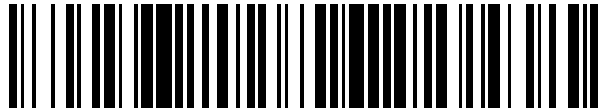


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 475**

51 Int. Cl.:

C12N 15/47 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/145 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2010 PCT/IB2010/000967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10116258**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2010 E 10717225 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2417259**

54 Título: **Generación, regeneración y protección de neuronas**

30 Prioridad:

07.04.2009 EP 09290257

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

03.11.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (50.0%)
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR y
THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PREHAUD, CHRISTOPHE;
LAFON, MONIQUE y
SCHNELL, MATTHIAS, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 640 475 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Generación, regeneración y protección de neuronas

CAMPO DE LA SOLICITUD O INVENCION

5 La solicitud, además de la invención, se refieren a la generación, regeneración y protección de neuronas, más particularmente al crecimiento de neuritas.

10 La solicitud, además de la invención, proporcionan medios para reducir y/o estimular efectos neuritogénicos, que son útiles en el campo médico, más particularmente en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de trastornos del sistema nervioso. Más particularmente, la solicitud, además de la invención, proporcionan medios para inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, que son útiles para inducir la diferenciación de neuronas, por ejemplo para el tratamiento de una neoplasia del sistema nervioso, además de en la regeneración de neuronas alteradas, por ejemplo para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa o en el tratamiento de una infección microbiana, o en la protección de neuronas de agentes neurotóxicos o estrés oxidativo.

Los medios de la solicitud, además de la invención, se basan en ciertas proteínas G del virus de la rabia no apoptótico, más particularmente de la cola citoplásmica de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA SOLICITUD O INVENCION

Durante el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas extienden los axones a lo largo de distancias considerables con el fin de enervar sus dianas de una manera apropiada. Esto implica la estimulación en las células de vías de señalización específicas que pueden estimular la actividad del cono de crecimiento.

20 Mientras que el sistema nervioso en desarrollo, más particularmente el sistema nervioso central en desarrollo, es altamente plástico, el sistema nervioso adulto, más particularmente el cerebro adulto, tiene potencial de reparación más limitado. Por tanto, el crecimiento de neuritas-axones y la protección contra la degeneración son factores importantes a considerar para mejorar el resultado de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa, tal como una lesión aguda del sistema nervioso o un trastorno neurodegenerativo crónico. Productos, que serían capaces de inducir el crecimiento de neuritas a partir de tales células neuronales, traerían una solución terapéutica y/o preventiva y/o paliativa muy útil a tales enfermedades, trastornos o afecciones.

25 En el otro lado del proceso de desarrollo de neuronas, la proliferación de progenitores neuronales, que no se diferencian en estructuras neuronales maduras, conduce a neoplasia del sistema nervioso. Productos, que serían capaces de inducir el crecimiento de neuritas a partir de tales células progénicas, traerían una solución terapéutica y/o preventiva y/o paliativa a tales neoplasias.

30 La idea general sobre la infección de células neuronales por un virus neurotrópico es que no tiene impacto positivo sobre la morfología de las neuronas, más particularmente sobre el crecimiento de neuritas.

De hecho, hay numerosos ejemplos que muestran que los virus neurotrópicos producen muerte celular neuronal por apoptosis. Esto se refiere a tanto virus de ADN, tales como el virus del herpes, como a virus de ARN, bien con envuelta tales como alfavirus, bunyavirus y paramyxovirus, o bien sin envuelta tales como picornavirus y reovirus.

35 También se ha descrito el virus de la rabia, más particularmente las cepas del virus de la rabia atenuadas, como inductor de apoptosis neuronal.

40 Por ejemplo, el documento WO 03/048198 se refiere a proteínas G del virus de la rabia y fragmentos de las mismas de al menos 100 aminoácidos, que inducen la rotura de la integridad de la célula neuronal y la formación de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son capaces de estimular una respuesta inmunitaria humoral, preferentemente una respuesta inmunitaria humoral dependiente de B.

El documento WO 03/048198 muestra que:

- la cepa del virus de la rabia atenuado (tal como la cepa ERA atenuada) induce la rotura apoptótica de las células que infecta,
- 45 - los cuerpos apoptóticos así producidos estimulan una respuesta inmunitaria humoral, más particularmente una respuesta inmunitaria humoral dependiente de B;
- la inducción de apoptosis por una cepa del virus de la rabia se determina por la naturaleza de su proteína G;
- un virus de la rabia que contiene la proteína G de una cepa del virus de la rabia atenuado (tal como la cepa ERA atenuada) es capaz de desencadenar la apoptosis de células humanas, pero no la expresión de la proteína G de un virus de la rabia patógeno (tal como una cepa de virus estándar de exposición -CVS-) (véase más particularmente el Ejemplo 5 y las Figuras 19 y 20 del documento WO 03/048198).

Por favor, véase también Lay *et al.* 2003 y Préhaud *et al.* 2003.

Así, se sabe que las proteínas G de cepas del virus de la rabia apoptósicas, tales como la proteína G de la cepa ERA atenuada, son útiles en estimular una respuesta humoral, más particularmente una respuesta inmunitaria humoral dependiente de B.

- 5 Como estas proteínas G particulares inducen la apoptosis de las células que infectan, también se han propuesto como agentes candidatos para eliminar células no deseables por rotura apoptósica de las células diana.

También se ha descrito que la patogenicidad de una cepa del virus de la rabia se correlaciona inversamente con su capacidad de inducción de apoptosis (véase el documento WO 03/048198; Ugolini 1995; Sarmiento *et al.* 2005; Ugolini 2008; Jackson *et al.* 2008).

- 10 Por tanto, la cepa del virus de la rabia más virulenta es la menos apoptósica.

Los hallazgos de que las cepas del virus de la rabia virulentas, tales como las cepas de CVS, no inducen apoptosis neuronal y así escapan de la detección humoral explican por qué las cepas del virus de la rabia virulentas pueden propagarse tan extensamente dentro del SNC antes de la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad.

- 15 Se han realizado estudios adicionales para analizar los cambios en el patrón de expresión génica que se inducen tras la infección por un virus neurotrópico, tal como un virus de la rabia o del herpes simple tipo 1 (VHS-1).

Estos estudios han demostrado que las neuronas humanas post-mitóticas, en ausencia de la glía, tienen la maquinaria intrínseca para detectar la infección por virus, y que los virus neurotrópicos, tales como el virus de la rabia patógeno o VHS-1, inducen la liberación de citocinas de neuronas humanas post-mitóticas (Préhaud *et al.* 2005). Se cree que esta liberación de citocinas contribuye además al escape de neuronas de la apoptosis y a la consecuente extensión de tales virus neurotrópicos.

- 20 Por tanto, se han investigado minuciosamente mecanismos de muerte celular neuronal, además de la capacidad de las neuronas para producir una respuesta inmunitaria tras la infección viral.

Sin embargo, se sabe menos sobre los procesos involucrados en la neurogeneración, neuroregeneración y neuroprotección, más particularmente en el crecimiento de neuritas a partir de neuronas pre-mitóticas, tales como progenitores neuronales o neuronas neoplásicas, o de neuronas degenerativas.

- 25 Si se centra en el virus de la rabia, un resumen esquemático del presente conocimiento sería que las cepas del virus de la rabia atenuadas son conocidas por tener aplicaciones médicas debido a la apoptosis que inducen, y que las cepas del virus de la rabia virulentas son conocidas por no inducir la apoptosis, sino, por el contrario, preservar la red neuronal, que favorece su extensión.

- 30 Aunque se ha descrito que las cepas del virus de la rabia virulentas preservan la integridad de la red neuronal, también se ha informado que tienen un impacto negativo, o como poco impacto no positivo, sobre la morfología neuronal, más particularmente sobre el crecimiento de neuritas.

Por ejemplo, la publicación de Guigoni y Coulon 2002 describe que la cepa del virus de la rabia virulenta CVS-Gif-sur-Yvette no induce el crecimiento de neuritas de motoneuronas de rata (véanse, por ejemplo, las Figuras 5A y 5B de esta publicación).

- 35 También se ha informado del impacto negativo sobre el crecimiento de neuritas. Por ejemplo, la publicación de Scott *et al.*, 2008 ha informado que la cepa del virus de la rabia patógena CVS-11 induce el rebordeado de las dendritas y axones, es decir, la formación de vacuolas que son características de un impacto de estrés negativo.

La solicitud, además de la invención, proporcionan medios para la generación, regeneración y protección de neuronas, que derivan de ciertas cepas del virus de la rabia patógenas, y que muestran propiedades sorprendentes e inesperadas.

SUMARIO DE LA SOLICITUD O INVENCION

- 45 La solicitud, además de la invención, demuestran que algunas proteínas G del virus de la rabia patógenas (y no apoptósicas) tienen un efecto promotor del crecimiento de neuritas, es decir, que algunas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas inducen y/o estimulan la neuritogénesis. Este efecto no se muestra por proteínas G del virus de la rabia apoptósicas. Ni se muestra por todas las proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas.

Los inventores identificaron un sub-grupo de cepas del virus de la rabia no apoptósicas (y virulentas), cuya proteína G tiene un efecto significativamente positivo sobre el crecimiento de neuritas. Como se describe e ilustra más adelante, una cepa representativa de este sub-grupo es la cepa CVS-NIV. La proteína G de esta cepa no apoptósica (y virulenta) se diferencia en solo 6 aminoácidos de la proteína G de la cepa ERA apoptósica (y atenuada) (CNCM I-2760).

- 50

La solicitud, además de la invención, demuestran además que este efecto promotor del crecimiento de neuritas es debido a la cola citoplásmica de dichas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas, más particularmente a su sitio de unión de PDZ (PDZ-BS) y/o a un aminoácido que, en la secuencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV, está en la posición 491, más particularmente a su PDZ-BS.

- 5 La solicitud, además de la invención, se refieren a polipéptidos, que son o derivan de ciertas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas, más particularmente de su cola citoplásmica, además de a ácidos nucleicos, vectores, células y composiciones farmacéuticas o fármacos.

Los medios de la solicitud, además de la invención, son en particular útiles como agentes estimulantes y/o inductores del crecimiento de neuritas. Pueden usarse en particular para inducir diferenciación de neuronas, por ejemplo en el tratamiento de una neoplasia del sistema nervioso, además de para regenerar neuronas alteradas, por ejemplo en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa o en el tratamiento de una infección microbiana, o para proteger neuronas de agentes neurotóxicos o estrés oxidativo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 Algunas de las figuras, a las que se refiere la solicitud, están en color. La solicitud como se presentó contiene la impresión en color de las figuras, a las que puede, por tanto, accederse por inspección del archivo de la solicitud en la oficina de patentes.

Figura 1: La neurogeneración, neuroregeneración y neuroprotección participan en diversos trastornos, afecciones y enfermedades neuronales, que incluyen neurotoxicidad, convulsión, accidente cerebrovascular, traumatismo, envejecimiento, enfermedad neurodegenerativa, encefalopatía.

20 **Figura 2:** Estructura esquemática del virus de la rabia recombinante (VRABr) producida por los inventores y usada en los ejemplos de más adelante.

La proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) se diferencia en solo 6 aa de la proteína G de la cepa ERA (cepa apoptósica).

G-supervivencia = proteína G de la cepa CVS-NIV

25 G-muerte = proteína G de la cepa ERA

G-cito muerte = cola citoplásmica de G-muerte en un antecedente génico de G de CVS-NIV

G-cito supervivencia = cola citoplásmica de G-supervivencia en un antecedente génico de G de ERA

SP = péptido señal

EC: dominio extracelular

30 TM: dominio transmembranario

Cito: dominio citoplásmico

Figuras 3A, 3B, 3C, 3D: La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) contiene una firma molecular que promueve el crecimiento de neuritas.

Figura 3A: ensayo de crecimiento de neuritas con G-CVS-NIV de VRABr y G-ERA de VRABr

35 Figura 3B: resultados del ensayo de crecimiento de neuritas con db-AMPC con G-CVS-NIV de VRABr y G-ERA de VRABr

Figura 3C: resultados del ensayo de crecimiento de neuritas sin db-AMPC con G-CVS-NIV de VRABr, G-CVS-Cito muerte de VRABr, G-ERA de VRABr y G-ERA-Cito supervivencia de VRABr

40 Figura 3D: resultados del ensayo de crecimiento de neuritas con G-CVS-NIV de VRABr, G-CVS de VRABr (LQ) y G-CVS de VRABr (HE)

N.I. = no infectado

VRABr = virus de la rabia recombinante

G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

45 G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV

G-ERA = proteína G de la cepa ERA

G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

5 G-CVS de VRABr (LQ) = proteína G del virus de la rabia recombinante de la cepa CVS-NIV, en la que el aminoácido H, que está en la posición 491 en la proteína G de longitud completa de la cepa CVS-NIV, se ha sustituido por el aminoácido L

G-CVS de VRABr (HE) = proteína G del virus de la rabia recombinante de la cepa CVS-NIV, en la que el aminoácido Q, que está en la posición 521 en la proteína G de longitud completa de la cepa CVS-NIV, se ha sustituido por el aminoácido E

10 **Figuras 4A, 4B:** La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) es un efecto intrínseco que promueve la neuritogénesis, que funciona sinérgicamente con AMPc*

Figura 4A: sin db-AMPc

Figura 4B: sin db-AMPc (primeros dos histogramas) y con AMPc (dos últimos histogramas)

★ significa significativamente diferente (prueba de la t de Student con $p=0,0067$)

15 N.I. = no infectado

VRABr = virus de la rabia recombinante

G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV

20 G-ERA = proteína G de la cepa ERA

G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figura 5: El efecto de neuritogénesis de la cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) depende de la firma molecular y n de la cantidad de proteína G expresada.

25 VRABr = virus de la rabia recombinante

G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV

G-ERA = proteína G de la cepa ERA

30 G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figuras 6A, 6B: La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) confiere neuroprotección contra el fármaco de colapso del cono de crecimiento (LPA)

Figura 6A: con db-AMPc

35 Figura 6B: sin db-AMPc

N.I. = no infectado

VRABr = virus de la rabia recombinante

G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

40 G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS

G-ERA = proteína G de la cepa ERA

G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figura 7: La neuroprotección contra el fármaco de colapso del cono de crecimiento LPA que se induce por la cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) es robusta.

★ significa significativamente diferente (prueba de ANOVA)

▲ significa no significativamente diferente (prueba de ANOVA)

- 5 N.I. = no infectado
- VRABr = virus de la rabia recombinante
- G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV
- G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV
- 10 G-ERA = proteína G de la cepa ERA
- G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA
- LPA = ácido lisofosfatídico

Figura 8: La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) confiere neuroprotección contra el estrés oxidativo (H₂O₂). Estos experimentos se realizaron sin db-AMPC.

★ significa significativamente diferente (prueba de la t de Student)

▲ significa no significativamente diferente (prueba de la t de Student)

- N.I. = no infectado
- VRABr = virus de la rabia recombinante
- 20 G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV
- G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV
- G-ERA = proteína G de la cepa ERA
- 25 G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figuras 9A, 9B, 9C: La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) confiere protección contra el efecto citopático del virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1).

- N.I. = no infectado
- VRABr = virus de la rabia recombinante
- 30 G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV
- G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV
- G-ERA = proteína G de la cepa ERA
- 35 G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figuras 10A, 10B: Proliferación celular de células de neuroblastoma humano tratadas con el fármaco pro-diferenciativo ácido all-trans-retinoico (ATRA) (Figura 10A: citometría de flujo; Figura 10B: ensayo MTT). N.I. = no infectado

Figuras 11A, 11B: La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptósica) confiere propiedades antiproliferativas: proliferación celular (Figura 11A) y longitud de neuritas (Figura 11B) de células de neuroblastoma humano tratadas con G-CVS-NIV de VRABr o G-ERA de VRABr

N.I. = no infectado

VRAB = virus de la rabia recombinante

G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

G-ERA = proteína G de la cepa ERA

5 **Figuras 12A, 12B:** La cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptótica) confiere propiedades antiproliferativas: proliferación celular de células de neuroblastoma humano tratadas con G-CVS de VRABr, G-ERA de VRABr, G-CVS-Cito muerte de VRABr o G-ERA-Cito supervivencia de VRABr (Figura 12A: citometría de flujo; Figura 12B: ensayo MTT) (N.I. = no infectado)

N.I. = no infectado

VRABr = virus de la rabia recombinante

10 G-CVS o G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV

G-CVS-Cito muerte = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa ERA en un antecedente génico de G de CVS-NIV

G-ERA = proteína G de la cepa ERA

15 G-ERA-Cito supervivencia = cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV en un antecedente génico de G de ERA

Figuras 13A, 13B: Secuencias de ácido nucleico y proteínas de la proteína G de la cepa CVS-NIV (Figura 13A) y de la cepa ERA (Figura 13B). En la Figura 13A, el motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV está subrayado (QTRL). aa = aminoácido

20 **Figura 14:** Alineamiento de secuencias de las proteínas G de las cepas CVS-NIV y ERA; las proteínas G se diferencian en solo 6 aminoácidos (mostrado en negrita en la Figura 14):

Tabla 1:

Posición del aminoácido en la secuencia de proteína G de longitud completa	Proteína G de la cepa CVS-NIV (cepa no apoptótica)	Proteína G de la cepa ERA (cepa apoptótica)
48	V	I
139	H	R
179	P	S
219	A	V
491	H	L
521	Q	E

El alineamiento mostrado en la Figura 14 se ha realizado usando los siguientes parámetros:

Matriz de comparación: BLOSUM62

25 Número de alineamientos calculados: 20

Penalización por apertura de hueco: 12

Penalización por extensión de hueco: 4

El resultado de este alineamiento es:

98,9 % de identidad en solapamientos de 524 residuos;

30 Puntuación: 2787,0;

Frecuencia de huecos: 0,0%.

Figura 15: Secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas del dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV y de la cepa ERA. En la Figura 15, el motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV está subrayado (QTRL).

aa = aminoácido

5 **Figura 16:** Secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV y de la cepa ERA.

aa = aminoácido

Figura 17: Alineamiento de la proteína G de la cepa CVS-NIV (SEQ ID NO: 2) y de la proteína G de la cepa CVS-Gif-sur-Yvette (SEQ ID NO: 15).

10 **Figura 18:** Alineamiento de la proteína G de la cepa CVS-NIV (SEQ ID NO: 2) y de las proteínas G de tres cepas CVS-11 (SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18).

Figura 19: Secuencia del fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV (SEQ ID NO: 6) y de dos variantes conservativas que derivan de la misma (secuencia A de variante de SEQ ID NO: 19; secuencia B de variante de SEQ ID NO: 20).

15 **Figura 20:** La delección de PDZ-BS afecta el fenotipo del crecimiento de neuritas (longitud de neurita promedio en μm 8 h después de la infección, en presencia de db-AMPC).

N.I. = no infectado;

G-CVS-NIV = proteína G de la cepa CVS-NIV;

G-CVS-NIV-DeltaPDZ-BS = proteína G de la cepa CVS-NIV de la que se ha delecionado PDZ-BS.

20 **Figura 21:** Estructura esquemática de mutantes de un solo punto de la solicitud o invención (variantes B y A). Los virus mutantes CVS HE (I-4143) y CVS LQ (I-4142) de la solicitud se diferencian de CVS-NIV (I-4140) por sus proteínas G, en las que se ha introducida una mutación de un solo punto.

CVS HE (variante B) = mutación de un solo punto del primer aminoácido PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV, que es E en CVS HE (posición 521) en lugar de Q.

25 CVS LQ (variante A) = mutación de un solo punto del aminoácido en la posición 491, que es E en lugar de Q.

SP: péptido señal

EC: dominio extracelular

TM: dominio transmembranario

Cito: dominio citoplásmico

30 **Figura 22: Secuencias de aminoácidos de dominios de la proteína G de una cepa de virus no apoptósica y de inserciones de construcción**

- **Secuencias de los dominios G-CVS:**

- **Longitud de G-Completa** (SEQ ID NO: 2): proteína G de longitud completa de una cepa del virus de la rabia apoptósica (CVS-NIV);

35 - **Péptido señal (SP; SEQ ID NO: 21):** péptido señal de una cepa del virus de la rabia apoptósica (CVS-NIV);

- **Ectodominio (EC; SEQ ID NO: 22):** ectodominio de una cepa del virus de la rabia apoptósica (CVS-NIV);

- **Dominio transmembranario (TM. SEQ ID NO: 23):** dominio transmembranario de una cepa del virus de la rabia apoptósica (CVS-NIV);

40 - **Dominio citoplásmico** (Cito; SEQ ID NO: 6): dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia apoptósica (CVS-NIV).

- **Secuencias de aminoácidos codificadas por inserciones de construcción:**

- Aminoácido M + SEQ ID NO: 6 = **SEQ ID NO: 24 (construcción G-Cito);**

- Dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 = **SEQ ID NO: 25;**

- Dos aminoácidos del extremo C del ectodominio de G-CVS-NIV (aminoácidos GK) + dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 = **SEQ ID NO: 26**;
- Péptido señal de SEQ ID NO: 21 + dos aminoácidos del extremo C del ectodominio de G-CVS-NIV (aminoácidos GK) + dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 = **SEQ ID NO: 27 (construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito)**.

Figura 23: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos codificadas por las inserciones de tres construcciones (SEQ ID NO: 2 codificadas por la construcción G-Completa; SEQ ID NO: 27 codificadas por la construcción G-(SP)-[2a]-TM-Cito (=GSP2aaTMCito); SEQ ID NO: 24 codificadas por la construcción G-Cito).

Figura 24: Representación esquemática de tres construcciones génicas de G de VRAB (G-Completa de SEQ ID NO: 2 (= Supervivencia de G); G-Cito de SEQ ID NO: 24 (= Supervivencia de G-Cito); G-(SP)-[2a]-TM-Cito de SEQ ID NO: 27 (= Supervivencia de G-ΔEC).

Figura 25: Expresión de G de VRAB (unidades arbitrarias) para el plásmido de control, construcción G-Completa (SEQ ID NO: 2), construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito) (SEQ ID NO: 27) y construcción G-Cito (SEQ ID NO: 24) en la línea celular SH-SY5Y (línea celular de neuroblastoma humano).

Figuras 26 y 27: Efecto sobre el crecimiento de neuritas de la expresión:

- de la proteína G de longitud completa de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (SEQ ID NO: 2; construcción G-Completa),
 - de los dominios transmembranarios y citoplásmicos de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (SEQ ID NO: 27; construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito)), o
 - del dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (SEQ ID NO: 24; construcción G-Cito),
- en células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y en presencia de db-AMPC), en comparación con control (sin ADN) y con el plásmido de control.

Figura 26: expresión transitoria.

Figura 27: expresión estable.

Figura 28: La expresión de los dominios transmembranarios y citoplásmicos de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (SEQ ID NO: 27; construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito) induce el crecimiento de neuritas de células de neuroblastoma humano (línea celular SH-SY5Y en presencia de db-AMPC), y confiere protección contra el fármaco de colapso del cono de crecimiento LPA a las neuritas que han crecido.

Figuras 29 y 30: La expresión (estable) del dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica induce y/o estimula la diferenciación de una línea celular de carcinoma embrionario (NTera 2cl.-D1; ATCC CRL-1973) en neuronas humanas post-mitóticas maduras (5 días después del procedimiento de diferenciación: efecto de la construcción de G-Completa - inserción de SEQ ID NO: 2-, de la construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito) - inserción de SEQ ID NO: 27-, o de la construcción G-Cito - inserción de SEQ ID NO: 24-, en comparación con plásmido de control).

Figura 29: imágenes en color.

Figura 30: puntas de neurita.

Figura 31: La expresión (estable) del dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica induce y/o estimula la diferenciación de una línea celular de carcinoma embrionario (NTera 2cl.-D1; ATCC CRL-1973) en neuronas humanas post-mitóticas maduras, e induce y/o estimula la organización de una red neuronal con axones largos (imágenes en color de neuronas vivas, 50 días después del procedimiento de diferenciación: efecto de la construcción G-Completa - inserción de SEQ ID NO: 2-, de la construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito) - inserción de SEQ ID NO: 27-, o de la construcción G-Cito - inserción de SEQ ID NO: 24-, en comparación con plásmido de control).

Figuras 32 y 33: La expresión de los dominios transmembranarios y citoplásmicos de una cepa del virus de la rabia no apoptósica induce y/o estimula la regeneración de neuronas humanas post-mitóticas maduras heridas (neuronas sembradas en utensilios de plástico de PDL-laminina, 3 días después de raspar con aguja de inyección (26GX1/2", 12-4,5); efecto del polipéptido de SEQ ID NO: 27 (construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito) -regeneración de neuritas-, en comparación con plásmido de control -degeneración de neuritas-).

Figura 32: imágenes en color

Figura 33: porcentaje de regeneración de neuritas

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA SOLICITUD O INVENCION

La solicitud se refiere a la materia como se define en las reivindicaciones como se presentaron y como se describen e ilustran en el presente documento.

5 La patogenicidad del virus de la rabia, un virus neurotrópico causante de la encefalitis letal en la mayoría de las especies de mamífero, se correlaciona con la capacidad de las neuronas infectadas a sobrevivir. La atenuación de las cepas de laboratorio obtenidas en la búsqueda de candidatos a vacuna viva está siempre asociada a la capacidad de aquellas cepas de vacuna para desencadenar la muerte celular.

La subversión de una célula infectada por un virus dado implica la perturbación de vías de señalización específicas.

10 El virus de la rabia es un virus con forma de bala envuelto que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* y el género *Lyssavirus*. La partícula viral consiste en una membrana compuesta de lípidos hospedadores y dos proteínas virales, las proteínas G y M, que rodean una nucleocápside helicoidal (NC). La NC está compuesta por una molécula de ARN de hebra negativa viral de ARN protegido por la proteína N, la proteína P y la ARN polimerasa dependiente de ARN, la proteína L. Las proteínas del virus de la rabia no son sintetizadas en cantidades iguales en células infectadas y no están presentes en las mismas relaciones en partículas virales. De hecho, las proteínas N, G y M son, en este orden, las especies más predominantes en los viriones.

15 La decisión estratégica entre la preservación de la integridad de la red neuronal (que favorece la extensión del virus de la rabia) y la muerte celular neuronal (que favorece la inmunogenicidad) implica necesariamente una elección entre al menos dos redes de señalización.

20 La solicitud, además de la invención, demuestran que la cola citoplásmica de la proteína G de la cepa del virus de la rabia tiene una función crucial en el dominio de la pro-supervivencia (es decir, preservación de la integridad de la red neuronal, que favorece la extensión del virus de la rabia) frente al proceso de decisión pro-apoptósica (es decir, muerte celular, que favorece la inmunogenicidad).

La solicitud, además de la invención, descubren además efectos inesperados de la estrategia de pro-supervivencia.

25 De hecho, la solicitud, además de la invención, muestran que las proteínas G de algunas cepas no apoptósicas (y virulentas) del virus de la rabia, más particularmente de la cepa CVS-NIV, tienen un efecto promotor del crecimiento de neuritas, es decir, que estas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas inducen y/o estimulan la neuritogénesis.

Este efecto no se muestra por las proteínas G del virus de la rabia apoptósico, tales como las proteínas G de ERA y otras cepas del virus de la rabia atenuadas.

30 Además, este efecto no es mostrado por todas las proteínas G del virus de la rabia apoptósicas y/o virulentas. Más particularmente, no se muestra por la proteína G de la cepa CVS-Gif-sur-Yvette (Préhaud *et al.* 1988), aunque esta proteína G tiene una alta puntuación de identidad con la proteína G de la cepa de CVS-NIV (véase la Figura 17). Dicho efecto no es mostrado por las proteínas G de las cepas de CVS-11 (por ejemplo, ACA57830, AAC34683, ABV24348), aunque estas proteínas G también tiene una alta puntuación de identidad con la proteína G de la cepa CVS-NIV (véase la Figura 18). Ni se muestra por las proteínas G de las cepas N2C o CVS-24.

