Estómago
Testículos
Timo
Tráquea
Útero
Agua
pb
500
300
MANF
PPIA
G
Corazón
Riñón
Hígado
Pulmón
Glándula sal.
Músculo esq.
Testículos
kDa
37
20
15
10
42
MANF
Actina
H
1
Bloque: MANF
WB: MANF
2
Bloque: CDNF
WB: MANF
Corazón
Hígado
Testículos
kDa
20
15

Figura 2.

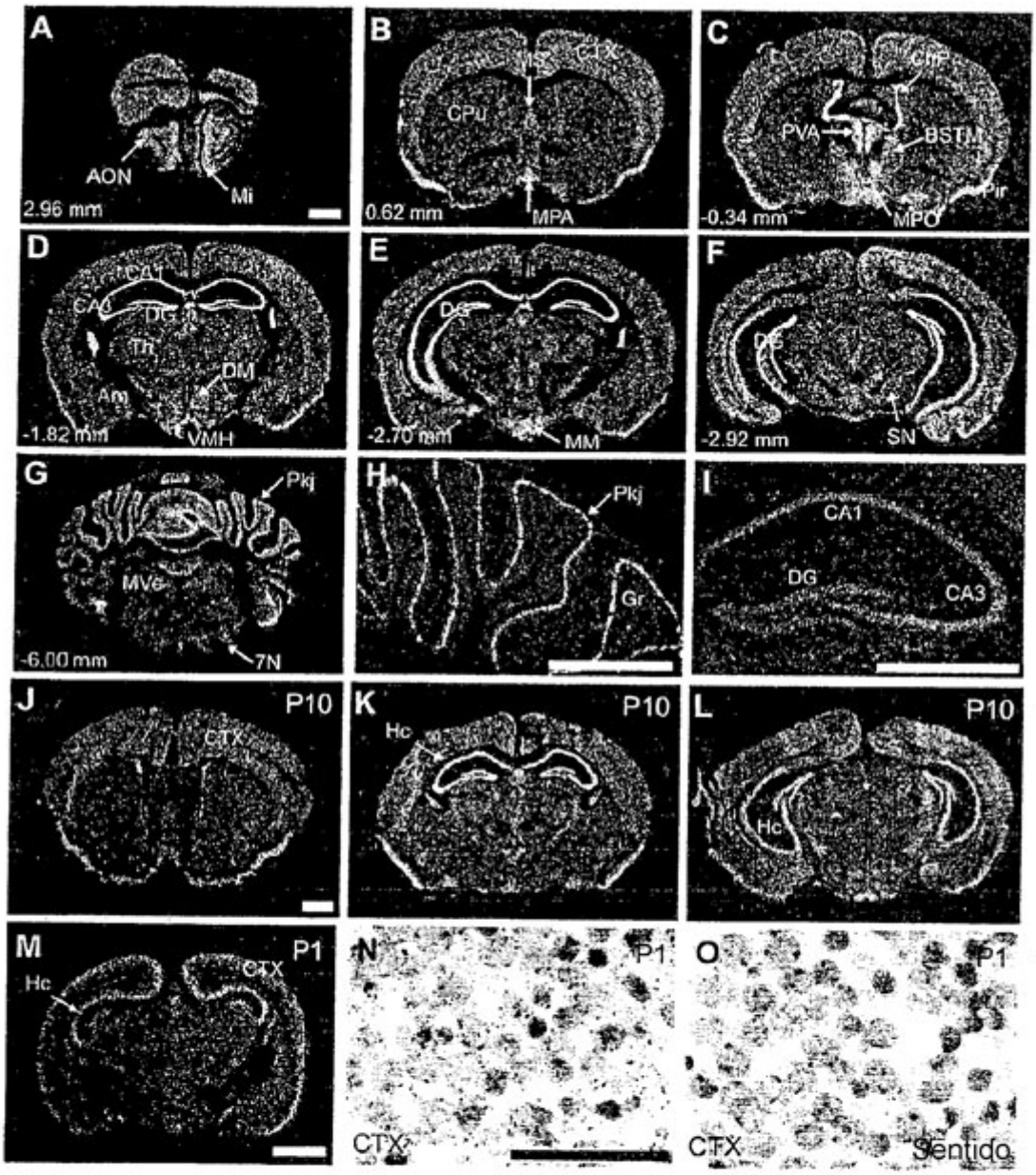

A
AON
Mi
2.96 mm
B
CTX
CPu
MPA
0.62 mm
C
ChP
PVA
BSTM
Pir
MPO
-0.34 mm
D
CA1
CA3
DG
Th
DM
Am
VMH
-1.82 mm
E
DG
MM
-2.70 mm
F
DG
SN
-2.92 mm
G
Pkj
MVe
7N
-6.00 mm
H
Pkj
Gr
I
CA1
DG
CA3
J
P10
CTX
K
P10
Hc
L
P10
Hc
M
P1
Hc
CTX
N
P1
CTX
O
P1
CTX
Sentido

Figura 3.

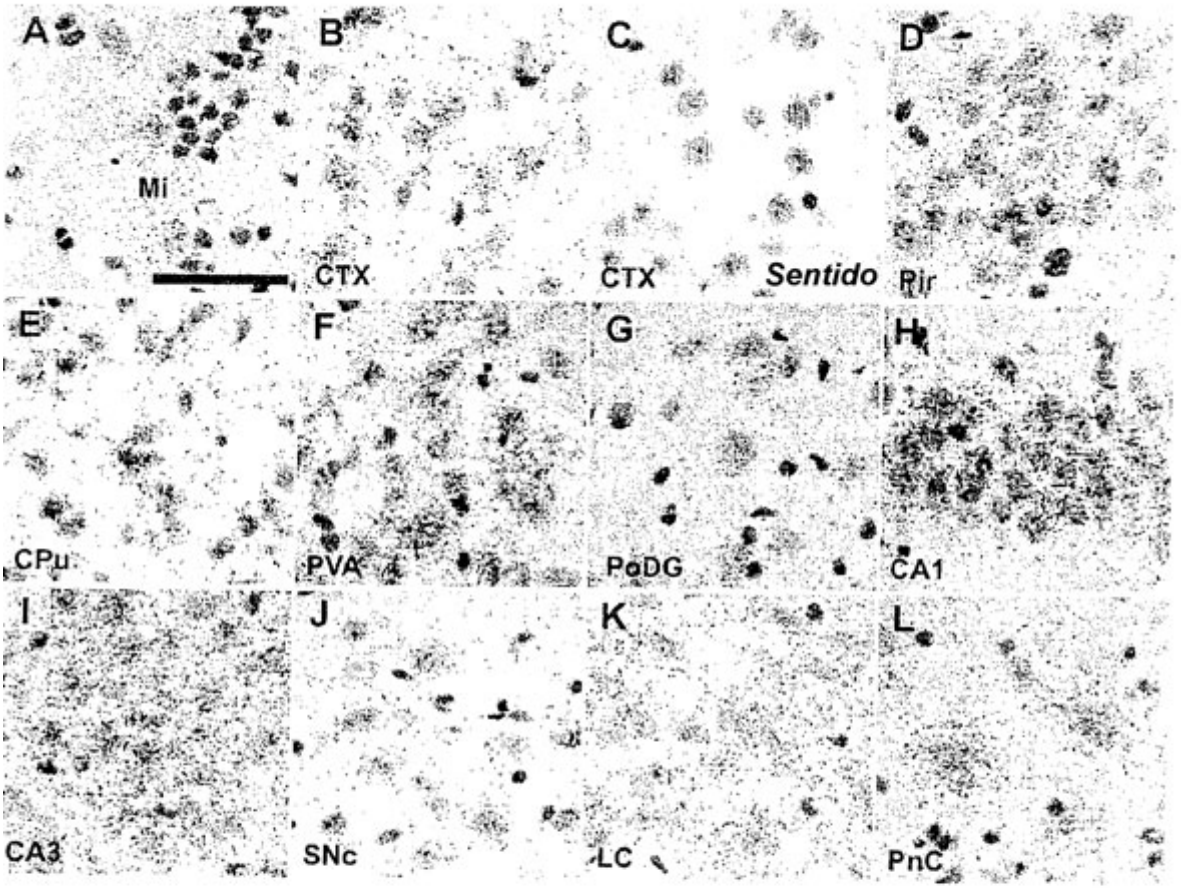

A
Mi
B
CTX
C
CTX
Sentido
D
Pir
E
CPu
F
PVA
G
PoDG
H
CA1
I
CA3
J
SNc
K
LC
L
PnC

Figura 4.

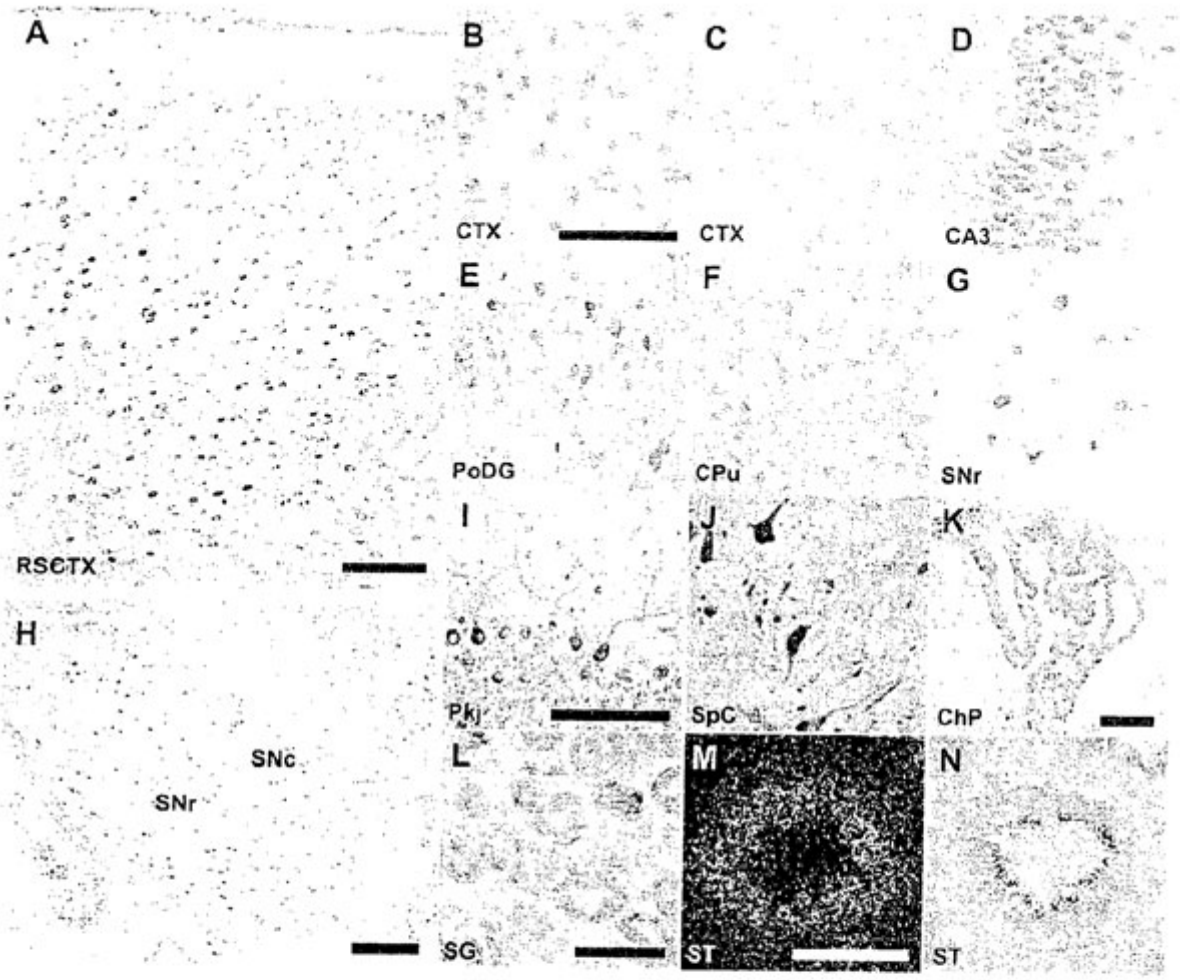

A
B
C
D
CTX
CTX
CA3
E
F
G
PoDG
CPu
SNr
I
J
K
RSCTX
H
Pkj
SpC
ChP
SNc
SNr
L
M
N
SG
ST
ST

Figura 5.

