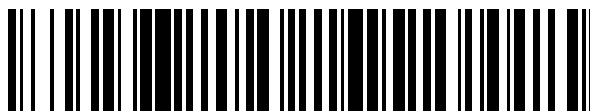


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 020**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2012** **PCT/US2012/031927**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12141936**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2012** **E 12712874 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017** **EP 2696889**

54 Título: **Variantes de GDNF humano**

30 Prioridad:

11.04.2011 US 201161474024 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2018

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

LEUNG, DONMIENNE, DOEN, MUN;
LU, JIRONG;
MERCHANT, KALPANA, MAHESH;
GHANEM, MAHMOUD;
O'BRYAN, LINDA, MAUREEN y
SMITH, ROSAMUND, CAROL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 020 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

Variantes de GDNF humano

La presente invención pertenece al campo de la medicina, particularmente al campo de las proteínas terapéuticas. Específicamente, la presente invención se refiere a variantes novedosas del factor neurotrófico derivado de células gliales humanas (GDNF). Las variantes novedosas del GDNF pueden ser útiles para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El GDNF es un factor neurotrófico bien conocido que se informa proporciona soporte trófico a neuronas dopaminérgicas in vitro e in vivo. Adicionalmente, se ha informado que el GDNF proporciona mejoras funcionales y tiene acciones neuroprotectoras en modelos de primates y roedores de la enfermedad de Parkinson. La proteína GDNF tipo silvestre de E. coli se ha administrado centralmente a pacientes que sufren de la enfermedad de Parkinson con resultados mixtos. En dos estudios etiquetados abiertos pequeños, se informa que el GDNF tipo silvestre produce mejora de larga duración en la función motriz. Sin embargo, en un ensayo, aleatorizado, controlado por placebo, fase IIa de 34 pacientes, el suministro intraputamenal del GDNF no mostro mejora sintomática en 6 meses. Un aumento en la señal biomarcadora fue solamente evidente en el tejido inmediato circundante en el sitio de infusión. Un informe reciente indica que el GDNF puede ser una molécula promisoría para rescatar los nervios que mueren; sin embargo, suministrar la molécula al área correcta del cerebro permanece siendo un reto desalentador. Naturaleza, Vol 466:19 de agosto de 2010.

En el documento WO97/11964(PCT/US96/14915) se reportan proteínas GDNF truncadas; sin embargo, continúa siendo una necesidad las variantes novedosas de GDNF con propiedades de biodistribución y estabilidad, propiedades farmacológicas deseadas: subsiste la necesidad de una variante del GDNF que es estable en un dispositivo de suministro, y facilite la biodistribución cerebral deseada, mientras que demuestre propiedades inmunogenicidad aceptables y de potencias deseadas. Las variantes GDNF ofrecen una o más de estas propiedades deseadas que pueden ser una nueva terapia medica farmacéuticamente útil, particularmente para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

La presente invención proporciona una variante GDNF truncada novedosa del dominio GDNF humano maduro que carece de los primeros 31 aminoácidos en el terminal N ("GDNF truncado de terminal N Δ31"), con determinadas substituciones de aminoácidos introducidas para proporcionar variantes GDNF, de potencia adecuada, estables, que ofrecen propiedades de bio-distribución deseables y un perfil de inmunogenicidad farmacéuticamente aceptable. La presente invención proporciona determinadas variantes de GDNF humano que imparten una o más ventajas sobre el GDNF tipo natural humano maduro que incluye variantes que tienen estabilidad farmacéutica mejorada, así como bio-distribución mejorada, reducción de unión a heparina, reducción de desamidación, susceptibilidad reducida a formación de succinimida, y reducción potencial inmunogenicidad en comparación con GDNF tipo silvestre humano. Determinadas variantes GDNF nuevas pueden ser una opción de tratamiento útil para pacientes con enfermedad de Parkinson.

La presente invención proporciona variantes GDNF humanas que comprende la SEQ ID NO: 23

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄

NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI (SEQ ID NO: 23), en las que:

i) Xaa₈₄ K es A;

II) Xaa₈₈ es R o K;

III) Xaa₉₀ es R o K;

IV) Xaa₁₂₅ es K o E; y

v) Xaa₁₃₀ es R o E.