35 Por tanto, no todas las cepas del virus de la rabia virulentas tienen una proteína G, que muestra un efecto significativamente positivo sobre el crecimiento de neuritas.

40 Por lo tanto, los inventores identificaron un sub-grupo de cepas no apoptósicas (y virulentas) del virus de la rabia, cuya proteína G tiene un efecto significativamente positivo sobre el crecimiento de neuritas. Una cepa representativa de este sub-grupo es la cepa CVS-NIV. Estas proteínas G pueden denominarse en el presente documento las proteínas G del tipo CVS-NIV.

La cepa CVS-NIV se ha depositado en la CNCM el 1 de abril de 2009 con el número de depósito I-4140.

Un plásmido que expresa la proteína G de la cepa CVS-NIV se ha depositado en la CNCM el 30 de noviembre de 2001 con el número de depósito I-2578.

45 La proteína G de la cepa CVS-NIV se ha descrito en Préhaud *et al.* 2003.

La secuencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV está disponible con el número de acceso AF 406694.

Una secuencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV es la secuencia de SEQ ID NO: 2 mostrada en la Figura 13A.

50 Una proteína G del virus de la rabia es una glucoproteína transmembranaria de tipo I que forma las espículas triméricas de la envoltura viral y que se encuentra en la membrana de células infectadas. La proteína G del virus de la rabia es una proteína de 524 aminoácidos de longitud, que consiste en un ectodominio, un segmento transmembranario y un dominio citoplásmico de 44 aminoácidos de longitud.

Los últimos 4 aminoácidos de este dominio del extremo C forman un sitio de unión de PDZ (PDZ-BS).

Los dominios PDZ (PSD-95, Discs Large, ZO-1) forman estructuras globulares de 80-100 aa organizadas en seis hebras beta y dos hélices alfa que crean un enchufe donde podría insertarse la secuencia del extremo C de una proteína componente.

- 5 Un sitio de unión de PDZ (PDZ-BS) es una secuencia de 4 aminoácidos; la secuencia de PDZ-BS es la secuencia de SEQ ID NO: 13:

$x_1 - x_2 - x_3 - x_4$, en la que:

x_1 es cualquier aminoácido, y

x_2 es T o S o I, y

- 10 x_3 es cualquier aminoácido, y

x_4 es L o V.

La solicitud, además de la invención, demuestran en particular que es la cola citoplásmica de dichas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas del tipo CVS-NIV, la que es responsable de este efecto de crecimiento de neuritas.

- 15 La solicitud, además de la invención, demuestran además que esto es en particular debido a que PDZ-BS está contenido en la cola citoplásmica de dichas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas del tipo CVS-NIV.

El motivo PDZ-BS de dichas proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas del tipo CVS-NIV muestra una mutación de un solo punto en comparación con aquellas de las proteínas G del virus de la rabia apoptósico. Esta mutación de un solo punto se refiere al primer aminoácido de PDZ-BS, que no es E en proteínas G del virus de la rabia no apoptósicas.

- 20 La solicitud, además de la invención, demuestran además que el aminoácido, que, en la secuencia de proteínas del virus de la rabia G no apoptósicas de longitud completa de la cepa CVS-NIV, está en la posición 491, también contribuye a este efecto de crecimiento de neuritas. Este aminoácido es H en la proteína G de la cepa CVS-NIV (véase la SEQ ID NO: 2). La posición 491 en la proteína G de longitud completa se corresponde con la posición 11 en el fragmento citoplásmico de esta proteína (SEQ ID NO: 6 en la Figura 15).

- 25 Los inventores demuestran que los aminoácidos, que, en la secuencia de proteínas del virus de la rabia G no apoptósicas de longitud completa de la cepa CVS-NIV (SEQ ID NO: 2), están en las posiciones 491 y 521, son ambos importantes para el efecto de crecimiento de neuritas de la solicitud o invención. Más particularmente, muestran que H (pero no L) en la posición 491 y Q (pero no E) en la posición 521, ambos favorecen el efecto de crecimiento de neuritas de la solicitud o invención. El virus mutante, que se diferencia de la cepa CVS-NIV en que sus proteínas G están mutadas en un solo punto H491L o mutadas en un solo punto Q521E, han sido construidas y producidas por los inventores (CNCM I-4142 y I-4143).

La proteína G mutante H491L todavía tiene Q en la posición 521.

La proteína G mutante Q521E todavía tiene H en la posición 491.

- 35 Ambas proteínas mutantes inducen un efecto de crecimiento significativamente positivo de neuritas, aunque a un menor grado que la proteína G de CVS-NIV, que tiene tanto H en la posición 491 como Q en la posición 521.

Los fragmentos citoplásmicos de estas proteínas G mutantes se muestran en la Figura 19 (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Definición de un polipéptido de la solicitud o invención:

La solicitud se refiere a un polipéptido, que es:

- 40 - un polipéptido, que comprende:

- la **secuencia parental** seleccionada de la secuencia de SEQ ID NO: 6, el fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa I-4140, el fragmento citoplásmico de la proteína G producida por el plásmido I-2578, el fragmento citoplásmico de la proteína G de secuencia AF406694, el fragmento citoplásmico de la proteína G de SEQ ID NO: 2,

- 45 o

- una **secuencia de variante conservativa** de dicha secuencia parental,

o

- un **fragmento conservativo** de dicha secuencia parental o de dicha secuencia de variante conservativa.

Dichas secuencias parentales, secuencias de variante conservativa y secuencias de fragmentos conservativos tienen ventajosamente la función de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, por ejemplo como se ilustra más adelante, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).

La solicitud se refiere más particularmente a dicho polipéptido, para su uso en estimular y/o inducir el crecimiento de neuritas, más particularmente para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección que implica un crecimiento de neuritas insuficiente o alterado, más particularmente una neuritogénesis insuficiente o alterada.

Preferentemente, la longitud de aminoácidos de dicho polipéptido es inferior a 100 aminoácidos, más preferentemente inferior a 90 aminoácidos.

La secuencia de las proteínas de variante anteriormente mencionadas puede ser una secuencia, que no se corresponde con ninguna proteína del virus de la rabia conocida o identificable.

De hecho, un experto medio en la materia reconocerá que a partir de la secuencia de una proteína del virus de la rabia dada, pueden hacerse una o varias sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos, mientras que todavía se retiene la capacidad de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas. Tal(es) sustitución (sustituciones) y/o adición (adiciones) y/o deleción (deleciones) de aminoácidos conservativas están englobadas en el presente documento.

Sin desear quedar ligado a teoría, se considera que cada uno de los ocho siguientes grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas por otro:

- 1) Alanina (A), glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- 7) Serina (S), treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), metionina (M).

Por tanto, las proteínas de variante anteriormente mencionadas en particular engloban proteínas, que han sido manipuladas por el hombre, y que se diferencian de dicha proteína G del virus de la rabia por una o varias sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos, a condición de que la proteína de variante resultante todavía tenga la capacidad de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).

Preferentemente, dicha secuencia de variante conservativa es:

- una secuencia de variante de dicha secuencia parental, que:
 - es de 34 a 54 aminoácidos,
 - es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia parental a lo largo de la longitud entera de la más corta de las secuencias parentales y de variante,
 - comprende una secuencia de PDZ-BS (preferentemente los cuatro últimos aminoácidos del extremo C), en la que dicha secuencia de PDZ-BS es:

$x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que

- x_1 es cualquier aminoácido excepto E (preferentemente Q), y
- x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

x_4 es L o V (preferentemente L)

(SEQ ID NO: 14),

siendo dicha secuencia de variante denominada **secuencia de variante A**,

5 o

- una secuencia de variante de dicha secuencia parental, que:

- es de 44 aminoácidos,

- es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia parental,

10 - comprende una secuencia de PDZ-BS (preferentemente los cuatro últimos aminoácidos del extremo C), en la que dicha secuencia de PDZ-BS es:

$x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que

x_1 es E, y

x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

15 x_4 es L o V (preferentemente L)

(SEQ ID NO: 13 con $x_1 = E$),

y

- no comprende el aminoácido L en la posición 11 (preferentemente comprende el aminoácido H en esta posición),

20 siendo dicha secuencia de variante denominada **secuencia de variante B**.

La invención se refiere a un polipéptido, cuya secuencia consiste en menos de 100 aminoácidos, que comprende:

- la secuencia de SEQ ID NO: 6,

o

- una secuencia, que:

25 - es de 34 a 54 aminoácidos,

- es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 a lo largo de la longitud entera de la más corta de las dos secuencias,

- comprende una secuencia de PDZ-BS, en la que dicha secuencia de PDZ-BS es $x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que:

x_1 es cualquier aminoácido excepto E (preferentemente Q), y

30 x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

x_4 es L o V (preferentemente L)

(SEQ ID NO: 14),

siendo dicha secuencia denominada secuencia de variante A,

35 o

- una secuencia, que:

- es de 44 aminoácidos,

- es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 6,

- comprende una secuencia de PDZ-BS, en la que dicha secuencia de PDZ-BS es $x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que:
 - x_1 es E, y
 - x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y
 - x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y
 - 5 x_4 es L o V (preferentemente L)
 - (SEQ ID NO: 13 con $x_1 = E$),
- y
- no comprende el aminoácido L en la posición 11,
- siendo dicha secuencia denominada secuencia de variante B,
- 10 o
- un fragmento de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, en la que dicho fragmento es de al menos 34 aminoácidos y ha retenido la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, respectivamente,
- 15 siendo dicho polipéptido para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, en el que dicho polipéptido se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.
- Preferentemente, dicha identidad de secuencia es de al menos el 95 % (preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, todavía más preferentemente al menos el 97,5 %, incluso todavía más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 98,5 %, todavía lo más preferentemente al menos el 99 %).
- 20 Más preferentemente, dicha secuencia de variante conservativa es una secuencia de variante A.
- Preferentemente, dicho fragmento conservativo es un fragmento de al menos 34 aminoácidos, que ha retenido la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia parental o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, respectivamente
- 25 Por brevedad, el término "polipéptido" pretende en el presente documento englobar proteínas, y a la inversa.
- Este término también engloba polipéptidos (o proteínas), que se han modificado por modificación post-transcripcional y/o por química sintética, por ejemplo, por adjucción de un grupo químico no peptídico y/o por modificación de la estructura terciaria del polipéptido, por ejemplo, por acetilación, acilación, hidroxilación, ciclación, racemización, fosforilación, etc., en tanto que el polipéptido modificado resultante haya retenido la capacidad de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).
- 30 El polipéptido de la solicitud o invención es ventajosamente, solo y por sí mismo, neurotrópico.
- Si se requiere o desea, el polipéptido de la solicitud o invención puede, sin embargo, acoplarse a, o fusionarse con un agente que mejora su neurotropicidad, más particularmente su tropicidad para neuronas cerebrales, tales como RVG-9R como se describe por Kumar *et al.* 2007.
- 35 Secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos se dan en el presente documento según la orientación estándar, es decir, de extremo N a extremo C para las secuencias de aminoácidos y de extremo 5' a extremo 3' para secuencias de nucleótidos.
- Según una realización de la solicitud o invención, la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de variante A es QTRL (SEQ ID NO: 10).
- 40 Según una realización de la solicitud o invención, dicha secuencia de variante A es de 44 aminoácidos y tiene el aminoácido H o L, preferentemente H, en la posición 11.
- 45 Una secuencia de variante A ilustrativa, que es de 44 aminoácidos y que tiene el aminoácido L en la posición 11, es la secuencia de SEQ ID NO: 19 (véase la Figura 19).

Según una realización de la solicitud o invención, la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de variante B es ETRL (SEQ ID NO: 12).

Según una realización de la solicitud o invención, dicha secuencia de variante B tiene el aminoácido H en la posición 11.

- 5 Una secuencia de variante B ilustrativa, que es de 44 aminoácidos y que tiene el aminoácido H en la posición 11, es la secuencia de SEQ ID NO: 20 (véase la Figura 19).

Según una realización de la solicitud o invención, dicho fragmento es el fragmento 11-44 de la secuencia de SEQ ID NO: 6.

- 10 Un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender, o consistir, en dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas y de la parte transmembranar de una proteína G del virus de la rabia o cualquier otro medio de anclaje que la persona de experiencia media en la materia puede encontrar apropiada para anclar el polipéptido sobre o en la membrana de una célula, tal como una célula como se define más adelante.

Un polipéptido de la solicitud o invención puede insertarse en la estructura de un anticuerpo modificado, por ejemplo un anticuerpo monocatenario.

- 15 Según una realización de la solicitud o invención, dicho polipéptido es la proteína G de una cepa del virus de la rabia, o un fragmento citoplásmico de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 6), o un sub-fragmento de un fragmento citoplásmico tal (por ejemplo, fragmento 11-54 de SEQ ID NO: 6). Dicha proteína G del virus de la rabia es más preferentemente una proteína del virus de la rabia no apoptósico. Por ejemplo, dicha cepa del virus de la rabia es la cepa depositada en la CNCM con I-4140. Según una realización de la solicitud o invención, dicho polipéptido comprende, o consiste en, una secuencia de variante A o B (como se definió anteriormente) de un fragmento citoplásmico o sub-fragmento tal. Por ejemplo, dicho polipéptido comprende, o consiste en, el fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa del virus de la rabia depositada en la CNCM con I-4142 o I-4143 (véase la Figura 21), cuyas proteínas G son proteínas mutantes de un solo punto de la proteína G de la cepa I-4140 (fragmentos citoplásmicos de SEQ ID NO: 19 y 20, respectivamente; véase la Figura 19).

- 25 CNCM es The Collection Nationale de Cultures de Microorganismes; Institut Pasteur; 28, rue du Docteur Roux; F-75724 Paris Cedex 15; Francia. Dichos depósitos se han hecho bajo los términos del Tratado de Budapest.

Secuencia de variante A:

Una secuencia de variante A de la solicitud o invención comprende la secuencia de SEQ ID NO: 14, es decir, la secuencia $x_1 - x_2 - x_3 - x_4$, en la que:

- 30 x_1 es cualquier aminoácido excepto E, y
 x_2 es T o S o I, y
 x_3 es cualquier aminoácido, y
 x_4 es L o V.

- 35 Esta secuencia es un motivo de PDZ-BS particular. Normalmente se localiza en el extremo C del polipéptido, lo más normalmente esta secuencia es la secuencia de los cuatro últimos aminoácidos del extremo C del polipéptido.

Preferentemente, dicho aminoácido x_1 es Q.

Preferentemente, dicho aminoácido x_2 no es I. Preferentemente es T.

Preferentemente, dicho aminoácido x_3 es R.

Preferentemente, dicho aminoácido x_4 es L.

- 40 Preferentemente, la secuencia de dicho motivo de PDZ-BS es la secuencia de SEQ ID NO: 14, en la que:

- x_1 es Q, y
 x_2 es T o S o I, y
 x_3 es R, y
 x_4 es L o V.

- 45 Lo más preferentemente, la secuencia de dicho motivo de PDZ-BS es la secuencia de SEQ ID NO: 14, en la que:

x₁ es Q, y

x₂ es T, y

x₃ es R, y

x₄ es L o V.

5 Lo más preferentemente, la secuencia de dicho motivo de PDZ-BS es la secuencia de SEQ ID NO: 14, en la que:

x₁ es Q, y

x₂ es T o S o I, y

x₃ es R, y

x₄ es L.

10 Más preferentemente, la secuencia de dicho motivo de PDZ-BS es la secuencia de SEQ ID NO: 14, en la que:

x₁ es Q, y

x₂ es T, y

x₃ es R, y

x₄ es L,

15 es decir, es la secuencia de SEQ ID NO: 10 (véase la Figura 16).

Esta secuencia de QTRL es la secuencia del motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV, estando dicha cepa disponible de la CNCM con el número de depósito I-4140, y/o de la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758 (*E. coli* recombinante que contiene dicho plásmido), y/o de la proteína de SEQ ID NO: 2 (véase la Figura 13A).

20 Condiciones apropiadas para el cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante que contiene el plásmido CNCM I-2758 que codifica la proteína G de CVS-NIV comprenden la incubación de dicha cepa de *E. coli* recombinante a 37 °C en un medio de crecimiento LB-TYM estándar (en presencia de ampicilina); véase el documento WO 03/048198.

25 Condiciones apropiadas para la propagación del virus I-4140 (virus de la rabia recombinante) comprenden la incubación de dicho virus a 37 °C con 5 % de CO₂ con células BHK-21 (sub-clon BSR) en un medio de crecimiento DMEM que contiene glucosa (por ejemplo, 4,5 g/l), piruvato de sodio y Glutamax (Invitrogen 31966047) y 5 % de FBS; véase el Ejemplo 1 más adelante.

Preferentemente, una secuencia de variante A de la solicitud o invención es de 44 aminoácidos y tiene el aminoácido H o L, preferentemente H, en la posición 11 de su secuencia de 44 aa.

30 Polipéptidos de variante A ilustrativos en particular comprenden la proteína G de la cepa del virus de la rabia recombinante depositada el 1 de abril de 2009 en la CNCM con el número de depósito I-4142 (cuya proteína G es una proteína mutante de un solo punto de la proteína G de I-4140; véase la Figura 21), el fragmento citoplásmico de la misma y los sub-fragmentos citoplásmicos conservativos de la misma.

35 La cepa I-4142 se diferencia de la cepa CVS-NIV (CNCM I-4140) en que su proteína G tiene el aminoácido L en la posición 491 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa), en lugar de H (véanse la Tabla 2 más adelante y la Figura 3D).

Condiciones apropiadas para la propagación del virus I-4142 (virus de la rabia recombinante) comprenden la incubación de dicho virus a 37 °C con 5 % de CO₂ con células BHK-21 (sub-clon BSR) en un medio de crecimiento DMEM que contiene glucosa (por ejemplo, 4,5 g/l), piruvato de sodio y Glutamax (Invitrogen 31966047) y 5 % de FBS; véase el Ejemplo 1 más adelante.

40 Polipéptidos de variante A ilustrativos en particular comprenden polipéptidos que comprenden el fragmento citoplásmico de SEQ ID NO: 19 o al menos un sub-fragmento conservativo de los mismos. La secuencia de SEQ ID NO: 19 es una variante conservativa ilustrativa de la secuencia de SEQ ID NO: 6 (véase la Figura 19). Todavía tiene un efecto positivo del crecimiento de neuritas, aunque a un nivel más bajo que la secuencia de SEQ ID NO: 6 (véase la Figura 3D y comentarios asociados en la sección de ejemplos).

45 Secuencia de variante B:

Una secuencia de variante B de la solicitud o invención es de 44 aminoácidos.

Comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 con $x_1 = E$, es decir, la secuencia $x_1 - x_2 - x_3 - x_4$, en la que:

x_1 es E, y

x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

5 x_4 es L o V (preferentemente L).

Esta secuencia es un motivo de PDZ-BS particular. Normalmente se localiza en el extremo C del polipéptido, lo más normalmente esta secuencia es la secuencia de los cuatro últimos aminoácidos del extremo C del polipéptido.

Preferentemente, dicha secuencia de SEQ ID NO: 13 es ETRL (SEQ ID NO: 12).

10 En una secuencia de variante B de la solicitud o invención, el aminoácido, que está en la posición 11, no es L. Es lo más preferentemente H.

Polipéptidos de variante B ilustrativos en particular comprenden la proteína G de la cepa del virus de la rabia recombinante depositada el 1 de abril de 2009 en la CNCM con el número de depósito I-4143 (cuya proteína G es una proteína mutante de un solo punto de la proteína G de I-4140; véase la Figura 21), el fragmento citoplásmico de la misma y los sub-fragmentos citoplásmicos conservativos de la misma.

15 La cepa I-4143 se diferencia de la cepa CVS-NIV (CNCM I-4140) en que su proteína G tiene el aminoácido E en la posición 521 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa), en lugar de Q (véanse la Tabla 2 más adelante y la Figura 3D).

20 Condiciones apropiadas para la propagación del virus I-4143 (virus de la rabia recombinante) comprenden la incubación de dicho virus a 37 °C con 5 % de CO₂ con células BHK-21 (sub-clon BSR) en un medio de crecimiento DMEM que contiene glucosa (por ejemplo, 4,5 g/l), piruvato de sodio y Glutamax (Invitrogen 31966047) y 5 % de FBS; véase el Ejemplo 1 más adelante.

25 Polipéptidos de variante B ilustrativos en particular comprenden polipéptidos que comprenden el fragmento citoplásmico de SEQ ID NO: 20 o al menos un sub-fragmento conservativo del mismo. La secuencia de SEQ ID NO: 20 es una variante conservativa ilustrativa de la secuencia de SEQ ID NO: 6 (véase la Figura 19). Todavía tiene un efecto positivo del crecimiento de neuritas, aunque a un nivel más bajo que la secuencia de SEQ ID NO: 6 (véanse la Figura 3D y comentarios asociados en la sección de ejemplos).

Las proteínas G de las cepas I-4142 y I-4143 inducen un efecto significativamente positivo del crecimiento de neuritas, aunque este efecto es significativamente más bajo que el de la proteína G de la cepa CVS-NIV (I-4140); véanse el Ejemplo 1 y la Figura 3D.

30 Por tanto, cada una de las dos posiciones de aminoácidos contribuye al efecto de crecimiento de neuritas, es decir:

- la posición de aminoácido, que, en la proteína G de la cepa CVS-NIV, es la posición 491 (es decir, H en la proteína G de la cepa CVS-NIV), y
- la posición de aminoácido, que, en la proteína G de la cepa CVS-NIV, es el primer aminoácido de PDZ-BS de la proteína G, es decir, la posición 521 en la proteína G de la cepa CVS-NIV (es decir, aminoácido Q en la proteína G de la cepa CVS-NIV).

35

Definición alternativa o complementaria de un polipéptido de la solicitud o invención:

Un polipéptido de la solicitud o invención es un polipéptido de crecimiento de pro-neuritas.

40 Un polipéptido de la solicitud o invención comprende una secuencia parental y/o una secuencia de variante conservativa (secuencia de variante A o B) y/o una secuencia de fragmento conservativo como se definió anteriormente.

45 Alternativamente o complementariamente, un polipéptido de la solicitud puede definirse como que es la proteína G de una cepa del virus de la rabia, o una secuencia de variante de la misma que deriva de la misma por una o varias sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos, o una secuencia de fragmento de una proteína G o proteína G de variante tal, más particularmente un fragmento citoplásmico o sub-fragmento de la misma, a condición de que dicho polipéptido tenga la función de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, por ejemplo como se ilustra más adelante, más particularmente el crecimiento de neuritas a partir de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).

50 Más particularmente, un polipéptido de la solicitud puede definirse alternativamente o complementariamente como que es la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, o una secuencia de variante de la misma que

deriva de la misma por una o varias sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos, o una secuencia de fragmento de una proteína G o proteína de variante tal, más particularmente un fragmento citoplásmico o sub-fragmento de la misma, a condición de que dicha secuencia de variante o dicho fragmento haya retenido la función de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, por ejemplo como se ilustra más adelante, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).

Proteínas de crecimiento de pro-neuritas ilustrativas, que no son la proteína G de la cepa CVS-NIV y/o que son distintas de la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, y/o que son distintas de la proteína de SEQ ID NO: 2, pero que todavía son polipéptidos de crecimiento de pro-neuritas adecuados en particular comprenden las proteínas G de las cepas del virus de la rabia recombinante depositadas el 1 de abril de 2009 en la CNCM con los números de depósito I-4142 y I-4143.

La cepa I-4142 se diferencia de la cepa CVS-NIV (CNCM I-4140) en que su proteína G tiene el aminoácido L en la posición 491 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa), en lugar de H (véanse la Tabla 2 más adelante y la Figura 3D).

La cepa I-4143 se diferencia de la cepa CVS-NIV (CNCM I-4140) en que su proteína G tiene el aminoácido E en la posición 521 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa), en lugar de Q (véanse la Tabla 2 más adelante y la Figura 3D).

Las proteínas G de las cepas I-4142 y the I-4143 inducen un efecto significativamente positivo del crecimiento de neuritas, aunque este efecto es significativamente más bajo que el de la proteína G de la cepa CVS-NIV (I-4140).

Por tanto, cada una de las dos posiciones de aminoácidos contribuye al efecto de crecimiento de neuritas, es decir:

- la posición de aminoácido, que, en la proteína G de la cepa CVS-NIV, es la posición 491 (es decir, H en la proteína G de la cepa CVS-NIV), y
- la posición de aminoácido, que, en la proteína G de la cepa CVS-NIV, es el primer aminoácido de PDZ-BS de la proteína G, es decir, la posición 521 en la proteína G de la cepa CVS-NIV (es decir, el aminoácido Q en la proteína G de la cepa CVS-NIV).

Por lo tanto, polipéptidos de crecimiento de pro-neuritas ilustrativos comprenden la proteína G de la cepa I-4142 y la proteína G de la cepa I-4143, además de los fragmentos de estas proteínas, más particularmente los fragmentos citoplásmicos de las mismas (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20 en la Figura 19) y los sub-fragmentos citoplásmicos de las mismas, a condición de que estos sub-fragmentos hayan retenido la función de inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, por ejemplo como se ilustra más adelante, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas humanas, por ejemplo, de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266; véase, por favor, el Ejemplo 1 más adelante para condiciones y materiales experimentales ilustrativos).

La solicitud se refiere más particularmente a dicho polipéptido, para su uso en estimular y/o inducir el crecimiento de neuritas, más particularmente para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección que implica un crecimiento de neuritas insuficiente o alterado, más particularmente una neuritogénesis insuficiente o alterada.

Preferentemente, la longitud de aminoácidos de dicho polipéptido es inferior a 100 aminoácidos, más preferentemente inferior a 90 aminoácidos.

La expresión "proteína del virus de la rabia no apoptósica" está prevista en el presente documento según su significado habitual en el campo.

PDZ-BS de una proteína G del virus de la rabia no apoptósica es de SEQ ID NO: 14.

Una proteína G del virus de la rabia no apoptósica puede caracterizarse adicionalmente o alternativamente por el hecho de que su secuencia es la secuencia de una proteína G de una cepa del virus de la rabia, y que no desencadena la apoptosis de neuronas humanas.

Medios ilustrativos para comprobar que un candidato a proteína G del virus de la rabia es uno no apoptogénico son conocidos para el experto habitual en la materia.

Uno de los medios comprende comprobar que la cepa del virus de la rabia, que comprende esta proteína G, es una cepa no apoptósica cuando infecta neuronas, más particularmente neuronas humanas, tales como la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC HTB11) o la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), preferentemente la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC HTB11). Tales medios son en particular útiles cuando una cepa del virus de la rabia que existe de forma natural que comprende el candidato a proteína G está disponible para análisis.

Otros medios comprenden manipular genéticamente células para hacer que expresen el candidato a proteína G, infectar células de neurona con candidato a proteína G expresado y determinar que la apoptosis no es inducida por dicha infección.

Una ilustración de tales medios se describe en Préhaud *et al.* 2003.

- 5 Células genéticamente manipuladas ilustrativas comprenden la línea celular de Jurkat transgénica que se describe en Préhaud *et al.* 2003, más particularmente en la página 10538 (véase el párrafo "inducible transgenic cell lines").

Células de neurona ilustrativas comprenden la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC HTB11) o la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), preferentemente la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (ATCC HTB 11).

- 10 Condiciones experimentales ilustrativas para preparar las células genéticamente manipuladas que infectan las células de neurona comprenden aquellas descritas en Préhaud *et al.* 2003, más particularmente en la página 10538 (véase el párrafo "inducible transgenic cell lines").