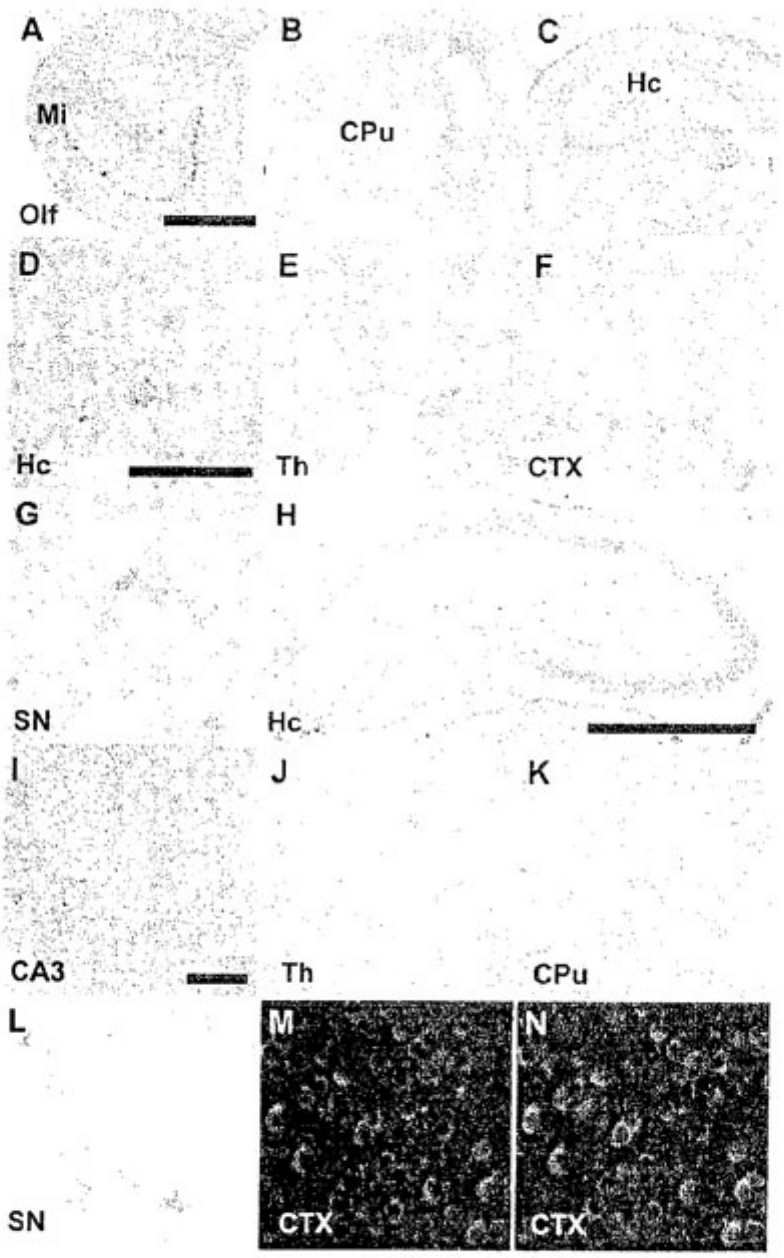

A
Mi
Olf
B
CPu
C
Hc
D
Hc
E
Th
F
CTX
G
SN
H
Hc
I
CA3
J
Th
K
CPu
L
SN
M
CTX
N
CTX

Figura 6.

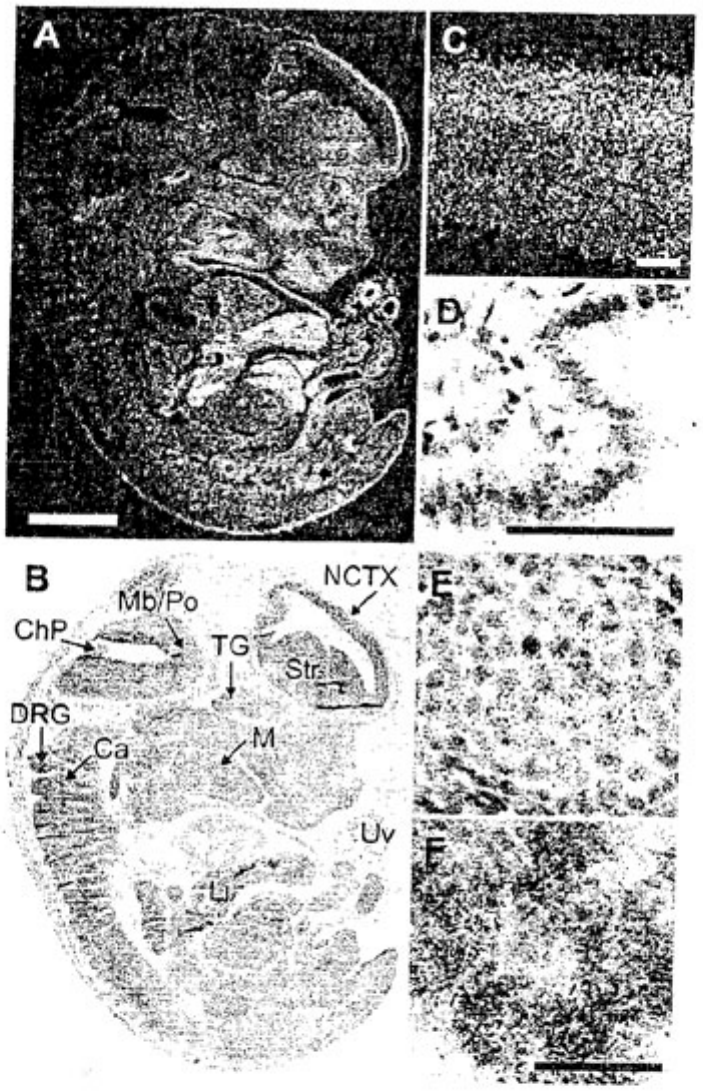


Figura 7.

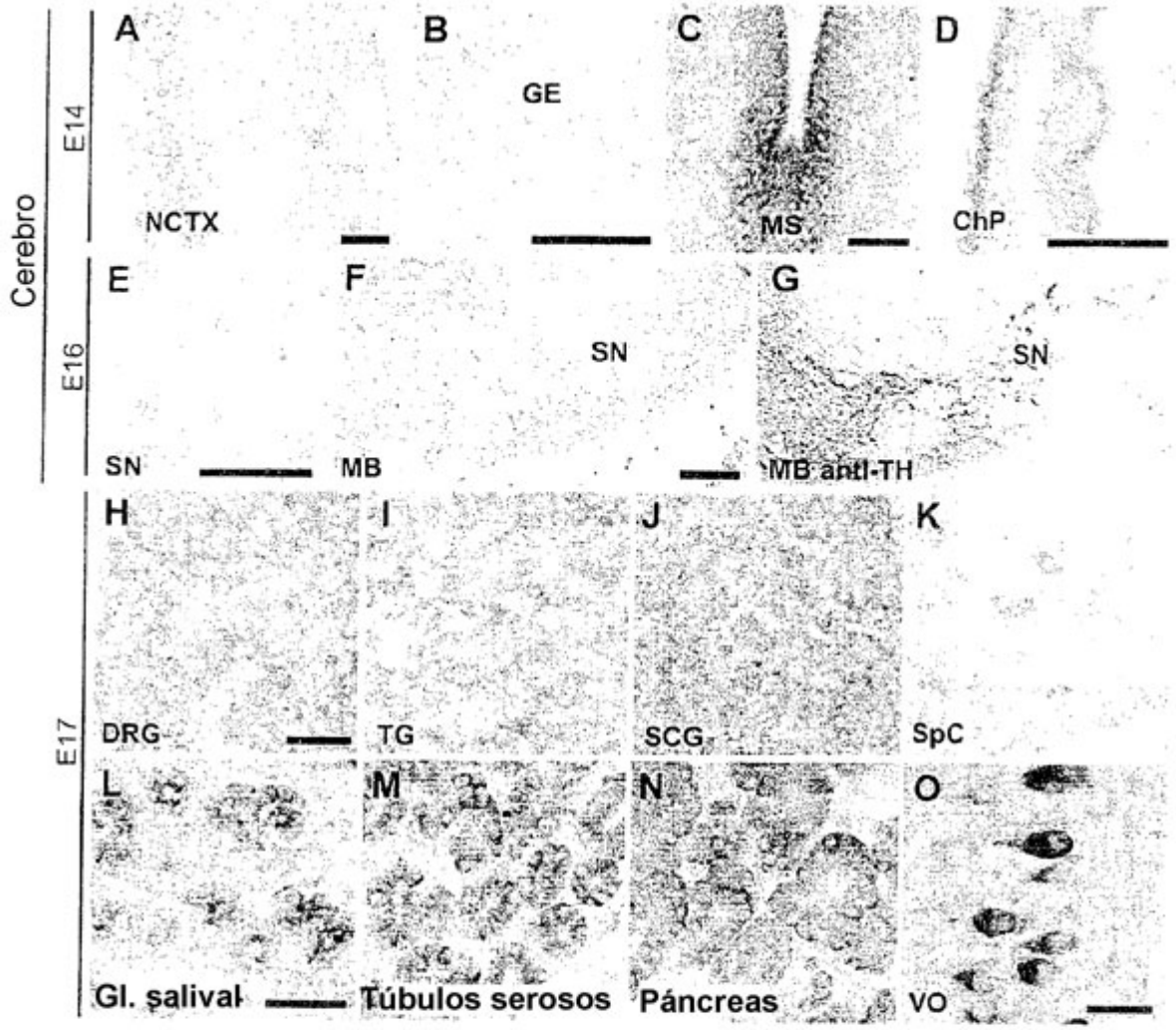

Cerebro
E14
E16
E17
A
B
C
D
GE
NCTX
MS
ChP
E
F
G
SN
SN
SN
MB
MB anti-TH
H
I
J
K
DRG
TG
SCG
SpC
L
M
N
O
Gl. salival
Túbulos serosos
Páncreas
VO

Figura 8.