La invención proporciona adicionalmente una variante GDNF humana en la que dicha variante se selecciona del grupo que consistente de

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL

SRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVYHILRKHSKRRCGCI (SEQ ID

NO:9),

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI (SEQ ID
NO:12),

y

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILREHSAKECGCI (SEQ ID
NO:15).

- 5 En un aspecto, la invención proporciona una variante GDNF humana que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9:

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL
SRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI.

- La invención proporciona adicionalmente un intermedio, útil para preparar una variante truncada de terminal -N-Δ31 de GDNF humano maduro. El intermedio comprende la serie de aminoácidos SEQ ID no: 23
10 RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄
NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI (SEQ ID NO: 23), que se extiende en el terminal -N con un péptido de secreción de señal. Los números de la secuencia de péptidos de señal se puede utilizar aquí: secuencias de péptidos de secreción de señal de ejemplo incluyen del péptido de secreción de señal líder kappa de murino que tienen una secuencia de METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 25), y el péptido de secreción de señal de hormonas de crecimiento humano en una secuencia de
15 MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO: 32).

- Los intermedios que tienen estos péptidos de secreción de señal pueden producir las variantes GDNF humanas reivindicadas con un aumento de producción sobre las construcciones GDNF truncadas que tienen otras secuencias líderes. Los intermedios divulgados incluyen el péptido de secreción de señal que pueden tener de esta manera una
20 secuencia de aminoácidos de

METDTLLLWVLLLWVPGSTGRGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVY
HILRKHSAKRCGCI (SEQ ID NO: 28);

o

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYET
KEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLD
DNLVYHILRKHSAKRCGCI (SEQ ID NO: 35).

- 25 La invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende una variante de GDNF humano como se reivindica por la presente invención y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La invención proporciona una variante de GDNF humano para su uso como un medicamento. La invención proporciona finalmente una variante de GDNF humano para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La invención proporciona una variante de GDNF para su uso como terapia.
- 30 Se prefiere una variante en la que Xaa₈₄ es A, Xaa₈₈ es K y Xaa₉₀ es K.
Se prefiere una variante en la que Xaa₈₄ es K, Xaa₈₈ es R y Xaa₉₀ es R.
Se prefiere una variante en la que Xaa₁₂₅ es K y Xaa₁₃₀ es R.
Se prefiere una variante en la que Xaa₈₄ es A, Xaa₈₈ es K y K Xaa₉₀ es, E Xaa₁₂₅ es y E Xaa₁₃₀ es.

Descripción detallada

Se ha reportado que el GDNF tipo silvestre se une a la matriz extracelular y heparina, probablemente a través de cargas positivas ubicadas en los residuos de aminoácidos 1-31 del terminal-N, limitando por lo tanto la distribución de GDNF luego del suministro cerebro (Lin et al., J Neurochem 63, 758-768, 1994; Rickard et al., Glycobiology 13, 419-426, 2003; Piltonen et al., Experimental Neurology 219, 499-506, 2009). También se ha informado que el GDNF proporciona mejoras funcionales y tiene acciones neuroprotectoras en modelos de roedores y primates de la enfermedad de Parkinson (Tomic et al, 1995; Gash et al., 1996): la proteína GDNF tipo silvestre de E. coli se ha administrado centralmente a pacientes que sufren de la enfermedad de Parkinson con resultados mezclados. En dos estudios etiquetados abiertos pequeños, el GDNF produjo una mejora de larga duración en la función motriz (Gill et al., 2003, Slevin et al., 2005). Adicionalmente, el aumento de la proliferación de neuronas dopaminérgicas fue evidente en un paciente que murió de causas no relacionadas - infarto de miocardio (Love et al 2005). Sin embargo, en un ensayo de fase dos a, controlado por placebo, aleatorizado, de 34 pacientes conducido por Amgen, en suministro de intra-putamen de GDNF (Liaternin) no mostró mejora sintomática en 6 meses (Lang et al., 2006). Las variantes GDNF reivindicada presentan propiedades mejoradas en comparación con la proteína GDNF tipo silvestre probada anteriormente E. coli.