- 15 La detección de que la cepa del virus de la rabia o la célula genéticamente manipulada no induce la apoptosis de las células de neurona está dentro del ámbito del experto medio en la materia. Medios ilustrativos comprenden aquellos descritos en Préhaud *et al.* 2003 y Préhaud *et al.* 2005. Medios ilustrativos comprenden detectar que no se induce fragmentación de ADN significativa, por ejemplo, por tinción de Hoechst (véase, Préhaud *et al.*, 2003, más particularmente en la página 10538, párrafo "Detection of nuclear fragmentation by Hoechst staining"), y/o por el método de TUNEL (véase Préhaud *et al.* 2003, más particularmente en la página 10538 (véase el párrafo "Detection of nuclear fragmentation by the TUNEL method"), y/o por electroforesis de ADN (véase Préhaud *et al.* 2005).

- 20 Medios ilustrativos adicionales o alternativos para detectar que no se induce fragmentación de ADN significativa comprenden la detección de que la caspasa 8 no es activada, por ejemplo, siguiendo el procedimiento descrito en Préhaud *et al.* 2003, más particularmente en la página 10538, párrafo "Detection of caspase activation"), con la condición de que las células de neurona usadas deban entonces contener la caspasa 8, que es el caso de la línea celular SK-N-SH.

- 25 Valores ilustrativos de apoptosis no significativa se muestran en la Figura 5D de Préhaud *et al.* 2003: véase la penúltima columna con el encabezamiento "JrtTA-G-CVS":

- solo el 19 % de las células apoptóticas como se mide por tinción de Hoechst;
- solo el 4,7 % de las células apoptóticas como se mide por evaluación de la activación de la caspasa 8.

- 30 Las cepas del virus de la rabia que son cepas atenuadas (es decir, no patógenas, por ejemplo, no patógenas cuando se inyectan por vía intramuscular en ratones inmunocompetentes), tales como la cepa ERA atenuada, la cepa RV194-2, la cepa AVO-1, la cepa SN10, la cepa SN-10-SAD, la cepa SAG2, son cepas apoptogénicas.

Aquellas cepas del virus de la rabia, que son patógenas, es decir, neurovirulentas *in vivo* (tales como la cepa CVS-NIV), son no apoptóticas.

- 35 Por tanto, una cepa del virus de la rabia no apoptogénica es una cepa patógena (neurovirulenta) (por ejemplo, patógena cuando se inyecta por vía intramuscular en ratones inmunocompetentes).

El actual conocimiento es que:

- cuando una cepa del virus de la rabia no apoptogénica infecta una célula de neurona humana, la proteína G que codifica se acumula en el citoplasma de dicha célula de neurona bajo la forma de estructuras globulares perinucleares, y no es difusivamente distribuida en el citoplasma de dicha célula de neurona;
- 40 - y que, por el contrario, cuando un virus de la rabia apoptogénico infecta una célula de neurona humana, la proteína G que codifica no se acumula en el citoplasma de dicha célula de neurona bajo la forma de estructuras globulares perinucleares, sino que se distribuye difusivamente en el citoplasma de dicha célula de neurona.

Como se mencionó anteriormente y se ilustra más adelante, un polipéptido de la solicitud puede ser la proteína G de una cepa del virus de la rabia.

- 45 Preferentemente, dicha proteína G del virus de la rabia es:

i. la proteína G de la cepa CVS-NIV, estando dicha cepa disponible de la CNCM con el número de depósito I-4140 (siendo la fecha de depósito el 1 de abril de 2009), y/o la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, (siendo la fecha de depósito el 30 de noviembre de 2001) y/o la proteína de SEQ ID NO: 2; o

ii. una proteína de variante de dicha proteína G del virus de la rabia de i., en la que dicha proteína de variante todavía es una proteína del virus de la rabia, y en la que la secuencia del motivo PDZ-BS de dicha proteína G de variante del virus de la rabia todavía es la secuencia de SEQ ID NO: 14.

Preferentemente, dicha proteína G del virus de la rabia es:

5 i. la proteína G de la cepa CVS-NIV que está disponible de la CNCM con el número de depósito I-4140, y/o la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, y/o la proteína de SEQ ID NO: 2; o

ii. una proteína de variante de dicha proteína G del virus de la rabia de i., en la que:

10 - dicha proteína de variante consiste en una secuencia que es al menos el 95 % idéntica (preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, todavía más preferentemente al menos el 97,5 %, incluso todavía más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 98,5 %, todavía lo más preferentemente al menos el 99 %) a la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i. a lo largo de la longitud entera de la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i., y

15 - la secuencia del motivo PDZ-BS de dicha proteína G de variante del virus de la rabia es la secuencia de SEQ ID NO: 14.

Preferentemente, dicha proteína G del virus de la rabia es:

i. la proteína G de la cepa CVS-NIV que está disponible de la CNCM con el número de depósito I-4140, y/o la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, y/o la proteína de SEQ ID NO: 2; o

20 ii. una proteína de variante de dicha proteína G del virus de la rabia de i., en la que dicha proteína de variante todavía es una proteína del virus de la rabia, y en la que:

25 - dicha proteína de variante consiste en una secuencia que es al menos el 95 % idéntica (preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, todavía más preferentemente al menos el 97,5 %, incluso todavía más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 98,5 %, todavía lo más preferentemente al menos el 99 %) a la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i. a lo largo de la longitud entera de la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i., y

- la secuencia del motivo PDZ-BS de dicha proteína de variante G del virus de la rabia es la secuencia de SEQ ID NO: 14.

Preferentemente, dicha proteína G del virus de la rabia es:

30 i. la proteína G de la cepa CVS-NIV que está disponible de la CNCM con el número de depósito I-4140, y/o la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, y/o la proteína de SEQ ID NO: 2; o

35 ii. una proteína de variante de dicha proteína G del virus de la rabia de i., en la que dicha proteína de variante todavía es una proteína del virus de la rabia, y en la que dicha proteína de variante consiste en una secuencia que:

40 - es al menos el 95 % idéntica (preferentemente al menos el 96 %, más preferentemente al menos el 97 %, todavía más preferentemente al menos el 97,5 %, incluso todavía más preferentemente al menos el 98 %, lo más preferentemente al menos el 98,5 %, todavía lo más preferentemente al menos el 99 %) a la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i. a lo largo de la longitud entera de la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i., y

- ha retenido el motivo PDZ-BS de SEQ ID NO: 14 de dicha proteína G del virus de la rabia de i. y/o contiene un motivo de PDZ-BS, cuya secuencia es QTRL (SEQ ID NO: 14 con $x_1=Q$; $x_2=T$; $x_3=R$; $x_4=L$).

45 Preferentemente, la longitud de aminoácidos de dicha proteína de variante G del virus de la rabia de ii. no supera la longitud de dicha proteína G del virus de la rabia de i. de más de 50 aminoácidos. Preferentemente, la longitud de aminoácidos de dicha proteína de variante G del virus de la rabia de ii. es no más de 50 aminoácido más baja que la longitud de dicha proteína G del virus de la rabia de i., por ejemplo de la misma longitud que la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i.

50 Más preferentemente, la longitud de aminoácidos de dicha proteína de variante G del virus de la rabia de ii. comprende al menos la longitud de dicha proteína G del virus de la rabia de i. menos 50 aminoácidos, y como máximo la longitud de dicha proteína G del virus de la rabia de i. más 50 aminoácidos, por ejemplo de la misma longitud que la secuencia de dicha proteína G del virus de la rabia de i.

Proteínas G del virus de la rabia de crecimiento de pro-neuritas ilustrativas que no son la proteína G de la cepa CVS-NIV (I-4140) y/o que son distintas de la proteína codificada por el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758, y/o que son distintas de la proteína de SEQ ID NO: 2, pero que todavía son proteínas G del virus de la rabia de crecimiento de pro-neuritas adecuadas en particular comprenden las proteínas G de la cepa del virus de la rabia recombinante depositadas el 1 de abril de 2009 en la CNCM con el número de depósito I-4142.

La cepa I-4142 se diferencia de la cepa CVS-NIV (CNCM I-4140) en que su proteína G tiene el aminoácido L en la posición 491 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa), en lugar de H (véanse la Tabla 2 más adelante y la Figura 3D).

Un fragmento ilustrativo de la secuencia de SEQ ID NO: 19 (véase la Figura 19).

Otras secuencias que pueden estar adicionalmente presentes:

Como se mencionó anteriormente y se ilustra más adelante, un polipéptido de la invención comprende una secuencia de aminoácidos, que tiene un efecto de crecimiento de pro-neuritas (y/o de brote de neuritas y/o de crecimiento de axones y/o de extensión de árboles dendríticos).

Como se mencionó anteriormente y se ilustra más adelante, dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas puede definirse como una secuencia parental y/o una secuencia de variante conservativa (secuencia de variante A o B) y/o una secuencia de fragmento conservativo como se definió anteriormente.

Como se mencionó anteriormente y se ilustra más adelante, dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas puede, alternativamente o complementariamente, definirse como que es la secuencia de la proteína G de una cepa del virus de la rabia (no apoptósica) (por ejemplo, la proteína G de la CNCM I-4140, I-4142 o I-4143), o una secuencia de variante de la misma, que deriva de la misma por una o varias sustituciones y/o adiciones y/o deleciones de aminoácidos, o una secuencia de fragmento de una proteína G o proteína G de variante tal, más particularmente un fragmento citoplásmico o sub-fragmento de la misma.

Ejemplos ilustrativos de tales fragmentos de proteína G o proteína de variante G en particular comprenden aquellos fragmentos, que han retenido el dominio citoplásmico y el dominio transmembranario de dicha proteína G o proteína G de variante.

Un dominio transmembranario tal en particular tiene la ventaja de anclar el fragmento citoplásmico en compartimento(s) intracelular(es) de las células, más particularmente en el retículo endoplásmico y/o la membrana de Golgi de las células, por lo que dicho fragmento citoplásmico ejerce más eficientemente sus efectos de estimulación y/o inducción de la neurogeneración, neuroregeneración y neuroprotección. Véanse, por favor, los Ejemplos 4 y 5 más adelante.

Por lo tanto, además de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además una secuencia, que ancla dicho polipéptido en la membrana del endoretículo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas, estando dicha secuencia de anclaje preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, lo más preferentemente directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas.

Por lo tanto, además de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además una secuencia de aminoácidos, que ancla dicho polipéptido en la membrana del endoretículo y/o en la membrana de Golgi (preferentemente en la membrana del endoretículo y en la membrana de Golgi) de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas (por ejemplo, la línea celular de neuroblastoma humano la línea celular SH-SY5Y como se describe en los ejemplos de más adelante, por ejemplo, el Ejemplo 4).

Dicha secuencia de anclaje está preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o secuencia de variante A o secuencia de variante B. Lo más preferentemente, dicha secuencia de anclaje está directamente o indirectamente, preferentemente directamente, unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B.

Una secuencia de anclaje tal puede, por ejemplo, ser una secuencia de aminoácidos, que tiene la capacidad de anclar el dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 en la membrana del endoretículo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas (por ejemplo, la línea celular de neuroblastoma humano la línea celular SH-SY5Y como se describe en los ejemplos de más adelante, por ejemplo, el Ejemplo 4).

Ilustrativo de una secuencia de anclaje tal es la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), preferentemente la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G del virus de la rabia CVS-NIV, que es de SEQ ID NO: 23.

Por lo tanto, además de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, dicho polipéptido puede comprender además, preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o secuencia de variante A o secuencia de variante B, lo más preferentemente directamente unido al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B:

- 5 - la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, o
- una secuencia, que se diferencia de dicha secuencia del dominio transmembranario G del virus de la rabia por al menos una sustitución y/o deleción y/o adición de aminoácidos, preferentemente por sustitución (sustituciones) y/o deleción (deleciones) de aminoácidos, más preferentemente por sustitución (sustituciones) de aminoácidos, pero que ha retenido la capacidad de anclar dicho polipéptido (más particularmente la capacidad de anclar el dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 -cuando dicha secuencia de anclaje está directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6-), en la membrana del endoretículo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas (por ejemplo, la línea celular de neuroblastoma humano la línea celular SH-SY5Y como se describe en los ejemplos más adelante, por ejemplo, el Ejemplo 4).

Por lo tanto, además de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además, preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o secuencia de variante A o secuencia de variante B, lo más preferentemente directamente unido al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B:

- la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, o
- 25 - una secuencia, que se diferencia de dicha secuencia de dominio transmembranario G del virus de la rabia por al menos una sustitución de aminoácidos y/o deleción y/o adición, preferentemente por sustitución (sustituciones) y/o deleción (deleciones) de aminoácidos, más preferentemente por sustitución (sustituciones) de aminoácidos, pero que ha retenido la capacidad de anclar el polipéptido de SEQ ID NO: 6 (cuando dicha secuencia de anclaje está directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6), en la membrana del endoretículo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas.

Ejemplos preferidos de tales secuencias de anclaje en particular comprenden:

- la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, todavía más particularmente de la cepa CVS-NIV, por ejemplo la secuencia de SEQ ID NO: 23, o
- 35 - una secuencia de variante de las mismas, que es de 18 a 26 aminoácidos, preferentemente de 18 a 22 aminoácidos, más preferentemente de 22 aminoácidos, y que es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 23 con respecto a la más corta de las dos secuencias (es decir, con respecto a la más corta de SEQ ID NO: 23 y de dicha secuencia de variante).

Una secuencia de anclaje tal es particularmente útil cuando está unida a una secuencia de crecimiento de pro-neuritas que es la secuencia de SEQ ID NO: 6 o dicha secuencia de variante A, más particularmente la secuencia de SEQ ID NO: 6.

Por lo tanto, según una realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención comprende, o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 23 seguida de (de extremo N a extremo C) la secuencia de SEQ ID NO: 6, en la que uno a cuatro aminoácidos, preferentemente un aminoácido (por ejemplo, M) está/n opcionalmente presentes entre dicha secuencia de SEQ ID NO: 23 y dicha secuencia de SEQ ID NO: 6. Ilustrativo de un polipéptido tal es el polipéptido de SEQ ID NO: 25.

Además de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además:

- 50 - un fragmento del ectodominio de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, todavía más particularmente de la cepa CVS-NIV, y/o
- un péptido señal, siendo este péptido señal preferentemente el péptido señal de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, todavía más particularmente de la cepa CVS-NIV.

Dicho fragmento de ectodominio y/o péptido señal pueden estar presentes en dicho polipéptido de la solicitud o invención, además de dicha secuencia de anclaje.

Preferentemente, cuando un péptido señal está comprendido en dicho polipéptido, dicho péptido señal es el primer componente en el extremo N del polipéptido.

- 5 Preferentemente, cuando un péptido señal y un fragmento de ectodominio están comprendidos en dicho polipéptido, dicho fragmento de ectodominio está comprendido en dicho polipéptido de la solicitud o invención entre dicho péptido señal y dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, preferentemente entre dicho péptido señal y cualquier posible secuencia de anclaje que puede estar comprendida en dicho polipéptido.

- 10 Según una realización, un polipéptido de la solicitud o invención comprende, o consiste en, de su extremo N a su extremo C:

dicho péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 21), dicha secuencia de anclaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 23) y dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas.

Según otra realización, un polipéptido de la solicitud o invención comprende, o consiste en, de su extremo N a su extremo C:

- 15 dicho péptido señal (por ejemplo, SEQ ID NO: 21), dicho fragmento de ectodominio (por ejemplo, los dos aminoácidos GK), dicha secuencia de anclaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 23) y dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas.

Preferentemente, dicho fragmento de ectodominio es de uno a cuatro aminoácidos, más preferentemente de 2 aminoácidos.

- 20 Preferentemente, dicho fragmento de ectodominio es un fragmento del extremo C de dicho ectodominio, más preferentemente los últimos uno a cuatro, más particularmente los últimos dos aminoácidos en el extremo C de dicho ectodominio.

Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además (directamente o indirectamente, preferentemente directamente) unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de anclaje:

- 25 uno a cuatro aminoácidos, preferentemente dos aminoácidos, más preferentemente uno a cuatro aminoácidos del extremo C del ectodominio de la proteína G de un virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), todavía más preferentemente los dos últimos aminoácidos del extremo C del ectodominio de la proteína G de un virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), por ejemplo los aminoácidos GK.

Ejemplos de un polipéptido tal en particular comprenden el polipéptido de SEQ ID NO: 26 y los polipéptidos, que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 26.

- 35 Por lo tanto, un polipéptido de la solicitud o invención puede comprender además un péptido señal, preferentemente el péptido señal de la proteína G de una cepa del virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), estando dicha secuencia de péptidos preferentemente en el extremo N de dicho polipéptido (lo más preferentemente en el mismo extremo N de dicho polipéptido, es decir, en el extremo N de cualquier secuencia de anclaje que pueda estar comprendida en dicho polipéptido).

Ejemplos de un polipéptido tal en particular comprenden el polipéptido de SEQ ID NO: 27 y los polipéptidos, que comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 27.

- 40 Ejemplos de polipéptidos preferidos:

Polipéptidos preferidos de la solicitud comprenden polipéptidos, que son de menos de 100 aminoácidos, más preferentemente de tan pocos aminoácidos como sea posible, mientras que todavía se retiene un efecto de crecimiento de neuritas, más preferentemente de menos de 90 aminoácidos.

- 45 Polipéptidos preferidos de la solicitud o invención comprenden polipéptidos, que comprenden, o consisten en los fragmentos citoplásmicos de dichas proteínas G, lo más preferentemente el fragmento citoplásmico de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 (véase la Figura 19).

Polipéptidos preferidos de la solicitud o invención también comprenden polipéptidos, que comprenden, o consisten en los 11-44 sub-fragmentos de estos fragmentos citoplásmicos.

- 50 Polipéptidos preferidos de la solicitud o invención comprenden polipéptidos, que, además de dicha secuencia de crecimiento de pro-neuritas, comprenden al menos una secuencia de anclaje como se definió anteriormente (por ejemplo, la secuencia de anclaje de SEQ ID NO: 23; véanse, por favor, los Ejemplos 4-6 de más adelante).

Ácidos nucleicos, vectores y células:

La solicitud, además de la invención, también se refiere a cualquier ácido nucleico, más particularmente a cualquier ADN o ARN, que codifica un polipéptido de la solicitud o invención, según el código genético universal, teniendo en cuenta su degeneración.

- 5 Como se muestra en la Figura 15, un ácido nucleico ilustrativo que codifica el fragmento citoplásmico de SEQ ID NO: 6 (es decir, el fragmento citoplásmico de la cepa CVS-NIV) es el ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.

Como se muestra en la Figura 16, un ácido nucleico ilustrativo que codifica PDZ-BS de SEQ ID NO: 10 (es decir, PDZ-BS de la cepa CVS-NIV) es el ácido nucleico de SEQ ID NO: 9.

- 10 La solicitud, además de la invención, también se refiere a cualquier vector de ácido nucleico, que comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la solicitud o invención. Dicho vector puede ser una transfección y/o vector de expresión.

- 15 Dicho vector de expresión puede comprender además al menos una señal de expresión y/o secuencia reguladora en la dirección 5' y/o en la dirección 3' de dicho ácido nucleico, tal como al menos un promotor, o al menos un potenciador y al menos un promotor, en la dirección 5' de dicho ácido nucleico. Dicho vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido.

Ilustrativo de tales vectores es el plásmido disponible de la CNCM con el número de depósito I-2758.

De forma interesante, pueden usarse vectores de lentivirus, vectores de AAV, vectores de adeno-virus y vectores del virus incapacitado del herpes simple.

- 20 Alternativamente o complementariamente, un ácido nucleico de la solicitud o invención puede acoplarse a, o de otro modo asociarse a, un dendrímero tal como liposomas, o un polímero catiónico tal como DEAE-dextrano o polietiliminina, o una nanopartícula de sólido inerte, tal como una partícula de oro, o cualquier otro medio de transfección que el experto medio en la materia pueda encontrar apropiado.

- 25 La solicitud, además de la invención, también se refiere a cualquier célula, que comprende al menos un polipéptido de la solicitud o invención, y/o al menos ácido nucleico de la solicitud o invención y/o al menos un vector de la solicitud o invención.

Dicha célula es preferentemente una célula, que ha sido genéticamente manipulada para comprender dicho polipéptido y/o ácido nucleico y/o vector.

Dicha célula puede ser una célula eucariota, preferentemente una célula de mamífero, por ejemplo una célula humana o una célula no humana, lo más preferentemente una célula humana.

- 30 Dicha célula puede ser una célula procariota, preferentemente una bacteria, por ejemplo *E. coli*.

Dicha célula puede ser un virión, siempre que dicho virión no induzca ningún efecto significativamente perjudicial o no deseable al sujeto receptor, más particularmente a un paciente humano. Preferentemente, dicha célula no es una célula embrionaria humana.

Usos:

- 35 La solicitud, además de la invención, se refieren más particularmente a dicho polipéptido y/o ácido nucleico y/o vector y/o célula, para su uso en inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, más particularmente en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección que implica una neuritogénesis insuficiente o alterada, más particularmente un crecimiento de neuritas insuficiente o alterado.

Dicho uso es un uso no inmunogénico.

- 40 De hecho, aquellas proteínas G del virus de la rabia, que son apropiadas para la solicitud o invención, pueden definirse como proteínas G no apoptósicas.

Por tanto, el polipéptido de la solicitud o invención no induce la formación de cuerpos apoptósicos tales como aquellos que se han descrito en la solicitud internacional PCT previamente publicada WO 03/048198.

- 45 Según la solicitud o invención, el polipéptido de la solicitud o invención está previsto como un efector de crecimiento de neuritas (y/o de desarrollo de axones y/o de dendritas), por ejemplo, para la diferenciación de neuronas de progenitores de neuronas o neuronas neoplásicas, y/o para la regeneración de neuronas de neuronas alteradas (siendo ambos efectos obtenidos mediante estimulación del crecimiento de neuritas).

- 50 Por tanto, el polipéptido de la solicitud o invención no es un agente o adyuvante inmunogénico, o como poco no se usa como un agente inmunogénico o adyuvante y no se usa en condiciones que permitirían que dicho polipéptido actuara de agente o adyuvante inmunogénico.

Más particularmente, a diferencia de las proteínas G de cepas del virus de la rabia apoptósicas, tales como las proteínas G de la cepa ERA atenuada y de las otras cepas del virus de la rabia atenuadas, el polipéptido de la solicitud o invención no provoca una respuesta inmunitaria humoral detectable cuando se administra a neuronas.

5 El polipéptido de la solicitud o invención no se usa en una composición farmacéutica o fármaco, que fuera una composición inmunogénica o una vacuna.

Por consiguiente, el polipéptido de la solicitud o invención preferentemente no se acopla a, no se fusiona con y no se asocia a ningún antígeno, más particularmente a ningún antígeno que fuera un antígeno viral, un antígeno de tumor, un antígeno de célula, cuya expresión en exceso o alteración conduciría a una patología tal como una neuropatología.

10 Enfermedades, trastornos y condiciones:

La solicitud, además de la invención, proporciona polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores y células. Estos productos inducen y/o estimulan la neuritogénesis, más particularmente el crecimiento de neuritas, todavía más particularmente el crecimiento de neuritas humanas.

15 Un producto de la solicitud o invención es preferentemente un vector de ácido nucleico de la solicitud o invención, más particularmente un plásmido de la solicitud o invención.

Más particularmente, un producto de la solicitud o invención induce y/o estimula la neuritogénesis, más particularmente el crecimiento de neuritas de neuronas pre-mitóticas, neuronas neoplásicas, progenitores de neuronas, además de neuronas alteradas.

20 Por tanto, la solicitud, además de la invención, se refieren a dicho producto, para su uso como un agente neurogenerativo y/o neuroregenerativo y/o neuroprotector.

Un producto de la solicitud o invención estimula y/o induce el brote de neuritas y/o el crecimiento de axones y/o la extensión de árboles dendríticos.

25 Un producto de la solicitud o invención estimula la actividad del cono de crecimiento. Además, previene que el cono de crecimiento colapse tras el contacto con un agente de colapso del crecimiento, tal como LPA o estrés oxidativo (véase el Ejemplo 1 más adelante).

Un producto de la solicitud o invención, por consiguiente, estimula y/o induce la sinaptogénesis y/o neurotransmisión.

Un producto de la solicitud o invención es un agente que inhibe la proliferación de neuronas neoplásicas, más particularmente como un agente de neuro-diferenciación.

30 Un producto de la solicitud o invención es un agente que estimula el desarrollo neuronal y/o la regeneración neuronal y/o crecimiento de axones y/o desarrollo de dendritas y/o extensión de árboles dendríticos y/o plasticidad neuronal y/o sinaptogénesis y/o neurotransmisión.

Un producto de la solicitud o invención es un agente que previene y/o inhibe y/o bloquea cualquier tipo de neurotoxicidad que conduciría a la retracción de neurita y/o colapso del cono de crecimiento.

35 Un producto de la solicitud o invención es un agente que estimula y/o induce la actividad de crecimiento de neuritas y/o de crecimiento del cono después de que dicha neurita y/o cono se hayan puesto en contacto con un agente neurotóxico.

Un producto de la solicitud o invención es un agente que previene y/o inhibe y/o bloquea el colapso del cono de crecimiento y/o la retracción de neuritas y/o daño o lesión axodendrítica y/o rotura de la integridad sináptica y/o pérdida de la conectividad de neuronas y/o daño a terminaciones nerviosas y/o alteración de la neurotransmisión.

40 Un producto de la solicitud o invención es un medio para inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas, que es en particular útil:

- en inducir la diferenciación de neuronas, por ejemplo en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una neoplasia del sistema nervioso, además de

45 - en regenerar neuronas alteradas, más particularmente neuritas alteradas, por ejemplo en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad neurodegenerativa, trastorno o afección, en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de infecciones microbianas de las neuronas, o en proteger neuronas de agentes neurotóxicos o estrés oxidativo.

Por tanto, la solicitud, además de la invención, se refieren a dicho producto, para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de cualquier enfermedad, trastorno o afección que implica una neuritogénesis insuficiente o alterada, más particularmente un crecimiento de neuritas insuficiente o alterado.

50

Dicha enfermedad, trastorno o afección se define alternativamente o complementariamente como cualquier enfermedad, trastorno o afección que implica un ciclo de células de neurona desequilibrado, en el que dicho ciclo de células de neurona está desequilibrado:

- 5 - bien por presencia excesiva o no deseada de neuronas pre-mitóticas (más particularmente, por diferenciación insuficiente de neuronas y/o por re-entrada excesiva o no deseada de neuronas post-mitóticas en el ciclo de células de neurona, como es el caso cuando se desarrolla una neoplasia en el sistema nervioso),
- o bien por degeneración de neuronas excesiva o no deseada, más particularmente degeneración de neuritas excesiva o no deseada (como es el caso para una enfermedad neurodegenerativa, trastorno o afección, y para cierta infección microbiana de las neuronas).

10 Un producto de la solicitud o invención puede usarse en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección, que altera el sistema nervioso central (SNC) y/o el sistema nervioso periférico (SNP), por ejemplo como una terapia neuro-restaurativa y/o prevención y/o paliación.

La expresión "sistema nervioso central" o "SNC" pretende significar en el presente documento el cerebro y (en el caso de un animal vertebrado) la médula espinal.

15 El sistema nervioso periférico (SNP) es la vasta red de nervios espinales y craneales que unen el cuerpo con el cerebro y la médula espinal. El SNP está subdividido en el sistema nervioso autónomo (SN simpático y SN parasimpático) y el sistema nervioso somático. El SNP consiste en neuronas sensitivas que corren de receptores de estímulos al SNC y neuronas motoras que corren del SNC al músculo y glándulas.

20 Según una realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad, trastorno o afección es o implica una infección microbiana del sistema nervioso, tal como una infección bacteriana y/o viral, más particularmente una infección viral.