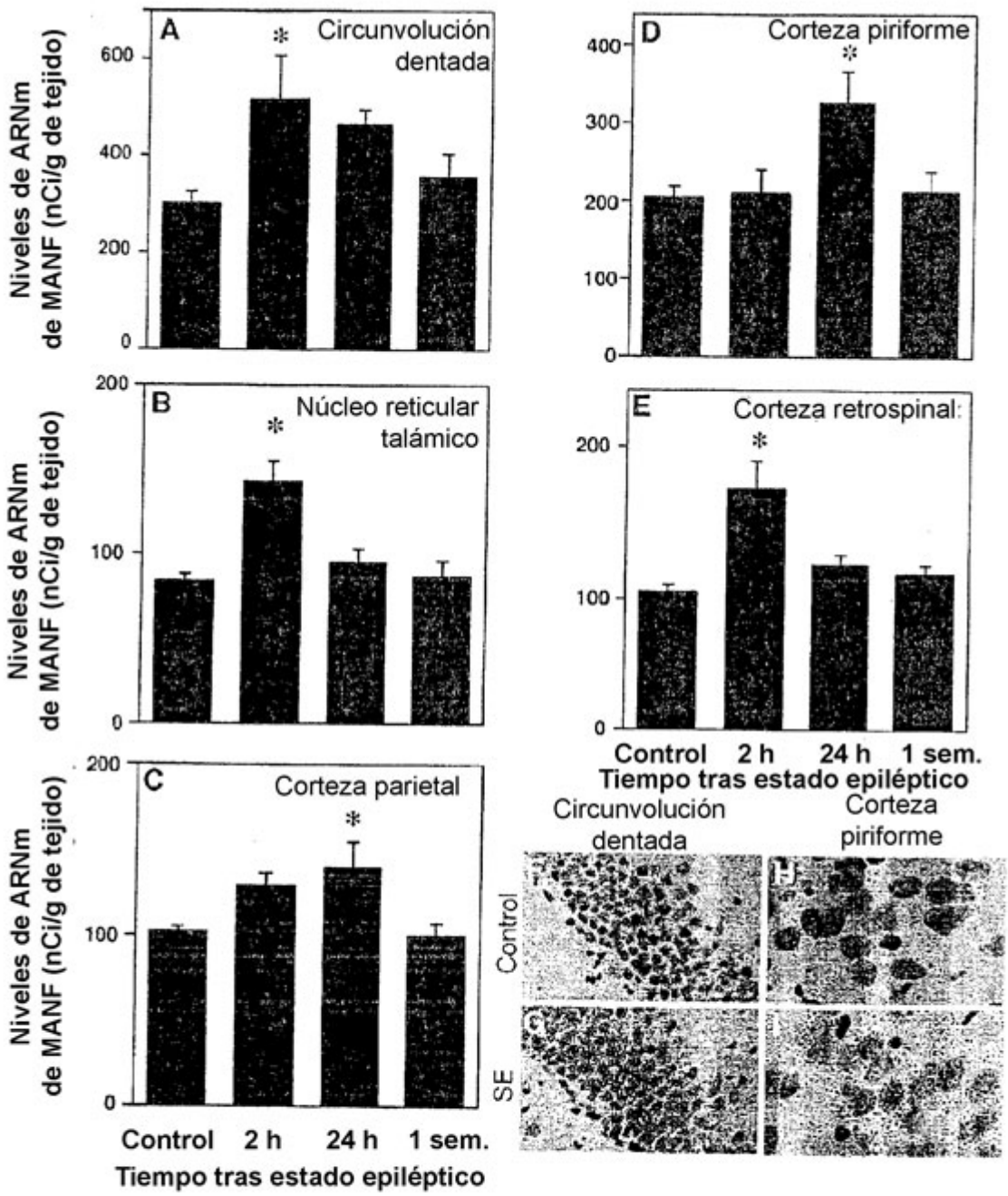

A
Circunvolución dentada
B
Núcleo reticular talámico
C
Corteza parietal
D
Corteza piriforme
E
Corteza retrospinal
Niveles de ARNm de MANF (nCi/g de tejido)
Control
2 h
24 h
1 sem.
Tiempo tras estado epiléptico
Circunvolución dentada
Corteza piriforme
Control
SE

Figura 9.

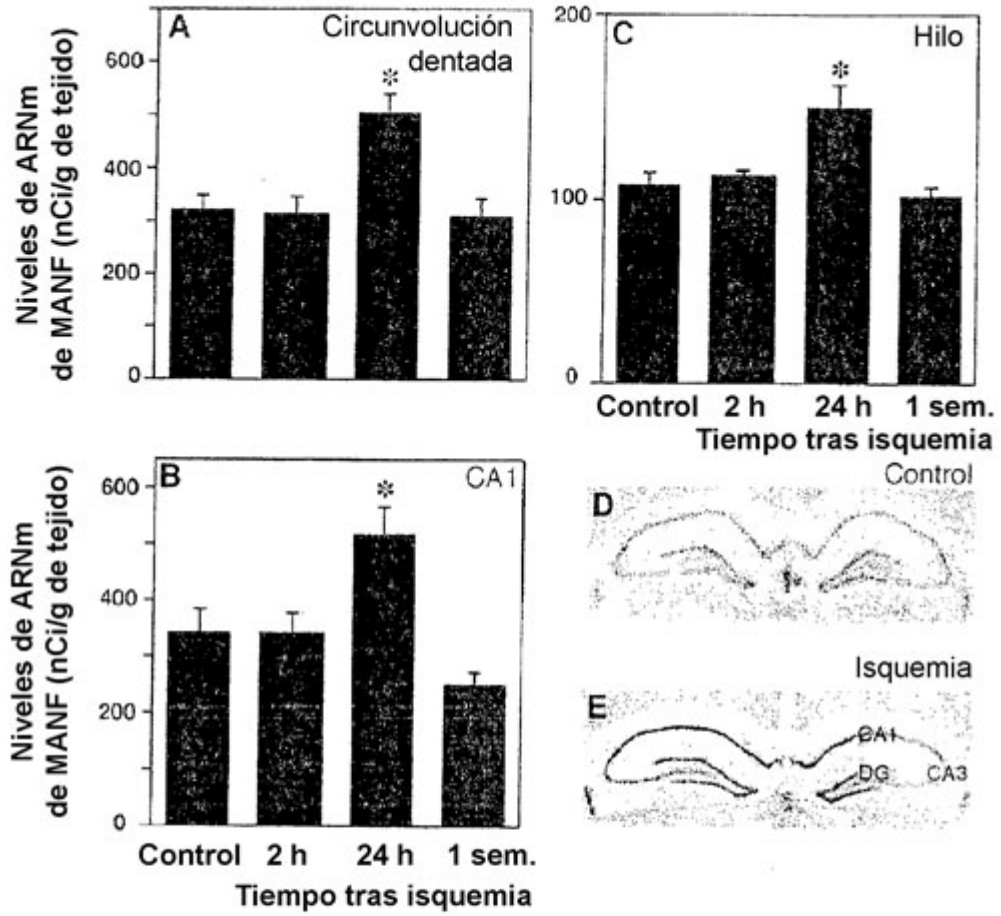

A
Circunvolución dentada
Niveles de ARNm de MANF (nCi/g de tejido)
600
400
200
0
C
Hilo
200
100
0
Control
2 h
24 h
1 sem.
Tiempo tras isquemia
B
CA1
Niveles de ARNm de MANF (nCi/g de tejido)
600
400
200
0
Control
2 h
24 h
1 sem.
Tiempo tras isquemia
D
Control
E
Isquemia
CA1
DG
CA3

Figura 10.

Plan experimental para estudios
de neuroprotección de MANF
(estudios de respuesta a la dosis de MANF)