La secuencia (211aa) de construcción de longitud completa de GDNF tipo silvestre que contiene el péptido señal (los primeros 19 aminoácidos, SEQ ID NO: 4), Pro-dominio (cursiva, SEQ ID NO: 5) y péptido maduro (subrayado, SEQ ID NO: 3) se indica como SEQ ID NO: 1:

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPE
 DYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMALPRRERNRQAAAAANPENSRGKGRR
GQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLS
RNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDLSDLDNVLVYHILRKHSARCGCI.

La secuencia de ADN de longitud completa de GDNF tipo silvestre se indica como SEQ ID NO: 2:

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
 GCGCTTTCCCACTGCCAGCCGGCAAGAGACCCCCAGAGGCCCCAGCCGAGGA
 CAGAAGCCTGGGCAGGCGGAGGGCCCCATTCGCCCTGAGCAGCGACAGCAAC
 ATGCCAGAGGACTACCCCGACCAAGTTCGACGACGTCATGGACTTCATCCAGG
 CCACCATCAAGAGGCTGAAGAGGTACCCCGACAAGCAGATGGCCGTGCTGCC
 CAGGCGGGAGAGGAACAGGCAGGCCGCCGCCGCCAACCCAGAGAATTCCAG
 GGGCAAGGGCAGAAGGGGTCAACGGGGCAAGAACAGGGGGCTGCGTGCTGAC
 CGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAG
 GAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCT
 ACGACAAGATCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCTGGTCTCCGACAA
 GGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTC
 CTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGAT
 GCGGCTGCATC.

Las posiciones de aminoácidos de las variantes de la presente invención se determinan a partir del polipéptido de aminoácido 134 de GDNF tipo silvestre humano maduro (SEQ ID NO: 3). Las mutaciones se diseñan mediante el aminoácido original, seguido por el número de posiciones de aminoácidos, seguido por los aminoácidos de reemplazo. La designación numérica de cada variante se basa en la secuencia madura tipo silvestre ("GDNF WT maduro") antes de truncación. Por ejemplo, una sustitución para Lys (K) en la posición 84 (es decir K84) con Ala (A) se designa como K84A. En una forma similar, las múltiples substituciones para Lys (K) en la posición 84 con Ala (A), Arg (R) en la posición 88 con Lys (K), Arg (R) en la posición 90 con Lys (K) y Asp (D) en la posición 95 con Glu (E) se designa como K84A/R88K/R90K/D95E. Como se utiliza aquí, la abreviatura "KAKKE" se refiere a K84A-R88K-R90K-D95E.

Como se utiliza aquí, "GDNF de longitud completa" se refiere a la secuencia de proteína completa, que, incluyendo el péptido señal, prodominio y dominio maduro.

Como se utiliza aquí, “GDNF maduro” o “GDNF maduro de longitud completa” se refiere al dominio maduro de GDNF completo (con el péptido señal y predominio dividido).

Como se utiliza aquí, “GDNF truncado de terminal N Δ 31” se refiere al dominio maduro GDNF que carece de los primeros 31 aminoácidos en el terminal N. Como se utiliza aquí, “GDNF truncado de terminal N Δ 31” y “variante de GDNF humano” (o “GDNFv”) se utiliza intercambiabilmente.

Las construcciones de GDNF de longitud completa cuando se transfectan en células HEK293 durante 5 días producen GDNF maduro de longitud completa predominantemente. Cuando las construcciones de GDNF de longitud completa se transfectan en células CHO durante un largo periodo de tiempo y durante la generación de estirpes celular estable, las formas truncadas de GDNF son las formas predominantes (Lin et al., Science 260, 1130-1132, 1993). Delta31 (“ Δ 31”), una forma variante truncada del GDNF maduro humano en el que los residuos de aminoácidos número 1 a 31 se han eliminado en el terminal N, tiene la SEQ ID NO: 8 y se pueden purificar a partir de la mezcla.