Dicha infección viral puede, por ejemplo, ser una infección por el virus del herpes simple (VHS), más particularmente una infección por VHS de tipo 1 (que conduce a encefalopatía viral).

Dicha infección microbiana puede ser una infección viral, que no induce apoptosis de neuronas, tal como una infección por el virus de la rabia.

25 Preferentemente, dicha infección microbiana es una infección microbiana que induce la apoptosis de neuronas, tal como la poliomielitis (véase Blondel *et al.*, 2005).

Según otra realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad, trastorno o afección es o implica una enfermedad, trastorno o afección no viral, más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no bacteriana y no viral, todavía más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no microbiana.

30 Según una realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad o trastorno es o implica una enfermedad neurodegenerativa o trastorno (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa crónica o trastorno), tal como encefalopatía no viral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple (EM) o enfermedad genética rara.

35 Preferentemente, dicha enfermedad neurodegenerativa o trastorno es una enfermedad no viral o trastorno, más preferentemente una enfermedad no bacteriana y no viral o trastorno, todavía más preferentemente un trastorno no microbiano.

Según una realización de la solicitud o invención, dicha afección es o implica una afección neurodegenerativa, tal como envejecimiento.

40 Preferentemente, dicha afección neurodegenerativa es una afección no viral, más preferentemente una afección no bacteriana y no viral, todavía más preferentemente una afección no microbiana.

Según una realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad, trastorno o afección es o implica una lesión física o isquémica del sistema nervioso, tal como convulsión, accidente cerebrovascular, traumatismo, epilepsia.

45 Preferentemente, dicha lesión física o isquémica es una enfermedad, trastorno o afección no viral, más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no bacteriana y no viral, todavía más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no microbiana.

Según una realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad, trastorno o afección implica la presencia de un agente neurotóxico químico y/o de un estrés oxidativo.

50 Preferentemente, dicha enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección no viral, más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no bacteriana y no viral, todavía más preferentemente una enfermedad, trastorno o afección no microbiana.

Según una realización de la solicitud o invención, dicha enfermedad es una neoplasia, más particularmente una neoplasia que comprende neuronas neoplásicas.

5 El término "neoplasia" está previsto en el presente documento más particularmente como una neoplasia maligna, más particularmente un cáncer, todavía más particularmente un tumor o una leucemia, incluso todavía más particularmente un tumor.

Un producto de la solicitud o invención no actúa de un agente inmunogénico. Más particularmente, un producto de la solicitud o invención no actúa de un agente inmunogénico, que produciría una respuesta humoral contra antígenos de tumor.

10 Preferentemente, un producto de la solicitud o invención no puede, solo y por sí mismo, actuar de agente inmunogénico. Más particularmente, un producto de la solicitud o invención no puede, solo y por sí mismo, actuar de agente inmunogénico, que produciría una respuesta humoral contra antígenos de tumor.

Un producto de la solicitud o invención actúa de agente antiproliferativo.

Un producto de la solicitud o invención induce y/o estimula el crecimiento de neuritas de neuronas neoplásicas, induciendo así y/o estimulando la diferenciación de neuronas neoplásicas en neuronas maduras.

15 Dicha neoplasia puede ser una neoplasia del SNC y/o SNP, preferentemente un ganglioglioma, un tumor cerebral, un neurocitoma central, un meduloblastoma, unependimoma, un teratoma, un neuroblastoma.

Preferentemente, dicha neoplasia es una neoplasia no viral, más preferentemente una neoplasia no bacteriana y no viral, todavía más preferentemente una neoplasia no microbiana.

20 Cualquier modo de administración que el experto pueda encontrar apropiado está englobado por la solicitud o invención.

Dependiendo de cómo se formule el producto de la solicitud o invención, puede administrarse por administración parenteral o enteral (por ejemplo, oral), preferentemente por administración parenteral, más preferentemente mediante inyección parenteral.

Composición farmacéutica o fármaco; método de tratamiento:

25 La solicitud, además de la invención, también se refieren a cualquier composición farmacéutica o fármaco, que comprende al menos un polipéptido de la solicitud o invención y/o al menos un ácido nucleico de la solicitud o invención y/o al menos un vector de la solicitud o invención y/o al menos una célula de la solicitud o invención.

30 La composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención puede usarse para el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad, trastorno o afección que implica un crecimiento de neuritas insuficiente o alterado como se describió anteriormente en más detalle. La composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención no es una composición inmunogénica y no es una vacuna.

35 La composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención puede comprender además al menos un vehículo farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptable (diluyente, excipiente, aditivo, agente de ajuste del pH, emulsionante o agente dispersante, conservante, tensioactivo, gelificante, además de agente de tamponamiento y otro estabilizante y solubilizante, etc.).

La composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención no contiene preferentemente ningún adyuvante inmunitario.

40 Lo más preferentemente, la composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención no comprende ningún antígeno, más particularmente ningún antígeno que sea un antígeno viral, un antígeno de tumor, un antígeno de célula, cuya expresión en exceso o alteración conduciría a una patología tal como una neuropatología.

La composición farmacéutica o fármaco de la solicitud o invención puede ser, por ejemplo, una disolución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. Preferentemente, se formula bajo una forma adecuada para administración parenteral.

45 La solicitud también describe un método de tratamiento de un sujeto, más particularmente de un ser humano, en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho sujeto o ser humano al menos un polipéptido de la solicitud y/o al menos un ácido nucleico de la solicitud y/o al menos un vector de la solicitud y/o al menos una célula de la solicitud como se describió anteriormente.

50 En la solicitud o invención, el término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye" o "que contiene", es de extremos abiertos y no excluye elemento(s), componente(s) o etapa(s) de método adicionales no citados, mientras que el término "que consiste en" es un término cerrado, que excluye cualquier elemento, etapa o componente adicional que no se haya citado explícitamente.

El término "que consiste esencialmente en" es un término parcialmente abierto, que no excluye elemento(s), etapa(s) o componente(s) adicionales no citados, en tanto que estos elemento(s), etapa(s) o componente(s) adicionales no afecten materialmente las propiedades básicas y novedosas de la materia de la solicitud o de la invención.

5 El término "que comprende" (o "comprende(n)"), por lo tanto, incluye el término "que consiste en" ("consiste(n) en"), además del término "que consiste esencialmente en" ("consiste(n) esencialmente en"). Por consiguiente, el término "que comprende" (o "comprende(n)") significa, en la solicitud o invención, como más particularmente que engloba el término "que consiste en" ("consiste(n) en"), y el término "que consiste esencialmente en" ("consiste(n) esencialmente en").

10 Cada una de las divulgaciones relevantes de todas las referencias citadas en el presente documento se incorpora específicamente por referencia. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

15 **EJEMPLO 1: El dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV no apoptótica del virus de la rabia (dominio citoplásmico de G-CVS-NIV o de "G-supervivencia") induce el crecimiento de neuritas, y el crecimiento de neuritas inducido es altamente resistente al agente de colapso del cono de crecimiento (es decir, LPA) y a estrés oxidativo (H₂O₂).**

La neuroregeneración y neuroprotección son hitos comunes en campos tan grandes como la neurotoxicidad, enfermedades neurodegenerativas, traumatismo-convulsión-accidente cerebrovascular, encefalopatía o incluso más envejecimiento en general (véase la Figura 1).

20 Neuronas humanas inmaduras, tales como células de neuroblastoma, son capaces de diferenciarse adicionalmente si se tratan con las moléculas de señalización apropiadas. Éste es el caso de las células SH-SY5Y cuando se tratan con db-AMPC permeable a la célula.

25 Los inventores han desarrollado una prueba de neuroprotección funcional, que implica el uso de una línea celular de neuroblastoma humano, tal como la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. En este sistema, las células pueden ser adicionalmente diferenciadas y puede monitorizarse el crecimiento de las neuritas, que permite probar efectores estimulantes de la actividad del cono de crecimiento. Además, puede evaluarse la capacidad de neuritas estiradas para luchar contra los procesos de retracción después del tratamiento con fármaco, tal como ácido lisofosfatídico (LPA) o peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Se ha demostrado que los datos reunidos con tales sistemas se correlacionan con los análisis de neurotoxicidad hechos *in vivo*.

El ejemplo a continuación en particular demuestra que:

- 30 - la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptótica (es decir, virulenta), es decir, la cepa CVS-NIV, tiene un efecto promotor del crecimiento de neuritas, es decir, algunas proteínas G del virus de la rabia no apoptóticas inducen y/o estimulan la neuritogénesis;
- este efecto de crecimiento de neuritas es suficientemente fuerte para proteger neuronas del fármaco de colapso del cono de crecimiento (LPA) y estrés oxidativo (H₂O₂);
- 35 - es la cola citoplásmica de la proteína G de dicha cepa del virus de la rabia CVS-NIV no apoptótica, que es responsable de este efecto de crecimiento de neuritas;
- proteínas G del virus de la rabia apoptóticas no muestran este efecto de crecimiento de neuritas; más particularmente la proteína G de la cepa ERA, que se diferencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV en solo seis aminoácidos (y en solo dos aminoácidos en la cola citoplásmica), no muestra este efecto de crecimiento de
- 40 neuritas;
- esto es en particular debido al hecho de que el motivo PDZ-BS que está contenido en la cola citoplásmica de dicha proteína G del virus de la rabia no apoptótica muestra una mutación de un solo punto en comparación con la de dicha proteína del virus de la rabia apoptótica: la proteína G de la cepa CVS-NIV no apoptótica tiene el aminoácido Q en la posición 521 (posición calculada con respecto a la proteína G de longitud completa de la
- 45 cepa CVS-NIV, correspondiente a la posición 41 en el fragmento citoplásmico de dicha proteína G), mientras que G-ERA tiene E en la misma posición;
- el aminoácido, que está en la posición 491 en la proteína G de longitud completa de la cepa CVS-NIV (posición 11 en el fragmento citoplásmico de dicha proteína G), también contribuye a este efecto de crecimiento de neuritas (aminoácido H).

50

MATERIAL Y MÉTODOS

Células, virus y clones moleculares

SH-SY5Y es una línea celular de neuroblastoma, que está disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; 10801 University Blvd.; Manassas, Virginia 20110-2209; EE.UU.) con el número de depósito CRL-2266.

- 5 Las cepas del virus de la rabia (VRAB) ERA y CVS originales están disponibles de la ATCC con el número de depósito vr332 y vr959, respectivamente. Las cepas ERA y CVS, que se han usado en este estudio, han sido sometidas a pases en el laboratorio de los inventores durante los últimos veinte años en células BSR (un clon de células de riñón de hámster bebé-clon 21, número de depósito de ATCC BHK-21). Estas cepas de pases son la cepa ERA-NIV y la cepa CVS-NIV, respectivamente.
- 10 En todos los ejemplos y las figuras de la solicitud, CVS significa CVS-NIV y ERA significa ERA-NIV (proteína G CNCM I-2760; SEQ ID NO: 4), a menos que se especifique de otro modo.
- La cepa CVS-NIV (CVS HQ de VRABr) se ha depositado en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) el 1 de abril de 2009 con los términos del Tratado de Budapest (CNCM; Institut Pasteur; 25, rue du Docteur Roux; F-75724 PARIS CEDEX 15; FRANCIA). El número de depósito de la CNCM es I-4140.
- 15 La obtención y caracterización de los clones moleculares representativos de la proteína G de la cepa ERA-NIV, es decir, de G-ERA-NIV, y de la proteína G de la cepa CVS-NIV, es decir, de G-CVS-NIV, se han descrito en Préhaud *et al.* 2003.
- Las secuencias de estas proteínas G también están disponibles con el número de acceso AF 406693 (para G-ERA-NIV) y AF 406694 (para G-CVS-NIV); véanse también las Figuras 13A y 13B.
- 20 La proteína G de la cepa CVS-NIV también está disponible de la cepa de *E. coli* recombinante depositada el 30 de noviembre de 2001 en la CNCM bajo los términos del Tratado de Budapest. El número de depósito de la CNCM I-2758. Esta *E. coli* recombinante comprende un plásmido (plásmido pRev-TRE-G-CVS; véase el documento WO 03/048198), que expresa induciblemente la proteína G de la cepa CVS-NIV.
- 25 La proteína G de la cepa ERA también está disponible de la cepa de *E. coli* recombinante depositada el 30 de noviembre de 2001 en la CNCM bajo los términos del Tratado de Budapest. El número de depósito de la CNCM es I-2760. Esta *E. coli* recombinante comprende un plásmido (plásmido pRev-TRE-G-ERA; véase el documento WO 03/048198), que expresa induciblemente la proteína G de la cepa ERA.
- Condiciones apropiadas para el cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante que contiene el plásmido CNCM I-2758 que codifican la proteína G de la cepa del virus de la rabia CVS-NIV y para el cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante que contiene el plásmido CNCM I-2760 que codifica la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia comprenden la incubación de dicha cepa de *E. coli* recombinante a 37 °C en un medio de crecimiento LB-TYM estándar (en presencia de ampicilina).
- 30 Condiciones apropiadas para el cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante que contiene el plásmido CNCM I-2758 que codifican la proteína G de la cepa del virus de la rabia CVS-NIV y para el cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante que contiene el plásmido CNCM I-2760 que codifica la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia comprenden la incubación de dicha cepa de *E. coli* recombinante a 37 °C en un medio de crecimiento LB-TYM estándar (en presencia de ampicilina).
- 35 Los virus de la rabia recombinantes (VRABr) se produjeron y aislaron siguiendo los procedimientos descritos por Faul *et al.* 2008. Se construyeron VRABr para alojar o bien las secuencias de "G supervivencia" o "G muerte" no mutantes (secuencia G de la cepa CVS-NIV y de la cepa ERA, respectivamente), o la cola citoplásmica de G supervivencia en un antecedente génico de G genético de ERA, o la cola citoplásmica de G muerte en un antecedente génico de G genético de CVS-NIV (véase la Figura 2).
- También se produjeron virus de la rabia recombinantes, que derivan de la cepa CVS-NIV por mutaciones en la secuencia codificante de G. Estos virus de la rabia recombinantes tienen una proteína G, que se diferencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV por uno o dos aminoácidos, concretamente:
- 40
- por el aminoácido, que en la secuencia de proteína G de longitud completa de la cepa CVS-NIV está en la posición 491 (posición 11 en el fragmento citoplásmico de la misma); y/o
 - por el aminoácido, que en la secuencia de proteína G de longitud completa de la cepa CVS-NIV está en la posición 521 (posición 41 en el fragmento citoplásmico de la misma).
- 45 Más particularmente, se produjeron las siguientes cepas del virus de la rabia recombinante:

Tabla 2:

	Posición 491 en la proteína G de longitud completa del virus (aminoácido H en la proteína G de la cepa CVS-NIV)	Posición 521 en la proteína G de longitud completa del virus (aminoácido Q en la proteína G de la cepa CVS-NIV)
CVS LE de VRABr	L	E
CVS LQ de VRABr	L	Q
CVS HE de VRABr	H	E

Se han depositado CVS LE de VRABr, CVS LQ de VRABr y CVS HE de VRABr en la CNCM bajo los términos del Tratado de Budapest el 1 de abril de 2009. Los números de depósito de la CNCM son I-4141, I-4142 y I-4143, respectivamente.

Condiciones apropiadas para la propagación del virus I-4141 o I-4142 o I-4143 (virus de la rabia recombinantes) comprenden la incubación de dicho virus a 37 °C con 5 % de CO₂ con células BHK-21 (sub-clon BSR) en un medio de crecimiento DMEM que contiene glucosa (por ejemplo, 4,5 g/l), piruvato de sodio y Glutamax (Invitrogen 31966047) y 5 % de FBS.

10 Crecimiento de neuritas de alto rendimiento y ensayos de retracción

Se siembran células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en placas de 24 pocillos (utensilios de plásticos Cell Bind, Corning, EE.UU.) a una densidad de 40,000 células por pocillo en medio no diferenciante [DMEMF12 (Invitrogen, R.U.) con 20 % de suero bovino fetal más 1 % de Pen:Strep y 1 % de glutamina], y se cultivan durante la noche a 37 °C. 24 h después de la siembra se sustituye el medio no de diferenciación por medio diferenciante [medio neurobasal (Invitrogen, R.U.) complementado con suplemento B27 (Invitrogen, R.U.) 1 % de P/S, 1 % de glutamina y db-AMPC 1 mM (dibutilil AMPc es permeable a la membrana, Sigma)], y las células se incuban durante 6 h. Entonces, las células se infectan con vector vacío, se infectan con VRABr a una MOI 3 en medio diferenciante. Después de 1 h de incubación, las células se lavan una vez con medio diferenciante, y después de añadir medio diferenciante se incuban durante 24 h a 37 °C.

20 Para la diferenciación natural, se usa el mismo procedimiento pero se omite db-AMPC.

30 h después de la diferenciación, las células se fijan con 3 % de paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 20 min a temperatura ambiente (TA), seguido de tratamiento durante 5 min con 0,1 % de Triton-X-100 y 50 % de suero de cabra normal (NGS) en PBS durante 1 h a TA. Se usan Ab anti-tubulina β III específico neuronal (Promega, Francia) y Ab anti-nucleocápside de VRAB para teñir los procesos de neuritas y para revelar la infección por VRAB respectivamente. Alternativamente, las células también se tiñen con cristal violeta que preserva los procesos de neuritas.

El ensayo de retracción es idéntico al ensayo de crecimiento como se ha mencionado anteriormente, excepto por la adición de LPA bien 10 μ M-30 μ M o 50 μ M (Sigma, EE.UU.) en medio diferenciante o bien H₂O₂ 75 μ M (Sigma, EE.UU.), en antioxidante B27 menos que contiene medio diferenciante. Se obtienen imágenes de las células usando un microscopio de UV Leica DM 5000B equipado con una cámara DC 300FX (x40 o x20 objetivos) y se analiza usando el software ImageJ 1.38X (Wayne Rasband, NIH, EE.UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y su programa adicional NeuronJ (Meijering *et al.* 2004; <http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>). La longitud de neuritas promedio por neurona se determina a partir de experimentos por triplicado.

Detección de antígenos de VRAB por citometría de flujo

Se diferenciaron células SH-SY5Y mediante tratamiento con db-AMPC y se infectaron con VRABr 6 horas después de la diferenciación. 24 horas después de la infección, las células se recogieron y se trataron para la detección por citometría de flujo de o bien la glucoproteína de VRAB que alcanzó la membrana citoplásmica o bien la cantidad total de proteína G expresada en las células infectadas. Los procedimientos seguidos se han descrito en Préhaud *et al.* 2003.

40 RESULTADOS y DISCUSIÓN

Cola citoplásmica de G-CVS-NIV (es decir, la cola citoplásmica de la proteína G de la cepa CVS-NIV) contiene una firma molecular que promueve el crecimiento de neuritas

En ausencia de infección, el tratamiento con db-AMPC desencadena la elongación de neuritas (Figura 3A, los dos paneles izquierdos). Cuando las células se tratan con db-AMPC y se infectan con G-CVS-NIV de VRABr, presentan neuritas más largas (191 %, Figura 3A, panel derecho central). Este resultado establece que G-CVS-NIV de VRABr

promueve el crecimiento de neuritas cuando la actividad del cono de crecimiento se estimula por señalización de AMPc.

5 A diferencia, la longitud de las neuritas es similar entre células no infectadas y células infectadas con G-ERA de VRABr ambas tratadas con db-AMPc (Figura 3B), que muestra que la muerte de G que expresa ERA de VRABr tiene un fenotipo silencioso para el ensayo de crecimiento de neuritas. Hay que tener entonces en cuenta que el transcurso de tiempo del experimento (es decir, 30 h después de la diferenciación y 24 horas después de la infección) es un momento de tiempo anterior al momento de tiempo donde el nivel máximo de apoptosis se detecta en células de neuroblastoma infectadas con ERA de VRABr (es decir, 48 h después de la infección).

10 Usando VRABr que llevan el intercambio final de la proteína G (véase la Figura 2) como se describe en la Figura 3C, los inventores muestran que este fenotipo es totalmente transferido por la cola citoplásmica solo. Este resultado establece firmemente que la cola citoplásmica de G-CVS-NIV contiene una firma molecular que promueve el crecimiento de neuritas cuando los procesos de elongación se inician por la vía de señalización de AMPc.

Además, se realizaron ensayos de crecimiento de neuritas con virus de la rabia recombinante, que se diferencian de la cepa CVS-NIV (G-CVS-NIV de VRABr) por uno o dos aminoácidos en sus proteínas G respectivas.

15 Más particularmente, se realizaron ensayos con CVS LE de VRABr, CVS LQ de VRABr y CVS HE de VRABr, que expresan una proteína G que se diferencia de G-CVS-NIV por el aminoácido 491 y/o el aminoácido 521 (véase la Tabla 2 anteriormente). Los resultados de estos ensayos se ilustran por la Figura 3D. En la Figura 3D, todas las diferencias con respecto al control son estadísticamente significativas ($p < 0,005$ prueba de la t de Student):

- G-CVS HQ de VRABr frente a N.I.: $p < 0,0001$;
- 20 - G-CVS LQ de VRABr frente a N.I.: $p = 0,0002$;
- G-CVS HE de VRABr frente a N.I.: $p = 0,0111$.

25 G-CVS-NIV de VRABr tiene H y Q en las posiciones 491 y 521 de su proteína G, respectivamente (posiciones calculadas con respecto a la proteína G de longitud completa de CVS-NIV, estas posiciones correspondientes a las posiciones 11 y 41 en el fragmento citoplásmico de esta proteína G, respectivamente).

CVS LQ de VRABr tiene L y Q en estas posiciones.

CVS HE de VRABr tiene H y E en estas posiciones.

CVS LE de VRABr tiene L y E en estas posiciones.

30 Como se ilustra por la Figura 3D, CVS LQ de VRABr y CVS HE de VRABr todavía muestran un efecto positivo del crecimiento de neuritas, aunque a un grado significativamente más bajo que CVS-NIV (G-CVS-NIV de VRABr) [análisis de la prueba de la t de Student: CVS HQ de VRABr frente a CVS LQ de VRABr: $p = 0,0156$; CVS HQ de VRABr frente a CVS HE de VRABr: $p = 0,0009$].

35 Por tanto, la posición 491 y la posición 521 de la proteína G de la cepa CVS (posiciones 11 y 41 en el fragmento citoplásmico) están ambas estrechamente involucradas en el efecto de crecimiento de neuritas y la posición 521 tiene un contribución predominante al mismo.

CVS LE de VRABr no indujo ningún efecto del crecimiento de neuritas significativamente positivo en comparación con el control (véase la Figura 3C, donde G-CVS-Cito muerte de VRABr = CVS LE de VRABr).

La cola citoplásmica de G-CVS-NIV es un efector intrínseco que promueve la neuritogénesis, que funciona sinérgicamente con AMPc

40 Los inventores investigaron si la expresión de la cola citoplásmica de G-CVS-NIV podría, sola y por sí misma, estimular la neuritogénesis. Se infectaron células SH-SY5Y con los diferentes VRABr (véase la Figura 2) y se monitorizó la elongación de las neuritas.

45 Como se observó en la Figura 4A, la expresión de G-CVS-NIV o G-ERA-Cito supervivencia es suficiente para promover el crecimiento de neuritas. Estos datos establecen que el dominio citoplásmico de G-CVS-NIV contiene una firma molecular intrínseca que señaló por un mecanismo desconocido los procesos de elongación de neuritas. Cuando el mismo experimento se realizó con o sin db-AMPc, se observó que tanto las neuritas mediadas por G-CVS-NIV como AMPc funcionan sinérgicamente (véase la Figura 4B).

El dominio citoplásmico basado en neuritogénesis de G-CVS-NIV es dependiente de la firma molecular y no de la cantidad de proteína G expresada

Se analizó muy cuidadosamente la cantidad de glucoproteína del virus de la rabia producida bien monitorizando la cantidad total de antígeno de VRAB producido en las células SH-SY5Y tratadas con db-AMPC infectadas, o la cantidad de proteína G completamente procesada a la membrana citoplásmica. Los dos VRAB que expresan G-CVS-NIV o G-ERA tienen una cantidad similar de proteína G expresada en total y en la membrana citoplásmica (véase la Figura 5). Así, el fenotipo de supervivencia, es decir, el crecimiento de neuritas, no está asociado a un fenómeno de cantidad de proteína disponible, sino a determinante(s) específico(s) presente(s) en la secuencia del péptido de supervivencia citoplásmico.

Además, es interesante observar que G-ERA-Cito supervivencia de VRABr expresan ligeramente menos glucoproteína, pero este virus todavía presenta un fuerte fenotipo de supervivencia (véanse las Figuras 3C, 4A). Significa que en tanto que el (los) determinante(s) de supervivencia estén presentes dentro de las células infectadas, la cantidad del péptido no es la principal advertencia y se estimula el crecimiento de neuritas.

La cola citoplásmica de G-CVS-NIV confiere neuroprotección contra el fármaco de colapso del cono de crecimiento

LPA es un lípido bioactivo que actúa de fosfolípidos similares al factor de crecimiento que se ha mostrado que ejerce diversas funciones celulares que influyen en el crecimiento, motilidad, morfología y destino celulares. En células neuronales, LPA media en el colapso del cono de crecimiento y la retracción de neuritas que implican la activación de Rho y Rho-cinasa que conduce la reorganización del citoesqueleto de actomiosina.

Se investigó la capacidad de la cola citoplásmica de la proteína G para proteger contra la retracción de neuritas inducida por LPA 10 μ M. Cuando células SH-SY5Y diferenciadas con db-AMPC se tratan con LPA, se observa la retracción de las neuritas (véase la Figura 6A, izquierda). El mismo efecto también se observa cuando las células se infectan con G-ERA de VRABr (véase la Figura 6A, derecha). Por el contrario, las neuritas largas detectadas en células tratadas con db-AMPC e infectadas con G-CVS-NIV de VRABr se preservan totalmente contra el tratamiento con un agente de colapso del cono de crecimiento (véase la Figura 6A, centro). Este resultado establece que G-CVS-NIV poseen algunas propiedades neuroprotectoras intrínsecas.

Esta protección también se reconoce tras la infección con G-ERA-Cito supervivencia de VRABr pero no con G-CVS-Cito muerte de VRABr: véase la Figura 6B. Por tanto, el uso de los mutantes de intercambio final establece firmemente que el fenotipo de neuroprotección está asociado a la expresión del dominio citoplásmico de G-CVS.

La neuroprotección de la cola citoplásmica G-CVS-NIV a LPA es robusta

El intervalo fisiológico de LPA es normalmente aproximadamente 1 μ M. Los inventores usaron una dosis alta de LPA, es decir, 10 μ M, para validar la robustez de la neuroprotección conferida por la cola citoplásmica de G-CVS-NIV.

Se probaron dosis sub-letales de LPA hasta 50 μ M con el fin de monitorizar la eficiencia de esta neuroprotección. Células SH-SY5Y fueron o bien no infectadas o bien infectadas con G-CVS-NIV de VRABr o G-ERA-Cito supervivencia de VRABr. 30 horas después de la diferenciación, las células se trataron con diferentes dosis de LPA (véase la Figura 7). Los tratamientos de células no infectadas con cantidad creciente de LPA conducen a una retracción lineal de la longitud de las neuritas (véase la Figura 7, izquierda). Por el contrario, las células que han sido infectadas con G-CVS-NIV de VRABr no presentan ningún colapso obvio de sus neuritas sea cual sea la dosis de LPA (véase la Figura 7, centro). Se observan los mismos datos para las células infectadas con G-ERA-Cito supervivencia de VRABr para una dosis de LPA hasta 30 μ M (véase la Figura 7, derecha). La ligera disminución observada para la dosis más alta de LPA (50 μ M) podría ser con respecto a la cantidad de proteína G más baja expresada por este VRABr. En este caso, y para una concentración muy alta de fármaco de colapso del cono de crecimiento, la cantidad relativa de proteína G podría llegar a ser un factor limitante. En cualquier caso, estos datos demostraron la muy alta eficiencia de la neuroprotección conferida por la cola citoplásmica de G-CVS-NIV.