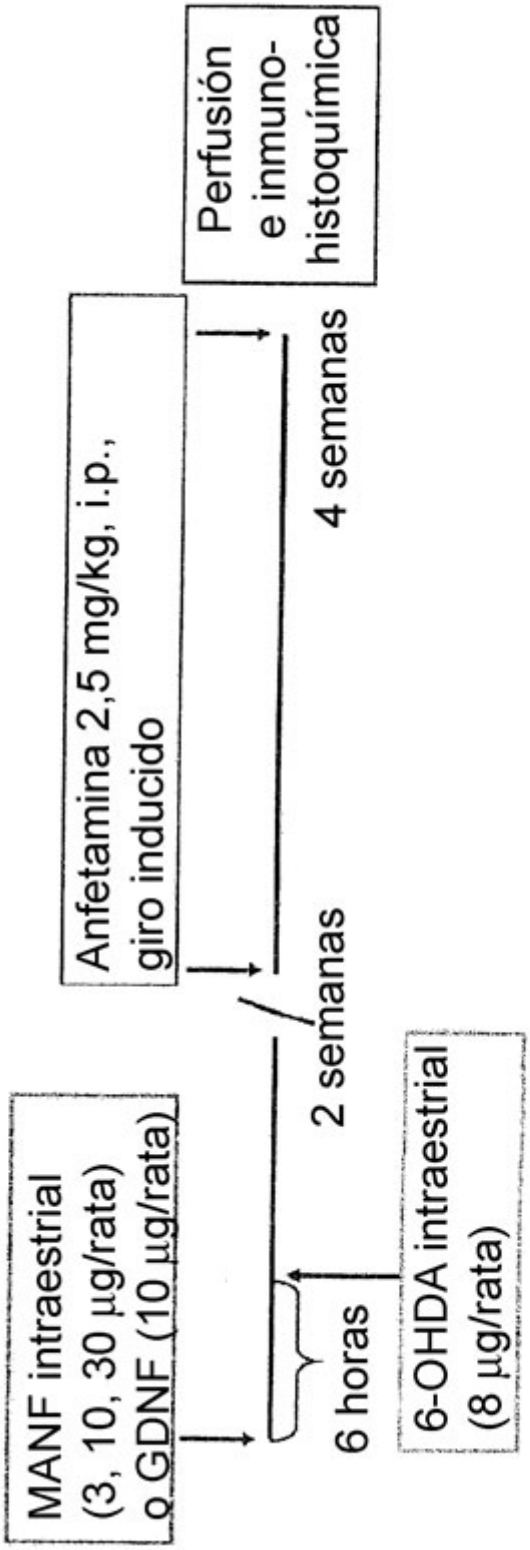


Figura 11

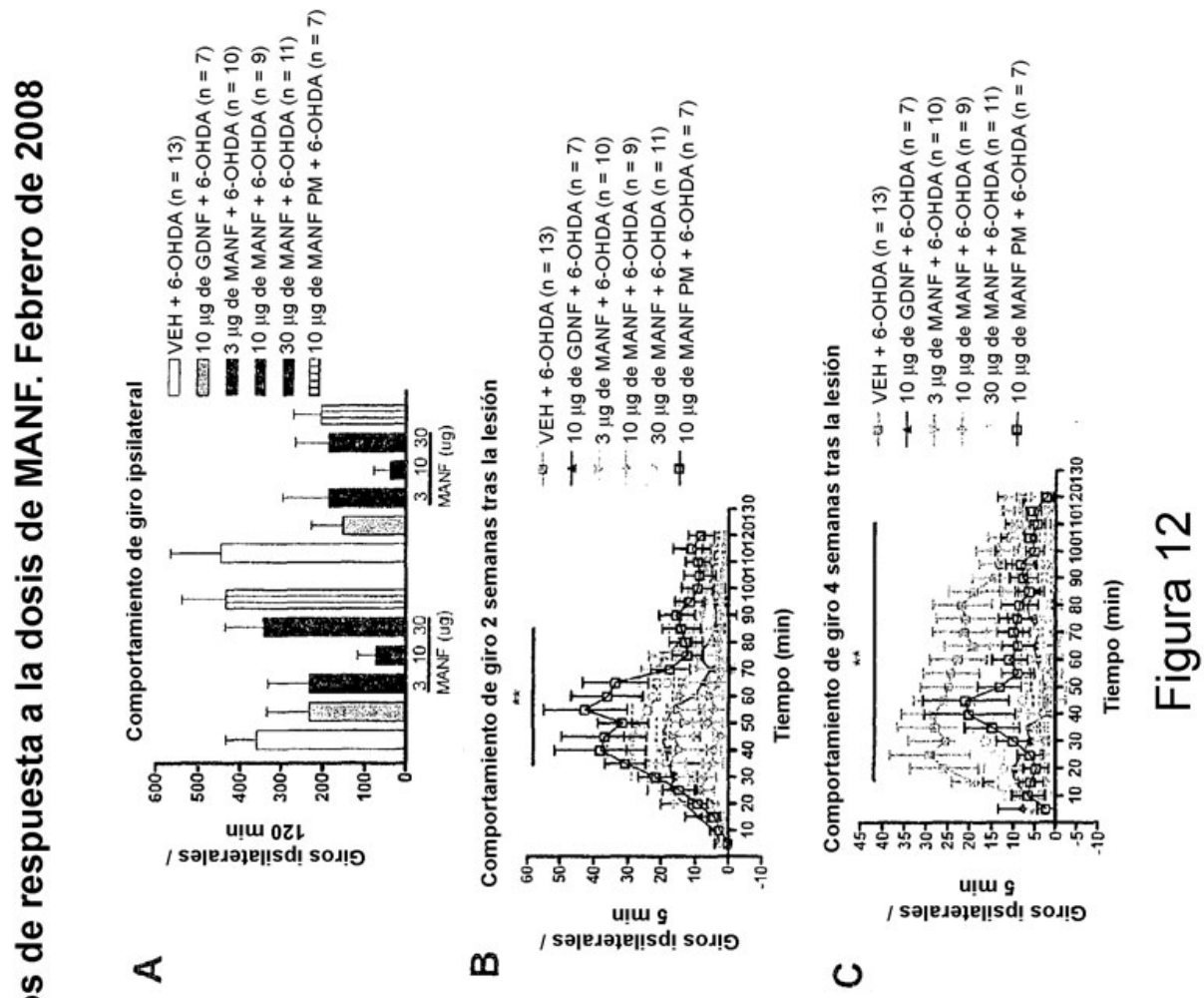

Estudios de respuesta a la dosis de MANF. Febrero de 2008
A
Comportamiento de giro ipsilateral
VEH + 6-OHDA (n = 13)
10 µg de GDNF + 6-OHDA (n = 7)
3 µg de MANF + 6-OHDA (n = 10)
10 µg de MANF + 6-OHDA (n = 9)
30 µg de MANF + 6-OHDA (n = 11)
10 µg de MANF PM + 6-OHDA (n = 7)
Giros ipsilaterales / 120 min
MANF (ug)
B
Comportamiento de giro 2 semanas tras la lesión
Giros ipsilaterales / 5 min
Tiempo (min)
C
Comportamiento de giro 4 semanas tras la lesión
Giros ipsilaterales / 5 min
Tiempo (min)

Figura 12

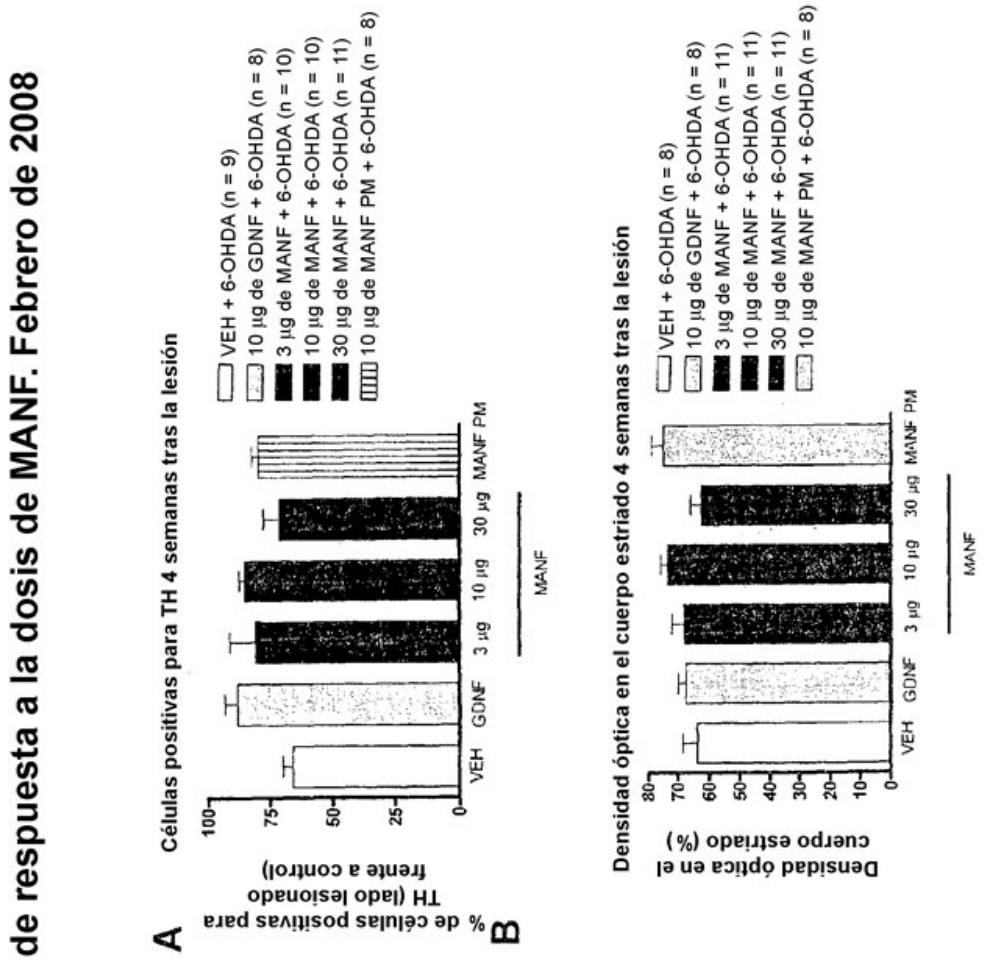

Estudios de respuesta a la dosis de MANF. Febrero de 2008
A
Células positivas para TH 4 semanas tras la lesión
% de células positivas para TH (lado lesionado frente a control)
VEH + 6-OHDA (n = 9)
10 µg de GDNF + 6-OHDA (n = 8)
3 µg de MANF + 6-OHDA (n = 10)
10 µg de MANF + 6-OHDA (n = 10)
30 µg de MANF + 6-OHDA (n = 11)
10 µg de MANF PM + 6-OHDA (n = 8)
VEH GDNF 3 µg 10 µg 30 µg MANF PM
MANF
B
Densidad óptica en el cuerpo estriado 4 semanas tras la lesión
Densidad óptica en el cuerpo estriado (%)
VEH + 6-OHDA (n = 8)
10 µg de GDNF + 6-OHDA (n = 8)
3 µg de MANF + 6-OHDA (n = 11)
10 µg de MANF + 6-OHDA (n = 11)
30 µg de MANF + 6-OHDA (n = 11)
10 µg de MANF PM + 6-OHDA (n = 8)
VEH GDNF 3 µg 10 µg 30 µg MANF PM
MANF

Figura 13

Efecto de infusión de MANF crónica en un modelo neurorrestaurativo
-- Plan experimental --