La variante GDNF Δ 31 truncada de terminal N se puede producir en un sistema de expresión bacteriano o de mamífero al eliminar tanto la secuencia del péptido de predominio como los 31 primeros residuos de aminoácidos del péptido GDNF maduro en el nivel de ADN y utilizando un número de péptidos de secuencia de señal de secreción, tal como el péptido de señal de secreción GDNF natural (SEQ ID NO: 4: MKLWDVVAVCLVLLHTASA); el péptido de señal de secreción líder kappa de murino (SEQ ID NO: 25: METDTLLLWVLLWVPGSTG); y el péptido de señal de secreción de hormona de crecimiento humana (SEQ ID NO: 32: MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA). Estas construcciones pueden producir variantes de GDNF truncadas de terminal N Δ 31 homogéneas de especie individual.

Un experto en la técnica comprenderá que las variantes GDNF reivindicadas no excluyen la posibilidad de glicosilación. Las variantes GDNF reivindicadas pueden ser glicosiladas según sea adecuado, dependiendo del sistema de expresión utilizado. Por ejemplo, variantes GDNF expresadas en mamíferos se glicosilan en la posición N49 mientras que las variantes expresadas bacterianas no.

Cuando se utiliza la construcción de secuencia natural de longitud completa (SEQ ID NO: 2) durante expresión, una mezcla de especies GDNF con diversas truncaciones de terminal N se producen, así como la forma madura (no truncada) con o sin la región de predominio.

Los siguientes ejemplos, realizados esencialmente como se describe adelante, se pueden utilizar para evaluar determinadas características de variantes GDNF humanas de la invención.

Ejemplo 1

Expresión de proteína, purificación y análisis de inmunogenicidad

a. Subclonación, mutación, expresión, despliegue, repliegue, y purificación de GDNFv expresado en E. coli

Subclonación. La cepa de E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL que alberga el plásmido pET-30a (+)/rhGDNF se cultiva en medio de caldo de cultivo Luria-Bertani que contiene kanamicina en una concentración final de 30 μ g/ml durante la noche a 37 °C. Después de cosechar las células por centrifugación se aísla el vector de plásmido al utilizar un kit QIAquick Spin Miniprep (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Luego se utiliza el ADN del plásmido aislado para reacción de extensión de cebador de los genes Δ 31-GDNF y Δ 31-N38Q-GDNF que codifican una proteína Δ 31-GDNF (31 residuos truncados del terminal N de GDNF humano maduro) y la proteína Δ 31-N38Q-GDNF (31 residuos truncados del terminal N del GDNF humano maduro en el que el residuo asparagina en la posición 38 se sustituye por glutamina), respectivamente. Esto se puede lograr utilizando los cebadores de oligonucleótidos Δ 31-for, Δ 31-rev, Δ 31-N38Q-for, y Δ 31-N38Q-rev (SEQ ID NOs: 6, 7, 39, y 40, respectivamente) que contienen los sitios de endonucleasa de restricción NdeI y XhoI diseñados para hibridar los extremos 5' y 3' del gen. Los sitios de restricción NdeI y XhoI se introducen en los extremos 5' de los cebadores codificantes y anticodificantes que permiten clonación de Δ 31-GDNF y Δ 31-N38Q-GDNF en los sitios correspondientes del vector pET-30a(+). Se realiza la reacción de extensión de cebador durante 3 min a 94 °C, seguido por 16 ciclos de etapa tres de 1 min a 94 °C, 0,5 min a 55 °C, y 1 min a 72 °C, con una etapa final de 10 min a 72 °C, en un volumen total de 100 μ l al utilizar un ADN plantilla de 80 ng, cebadores directos e inversos, y Supermix PCR (Invitrogen #10572-014). Los amplicones resultantes varían en electroforesis de gel de agarosa y se limpian utilizando el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