La cola citoplásmica de G-CVS-NIV confiere neuroprotección contra el estrés oxidativo

Basándose en las observaciones hechas anteriormente sobre la neuroprotección conferida por el dominio citoplásmico de G-CVS-NIV en la retracción de neuritas conducida por LPA, los inventores hicieron la pregunta de si este fenotipo podría ser generalizado a otros agentes más ubicuos.

El estrés oxidativo representa una vía importante que conduce a degeneración neuronal. El estrés oxidativo participa en muchas enfermedades neurodegenerativas, pero también en caso de daño agudo al cerebro tal como traumatismo, accidente cerebrovascular y epilepsia. Por tanto, los inventores realizaron un estudio sobre los fenotipos de retracción de neuritas después del tratamiento con peróxido de hidrógeno. Cuando las células diferenciadas se someten a H₂O₂ 75 μ M, sus neuritas se acortan (véase la Figura 8, primer par de barras a la izquierda). Se hace la misma observación cuando las células han sido previamente infectadas con G-ERA de VRABr (véase la Figura 8, tercer par de barras). Por el contrario, no se observa retracción de las neuritas cuando las células

se infectan con G-CVS-NIV de VRABr (véase la Figura 8, segundo par de barras). Así, la expresión de G-CVS-NIV confiere neuroprotección contra un estrés oxidativo.

5 Usando mutantes de intercambio final, los presentes inventores también mostraron que esta propiedad neuroprotectora está asociada a la expresión de la cola citoplásmica de G-CVS-NIV como se describe en la Figura 8 (véanse cuarto y quinto pares de barras, referentes a G-CVS-Cito muerte de VRABr y G-ERA-Cito supervivencia de VRABr, respectivamente; véase la Figura 2 para la estructura de estos mutantes de intercambio final).

El PDZ-BS del extremo COOH del dominio citoplásmico de la proteína G del virus de la rabia está críticamente involucrado en el destino del fenotipo de supervivencia de las células neuronales infectadas.

10 La delección de los últimos restos de 4 aa de G-Cito supervivencia (supervivencia G-proteína-delta) fue suficiente para reducir significativamente el fenotipo de supervivencia de VRABr, como se mide por su efecto sobre el crecimiento de neuritas.

15 Véase, por ejemplo, la Figura 20, que muestra el crecimiento de neuritas medido 8 horas después de la infección, en presencia de db-AMPC, como se indujo por CVS-NIV Delta-PDZ-BS de VRABr (CVS-NIV que tiene el aminoácido H en la posición 491 y del que se ha delecionado PDZ-BS), en comparación con el control (N.I.) y con G-CVS-NIV (CVS-NIV que tiene el aminoácido H en la posición 491 y que tiene su PDZ-BS, es decir, QTRL en las posiciones 521-524): el efecto de crecimiento de neuritas inducido por CVS-NIV Delta-PDZ-BS de VRABr es significativamente diferente del inducido por el control ($p = 0,0002$ prueba de la t de Student) y es significativamente diferente del inducido por CVS-NIV de VRABr ($p = 0,0003$ prueba de la t de Student).

Los inventores en particular demuestran que:

- 20 - la proteína G de CVS-NIV (G-CVS-NIV) es capaz de promover el crecimiento de neuritas (neuritogénesis) en un sistema donde la actividad del cono de crecimiento se estimula por la vía de señalización de AMPc (administrado como un efecto externo);
- El dominio citoplásmico de G-CVS-NIV es responsable de este fenotipo;
- 25 - La expresión de la cola citoplásmica de G-CVS-NIV también es responsable de la estimulación del crecimiento de neuritas en ausencia de AMPc;
- Tanto G-CVS-NIV como AMPc funcionan como efectos sinérgicos;
- Los fenotipos están unidos a la firma molecular administrada por la cola citoplásmica de G-CVS-NIV, más particularmente por aquellos aminoácidos que están en las posiciones 491 y 521 en la proteína G-CVS-NIV de longitud completa (posiciones 11 y 41 en el fragmento citoplásmico de la misma), todavía más particularmente
- 30 por el aminoácido que está en la posición 521 en la proteína G-CVS-NIV de longitud completa (posición 41 en el fragmento citoplásmico de la misma), y que es parte de PDZ-BS;
- El fenotipo de supervivencia conferido por la cola citoplásmica de G-CVS-NIV es altamente resistente a los tratamientos por el agente de colapso del cono de crecimiento (es decir, LPA);
- 35 - El fenotipo de supervivencia conferido por la cola citoplásmica de G-CVS-NIV también es resistente al estrés oxidativo (H_2O_2).

EJEMPLO 2: El dominio citoplásmico de G-CVS-NIV confiere neuroprotección contra el efecto citopático de VHS-1

40 La encefalitis del virus del herpes simple tipo I (EVHS) es la infección del sistema nervioso central mortal esporádica más común en los países occidentales y se manifiesta durante todo el año en pacientes de todas las edades. La EVHS se desarrolla cuando el virus del herpes simple de tipo 1 infecta tejidos cerebrales de una manera lítica/necrótica.

Se investigó la capacidad de la cola citoplásmica de la proteína G para proteger contra el efecto citopático del VHS-1 en células.

MATERIAL Y MÉTODOS

45 Crecimiento de neuritas

Como se describió en el Ejemplo 1 anteriormente.

Determinación del efecto citopático del VHS-1

Se produjeron VRABr como se describió en el Ejemplo 1 anteriormente.

Se propagó VRABr en células BSR (véanse, Faul *et al.* 2008)

Se propagó la cepa KOS del VHS-1 (véanse, Skare *et al.* 1975) en células U373MG (ATCC HTB 17).

Se infectaron con vector vacío células SH-SY5Y o se infectaron con VRABr en medio diferenciante menos db-AMPC durante 6 horas. Entonces, se añadió VHS-1 a una multiplicidad de infección de 3 (MOI 3) y se determinaron los fenotipos de crecimiento de neuritas 24 horas después. Con el fin de establecer el efecto sobre el crecimiento de neuritas de la única infección por VHS-1, se diferenciaron células SH-SY5Y por db-AMPC en medio diferenciante durante 6 horas y entonces se realizó la infección por VHS-1 (MOI 3).

También se determinó el fenotipo de crecimiento de neuritas 24 horas después.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Células de neuroblastoma SH-SY5Y, que habían sido diferenciadas mediante tratamiento con db-AMPC, muestran una drástica retracción de sus neuritas (hasta el 79 %, véase la Figura 9A) después de la infección por VHS-1, que pueden con el tiempo conducir a la muerte de las células.

Al contrario, cuando las células han sido previamente infectadas con G-CVS-NIV de VRABr o G-ERA-Cito supervivencia de VRABr (véase el Ejemplo 1 anteriormente), presentan crecimiento de neuritas (véase la Figura 9B) y se protegen contra la extensa retracción de neuritas (véase la Figura 9C).

15 **EJEMPLO 3: El dominio citoplásmico de G-CVS-NIV presenta propiedades antiproliferativas para células de neuroblastoma**

El neuroblastoma es el segundo tumor sólido más común de la infancia que representa más del 13 % de la muerte por cáncer en niños en los Estados Unidos. El pronóstico depende del estadio clínico del trastorno y la edad del niño. Generalmente, la mayoría de los pacientes con neuroblastoma se tratan con enfoques terapéuticos que incluyen cirugía, radiación y quimioterapia citotóxica.

Como el neuroblastoma maligno humano se caracteriza por mala diferenciación y proliferación no controlada de neuroblastos inmaduros, se han usado fármacos pro-diferenciativos tales como el ácido all-trans-retinoico (ATRA) a alta dosis. Los inventores han demostrado que la cola citoplásmica de G-CVS-NIV de VRAB es capaz de promover el crecimiento de neuritas en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (véanse los ejemplos anteriormente), es decir, de inducir la diferenciación de estas células. Por tanto, los inventores quisieron responder la pregunta de si esta propiedad de diferenciación era lo suficientemente eficiente como para controlar la proliferación de tales células en cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo MTT

El ensayo se describe por Sargent 2003. Brevemente, células que han sido infectadas con vector vacío o infectadas con VRABr durante 48 h en medio diferenciante sin db-AMPC, se tiñen con la disolución de MTT durante 3,5 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Entonces se elimina la mezcla de medio y la disolución de tinción, se disuelven los cristales de MTT con el disolvente durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. El ensayo se lee a una DO de 550 nm. Cada condición representa un n de 8. El análisis estadístico se hizo con pruebas de ANOVA.

35 Citometría de flujo

Se evaluaron el recuento de células y los cambios morfológicos por dispersión de la luz lateral y frontal (SSC y FSC, respectivamente) como se describe en Préhaud *et al.* 2003. Cada punto representa las células reunidas durante 1 minuto a baja velocidad. Los análisis de citometría de flujo se regularon en una población viable con el fin de excluir células muertas o necróticas que representan menos del 1 % de la población de células en el momento de tiempo de 48 h.

Crecimiento de neuritas

Como se describió en el Ejemplo 1 anteriormente.

Tratamiento con ATRA

Se realizó tratamiento con ácido all-trans-retinoico (ATRA) de las células de neuroblastoma como ya se describió por Préhaud *et al.* 2005.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

En un primer caso, células SH-SY5Y fueron o bien no tratadas o bien tratadas con ATRA a 5 µM o 10 µM en el medio de cultivo. La proliferación celular se ensayó o bien por citometría de flujo para células viables o bien por recuento de células mediante un ensayo MTT. Los datos se presentan en las Figuras 10A y 10B, respectivamente.

En cada caso, el tratamiento con ATRA de las células conduce a un crecimiento más lento de los neuroblastos con una disminución en la proliferación variable en entre el 27 % hasta el 55 % dependiendo de la prueba usada para monitorizar el crecimiento celular. Así, células SH-SY5Y están respondiendo eficazmente al efecto de fármacos antiproliferativos.

- 5 Por tanto, se infectaron células SH-SY5Y bien con G-CVS-NIV de VRABr o bien con G-ERA de VRABr y se midieron la proliferación de las células (establecida por un ensayo MTT), además del crecimiento de las neuritas (véanse las Figuras 11A y 11B). Los presentes inventores encontraron que el crecimiento celular estaba inversamente correlacionado con el crecimiento de neuritas, estableciendo que la propiedad de neurosupervivencia de G-CVS-NIV está asociada por un fenotipo antiproliferativo intrínseco sobre neuroblastos.
- 10 Se infectaron células de neuroblastoma en una segunda serie de experimentos con o bien los virus parentales G-CVS-NIV de VRABr o G-ERA de VRABr, además de los mutantes de intercambio final (G-CVS-Cito muerte de VRABr o G-ERA-Cito supervivencia de VRABr; véanse el Ejemplo 1 anteriormente y la Figura 2). El crecimiento celular se midió por citometría de flujo y ensayo MTT (véanse las Figuras 12A y 12B, respectivamente). Los datos mostraron que en cada caso cuando las células se infectan con virus de la cola de G-Cito supervivencia promotoras del crecimiento de neuritas, la proliferación de los neuroblastos se afecta variando de un retardo entre el 18,3 % al
- 15 23 %. Así, G-Cito supervivencia posee una propiedad intrínseca para ralentizar el crecimiento de células de neuroblastos.

EJEMPLO 4: Demostración experimental de que las propiedades de pro-supervivencia Cito-G están conservadas en el vector de expresión

- 20 Este ejemplo demuestra que, cuando se expresa en la célula en ausencia de infección viral (polipéptidos administrados al principio como un vector de expresión), el dominio citoplásmico de VRAB de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (Cito-G) conserva las propiedades de pro-supervivencia (neuritogénesis y protección contra la retracción).

- 25 Este ejemplo investiga además si dichas propiedades de supervivencia dependen del tamaño y del anclaje en la membrana citoplásmico o endoplásmica.

- Se realizó mutagénesis usando procedimientos de mutagénesis basada en PCR de oligonucleótidos satisfactoriamente usados para generar los VRAB del Ejemplo 1 (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning, Agilent Technologies; división de producto de Stratagene; número de catálogo 210518-12; kit usado según las recomendaciones de fabricación; patentes de EE.UU. N.º 7.176.004; 7.132.265; 7.045.328; 6.734.293; 6.489.150; 6.444.428; 6.391.548; 6.183.997; 5.948.663; 5.932.419; 5.866.395; 5.789.166; 5.545.552, y patentes en tramitación).
- 30

Los oligonucleótidos se diseñaron para introducir respectivamente sitios *NheI* y *XmaI* en los extremos de las construcciones.

Los cebadores mutagénicos fueron:

- 35 GFullATG:

GGCCGCTAGCATGGTTCCTCAGGCTCTCCTGTTT (SEQ ID NO: 28)

- GCitoATG:

GGCCGCTAGCATGAGAAGAGTCAATCGATCAGAACCT (SEQ ID NO: 29)

- GendSTOP:

- 40 GGCCCCGGGTCACAGTCTGGTCTGACCCCACT (SEQ ID NO: 30)

- mutTM.Cito:

CCCCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGGGGAAGTATGTATTACTGAGT (SEQ ID NO: 31)

Los mutantes se cribaron por secuenciación de las inserciones. Usando esta metodología, se obtuvieron especialmente las tres siguientes construcciones (G-Completa; G-[SP-(2aa)-TM-Cito]; G-Cito):

- 45

G-Completa: número de acceso AF 406694 (proteína G de CVS-NIV)

MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNL
 SGFSYMELKVGYILAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDA
 CRAAYNWKMAGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDR
 SLHSRVFSPGKCPGVAVSSTYCSTNHDIYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASK
 GSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPD
 QLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVRKREECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGF
 GKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPSKGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILG
 PDGNVLIPEMQSSLLQQHMELESSVIPLVHPLADPSTVFKDGDAAEDFVEVHLPD
 VHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRRVNRSEPTQHNLRG
 TGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 2)

G-[SP-(2aa)-TM-Cito]:

G-[SP-(2aa)-TM-Cito] es una construcción que comprende (de extremo N a C):

- 5 - el péptido señal de una proteína G (por ejemplo, el péptido señal de CVS-NIV; SEQ ID NO: 21);
- 2 aminoácidos (por ejemplo, desde el ectodominio de una proteína G, tal como de G-CVS-NIV);
- el dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (por ejemplo, el dominio transmembranario de G-CVS-NIV; SEQ ID NO: 23);
- 10 - el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (por ejemplo, el dominio citoplásmico de G-CVS-NIV; SEQ ID NO: 6).

La secuencia de G-[SP-(2aa)-TM-Cito] que se usó en el presente ejemplo es:

MVPQALLFVPLLVFPLCFGGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRRVNRSEPTQHN
 LRGTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 27)

G-Cito:

- 15 G-Cito es una construcción que comprende (de extremo N a C): un aminoácido (por ejemplo, M) y el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (por ejemplo, el dominio citoplásmico de G-CVS-NIV; SEQ ID NO: 6).

La secuencia de G-Cito que se usó en el presente ejemplo es:

MRRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 24).

Las secuencias se muestran en la Figura 22.

- 20 El alineamiento de secuencias se muestra en la Figura 23.

Una representación esquemática de las tres construcciones se muestra en la Figura 24.

- 25 Se eliminaron las inserciones por digestión de *NheI* y *XmaI* y se clonaron en derivado de pCI-Neo desfosforilado con SAP (Promega, Francia) por procedimientos de clonación estándar. Se transformaron células XL1-blue de *E. coli* (Stratagene, EE.UU.) con las construcciones de plásmido. Se purificó ampliamente el ADN de plásmido en columnas Purelink (Invitrogen, R.U.) y las inserciones se secuenciaron con el fin de verificar la integridad de la secuencia insertada en el plásmido. Se usaron clones de plásmido para nucleofectar las células de neuroblastoma humano [células SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), o células Ntera cl2D1 (ATCC CRL-1973)] usando la tecnología de electroporación Amaxa GmbH (kit V Amaxa® nucleofector®, N.º de catálogo VCA 1003, Lonza, Alemania, siguiendo las recomendaciones del fabricante). La expresión de las proteínas G se ensayó por citometría de flujo como se describió en Ejemplo 1.
- 30

Para la expresión transitoria, los ensayos biológicos se realizaron 24 h después de la nucleofección.

Para la expresión estable, ambas líneas celulares nucleofectadas [SH-SY5Y o Ntera cl2D1] se trataron con G418 a 800 µg/ml durante tres semanas. Se aislaron y congelaron los clones de células resistentes a G418. La línea celular de control consiste en células, que han sido nucleofectadas con pCI-Neo solo sin ninguna inserción.

Se realizaron ensayos de crecimiento de neuritas y ensayos de retracción como se describió en el Ejemplo 1.

5 Resultados ilustrativos se muestran en las Figuras 25-28.

La Figura 25 ilustra la expresión de un polipéptido que comprende el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, más particularmente la expresión:

- de la proteína G de longitud completa de dicha cepa del virus de la rabia,
- 10 - de un polipéptido, que comprende los dominios transmembranarios y citoplásmicos de dicha proteína G, pero que no comprende el ectodominio de dicha proteína G, y
- de un polipéptido, que comprende el dominio citoplásmico de dicha proteína G, pero que no comprende el ectodominio y el dominio transmembranario de dicha proteína G, en comparación con la expresión medida con el plásmido de control.

15 Como ya se ilustró, la expresión al nivel de G es diferente y los fenotipos biológicos no están directamente correlacionados con el nivel de expresión (véase más adelante y la Figura 5).

La expresión transitoria del dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica -en ausencia de infección viral- induce y/o estimula el crecimiento de neuritas de células de neuroblastoma humano (Figura 26). Un polipéptido transitoriamente expresado que comprende el dominio transmembranario, además del dominio citoplásmico (pero que no comprende el ectodominio) de dicha proteína G, es más eficiente en inducir y/o 20 estimular el crecimiento de neuritas que la proteína G de longitud completa transitoriamente expresada o que el dominio citoplásmico transitoriamente expresado de dicha proteína G (dominio citoplásmico sin el ectodominio y sin el dominio transmembranario) (Figura 26).

La expresión estable del dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, o de polipéptidos o proteínas que comprenden dicho dominio -en ausencia de infección viral- es factible en células de neuroblastoma humano (Figura 27). Un polipéptido establemente expresado que comprende el dominio transmembranario, además del dominio citoplásmico (pero que no comprende el ectodominio) de dicha proteína G, es más eficiente en inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas que la proteína G de longitud completa establemente expresada o que el dominio citoplásmico establemente expresado de dicha proteína G (dominio citoplásmico sin el ectodominio y sin el dominio transmembranario) (Figura 27). El dominio citoplásmico 30 establemente expresado de dicha proteína G (dominio citoplásmico sin el ectodominio y sin el dominio transmembranario) es tan eficiente en inducir y/o estimular el crecimiento de neuritas como la proteína G de longitud completa establemente expresada (Figura 27).

La expresión de un polipéptido que comprende el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica -en ausencia de infección viral- confiere resistencia a un agente neurotóxico (por ejemplo, el fármaco de colapso del cono de crecimiento LPA; (véase la Figura 28, que muestra los resultados obtenidos con la construcción G-(SP-[2a]-TM-Cito)).

En las mismas condiciones experimentales, este lote de LPA está induciendo el colapso del cono de crecimiento como se ilustra en las Figuras 6A, 6B, 7.

40 El dominio transmembranario de G-(SP-[2a]-TM-Cito) en particular permite que el polipéptido expresado por esta construcción se ancle en la membrana de Golgi y/o la membrana del endoretículo de las células, aumentando así la eficiencia del polipéptido expresado en inducir y/o estimular la neurogeneración, neuroregeneración y neuroprotección.

Por lo tanto, el acoplamiento del dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica a una secuencia de anclaje de membrana tal aumenta los efectos de neurogeneración, neuroregeneración y neuroprotección inducidos y/o estimulados por dicho dominio citoplásmico.

EJEMPLO 5: Demostración experimental de que el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica posee propiedades intrínsecas para conducir el precursor neuronal (células EC) a la diferenciación a neuronas maduras (compromiso)

50 El dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, tal como Cito-G (véase el Ejemplo 4 anterior; por ejemplo, SEQ ID NO: 6 o 24), promueve el crecimiento de las neuritas por tal promoción de la diferenciación de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (véase el Ejemplo 4 anterior).

El Ejemplo 5 trae la demostración experimental de que esta propiedad revela una capacidad más amplia de dicho dominio citoplásmico para promover y para orientar el compromiso de la línea celular hacia la diferenciación neuronal.

5 Se ha descrito la producción de neuronas humanas post-mitóticas puras de la línea celular de carcinoma embrionario NTERA 2cl.-D1 (ATCC CRL-1973) en la materia, por ejemplo, en Préhaud *et al.* 2005.

Se usaron construcciones que expresan el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, como se describe en el Ejemplo 4 anteriormente, por ejemplo:

- la construcción G-Completa que contiene la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (proteína G de SEQ ID NO: 2) como inserción,
- 10 - la construcción G-Cito que contiene el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6) como inserción, y
- la construcción G-(SP)-[2aa]-TM-Cito, que contiene el péptido señal de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (péptido señal de SEQ ID NO: 21), dos aminoácidos (del extremo C del ectodominio de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, por ejemplo, GK), el dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus no apoptósica (dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23) y el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6).

Se investigó la capacidad de construcciones que expresan G para inducir la diferenciación de células NTERA 2-D1 en neuronas.

20 Se procesaron células NTERA 2-D1 que expresan G estables siguiendo el protocolo similar a neuroesfera de ATRA como se describe Préhaud *et al.* 2005.

Después del último tratamiento antimitótico y los dos duplicados, se sembraron células o bien para representar puntas de neuritas (5 días después del último duplicado) o bien la arquitectura de red neuronal (50 días después del último duplicado).

Resultados ilustrativos se muestran en las Figuras 29-31.

25 La expresión de un polipéptido que comprende el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica -en ausencia de infección viral- induce y/o estimula la producción de neuronas humanas post-mitóticas maduras por diferenciación de células de neuroblastoma: véase la Figura 29, que ilustra los resultados obtenidos con la expresión:

- de la proteína G de longitud completa de una cepa del virus de la rabia no apoptósica,
- 30 - de un polipéptido que comprende el dominio transmembranario y el dominio citoplásmico (pero que no comprende el ectodominio) de dicha proteína G,
- del dominio citoplásmico de dicha proteína G (dominio citoplásmico sin el ectodominio y sin el dominio transmembranario),

en comparación con el plásmido de control.

35 El polipéptido, que comprendía el dominio transmembranario, además del dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica (pero que no comprende el ectodominio de dicha proteína G), es más eficiente en inducir y/o estimular dicha diferenciación de neuronas humanas post-mitóticas que la proteína G de longitud completa o que el dominio citoplásmico de dicha proteína G (dominio citoplásmico sin el ectodominio y sin el dominio transmembranario); véase la Figura 30.

40 Además de inducir y/o estimular la producción de neuronas humanas post-mitóticas maduras por diferenciación de células de neuroblastoma, la expresión de un polipéptido que comprende el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica -en ausencia de infección viral- induce y/o estimula la organización de una red de neuronas humanas post-mitóticas maduras con axones largos (véase la Figura 31).

45 **EJEMPLO 6: Demostración experimental de que el dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica es capaz de promover la regeneración de neuronas lesionadas**

Neuronas lesionadas pueden tener la posibilidad de regenerarse, dependiendo de sus orígenes y del entorno local. Por ejemplo, las neuronas del sistema nervioso central del mamífero tienen capacidad regenerativa muy limitada, aún cuando la lesión a un proceso periférico produzca el aumento de la regeneración de las neuronas de los ganglios de las raíces dorsales. Está evidentemente establecido que las señales de regeneración intrínseca influyen en el éxito de la regeneración apropiada, implicando algunas de ellas la vía de cinasa específica (Hammarlund *et al.* 2009).

El dominio citoplásmico de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, tal como el dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 contenido en la construcción Cito-G (véase el Ejemplo 4 anterior), presenta al menos dos propiedades interesantes en lo que se refiere a la medicina regenerativa. Primero, promueve el crecimiento de neuritas, que significa que dicho dominio citoplásmico puede estimular el cono de crecimiento neuronal.

- 5 En segundo lugar, preserva que las neuritas se retraigan después del tratamiento con LPA o H₂O₂, que significa que dicho dominio citoplásmico puede estimular o reforzar las cerraduras moleculares que evitan el colapso del cono de crecimiento.

Con el fin de presentar la demostración experimental que estas propiedades conducen a la regeneración de una neurona lesionada, se investigó el fenómeno en un modelo celular. Se eligió la línea celular NT2-N (células neuronales humanas), que expresan establemente la construcción G-[SP-(2aa)-TM-Cito] del Ejemplo 4 (construcción que contiene SEQ ID NO: 27 como una inserción). Se usó pCI-Neo-NT2-N como control.

La línea celular NT2-N se derivó de células Ntera-2cl.D1 diferenciadas (NT2/D1; ATCC CRL-1973) como se describe en Préhaut *et al.* 2005, Cheung *et al.* 1999 y Paquet-Durand *et al.* 2003.

15 Para ensayos inducidos por arañazo, se sembraron células en utensilios de plástico de 12 pocillos Cell + recubiertos de poli-D-lisina-laminina (Sarstedt, Alemania), y se cultivaron durante dos días con el fin de recuperar completamente después de la tripsinación. El medio se cambió 10 h antes de los arañazos. Se hicieron heridas individuales con una aguja de inyección (26GX1/2", 12-4,5). Se hicieron al menos 10 arañazos en cada célula individual. Se fijaron células con PFA (4 %) 3 días después de la formación de heridas y se tiñeron con disolución de cristal violeta. Se obtuvieron imágenes de las células usando un microscopio Leica DM 5000B equipado con una cámara DC 300FX (objetivo x20) y se analizaron usando el software ImageJ 1.38X (Wayne Rasband, NIH, EE.UU., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y su programa adicional NeuronJ. El porcentaje promedio de neurona en la regeneración se determina a partir de 8 experimentos.

Resultados ilustrativos se muestran en las Figuras 32-33.

25 La expresión de un polipéptido, que comprende el dominio citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, induce y/o estimula la regeneración de neuronas humanas post-mitóticas maduras heridas (véase la Figura 32, que ilustra los resultados obtenidos con la expresión de un polipéptido que comprende los dominios transmembranarios y citoplásmicos de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica).

30 La regeneración de neuritas así inducida después de la formación de heridas es drástica, más particularmente cuando el polipéptido comprende los dominios transmembranarios y citoplásmicos de dicha proteína G, pero no comprende el ectodominio de dicha proteína G (véase la Figura 33, que ilustra los resultados obtenidos con la expresión de un polipéptido que comprende los dominios transmembranarios y citoplásmicos de la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica).

EJEMPLO 7:

35 Se generó un ADNc de VRABr infeccioso a partir de la cepa del virus de la rabia CVS-N2c (Morimoto *et al.* 1999), un patógeno fijado y VRAB no apoptósico.

El ADNc de VRABr infeccioso así generado (cN2C) se describe en Schnell *et al.* 2010.

El gen que codifican G-vir (la proteína G de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, tal como la proteína G de SEQ ID NO: 2) ha sido integrado en este ADNc de VRAB. El virus infeccioso se ha recuperado como se describió en el Ejemplo 1.

40 El virus recombinante ha sido inyectado a grupos de 8 ratones C57B16 hembra de seis semanas de edad por vía intramuscular con el número de partículas de virus de G-vir de VRABr para desencadenar encefalitis mortal en el 80 % de los ratones. El número de ratones y experimentos han sido cuidadosamente evaluados para minimizar la contribución del animal.