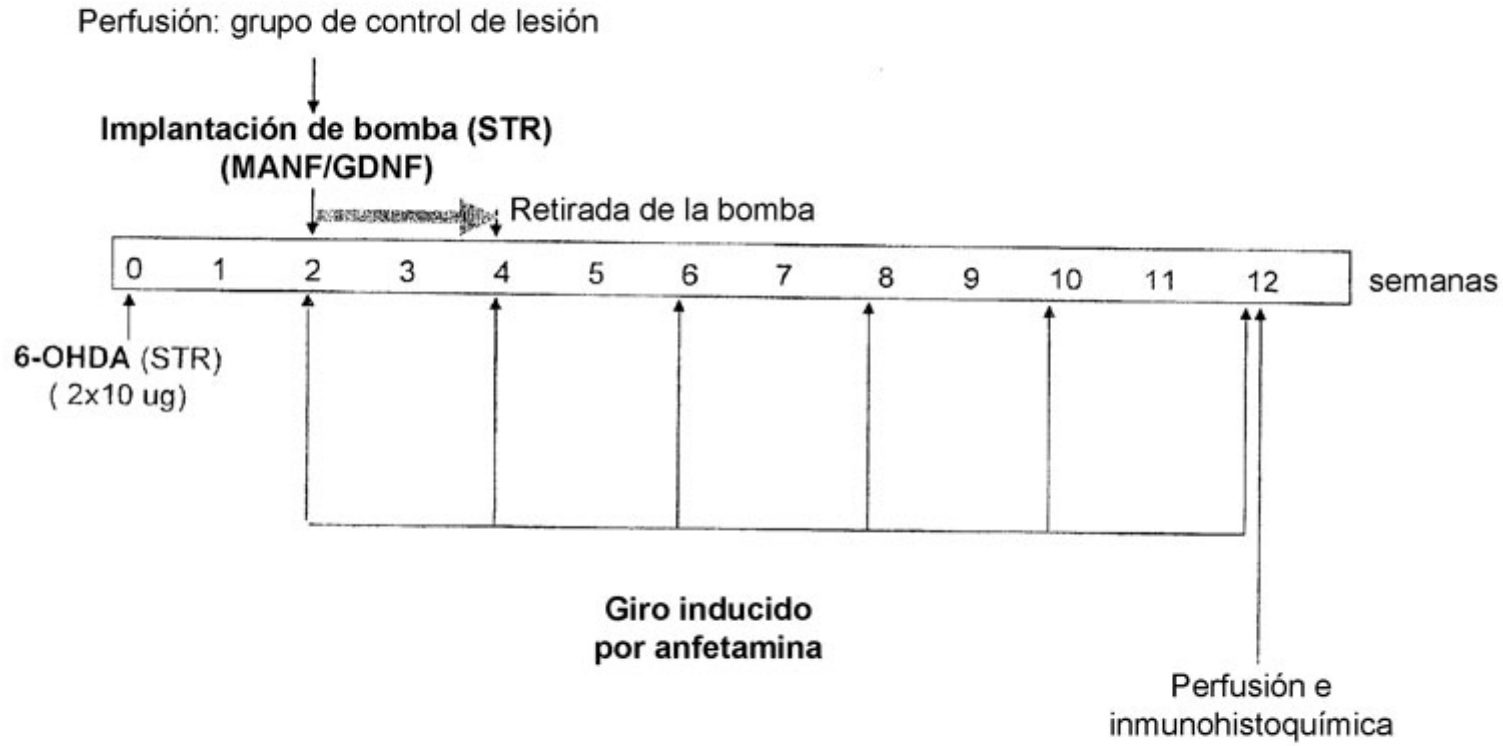


Figura 14

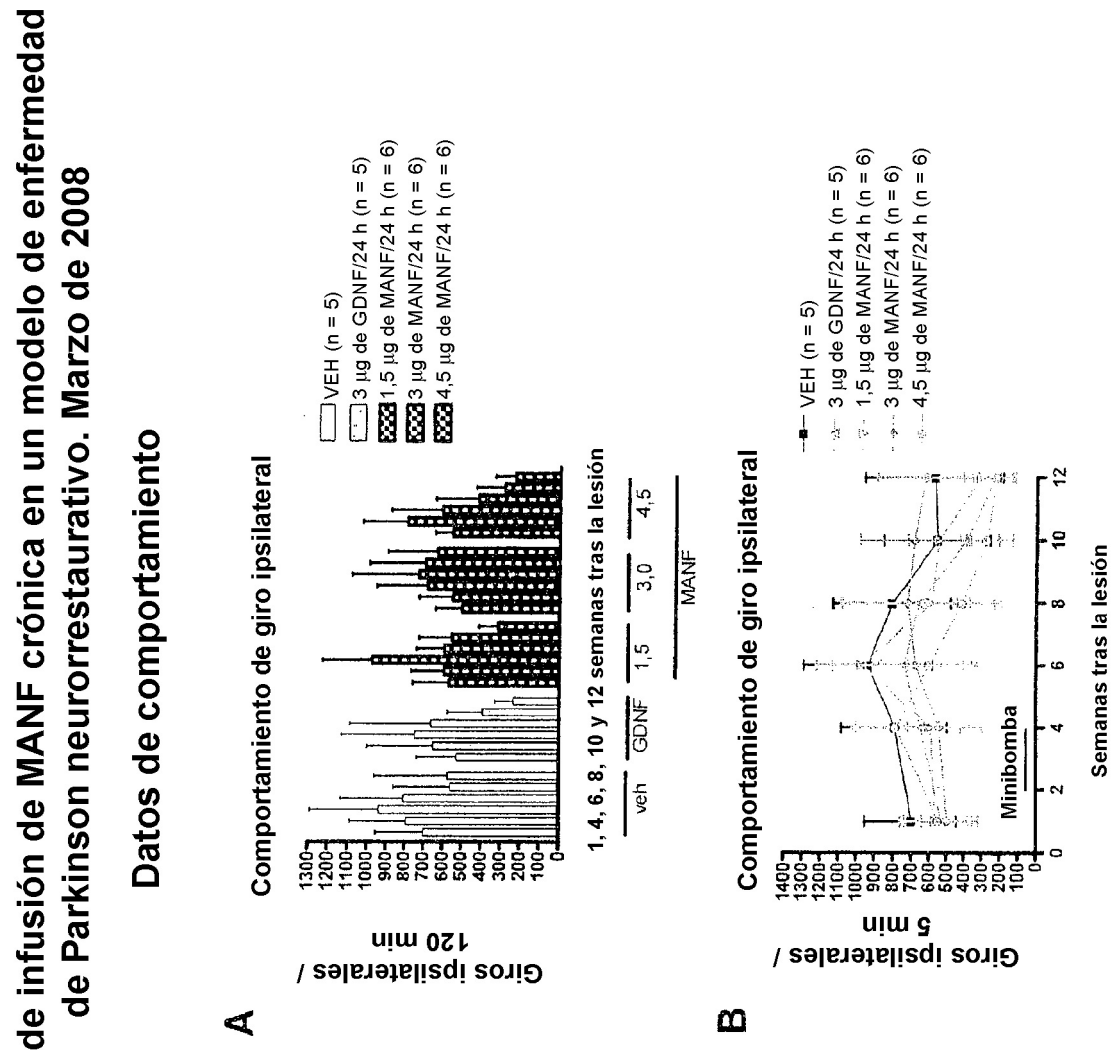

Efecto de infusión de MANF crónica en un modelo de enfermedad de Parkinson neurorrestaurativo. Marzo de 2008
Datos de comportamiento
A
Comportamiento de giro ipsilateral
Giros ipsilaterales / 120 min
VEH (n = 5)
3 µg de GDNF/24 h (n = 5)
1,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
3 µg de MANF/24 h (n = 6)
4,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
1, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas tras la lesión
veh
GDNF
1,5
3,0
4,5
MANF
B
Comportamiento de giro ipsilateral
Giros ipsilaterales / 5 min
VEH (n = 5)
3 µg de GDNF/24 h (n = 5)
1,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
3 µg de MANF/24 h (n = 6)
4,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
Minibomba
Semanas tras la lesión

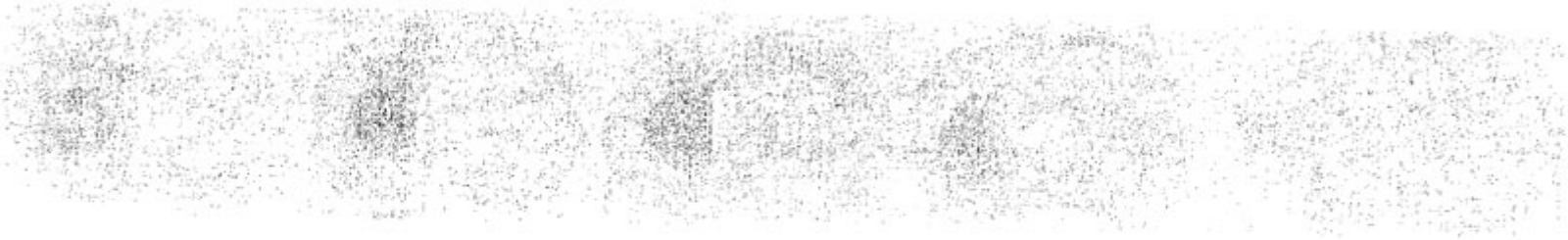
Figura 15

Efecto de infusión de MANF crónica en un modelo de enfermedad de Parkinson neurorrestaurativo. Marzo de 2008
Inmunohistoquímica
A Infusiones crónicas de MANF: densidad óptica en el cuerpo estriado
Densidad óptica en el cuerpo estriado (%)
VEH (n = 5)
3 µg de GDNF/24 h (n = 5)
1,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
3 µg de MANF/24 h (n = 6)
4,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
Control de lesión (n = 4)
VEH GDNF 1,5 3 4,5
MANF (ug/24h)
B Células TH+ en SN 12 semanas tras la lesión
Células TH+ en la sustancia negra (%)
VEH (n = 5)
3 µg de GDNF/24 h (n = 5)
1,5 µg de MANF/24 h (n = 4)
3 µg de MANF/24 h (n = 6)
4,5 µg de MANF/24 h (n = 6)
VEH GDNF 1,5 3 4,5
MANF (ug/24h)

Figura 16

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN: MANF Y GDNF
Inmunohistoquímica (24 h)