Tanto el gen Δ 31-GDNF o Δ 31-N38Q-GDNF amplificados como el vector pET-30a(+) se digieren durante 2 h a 37 °C con NdeI y XhoI, seguido por purificación del ADN mediante electroforesis de gel de agarosa utilizando el kit de extracción de Gel QIAquick. Luego se liga el Δ 31 GDNF o Δ 31-N38Q-GDNF en el plásmido pET-30a(+) utilizando ligasa de ADN T4 y siguiendo el protocolo del fabricante. Se utiliza 2-5 μ l de mezclas de reacción de ligación para transformar directamente 50-100 μ l de cepas de E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, células químicamente competentes siguiendo el protocolo del fabricante (Agilent #230280). Las colonias transformantes resultantes obtenidas al colocar en platos en placas agar Luria-Bertani que contienen kanamicina en una concentración final de 30 μ g/ml se tamizan para detectar la presencia de construcciones correctas a través del secuenciamiento del

plásmido extraído en ambas direcciones al utilizar los cebadores de oligonucleótidos terminadores T7 y promotores T7 estándar.

Mutaciones. La mutagénesis dirigida a sitio se lleva a cabo utilizando el kit de mutagénesis QuikChange Multi Site-Directed Mutagénesis (Stratagene, La Jolla, CA) para preparar $\Delta 31$ -N38Q-D95E-GDNF y $\Delta 31$ -N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF. El procedimiento utiliza $\Delta 31$ -N38Q-GDNF, insertado en el pET-30a(+) como una plantilla, y los oligonucleótidos $\Delta 31$ -N38Q-D95E-for y $\Delta 31$ -N38Q-D95E-rev (tabla 1, SEQ ID N°: 41 y 42) como cebadores directos e inversos, respectivamente. Posteriormente, el gen $\Delta 31$ -N38Q-D95E mutado exitosamente se inserta en el pET-30a(+) se utiliza como plantilla, y los oligonucleótidos $\Delta 31$ -N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-for y $\Delta 31$ -K84A-R88K-R90K-D95E-D95E-rev (tabla 1, SEQ ID N°: 43 y 44) como cebadores directos e inversos, respectivamente, para producir $\Delta 31$ -N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF. La secuencia de ADN se confirma y el plásmido se transforma en la cepa de E. coli BL21-CodonPlus (DE3)- RIPL células químicamente competentes.

Expresión de proteína. Reservas congeladas permanentes de células de E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL que albergan el plásmido pET-30a(+)/GDNFv se utilizan para inocular 50 ml de medio de caldo de cultivo 2xTY que contiene kanamicina en concentraciones finales de 30 μ g/ml a 37 °C. Después de 9 h, se utilizan 5 ml de cultivo iniciador para inocular 6 x 2 litros del mismo medio de cultivo líquido a 37 °C. Cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 600 nm entre 0,8 y 1,4, normalmente después de 16 h, se agrega IPTG a una concentración final de 1 mM y la temperatura de cultivo se reduce entre 27 y 30 °C durante 5 h. Las células se cosechan mediante centrifugación a 10.000 g durante 20 min a 4 °C y se almacenan a -80 °C.

Solubilización de replegado. Se suspende pasta celular en 2-3 volúmenes de una solución de 0,2 mg/ml de lisozima, 5 MgCl₂ y 50 mM Tris-Cl en pH 8 y se le permite incubar con agitación durante 30 min en hielo. La suspensión resultante se sónica en hielo durante 10 min (pulsos de 5 seg, intervalos de 2 seg, 30-40 % de amplitud). Después de eso, el GDNFv se recupera en la forma de cuerpos de inclusión que se aíslan del lisado celular mediante centrifugación a 20.000 g durante 20 min y se solubiliza en guanidina 4 M, cisteína 90 mM, Tris-Cl 20 mM, pH 8,5. La proteína se repliega hasta la forma activa mediante dilución 10X con guanidina 0,2 M, urea 2M, Tris-Cl 20 mM, pH 8,75. La mezcla replegada se mantiene a 4 °C durante 2 días.

Purificación. El GDNFv replegado se purifica hasta homogeneidad a través de 3 etapas de cromatografía de columna:

1. Cromatografía de intercambio de cationes (CEX) en columna SP
2. Cromatografía de Interacción hidrófoba (HIC) en columna fenilo
3. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) en columna Superdex-75.