45 Se ha monitorizado la progresión de la enfermedad puntuando signos clínicos y la mortalidad (como se describe en Camelo *et al.* 2001). En el transcurso de la infección, grupos de dos o tres ratones han sido perfundidos, y se han extraído cerebros, congelado criogénicamente y guardado a -80 °C antes de ser procesados para la extracción de ARN (mitad del cerebro) y matrices de inmunohistoquímica o múltiples (segunda mitad del cerebro) con el fin de medir la neuroinvasividad del virus.

50 Este modelo permite analizar además diferentes parámetros de la respuesta inmunitaria innata del cerebro desencadenada por la cepa de VRABr.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blondel *et al.*, Poliovirus, pathogenesis of poliomyelitis, and apoptosis, CTMI, 2005, 289, 25-56.

- Camelo et al. 2001 "Selective role for the p55 Kd TNF- α receptor in immune unresponsiveness induced by an acute viral encephalitis"; J. Neuroimmunol. 113: 95-108.
- Cheung et al. 1999; BioTechniques 26: 946-954.
- Faul et al. 2008; Virology 382: 226-238.
- 5 Guigoni and Coulon 2002, Journal of NeuroVirology 8: 306-317.
- Hammarlund et al. 2009 "Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway" Science 323: 802-806.
- Kumar et al. 2007; Nature 448: 39-43 e Información complementaria asociada ("*Methods*").
- Lay et al. 2003; Ann. N. Y. Acad. Sci. 1010: 577-581.
- Loh et al. 2008; Cell Death and Differentiation 15: 283-298.
- 10 Meijering et al. 2004; Cytometry Part A 58A: 167-176; y
<http://www.imagescience.org/meijering/software/neuronj/>
- Morimoto et al. 1999, Journal of Virology 73(1): 510-518.
- Paquet-Durand et al. 2003 Brain Res. Dev. Brain Res. 142: 161-167.
- Préhaud et al. 1988; Journal of Virology 62(1): 1-7.
- 15 Préhaud et al. 2003; Journal of Virology 77(19): 10537-10547.
- Préhaud et al. 2005; Journal of Virology 79(20): 12893-12904.
- Sargent 2003; Recent Results in Cancer Research, vol. 161, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, páginas 13-25
- Sarmiento et al. 2005; Journal of NeuroVirology 11: 571-581.
- Schnell et al. 2010; Nature Reviews Microbiology 8(1): 51-65.
- 20 Skare et al. 1975; J. Virol. 15:726-732 (Structure and function of herpesvirus genomes. I. Comparison of five HSV-1 and two HSV-2 strains by cleavage of their DNA with *Eco R I* restriction endonuclease).
- Ugolini 1995; The Journal of Comparative Neurology 356: 457-480.
- Ugolini 2008; Dodet B, Fooks AR, Müller T, Tordo N, and the Scientific & Technical Department of the OIE (eds): Towards the Elimination of Rabies in Eurasia. Dev. Biol. Basel, Karger, vol. 131, pp. 493-506.
- 25 Documento WO 03/048198; solicitud internacional PCT en nombre del Instituto Pasteur, Inv. Lafon *et al.*, publicado el 12 de junio de 2003; además de sus solicitudes homólogas nacionales / regionales.
- Cada una de las divulgaciones relevantes de todas las referencias citadas en el presente documento se incorpora específicamente por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido, cuya secuencia consiste en menos de 100 aminoácidos, que comprende:

- la secuencia de SEQ ID NO: 6,

o

5 - una secuencia, que:

- es de 34 a 54 aminoácidos,

- es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 a lo largo de la longitud entera de la más corta de las dos secuencias,

- comprende una secuencia de PDZ-BS, en la que dicha secuencia de PDZ-BS es $x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que:

10 x_1 es cualquier aminoácido excepto E (preferentemente Q), y

x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

x_4 es L o V (preferentemente L)

(SEQ ID NO: 14),

15 siendo dicha secuencia denominada secuencia de variante A,

o

- una secuencia, que:

- es de 44 aminoácidos,

- es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 6,

20 - comprende una secuencia de PDZ-BS, en la que dicha secuencia de PDZ-BS es $x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que:

x_1 es E, y

x_2 es T o S o I (preferentemente no I, más preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

x_4 es L o V (preferentemente L)

25 (SEQ ID NO: 13 con $x_1 = E$),

y

- no comprende el aminoácido L en la posición 11,

siendo dicha secuencia denominada secuencia de variante B,

o

30 - un fragmento de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, en el que dicho fragmento es de al menos 34 aminoácidos y ha retenido la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B, respectivamente,

35 siendo dicho polipéptido para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, en el que dicho polipéptido se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.

2. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1, en el que la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de variante A es QTRL (SEQ ID NO: 10).

40 3. El polipéptido para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia de variante A es de 44 aminoácidos y tiene el aminoácido H o L, preferentemente H, en la posición 11.

4. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la secuencia de PDZ-BS de dicha secuencia de variante B es ETRL (SEQ ID NO: 12).
5. El polipéptido para su uso según la reivindicación 4, en el que dicha secuencia de variante B tiene el aminoácido H en la posición 11.
- 5 6. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho fragmento es el fragmento 11-44 de la secuencia de SEQ ID NO: 6.
7. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho polipéptido es o comprende el fragmento citoplásmico de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, o un sub-fragmento de un fragmento citoplásmico tal.
- 10 8. El polipéptido para su uso según la reivindicación 7, en el que dicha cepa del virus de la rabia es la cepa depositada en la CNCM con 1-4140,1-4142 o I-4143.
9. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho polipéptido comprende además una secuencia de aminoácidos, que ancha dicho polipéptido en la membrana del endoreticulo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas, estando dicha secuencia de anclaje preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o secuencia de variante A o secuencia de variante B, lo más preferentemente directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B.
- 15 10. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho polipéptido comprende además, preferentemente en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o secuencia de variante A o secuencia de variante B, lo más preferentemente directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o de dicha secuencia de variante A o de dicha secuencia de variante B:
- la secuencia del dominio transmembranario de la proteína G de una cepa del virus de la rabia, más particularmente de una cepa del virus de la rabia no apoptósica, o
 - una secuencia, que se diferencia de dicha secuencia de dominio transmembranario G del virus de la rabia por al menos una sustitución y/o delección y/o adición de aminoácidos, preferentemente por sustitución (sustituciones) y/o delección (delecciones) de aminoácidos, más preferentemente por sustitución (sustituciones) de aminoácidos, pero que ha retenido la capacidad de anclar el polipéptido de SEQ ID NO: 6 (cuando dicha secuencia de anclaje está directamente unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de SEQ ID NO: 6), en la membrana del endoreticulo y/o en la membrana de Golgi de células, más particularmente de células neuronales, más particularmente de células neuronales humanas.
- 20 11. El polipéptido para su uso según la reivindicación 9 o 10, en la que dicha secuencia de anclaje es:
- la secuencia de SEQ ID NO: 23, o
 - una secuencia de variante de la misma, que es de 18 a 26 aminoácidos, preferentemente de 18 a 22 aminoácidos, más preferentemente de 22 aminoácidos, y que es al menos el 94 % idéntica a dicha secuencia de SEQ ID NO: 23 a lo largo de la más corta de las dos secuencias (es decir, a lo largo de la más corta de SEQ ID NO: 23 y de dicha secuencia de variante).
- 25 12. El polipéptido para su uso según una cualquiera reivindicaciones 9-11, en el que dicho polipéptido comprende dicha secuencia de SEQ ID NO: 6 o dicha secuencia de variante A, más particularmente dicha secuencia de SEQ ID NO: 6.
- 30 13. El polipéptido para su uso según la reivindicación 12, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 23 seguido de (de extremo N a extremo C) la secuencia de SEQ ID NO: 6, en el que uno a cuatro aminoácidos, preferentemente un aminoácido (por ejemplo, M) está/n opcionalmente presente/s entre dicha secuencia de SEQ ID NO: 23 y dicha secuencia de SEQ ID NO: 6.
- 35 14. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que dicho polipéptido es o comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25.
- 40 15. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido comprende además (directamente o indirectamente, preferentemente directamente) unida al primer aminoácido en el extremo N de dicha secuencia de anclaje:
- uno a cuatro aminoácidos, preferentemente dos aminoácidos, más preferentemente uno a cuatro aminoácidos del extremo C del ectodominio de la proteína G de un virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), todavía más preferentemente los dos últimos aminoácidos del extremo C del ectodominio
- 50

de la proteína G de un virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), por ejemplo aminoácidos GK.

16. El polipéptido para su uso según la reivindicación 15, en el que dicho polipéptido es o comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26.
- 5 17. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-16, en el que dicho polipéptido comprende además un péptido señal, preferentemente el péptido señal de la proteína G de una cepa del virus de la rabia (por ejemplo, una cepa del virus de la rabia no apoptósica), estando dicha secuencia de péptidos preferentemente en el extremo N de dicho polipéptido (lo más preferentemente en el mismo extremo N de dicho polipéptido, es decir, en el extremo N de cualquier secuencia de anclaje que puede estar comprendida en dicho polipéptido).
- 10 18. El polipéptido para su uso según la reivindicación 17, en el que dicho polipéptido es o comprende la secuencia de SEQ ID NO: 27.
- 15 19. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que dicho ácido nucleico es para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, y en el que dicho ácido nucleico se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.
- 20 20. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que dicho vector es para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, y en el que dicho vector se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.
- 25 21. Una célula, que comprende el polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y/o un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido y/o un vector que comprende dicho ácido nucleico, en la que dicha célula es para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, y en la que dicha célula se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.
- 30 22. Una composición farmacéutica o fármaco, que comprendía al menos uno del polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, el ácido nucleico como se define en la reivindicación 19, el vector como se define en la reivindicación 20, la célula como se define en la reivindicación 21, en la que dicha composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento y/o la paliación y/o prevención de una enfermedad o trastorno que afecta el sistema nervioso por estimulación y/o inducción del crecimiento de neuritas y/o brote de neuritas y/o crecimiento de axones y/o extensión de árboles dendríticos de neuronas de dicho sistema nervioso, y en la que dicha composición farmacéutica se usa como un principio activo para dicha estimulación y/o inducción.
- 35 23. El polipéptido de una cualquiera para su uso según las reivindicaciones 1-18, el ácido nucleico de la reivindicación 19, el vector de la reivindicación 20, la célula de la reivindicación 21, o la composición farmacéutica de la reivindicación 22, que se usa para estimular y/o inducir la sinaptogénesis y/o neurotransmisión y/o plasticidad neuronal.
- 40 24. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y 23, el ácido nucleico para su uso según la reivindicación 19 o 23, el vector para su uso según la reivindicación 20 o 23, la célula para su uso según la reivindicación 21 o 23, o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 22 o 23, que se usa como un agente neurogenerativo y/o neuroregenerativo y/o neuroprotector.
- 45 25. El polipéptido de una cualquiera para su uso según las reivindicaciones 1-18, 23 y 24, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23 y 24, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23 y 24, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23 y 24, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22, 23 y 24, en el que dicho uso es en un uso no inmunogénico y/o dicho producto no es un agente inmunogénico o adyuvante.
- 50 26. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y 23-25, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 23-25, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 y 23-25, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 23-25, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dichas neuronas son neuronas que están alteradas por neurodegeneración.
- 55 27. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y 23-26, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 23-26, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 y 23-26, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 23-26, o la

composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-26, en el que dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad neurodegenerativa o trastorno, tal como encefalopatía no viral, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA, enfermedad de Huntington, una enfermedad neurodegenerativa relacionada con la edad o trastorno, EM o enfermedad genética rara.

- 5 28. El polipéptido para su uso según 26 o 27, el ácido nucleico para su uso según la reivindicación 26 o 27, el vector para su uso según la reivindicación 26 o 27, la célula para su uso según la reivindicación 26 o 27, o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 26 o 27, en el que dicha enfermedad o trastorno es EM.
- 10 29. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y 23-25, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 23-25, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 y 23-25, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 23-25, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dichas neuronas son neuronas que están alteradas por una infección microbiana del sistema nervioso y/o por una lesión física o isquémica del sistema nervioso y/o por un agente neurotóxico químico y/o por un estrés oxidativo.
- 15 30. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, 23-25 y 29, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23-25 y 29, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23-25 y 29, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23-25 y 29, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 y 29, en el que dicha enfermedad o trastorno implica una infección microbiana del sistema nervioso, tal como poliomielitis.
- 20 31. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, 23-25 y 29, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23-25 y 29, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23-25 y 29, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23-25 y 29, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 y 29, en el que dicha enfermedad o trastorno es una lesión del sistema nervioso física o isquémica, tal como convulsión, accidente cerebrovascular, traumatismo, epilepsia.
- 25 32. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, 23-25 y 29, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23-25 y 29, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23-25 y 29, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23-25 y 29, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 y 29, en el que dicha enfermedad o trastorno implica la presencia de un agente neurotóxico químico y/o de un estrés oxidativo.
- 30 33. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18 y 23-25, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 23-25, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 y 23-25, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 y 23-25, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, en el que dichas neuronas son neuronas pre-mitóticas o progenitores de neuronas.
- 35 34. El polipéptido de una cualquiera para su uso según las reivindicaciones 1-18, 23-25 y 33, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23-25 y 33, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23-25 y 33, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23-25 y 33, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25 y 33, que se usa como agente neuro-diferenciador.
- 40 35. El polipéptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, 23-25, 33 y 34, el ácido nucleico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19, 23-25, 33 y 34, el vector para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20, 23-25, 33 y 34, la célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21, 23-25, 33 y 34, o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22-25, 33 y 34, en el que dicha enfermedad es un tumor del SNC y/o SNP, tal como un ganglioglioma, un tumor cerebral, un neurocitoma central, un meduloblastoma, un ependimoma, un teratoma, un neuroblastoma.
- 45

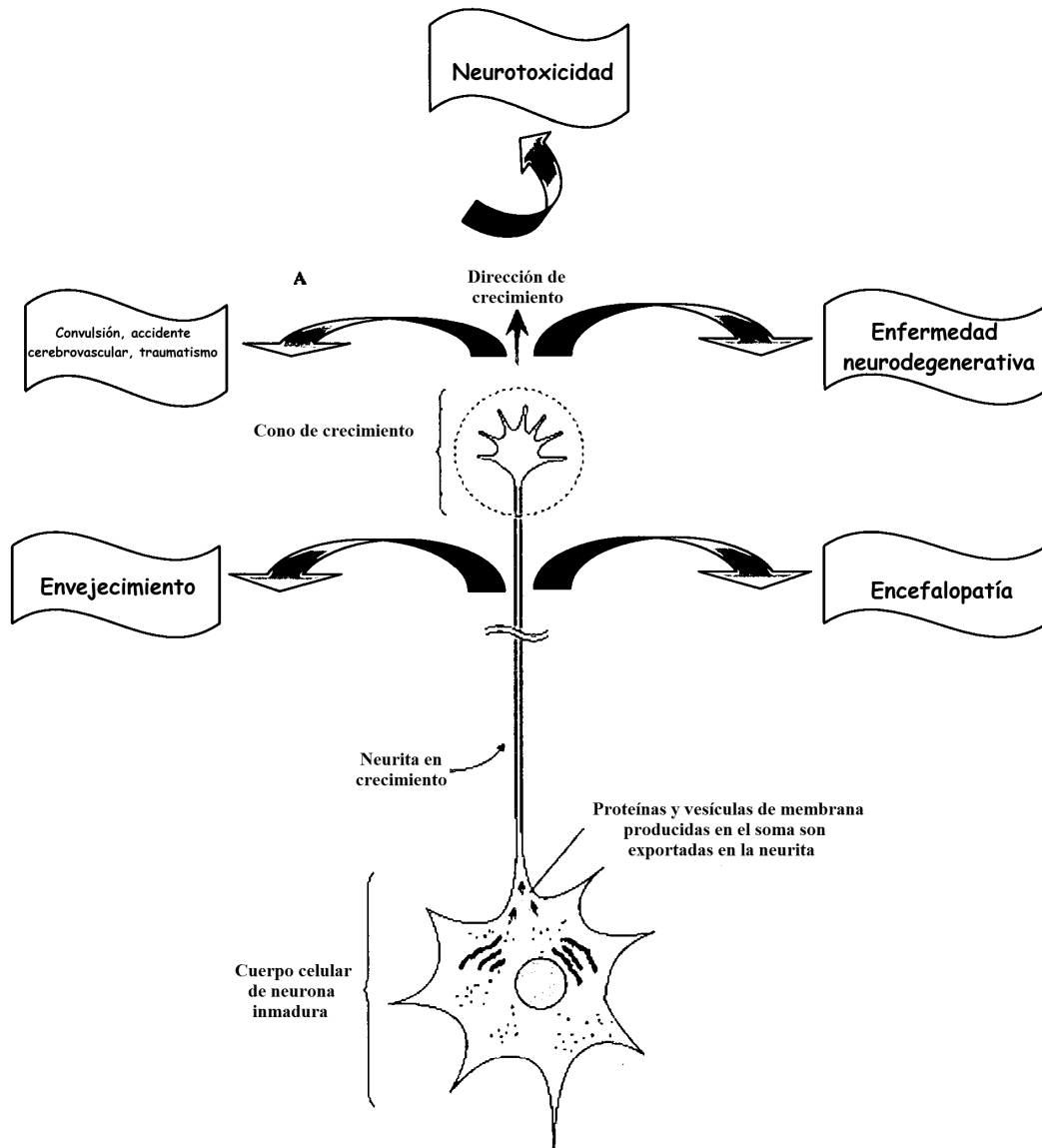


FIGURA 1

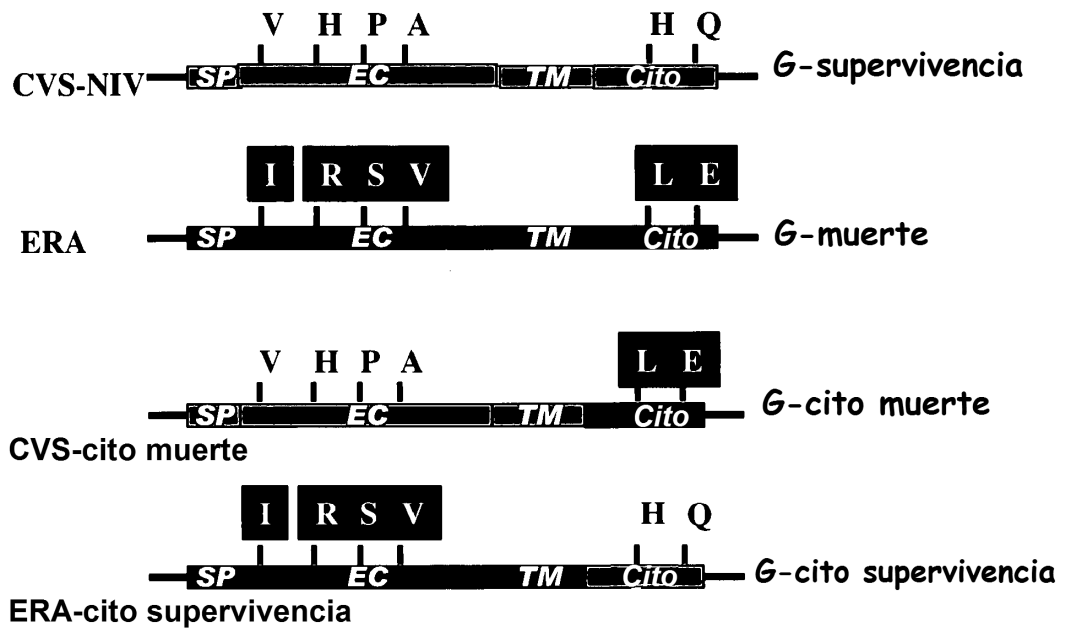


FIGURA 2

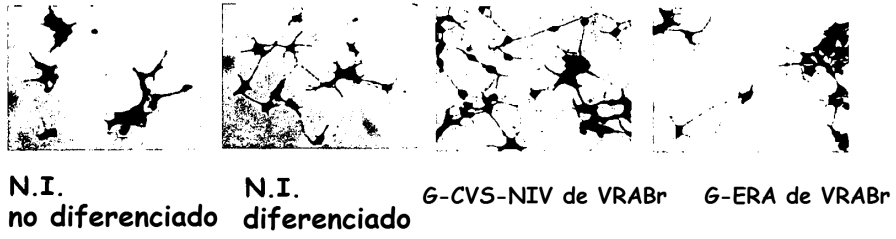


FIGURA 3A

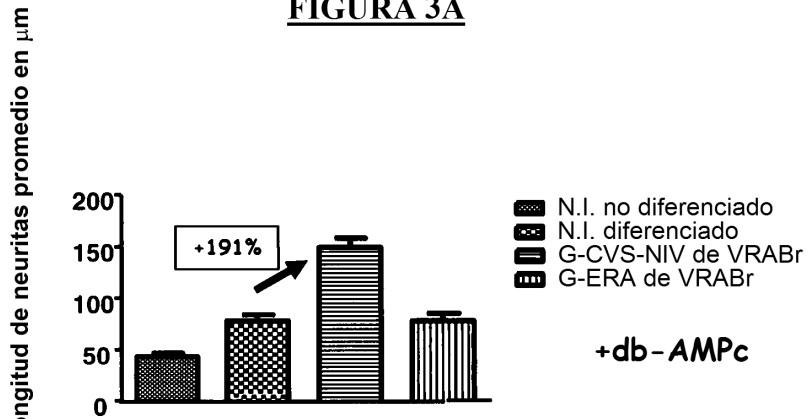


FIGURA 3B

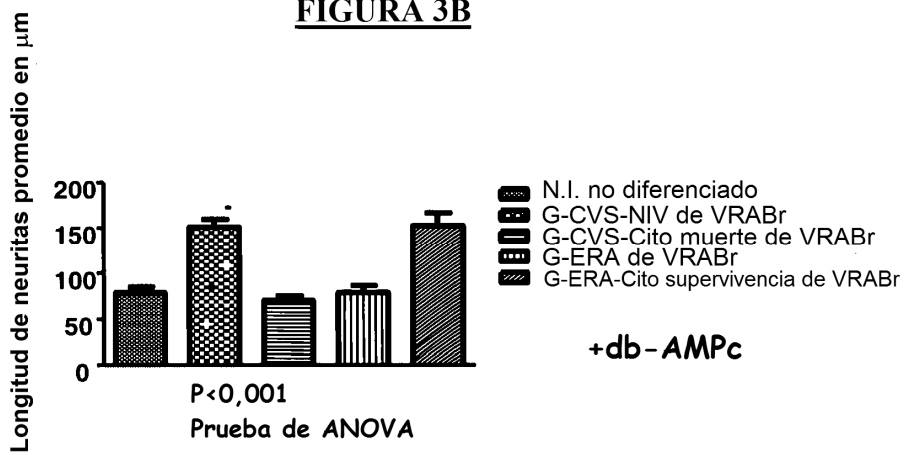


FIGURA 3C

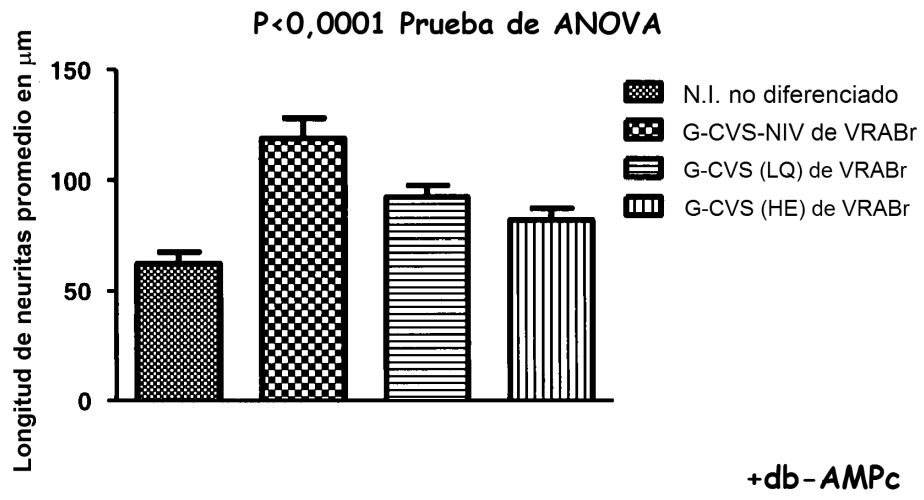


FIGURA 3D

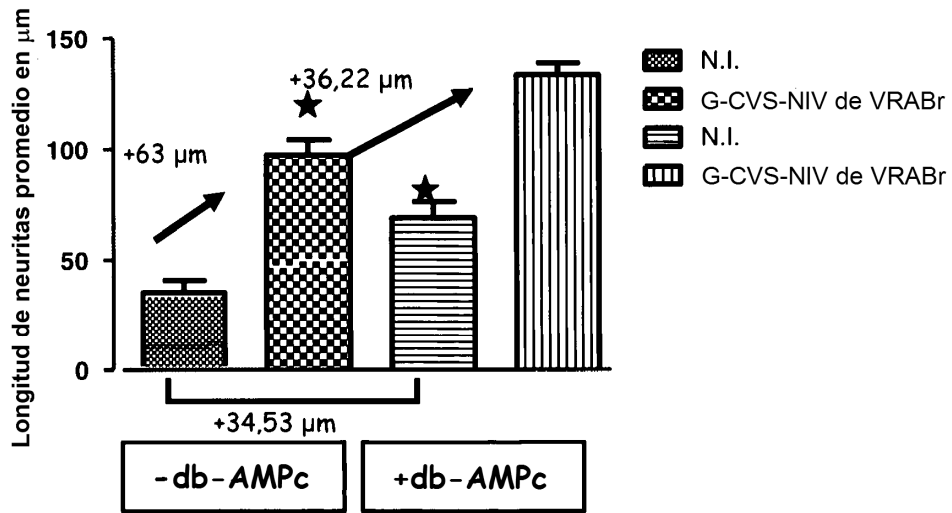
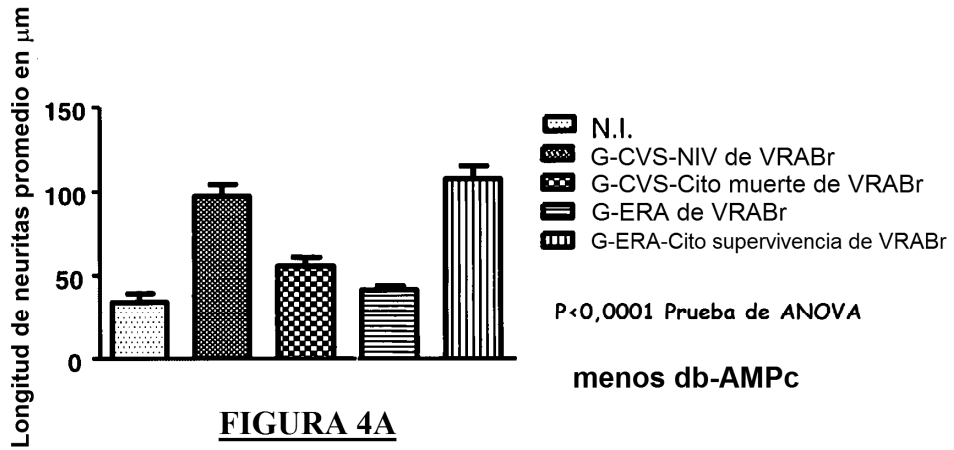
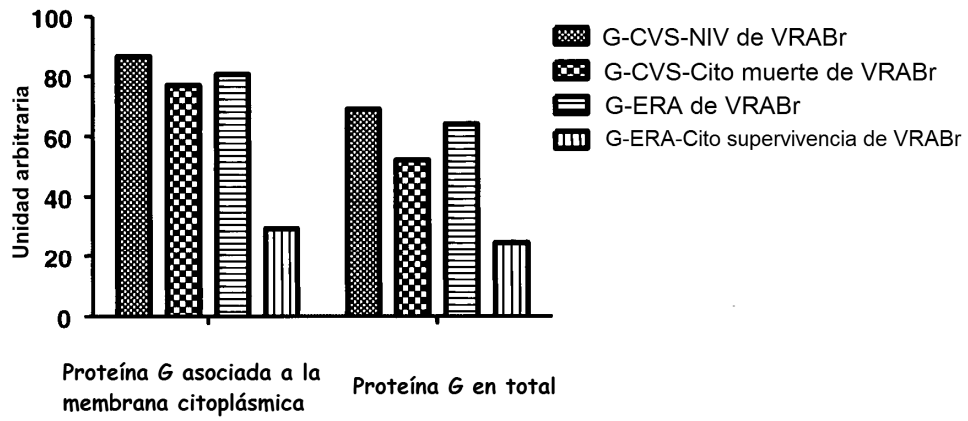