Tinción anti-MANF



Tinción anti-GDNF

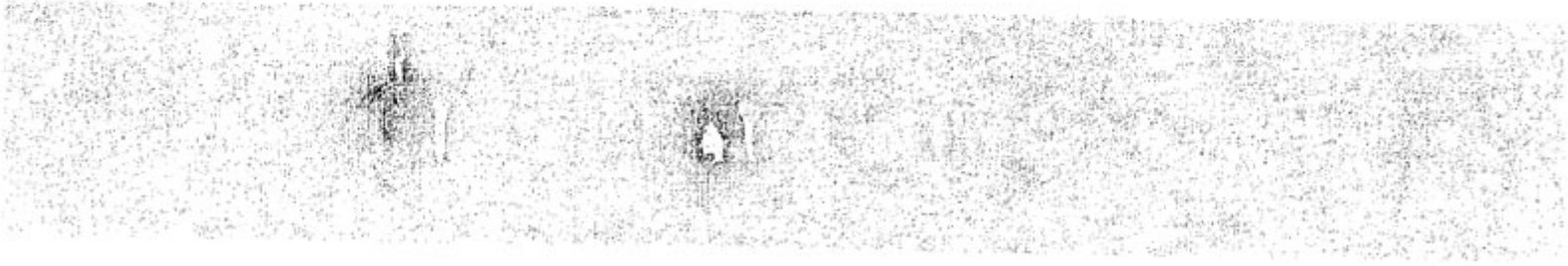


Figura 17

ES 2 530 222 T3

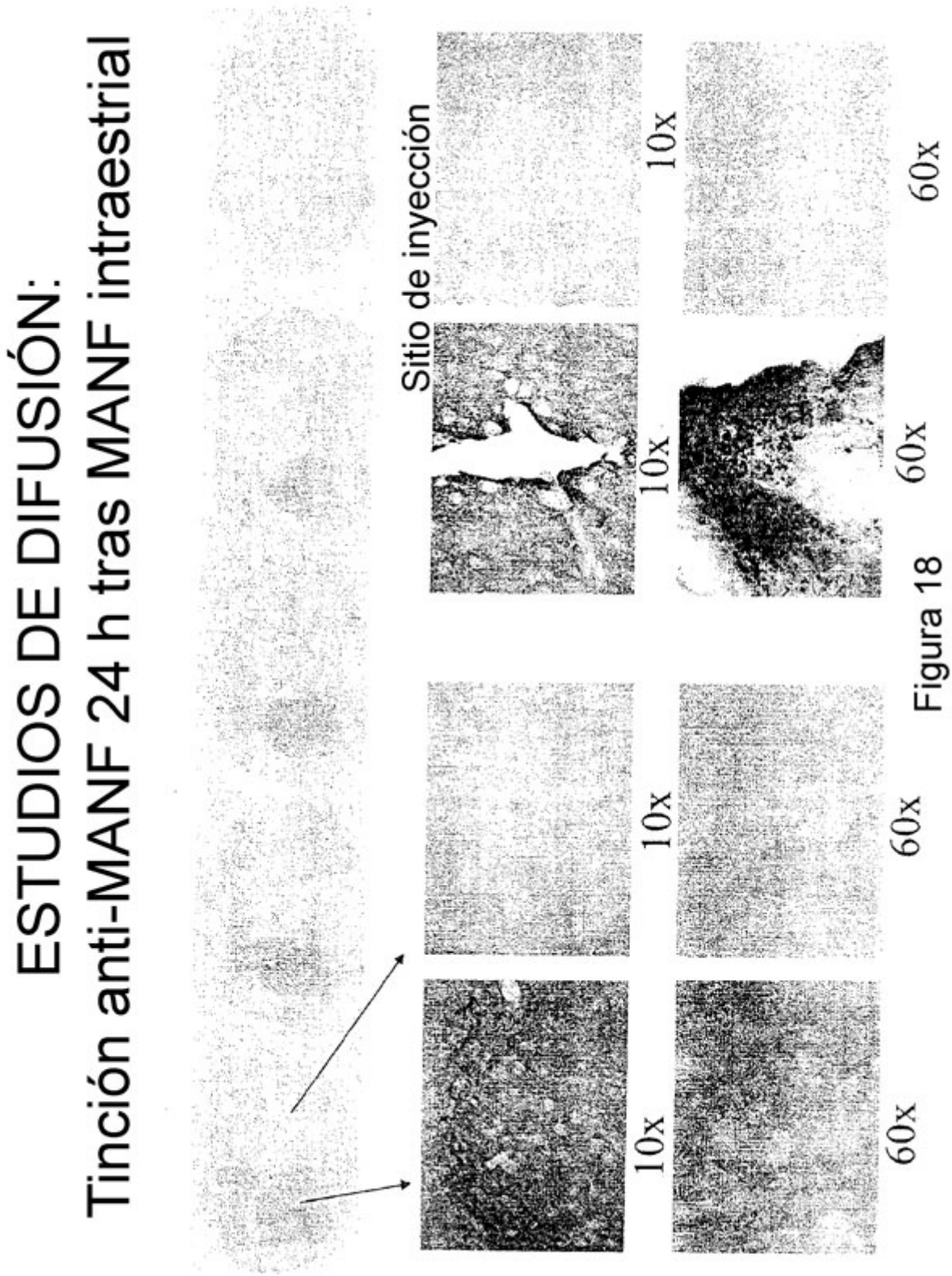

ESTUDIOS DE DIFUSIÓN:
Tinción anti-MANF 24 h tras MANF intraestrial
Sitio de inyección
10x
60x
10x
60x
10x
60x
10x
60x

Figura 18

Experimentos de transporte:
Autorradiografía
GDNF
MANF
CDNF
Bulbo olfatorio
STR
Hipo-campo
SN

Figura 19

Experimentos de transporte:
Radiactividad en SN medida con un contador γ

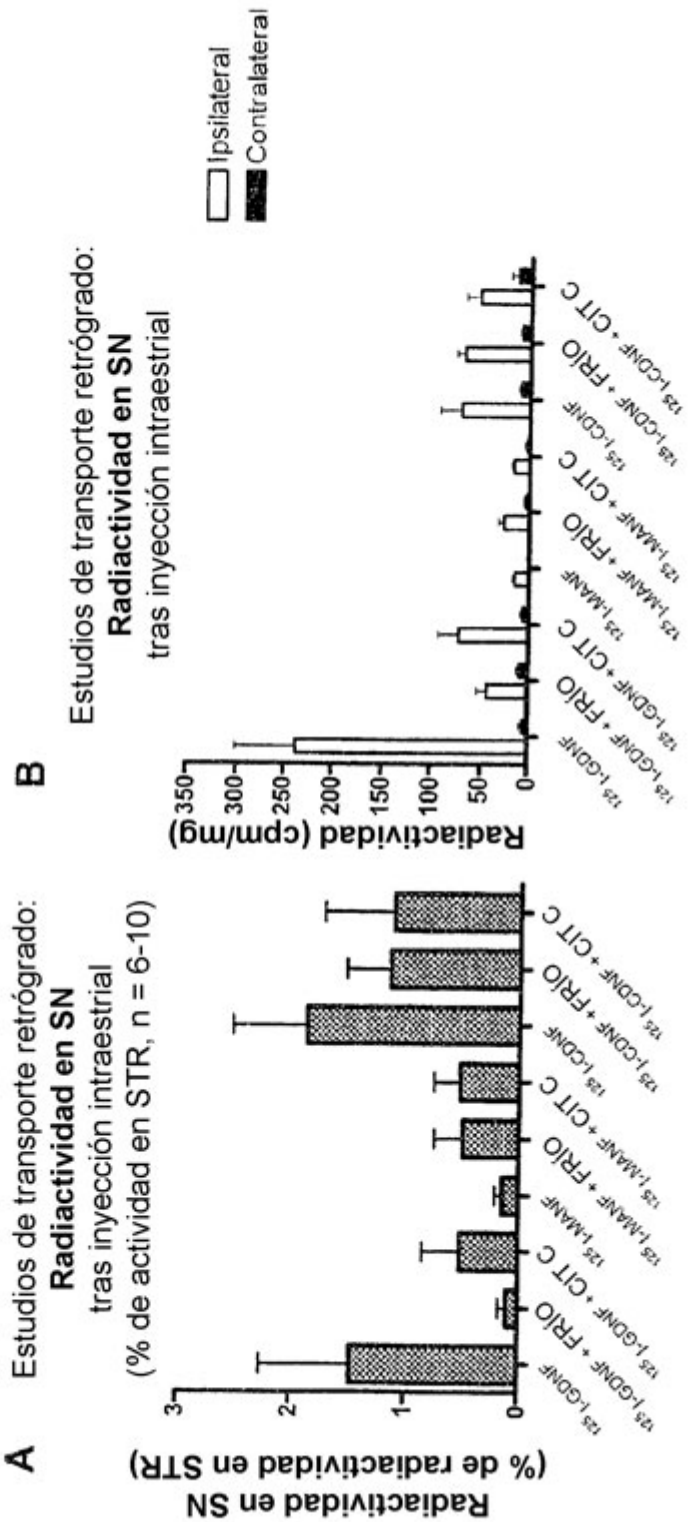


Figura 20

Experimentos de transporte:
Radiactividad en la corteza y corteza frontal medida con un contador γ

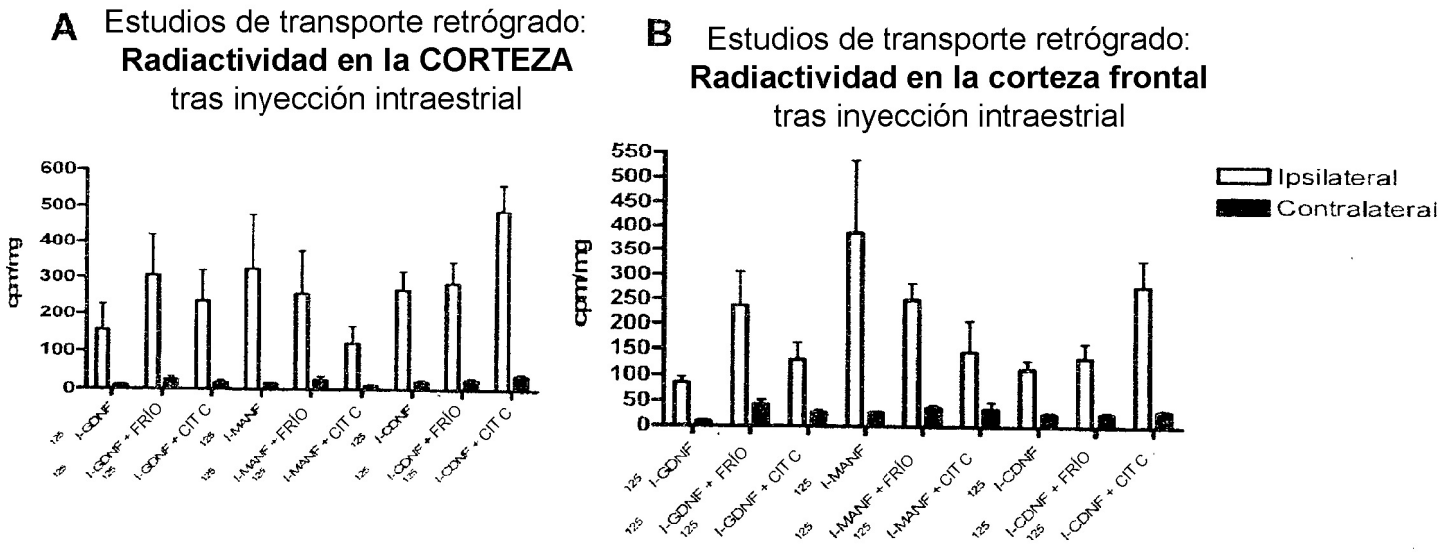


Figura 21

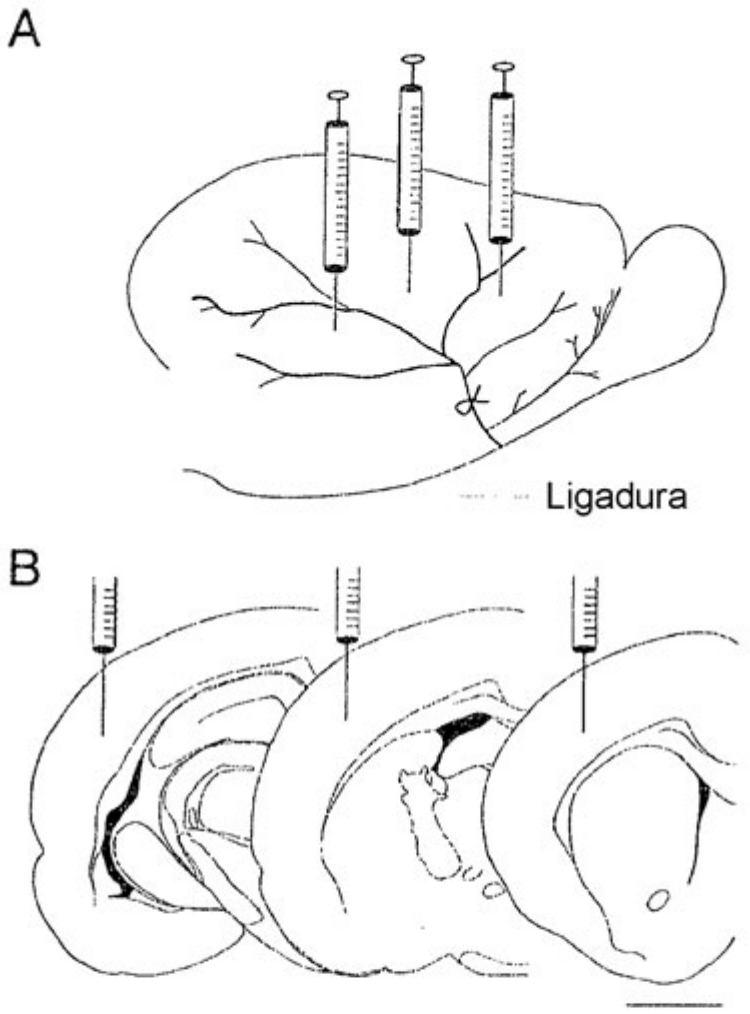


Figura 22.