La proteína renaturalizada se aplica en primer lugar a una columna de flujo rápido Sefarosa SP equilibrada en 20 mM de acetato de sodio, pH 5. El GDNFv se eluye con un gradiente de sal lineal ascendente de 0,3 para NaCl 1 M en 20 mM de acetato de sodio, pH 5. El grupo de corriente principal CEX se complementa con NaCl hasta una concentración final de 2,5 M y luego aplicada hasta una columna de cromatografía de interacción hidrófoba Fenil Sefarosa HP en 20 mM citrato de sodio, pH 5. La columna HIC se eluye con un gradiente de sal lineal descendente de 2,5 hasta 0 M de NaCl en 20 mM de citrato de sodio, pH 5. El GDNFv se une estrechamente a la columna HIC. El grupo de corriente principal del HIC se concentra luego y se aplica finalmente a una columna de Superdex-75 y la proteína se eluye con PBS, pH 7,4. El producto final se concentra, se filtra a través de una membrana de 0,22 micrómetros y se almacena a -80 °C.

b. Expresión y purificación de GDNFv en células de mamíferos

Se pueden preparar variantes GDNF que codifican genes utilizando técnicas de biología molecular estándar o mediante síntesis génica en un vector de expresión de mamífero controlado por promotor CMV. Los plásmidos recombinantes se utilizan para transfectar transitoriamente células 293EBNA (HEK293) de riñón embrionario humano y el medio se cosecha 5 días después. En otro procedimiento, se generan estirpes de células de ovario de hámster chino (CHO) estables para expresar variantes de GDNF. Los genes que codifican para las proteínas variantes se subclonan en las estructuras principales de plásmidos de supresión que contienen glutamina sintetasa (GS) (plásmidos basados en pEE12.4, Lonza Biologics, Slough, UK) en marco con la secuencia de señal GDNF natural con prodominio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las construcciones GDNF de longitud completa (SEQ ID NO: 2) en vectores basados en pEE12.4 se transfectan en CHO y producen formas truncadas de GDNF en el que $\Delta 31$ es la forma predominante y se puede purificar a partir de la mezcla. Cuando el prodominio y los primeros 31 aminoácidos terminal N se eliminan, entonces la variante GDNF truncada del terminal N- $\Delta 31$ se produce eficientemente y limpiamente en un sistema de expresión de mamífero sin la necesidad de purificación desde una mezcla de longitud completa y productos truncados como se informó anteriormente. El péptido de señal de secreción GDNF natural también se puede reemplazar con números de péptidos de señal de secreción, que incluyen el péptido señal de secreción líder kappa de murino o péptido de señal de secreción de hormona de crecimiento humano. La variante GDNF truncada de terminal N- $\Delta 31$ produce aun eficientemente y limpiamente con todos los péptidos de señal de secreción divulgados, pero con niveles de expresión variables. Las variantes GDNF que

incorporan mutaciones deseadas se subclonan en vectores de expresión adecuados (tal como pEMK-NF2, Lonza) en marco con la secuencia de señal kappa de murino.

Purificación. El GDNFv se purifica hasta homogeneidad a través de cromatografía de lecho de 4 etapas:

1. Cromatografía de intercambio de cationes (CEX) sobre columna SP
2. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) sobre columna de fenilo
3. Cromatografía de intercambio de cationes (CEX) sobre columna Capto multi modelo MMC
4. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) sobre columna Superdex-75.

En resumen, el medio de cultivo cosechado que contiene proteínas variantes GDNF se aplica en primer lugar a una columna de flujo rápido Sefarosa SP equilibrada en 20 mM de acetato de sodio pH 5. El GDNFv se eluye con un gradiente de sal lineal de NaCl 0 hasta 1M en 20 mM de acetato de sodio pH 5. El grupo de corriente principal CEX se complementa con NaCl hasta una concentración final de 2,5 M y luego se aplica a una columna de cromatografía de interacción hidrófoba HP Fenil Sefarosa en 20 mM de acetato de sodio, pH 5. La columna HIC se eluye con un gradiente de sal lineal inverso de NaCl 2,5 a 0 M en 20 mM de acetato de sodio, pH 5. El GDNFv se une débilmente a la columna HIC. Un grupo del flujo a través de fracciones de elución temprana se aplica luego a la resina multimodelo de la columna Capto MMC en pH 5. La columna se lava con 50 mM de Tris-Cl, pH 8, y luego se eluye GDNFv con un gradiente de sal lineal de NaCl 0 a 1 M en 50 mM Tris-Cl, pH 8. La corriente principal de Capto MMC se aplica finalmente a una columna Superdex-75 y la proteína se eluye con PBS, pH 7,4. El grupo final se filtra a través de una membrana de 0,22 micrómetros y se almacena a 2-8 °C.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos utilizados para mutagénesis dirigida a sitio y PCR