FIGURA 4B



+db-AMPC

FIGURA 5

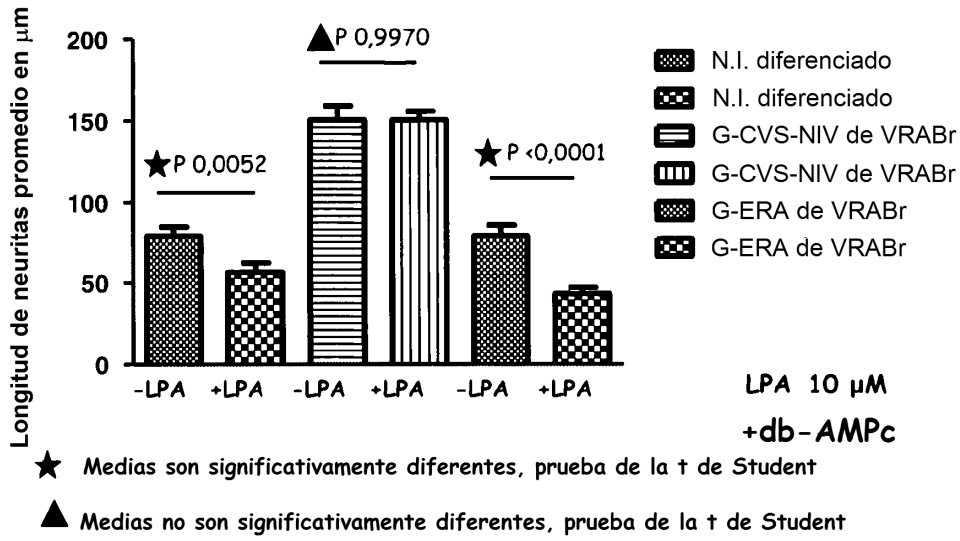


FIGURA 6A

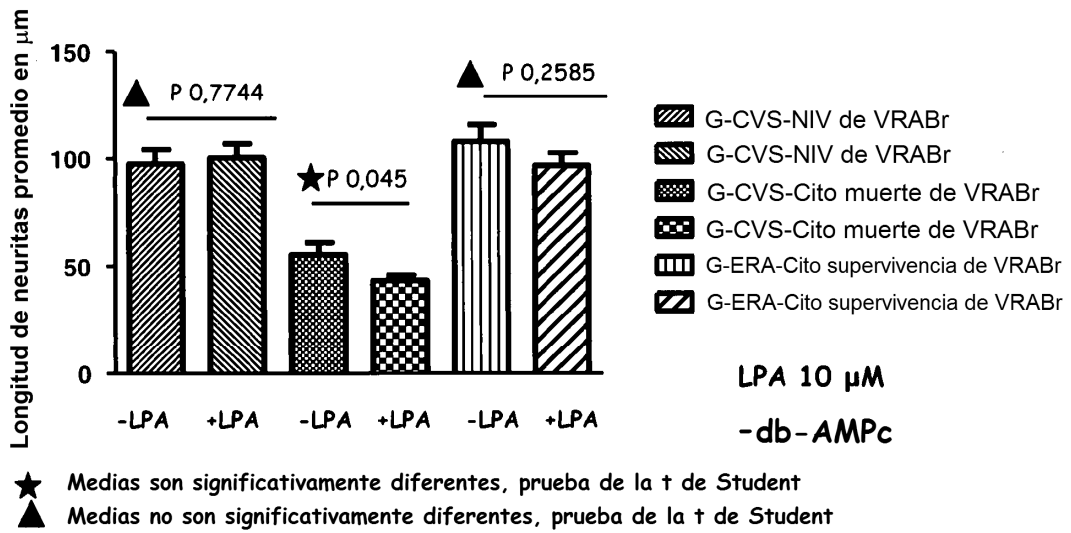
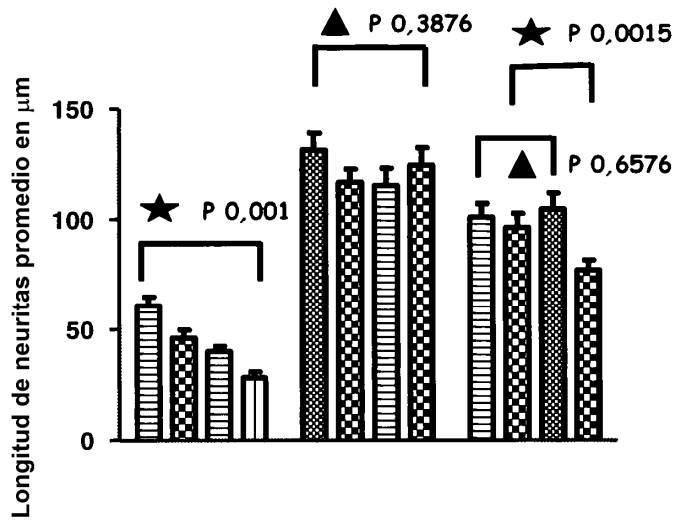


FIGURA 6B

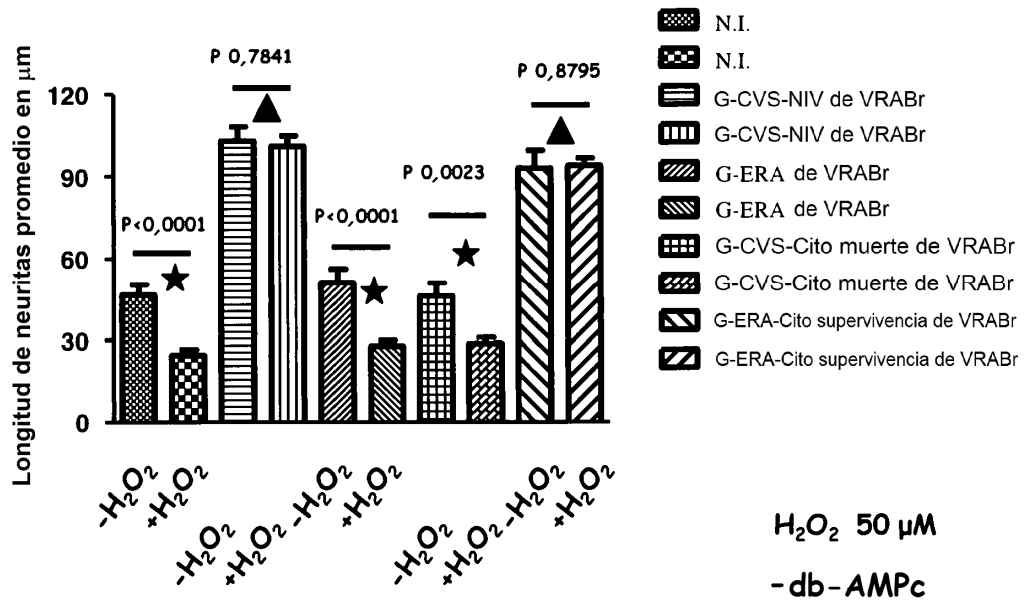


- ▨ N.I. -LPA
- ▩ N.I. +LPA 10 μM
- ▧ N.I. +LPA 30 μM
- ▦ N.I. +LPA 50 μM
- ▤ G-CVS-NIV de VRABr -LPA
- ▣ G-CVS-NIV de VRABr +LPA 10 μM
- ▢ G-CVS-NIV de VRABr +LPA 30 μM
- G-CVS-NIV de VRABr +LPA 50 μM
- G-ERA-Cito supervivencia de VRABr -LPA
- ▞ G-ERA-Cito supervivencia de VRABr +LPA10 μM
- ▟ G-ERA-Cito supervivencia de VRABr +LPA30 μM
- G-ERA-Cito supervivencia de VRABr +LPA50 μM

★ Medias son significativamente diferentes, prueba de ANOVA -db-AMPc

▲ Medias no son significativamente diferentes, prueba de ANOVA

FIGURA 7



- ▲ Medias son significativamente diferentes, prueba de la t de Student
- ★ Medias no son significativamente diferentes, prueba de la t de Student

FIGURA 8

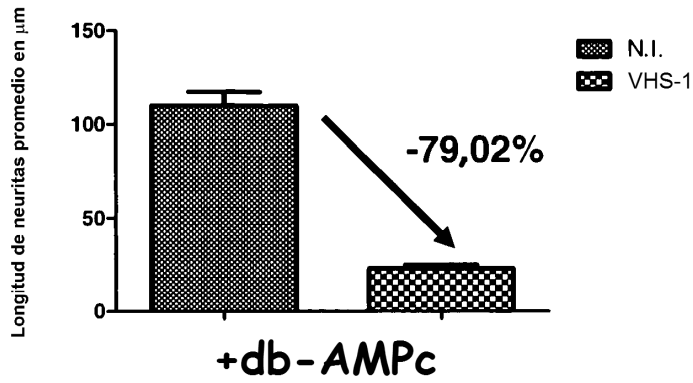


FIGURA 9A

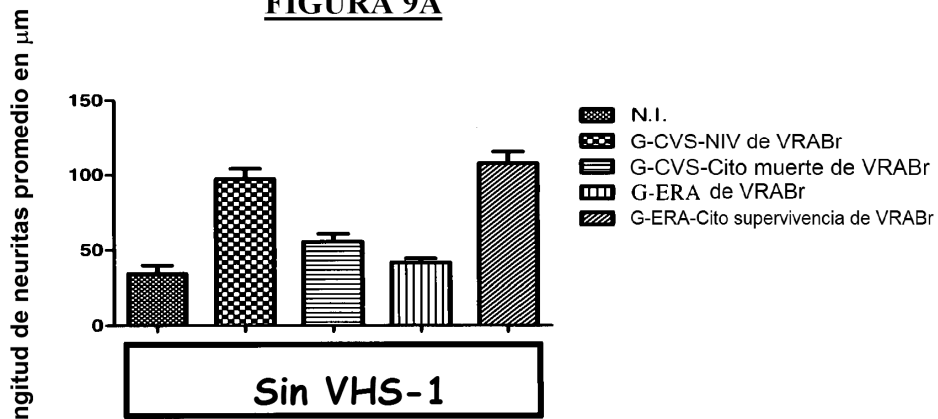


FIGURA 9B

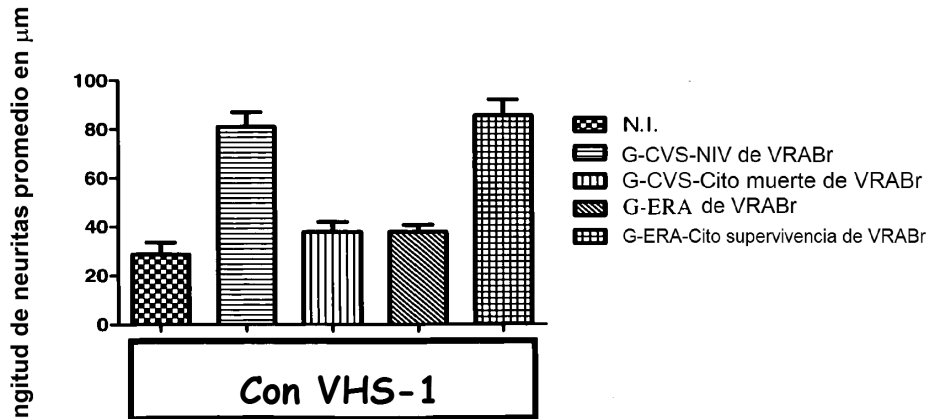


FIGURA 9C

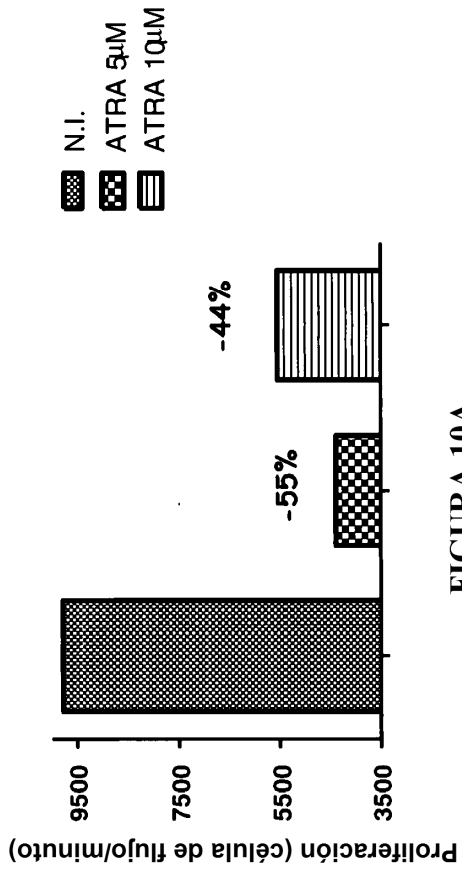


FIGURA 10A

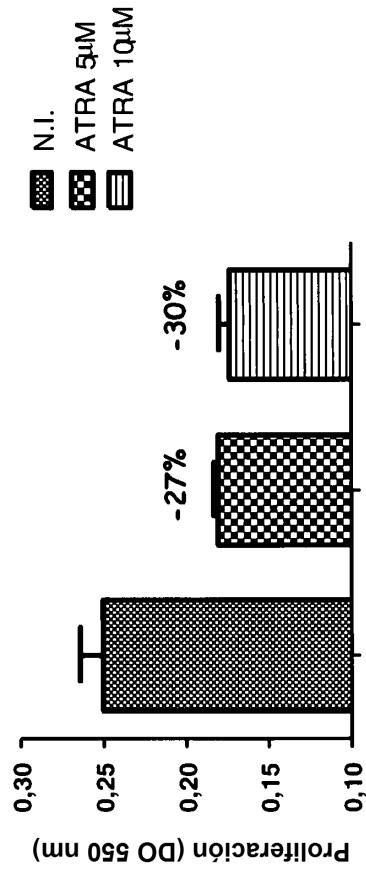


FIGURA 10B

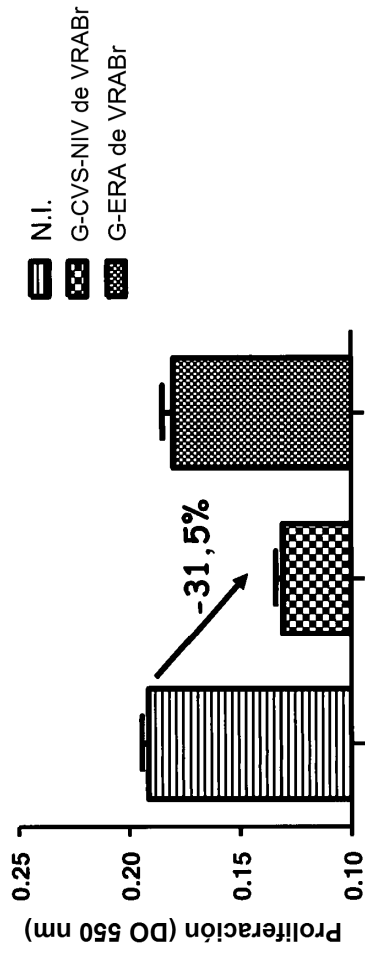


FIGURA 11A

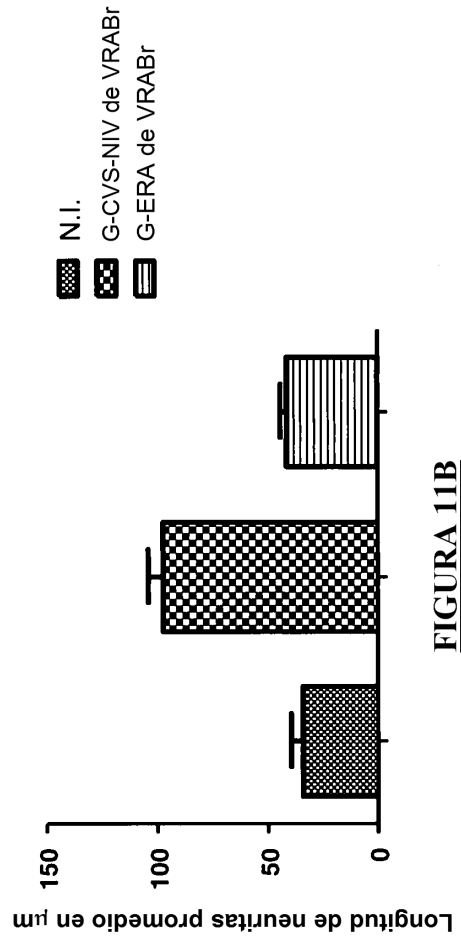


FIGURA 11B

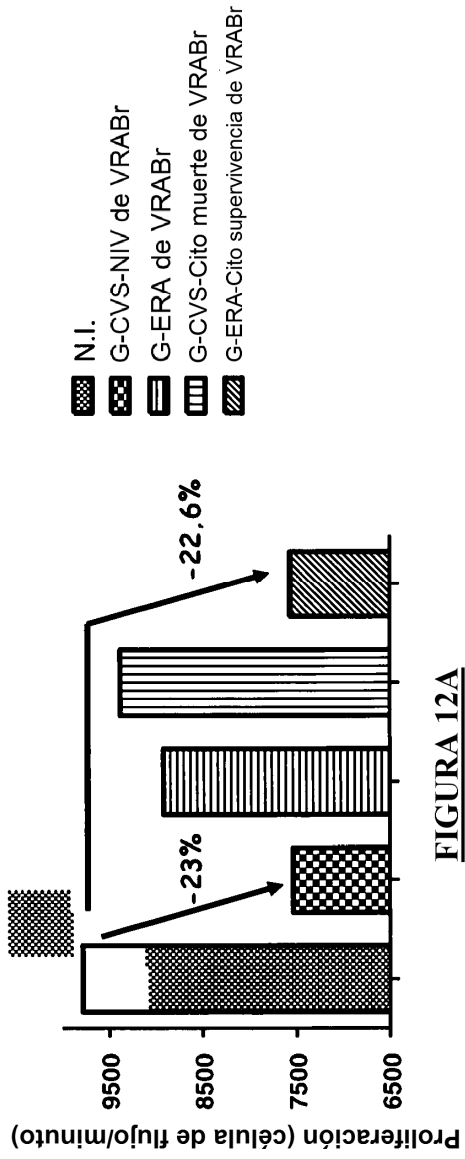


FIGURA 12A

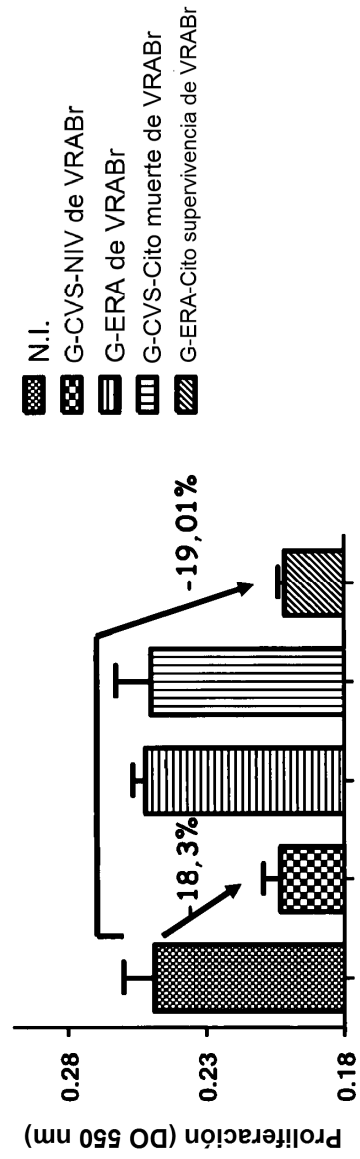


FIGURA 12B

ES 2 640 475 T3

Secuencias de nucleótidos que codifica la **proteína G de la cepa CVS-NIV** del virus de la rabia (número de acceso de secuencia AF 406694, que incluye el codón de iniciación ATG y el codón de parada TGA):

```
1 atgggtcctc aggctctcct gttgtacc cttctggtt ttccattgtg ttttgggaaa
61 ttccctattt acacgatacc agacaagctt ggtccctgga gcccgattga catacatcac
121 ctccagctgcc caaacaattt ggtagtggag gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc
181 tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc ttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc
241 acaggcgttg tgacggaggc tgaacctac actaactcgc ttggttatgt cacaaccacg
301 ttcaaaagaa agcatctccg cccaacacca gatgcatgta gagccgcgta caactggaag
361 atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccactgg
421 ctccgaactg taaaaaccac caaggagtct ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat
481 ttggacccat atgacagatc ccttcactcg agggctctcc ctagcgggaa gtgccaggga
541 gtacgggtgt cttctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatttg gatgcccgag
601 aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaaccaata gttagagggaa gagagcatcc
661 aaagggagtg agacttgccg cttttagatg gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga
721 gcatgcaaac tcaagttagt tggagttcta ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc
781 gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg tgcctccc atcagttggt gaacctgcac
841 gactttcgct cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttggtcag gaagagagag
901 gagtgtctgg atgcactaga gtccatcatg acaaccaagt cagttagttt cagacgtctc
961 agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc
1021 ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctccctca
1081 aaaggggtgt taagagttag ggggaggtgt catcctcatg tgaacggggt gttttcaat
1141 ggtataatat taggacctga cggcaatgtc ttaatcccag agatgcaatc atcctcctc
1201 cagcaacata tggagtgttt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcacc cctggcagac
1261 ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttggtgaagt tcaccttccc
1321 gatgtgcaca atcaggtctc aggagttgac ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta
1381 ttactgagtg caggggccct gactgccttg atgttgataa ttttctgat gacatgttgt
1441 agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggaggtg
1501 tcagtcactc cccaaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt
1561 cagaccagac tgtga                               SEQ ID NO: 1
```

Secuencia de la proteína G de la cepa CVS-NIV del virus de la rabia (cepa virulenta);
524 aa (número de acceso de secuencia AF 406694):

```
MVPQALLFVPLLVPLFCGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYMEKLVGYILA IKMNGFTCT
GVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMGDPRYEESLHNPYPDYHWRVTKTKESLVIISPSVADLD
PYDRSLHSRVFSPGKCPGVAVSSTYCSNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFNTRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACK
LKLCGVGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPDQVLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVVRKRECLDALESIMTTKSVSPRRLSHLR
KLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPSKGLRVGGRCRHPVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHME
LLESSVILVHPLADPSTVFKDGDEAEDFVEVHLDPVHNQVSGVDLGLPNWVKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRRVNR
EPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL                               SEQ ID NO: 2
```

FIGURE 13A

ES 2 640 475 T3

Secuencia de nucleótidos que codifica la **proteína G de la cepa ERA** del virus de la rabia (número de acceso de secuencia AF 406693, que incluye el codón de iniciación ATG y el codón de parada TGA):

```
1 atgggtctctc aggetctcct gttgtacc cttctggttt ttccattgtg tttgggaaa
61 ttccctattt acacgatacc agacaagctt ggtccctgga gcccgattga catacatcac
121 ctgagctgcc caaacaattt gatagtgagg gacgaaggat gcaccaacct gtcagggttc
181 tcctacatgg aacttaaagt tggatacatc tttagccataa aaatgaacgg gttcacttgc
241 acaggcgttg tgacggaggc tgaaacctac actaacttcg ttggttatgt cacaaccacg
301 ttcaaaagaa agcatttccg cccaacacca gatgcatgta gagcccgta caactggaag
361 atggccggtg accccagata tgaagagtct ctacacaatc cgtaccctga ctaccgctgg
421 cttcgaactg taaaaaccac caaggagtct ctcgttatca tatctccaag tgtggcagat
481 ttggaccat atgacagatc cttcactcg agggctctcc ctagecggaa gtgctcagga
541 gtagcgggtg cttctaccta ctgctccact aaccacgatt acaccatttg gatccccgag
601 aatccgagac tagggatgtc ttgtgacatt tttaaccaata gtagagggaa gagagtatcc
661 aaagggagtg agacttgcgg cttttagat gaaagaggcc tatataagtc tttaaaagga
721 gcatgcaaac tcaagtatg tggagtctt ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc
781 gcgatgcaaa catcaaatga aaccaaatgg tgcctccc atcagttggt gaacctgcac
841 gactttcgtc cagacgaaat tgagcacctt gttgtagagg agttggtcag gaagagagag
901 gagtgtctgg atgactaga gtccatcatg acaaccaagt cagtgagttt cagacgtctc
961 agtcatttaa gaaaacttgt ccctgggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaagacc
1021 ttgatggaag ccgatgctca ctacaagtca gtcagaactt ggaatgagat cctccctca
1081 aaaggggtgt taagagtgg ggggaggtgt catcctcatg tgaacggggt gttttcaat
1141 ggtataatat taggacctga cggcaatgct ttaatcccag agatgcaatc atcctcctc
1201 cagcaacata tggagtgtt ggaatcctcg gttatcccc ttgtgcacc cctggcagac
1261 ccgtctaccg ttttcaagga cggtgacgag gctgaggatt ttgttgaagt tcacctccc
1321 gatgtgcaca atcaggtctc aggagttagc ttgggtctcc cgaactgggg gaagtatgta
1381 ttactgagtg caggggccct gactgccttg atgttgataa ttttctgat gacatgttgt
1441 agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa ctcaatctca gagggacagg gagggaggtg
1501 tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt
1561 gagaccagac tgtga
```

SEQ ID NO: 3

Secuencia de la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia (cepa atenuada); 524 aa (número de acceso de secuencia AF 406693):

```
MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLIVEDEGCTNLSGFSYMELKVGYILAIKMNFGTCT
GVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMGDPRYEESLHNPYPDYRWLRTVKTTKESLVIISPSVADLD
PYDRSLHSRVFPSGKCSGVAVSSTYCSNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFNTRGKRVSKGSETCGFVDERGLYKSLKGACK
LKLGVGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQVLNLDHFRSDEIEHLVVEELVVRKRECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLR
KLVPGFGKAYTIFNKTLMHEADAHYKSVRTWNEILPSKGLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHME
LLESSVILPVHPLADPSTVFKDGEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWKGKYLVSAGALTALMLIIFLMTCCRRVNR
EPTQLNLRGTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGETRL
```

SEQ ID NO: 4

FIGURA 13B

G-CVS-NIV 1 MVPQALLFVPLLVFPLFCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF
 G-ERA 1 MVPQALLFVPLLVFPLFCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF

 G-CVS-NIV 61 SYMELKVGYIILAIKMNNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVVTTTFRKHKHFRPTPDACRAAYNWK
 G-ERA 61 SYMELKVGYIILAIKMNNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVVTTTFRKHKHFRPTPDACRAAYNWK

 G-CVS-NIV 121 MAGDPRYEESLHNPYDYPHWRVTKTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGKCPG
 G-ERA 121 MAGDPRYEESLHNPYDYPHWRVTKTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGKCSG
 ***** *
 G-CVS-NIV 181 VAVSSTYCSTNHDYTIWMPENRPLGMSCDIFFTNSRGKRAKSGSETCGFVDERGLYKSLKG
 G-ERA 181 VAVSSTYCSTNHDYTIWMPENRPLGMSCDIFFTNSRGKRVKSGSETCGFVDERGLYKSLKG

 G-CVS-NIV 241 ACKLKCGLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVRKRE
 G-ERA 241 ACKLKCGLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVRKRE

 G-CVS-NIV 301 ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPS
 G-ERA 301 ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPS

 G-CVS-NIV 361 KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSLLQQHMELESSEVPLVHPLAD
 G-ERA 361 KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSLLQQHMELESSEVPLVHPLAD

 G-CVS-NIV 421 PSTVFKDGEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC
 G-ERA 421 PSTVFKDGEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC

 G-CVS-NIV 481 RRVNRSEPTQNLNLRGTGREVSPTQSGKIISWESHKSGGTFL SEQ ID NO: 2
 G-ERA 481 RRVNRSEPTQNLNLRGTGREVSPTQSGKIISWESHKSGGTFL SEQ ID NO: 4

FIGURA 14

ES 2 640 475 T3

Secuencia de nucleótidos que codifica el **dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV** del virus de la rabia (fragmento 1441-1572 de la secuencia codificante de G de longitud completa):

```
agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa cacaatctca gagggacagg gagggagggtg  
tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt  
cagaccagac tg SEQ ID NO: 5
```

Secuencia del dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV del virus de la rabia (últimos 44 aa del extremo C de la proteína G, es decir, fragmento 481-524 de la proteína G de longitud completa):

```
RRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESHKSGGQTRL SEQ ID NO: 6
```

Secuencia de nucleótidos que codifica el **dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa ERA** del virus de la rabia (fragmento 1441-1572 de la secuencia codificante de G de longitud completa):

```
agaagagtca atcgatcaga acctacgcaa ctcaatctca gagggacagg gagggagggtg  
tcagtcactc cccaaagcgg gaagatcata tcttcatggg aatcacacaa gagtgggggt  
gagaccagac tg SEQ ID NO: 7
```

Secuencia del dominio citoplásmico de la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia (los últimos 44 aa del extremo C de la proteína G, es decir, fragmento 481-524 de la proteína G de longitud completa):

```
RRVNRSEPTQLNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESHKSGGETRL SEQ ID NO: 8
```

FIGURA 15

ES 2 640 475 T3

Secuencia de nucleótidos que codifica el **motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV** del virus de la rabia (fragmento 1561-1572 de la secuencia codificante de G de longitud completa):

cagaccagac tg

SEQ ID NO: 9

Motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa CVS-NIV del virus de la rabia (últimos 4 aa del extremo C de la proteína G, es decir, fragmento 521-524 de la proteína G de longitud completa):

QTRL

SEQ ID NO: 10

Secuencia de nucleótidos que codifica el **motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa ERA** del virus de la rabia (fragmento 1561-1572 de la secuencia codificante de G de longitud completa):

gagaccagac tg

SEQ ID NO: 11

Motivo PDZ-BS de la proteína G de la cepa ERA del virus de la rabia (últimos 4 aa del extremo C de la proteína G, es decir, fragmento 521-524 de la proteína G de longitud completa):

ETRL

SEQ ID NO: 12

Secuencia genérica del motivo PDZ-BS de una proteína G del virus de la rabia:

$x_1 - x_2 - x_3 - x_4$, en la que:

x_1 es cualquier aminoácido, y

x_2 es T o S o I, y

x_3 es cualquier aminoácido, y

x_4 es L o V.