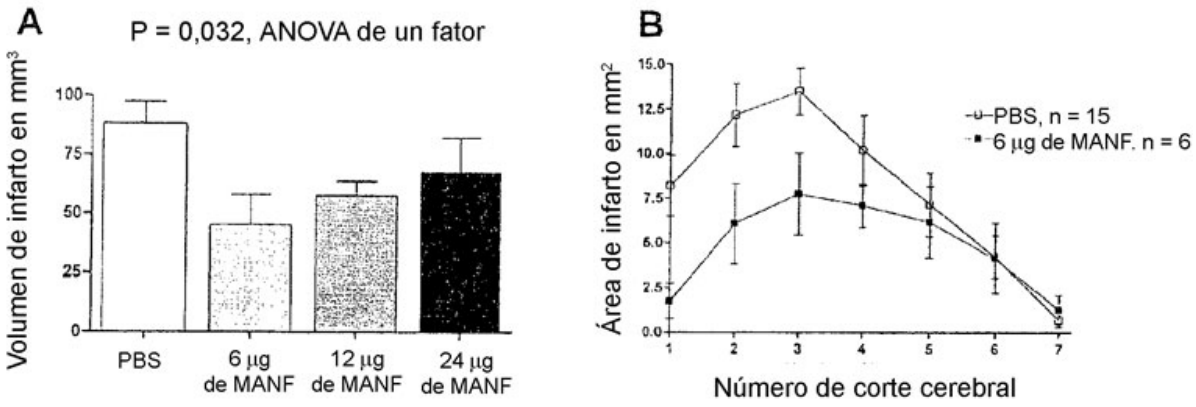

A
P = 0,032, ANOVA de un fator
Volumen de infarto en mm3
100
75
50
25
0
PBS
6 µg de MANF
12 µg de MANF
24 µg de MANF
B
Área de infarto en mm2
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
Número de corte cerebral
PBS, n = 15
6 µg de MANF. n = 6

Figura 23.

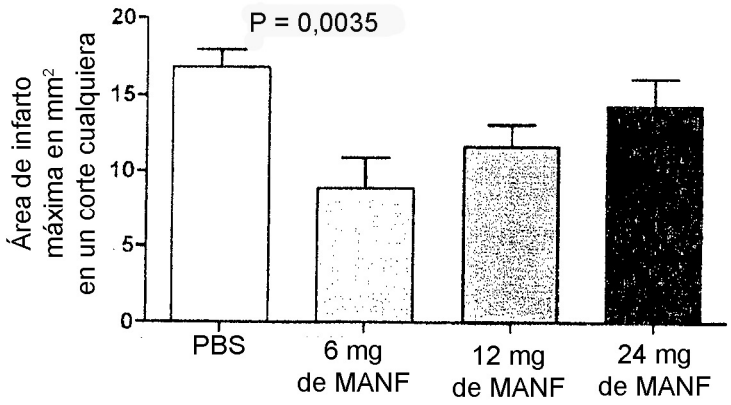

P = 0,0035
Área de infarto máxima en mm² en un corte cualquiera
20
15
10
5
0
PBS
6 mg de MANF
12 mg de MANF
24 mg de MANF

Figura 24.

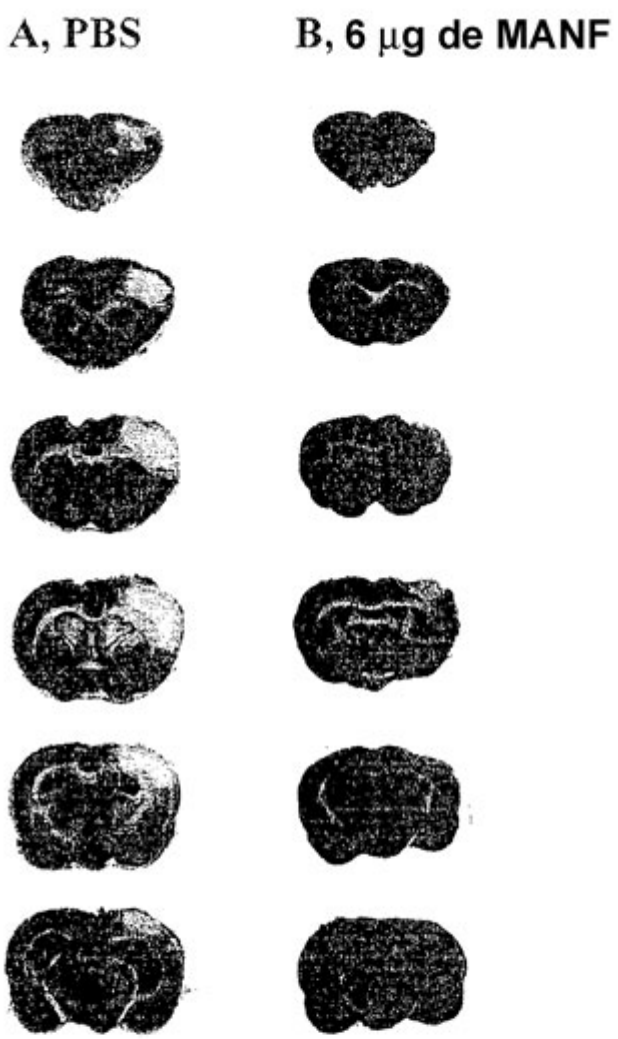


Figura 25.

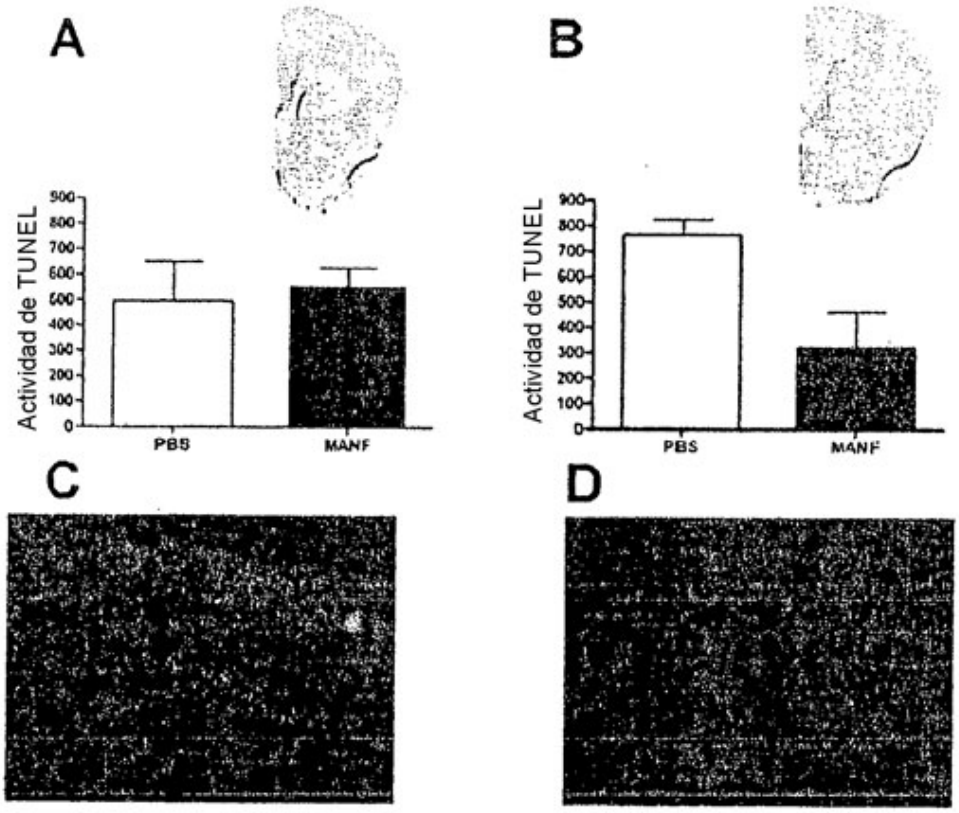

A
B
Actividad de TUNEL
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
PBS
MANF
C
D

Figura 26.

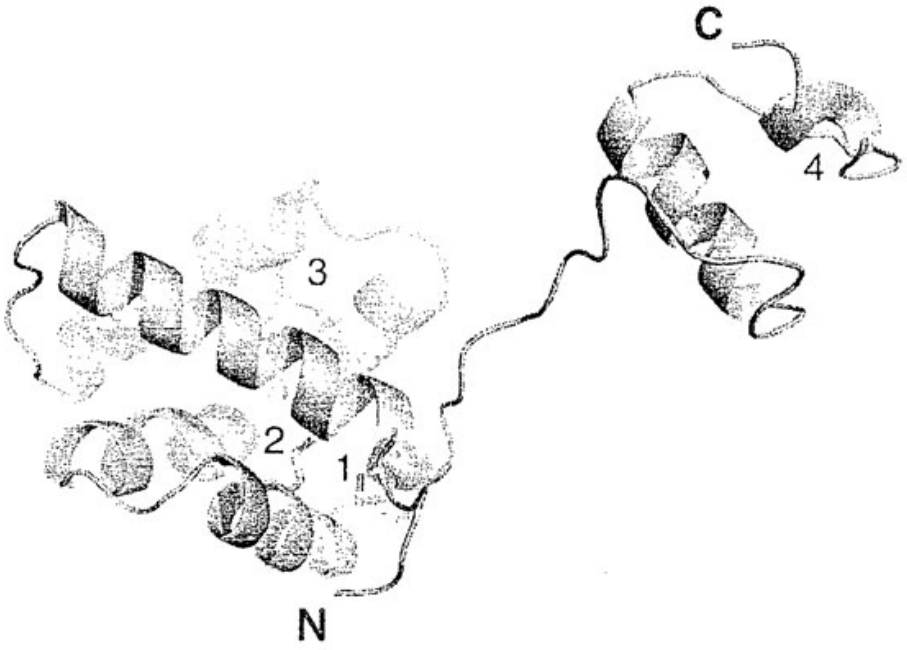


Figura 27.

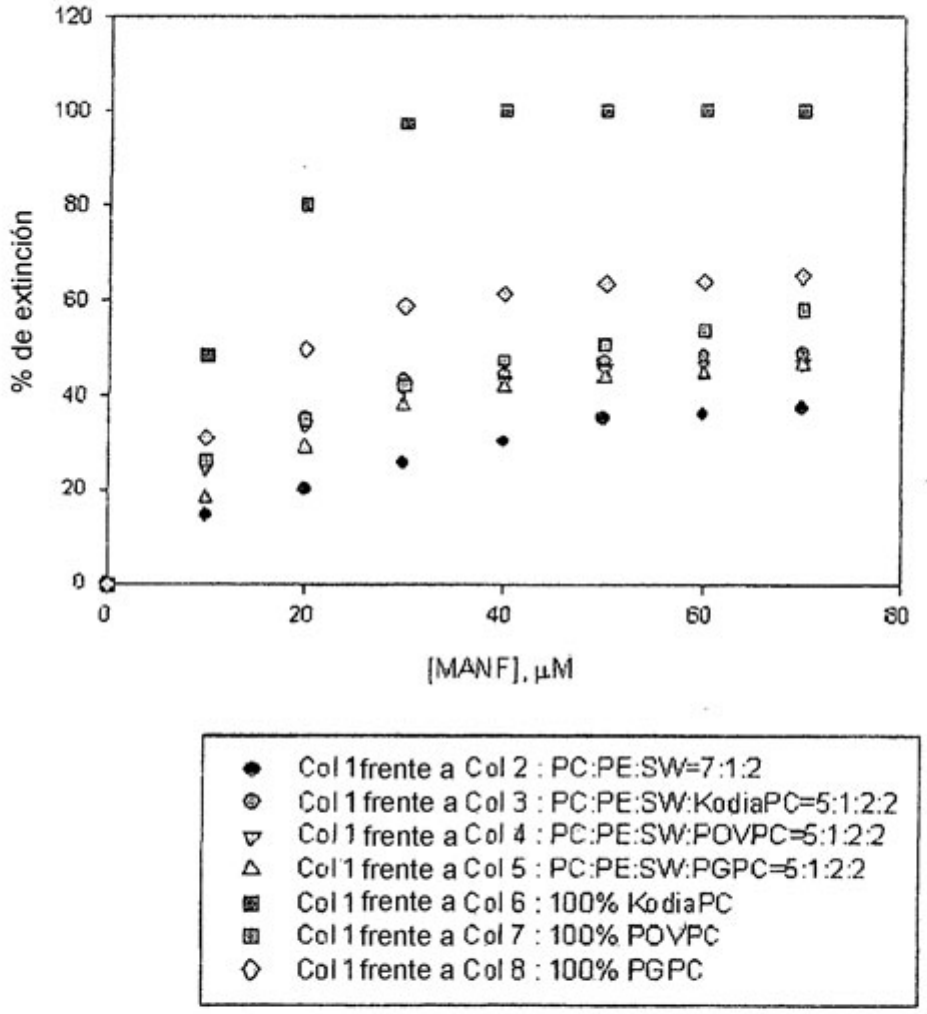

120
100
80
60
40
20
0
% de extinción
0
20
40
60
80
[MANF], µM
Col 1 frente a Col 2 : PC:PE:SW=7:1:2
Col 1 frente a Col 3 : PC:PE:SW:KodiaPC=5:1:2:2
Col 1 frente a Col 4 : PC:PE:SW:POVPC=5:1:2:2
Col 1 frente a Col 5 : PC:PE:SW:PGPC=5:1:2:2
Col 1 frente a Col 6 : 100% KodiaPC
Col 1 frente a Col 7 : 100% POVPC
Col 1 frente a Col 8 : 100% PGPC

Figura 28

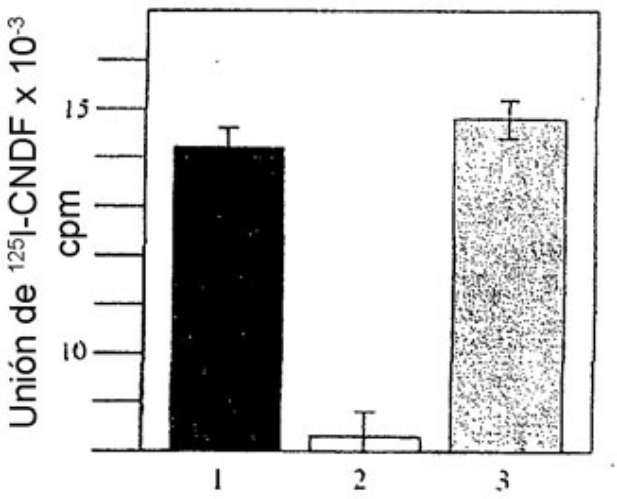


Figura 29.

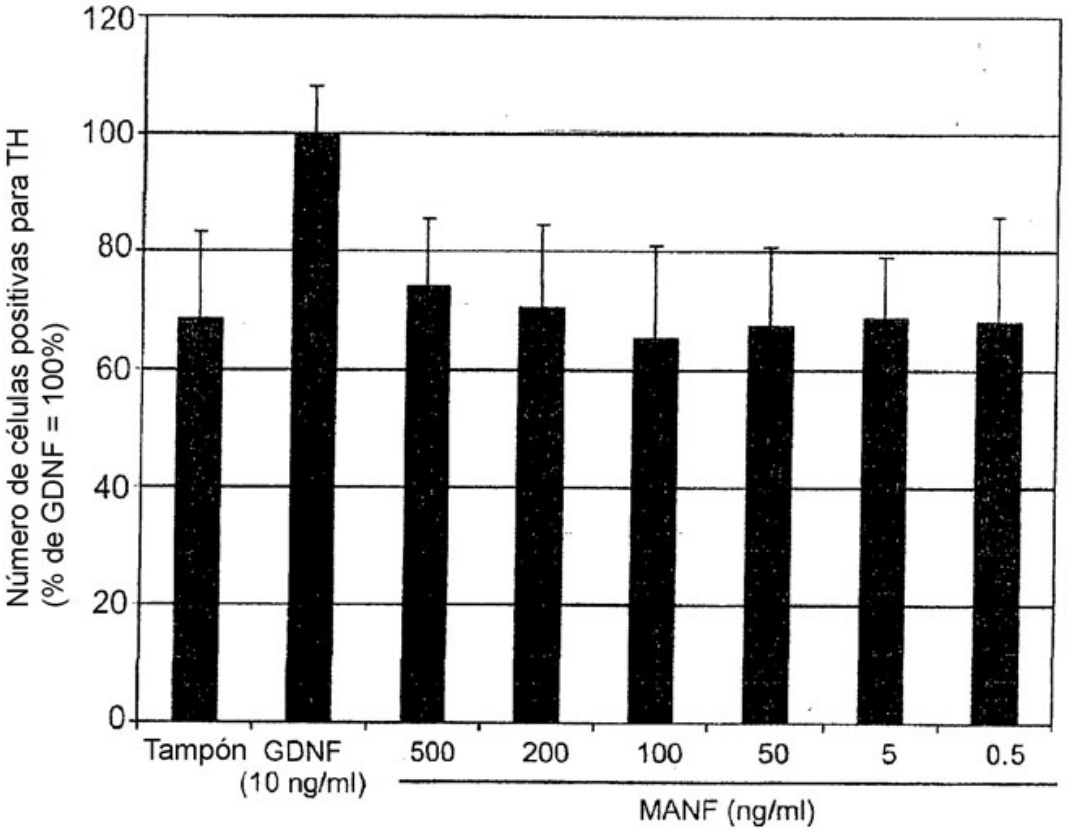

Número de células positivas para TH
(% de GDNF = 100%)
120
100
80
60
40
20
0
Tampón
GDNF
(10 ng/ml)
500
200
100
50
5
0.5
MANF (ng/ml)

Figura 30

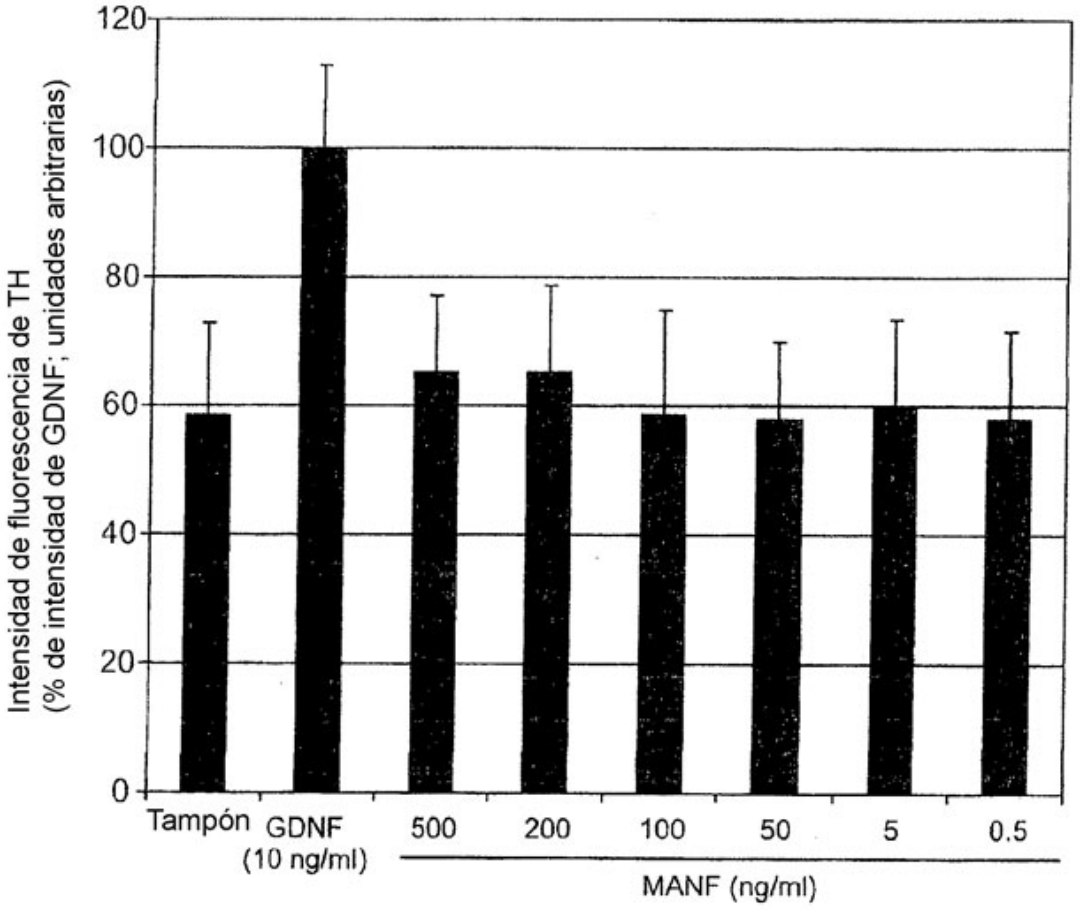

Intensidad de fluorescencia de TH
(% de intensidad de GDNF; unidades arbitrarias)
120
100
80
60
40
20
0
Tampón
GDNF
(10 ng/ml)
500
200
100
50
5
0.5
MANF (ng/ml)

Figura 31