SEQ ID NO: 13

Secuencia del motivo PDZ-BS de una proteína G del virus de la rabia no apoptósico:

$x_1-x_2-x_3-x_4$, en la que

x_1 es cualquier aminoácido excepto E (siendo x_1 preferentemente Q), y

x_2 es T o S o I (preferentemente T), y

x_3 es cualquier aminoácido (preferentemente R), y

x_4 es L o V (preferentemente L)

SEQ ID NO: 14

FIGURA 16


```

361 KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELLESSVPLVHPLAD
361 KGCLKVGRCHPHVNGVFFNGIILGPDDRVLIPEMQSSLLRQHMELLESSVPLMHPLAD
*** *****
421 PSTVFKDGEAEFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC
421 PSTVFKEGDEAEFVEVHLPDVYKQISGVDLGLPNWGKYVLMTAGAMIGLVLIFSLMTWC
*** *****
481 RRVNRSEPTQHNLRGTRGTVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL SEQ ID NO: 2
481 RRANRPESKQRSFGGTGGNVSVTSQSGKVIPSWESYKSGGEIRL SEQ ID NO: 15
** ** *

```

FIGURA 17 (fin)

Alineamiento múltiple de secuencias de CLUSTAL 2.0.10

```

G_ACA57830_
G_AAC34683_
G_ABV24348_
G-NIV
MVPQVLLFVPLLGFSLCFGKFPYITIPELGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSEF 60
MVPQVLLFVPLLGFSLCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSEF 60
MVPQVLLFVPLLGFSLCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSEF 60
MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPYITIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSEF 60
****.**** ** * .*****:***** ***** ***** *

G_ACA57830_
G_AAC34683_
G_ABV24348_
G-NIV
SYMELKVGYSIAIKVNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVYVTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
SYMELKVGYSIAIKVNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVYVTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
SYMELKVGYSIAIKVNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVYVTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
SYMELKVGYSIILAIKMNNGFTCTGVVTEAEYTNFVGVYVTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
*****.***:***** ***** ***** *****

G_ACA57830_
G_AAC34683_
G_ABV24348_
G-NIV
MAGDPRYEESLHNPYPDYHHLRVTVRTTKESLIIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCSG 180
MAGDPRYEESLHNPYPDYHHLRVTVRTTKESLIIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCSG 180
MAGDPRYEESLQNPYPDYHHLRVTVRTTKESLIIISPSVTDLDPYDKSLHSRVFPGGKCSG 180
MAGDPRYEESLHNPYPDYHHLRVTVRTTKESLVIIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGKCPG 180
*****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****.***.

G_ACA57830_
G_AAC34683_
G_ABV24348_
G-NIV
ITVSSSTYCSTNHDYTIWMPEDPRPRTPCNIFTNSRGKRAKGNKTCGFVDERGLYKSLKG 240
ITVSSSTYCSTNHDYTIWMPENPRPRTPCDIFTNISRGKRAKGNKTCGFVDERGLYKSLKG 240
ITVS-TYCSTNHDYTIWMPEDPRPGTPCDIFTNISRGKRAKGNKTCGFVDERGLYKSLKG 239
VAVSSTYCSTNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNISRGKRAKGSSETCGFVDERGLYKSLKG 240
:.*.*****:***.***:*****:***:*****:***:*****:*****:*****

```

FIGURA 18 (principio)

ES 2 640 475 T3

Fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV del virus de la rabia
(SEQ ID NO: 6):

RRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKI ISSWESHKSGGQTRL

Fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV LQ del virus de la rabia
(SEQ ID NO: 19):

RRVNRSEPTQLNLRGTGREVSVTPQSGKI ISSWESHKSGGQTRL

Fragmento citoplásmico de la proteína G de la cepa CVS-NIV HE del virus de la rabia
(SEQ ID NO: 20):

RRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKI ISSWESHKSGGETRL

FIGURA 19

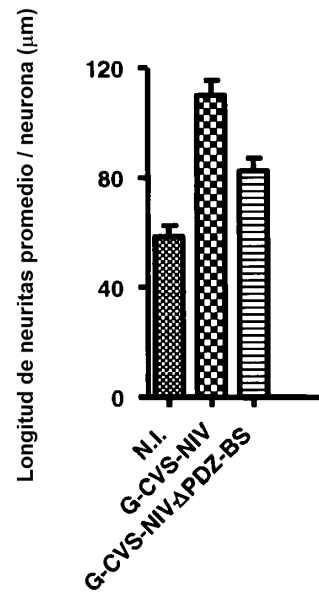


FIGURA 20

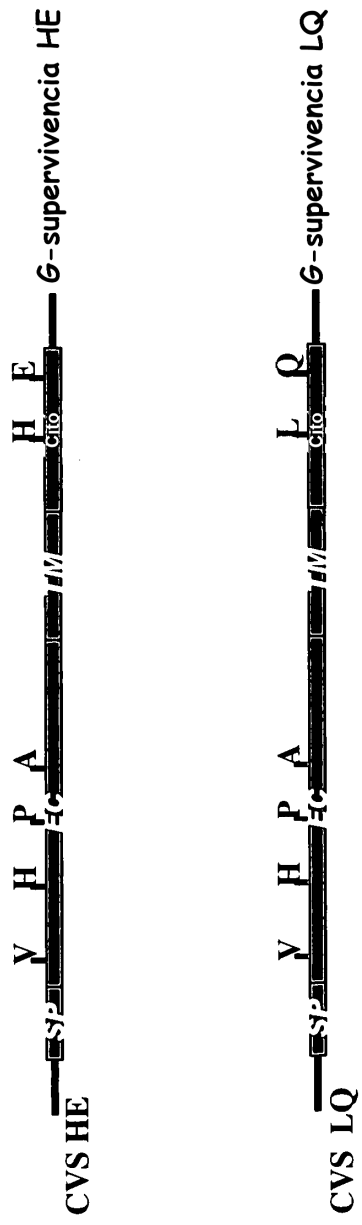


FIGURA 21

Dominios de G-CVS:

Longitud de G-Completa

MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPYIYTIIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYMELKVGYILAIKMNGFTCT
 GVVTEAETYTNFVGYVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWKMGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPSVADLD
 PYDRSLHSRVFPPSGKCPGVAVSSTYCSSTNHDTIWMPEPNRGLMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACK
 LKLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVVRKREECLEDALESIMTTKSVSFRRLSHLR
 KLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPSKGCCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHME
 LLESSVIPLEVHPLADPSTVFKDGEAEDFVEVHLDPVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRVRNS
 EPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 2)

Péptido señal (SP):

MVPQALLFVPLLVFPLCFG (SEQ ID NO: 21)

Ectodominio (EC):

KFPYIYTIIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGFSYMELKVGYILAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTT
 FKRKHFRPTPDACRAAYNWKMGDPRYEESLHNPYPDYHWLRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPPSGKCPGV
 AVSSTYCSSTNHDTIWMPEPNRGLMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKGACKLKLKCGVLGLRLMDGTWVAM
 QTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVVRKREECLEDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLME
 ADAHYKSVRTWNEILPSKGCCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELESSVIPLEVHPLADPSTV
 FKDGEAEDFVEVHLDPVHNQVSGVDLGLPNWGK (SEQ ID NO: 22)

Dominio transmembranario (TM):

YVLLSAGALTALMLIIFLMTCC (SEQ ID NO: 23)

Dominio citoplásmico (Cito):

RRVNRSEPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 6)

Aminoácidos codificados por las inserciones de construcción:

Aminoácido M + SEQ ID NO: 6 =

MRRVNRSEPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 24)

Dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 =

YVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRVRNRSEPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 25)

Dos aminoácidos del extremo C del ectodominio de G-CVS-NIV (aminoácidos GK) + dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 =

GKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRVRNRSEPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 26)

Péptido señal de SEQ ID NO: 21 + dos aminoácidos del extremo C del ectodominio de G-CVS-NIV (aminoácidos GK) + dominio transmembranario de SEQ ID NO: 23 + dominio citoplásmico de SEQ ID NO: 6 =

MVPQALLFVPLLVFPLCFGGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCCRVRNRSEPTQHNLRGTRGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL (SEQ ID NO: 27)

FIGURA 22

ES 2 640 475 T3

Alineamiento múltiple de secuencias de CLUSTAL 2.0.10

```

Gcompleta      MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPPIYTIIPDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVEDEGCTNLSGF 60
GSP2aaTMCito  MVPQALLFVPLLVFPLCFG----- 19
GCito          -----

Gcompleta      SYMELKVGYILAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGIVTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

Gcompleta      MAGDPRYEESLHNPYPDYHWRVTKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFSPGKCPG 180
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

Gcompleta      VAVSSTYCSTNHDTIWPENPRLGMSCDIFTNSRGKRASKGSETCGFVDERGLYKSLKG 240
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

Gcompleta      ACKLKLKCVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVRKRE 300
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

Gcompleta      ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPS 360
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

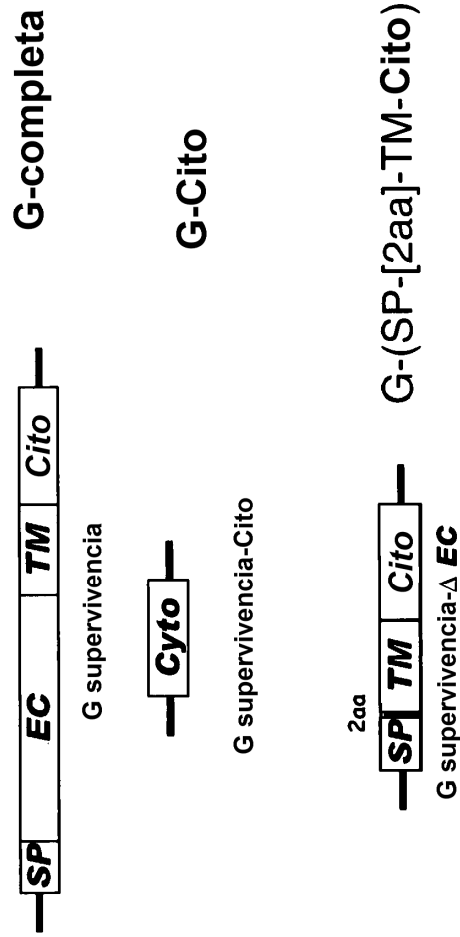
Gcompleta      KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPMQSSLLQQHMELESSVIPLVHPLAD 420
GSP2aaTMCito  -----
GCito          -----

Gcompleta      PSTVFKDGDEAEDFVEVHLPDVHNQVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC 480
GSP2aaTMCito  -----GKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC 43
GCito          -----M 1

Gcompleta      RRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL 524 SEQ ID NO: 2
GSP2aaTMCito  RRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL 87 SEQ ID NO: 27
GCito          RRVNRSEPTQHNLRGTTGREVSVTPQSGKIISWESHKSGGQTRL 45 SEQ ID NO: 24
*****

```

FIGURA 23



(SP Péptido señal, EC Dominio extracelular, TM Dominio transmembranario, Cito Dominio citoplásmico)

FIGURA 24

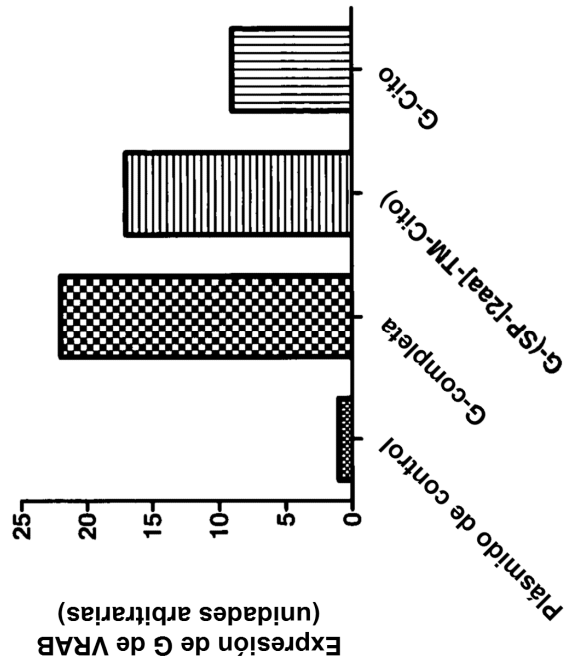
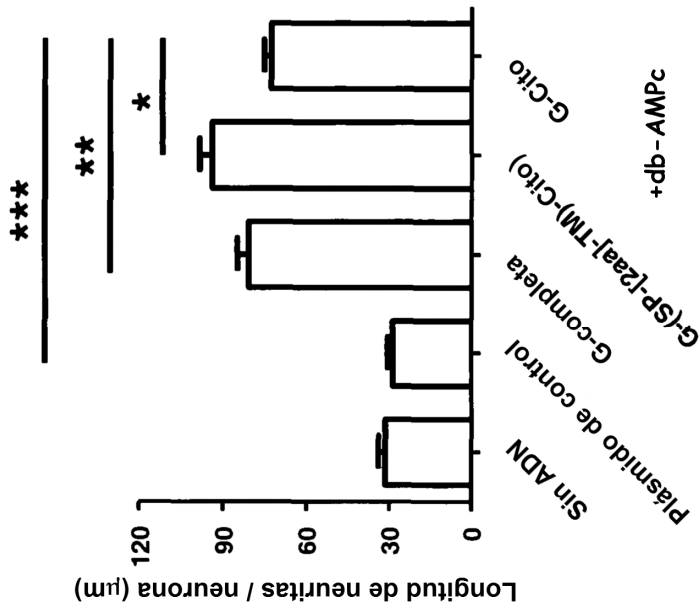
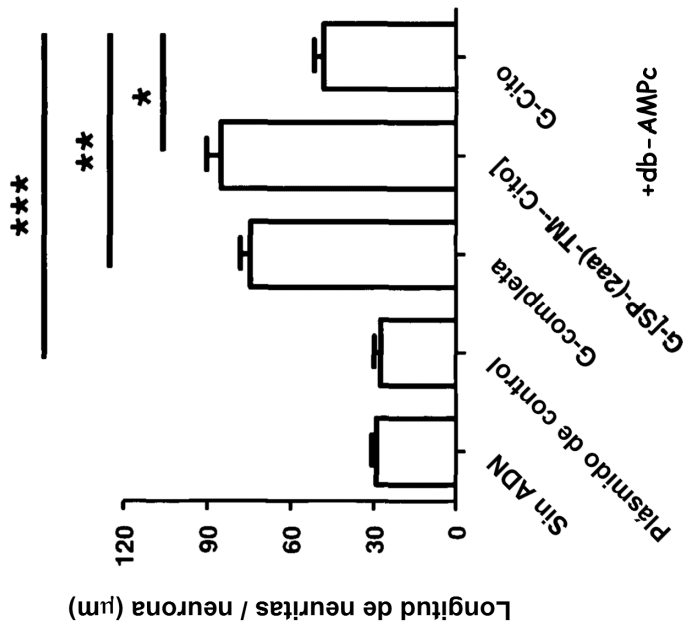


FIGURA 25



Prueba de la t de Student:
 * p<0,0001
 ** p<0,0001
 *** p<0,0001

FIGURA 27



Prueba de la t de Student:
 * p<0,0001
 ** p<0,0001
 *** p<0,0001

FIGURA 26

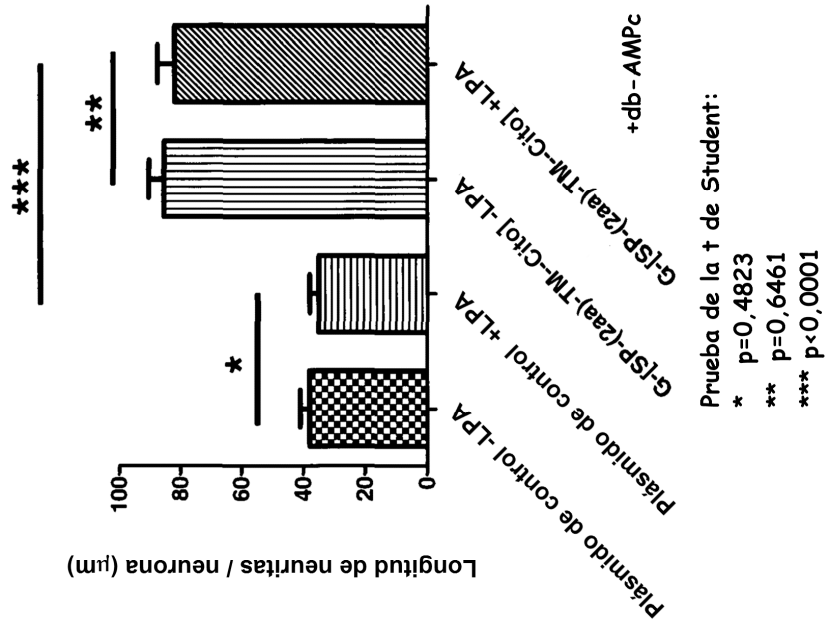


FIGURA 28

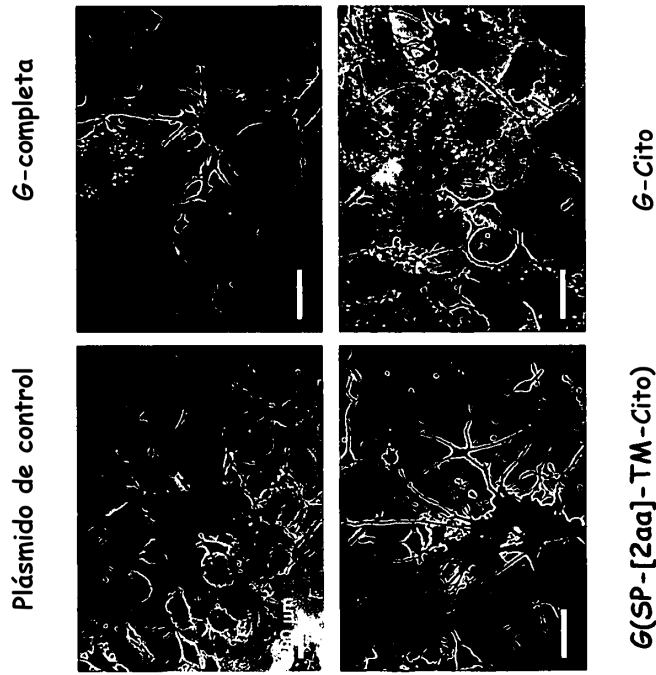


FIGURA 29

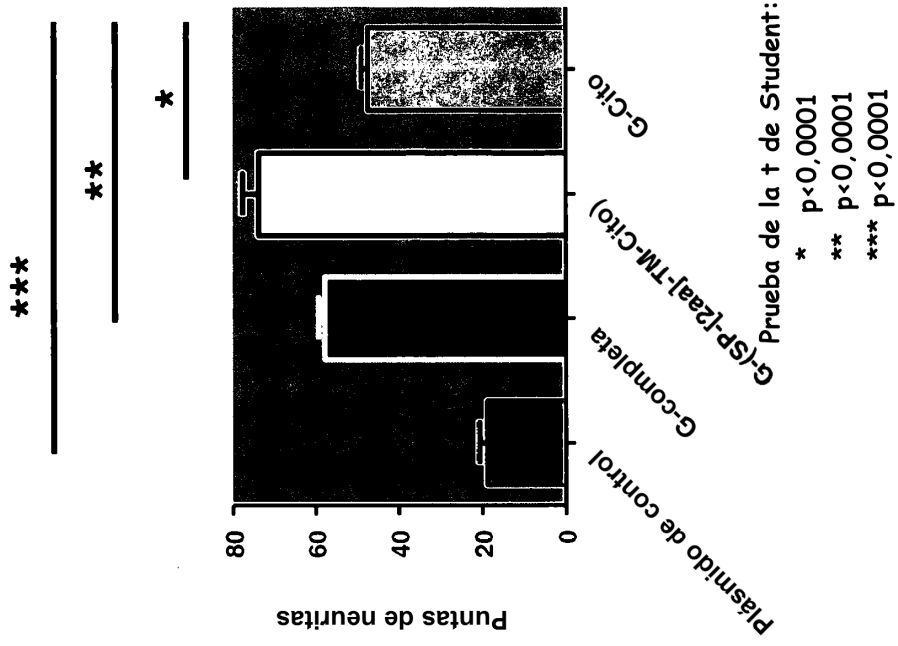


FIGURE 30

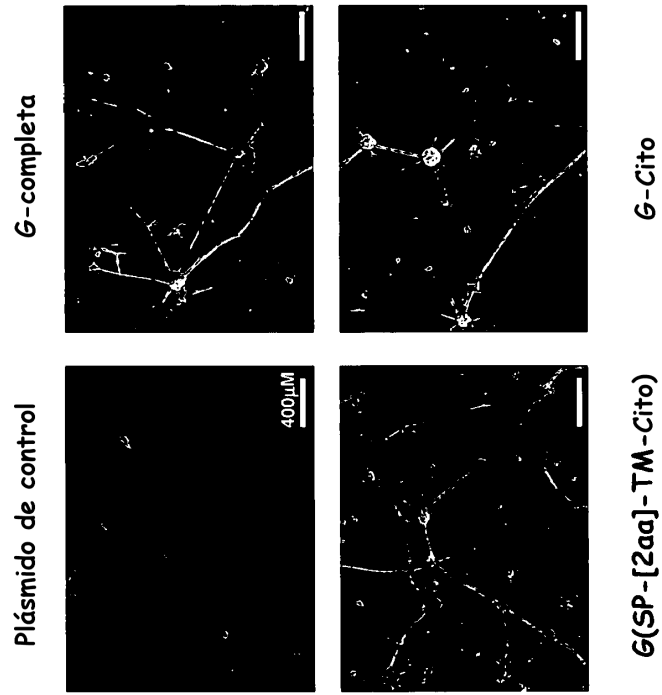
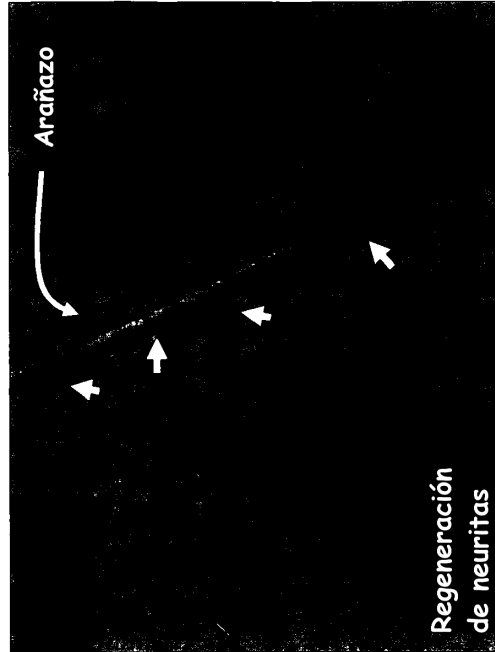


FIGURA 31

G(SP-[2aa]-TM-Cito)



Plásmido de control



FIGURA 32

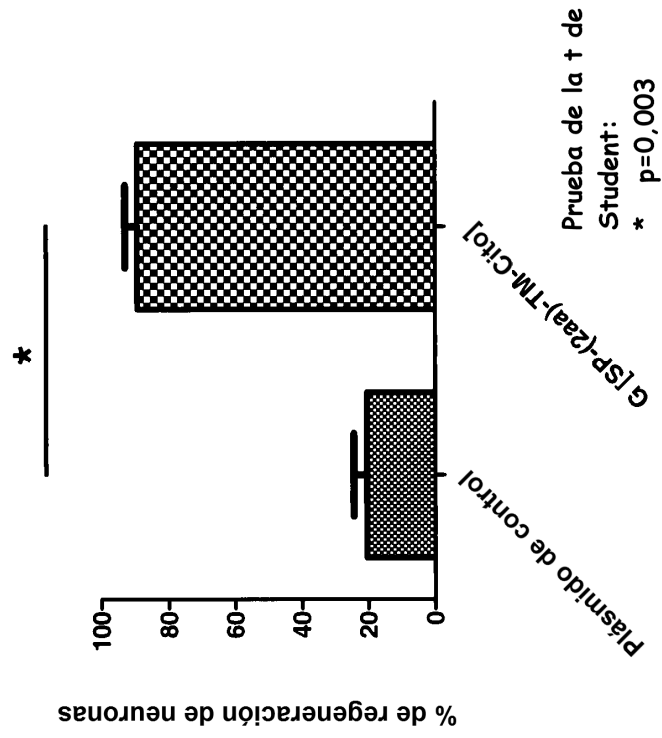


FIGURA 33