Cebador	Secuencia de Nucleótidos	Propósito
$\Delta 31$ -for ^a	5'-TATACATATGCGTGGACAACGTGGTAAAAACCGTGGTTGTGTGCT G-3' (SEQ ID No: 6)	PCR
$\Delta 31$ -rev ^a	5'-GGTGCTCGAGTTATTAAATGCAGCCGCAACGTTTCGCGCT-3' (SEQ ID No: 7)	PCR
$\Delta 31$ -N38Q-for ^{a,b}	5'- TATACATATGCGTGGACAACGTGGTAAACAACCGTGGTTGTGTGCTG -3' (SEQ ID No: 39)	PCR
$\Delta 31$ -N38Q-rev ^a	5'-GGTGCTCGAGTTATTAAATGCAGCCGCAACGTTTCGCGCT-3' (SEQ ID No: 40)	PCR
$\Delta 31$ -N38Q-D95E-for ^b	5'-GTCTGGTGAGCGAGAAAGTGGGTCAG-3' (SEQ ID No: 41)	Mutagénesis
$\Delta 31$ -N38Q-D95E-rev ^b	5'-CTGACCCACTTTCTCGCTCACCAGAC-3' (SEQ ID No: 42)	Mutagénesis
$\Delta 31$ -N38Q-KAKKE-for ^b	5'- CCTATGATAAAATCCTGGCAACCTGAGCAAGAACAACCGTCTGG TGAGCGAGAAAG-3' (SEQ ID No: 43)	Mutagénesis
$\Delta 31$ -N38Q-KAKKE-rev ^b	5'- CTTCTCGCTCACCAGACGTTTGTCTCTGCTCAGGTTTGCAGGATT TTATCATAGG-3' (SEQ ID No: 44)	Mutagénesis

^a Sitios de restricción de endonucleasa para enzimas NdeI y XhoI se encuentran en cursiva ^b Las letras subrayadas indican emparejamientos incorrectos

20 Análisis Epivax de potencial de inmunogenicidad

Las variantes GDNF humanas seleccionadas con una probabilidad reducida de unión HLA-DR se hacen (SEQ ID no: 12 y 15) y comparan con el GDNF tipo silvestre en el GFRα y el ensayo de unión de heparina.

Ejemplo 2

Estabilidad de GDNF tipo silvestre y variante y GDNF $\Delta 31$

La estabilidad de las variantes GDNF truncadas de terminal N $\Delta 31$ y tipo silvestre GDNF madura de longitud completa se pueden evaluar utilizando una serie de técnicas analíticas tal como RP-HPLC, SE-HPLC, HPLC de Intercambio de Cationes y espectrometría de masas para identificar cualesquiera sitios de degradación en estas moléculas. Luego se hacen mutaciones para retirar los sitios de degradación química para mejorar la estabilidad de la variante GDNF humano.

Cromatografía de fase inversa analítica (RP-HPLC). En columna Zorbax C₈ SB-300Å, 3,5 micrómetros, 4,6 x 50 mm calentada a 60 °C (Agilent Technologies # 865973-909). La fase móvil es 0,1 % TFA en H₂O. El GDNFv se eluye

como un único pico en 214 nm con un tiempo de retención de 19-20 min mediante un gradiente de acetonitrilo lineal de 5 al 50 % durante 30 min en un índice de fluidez de 1 ml/min durante 35 minutos.

Cromatografía de exclusión de tamaño analítica (SEC-HPLC). En columna TSK-G-2000-SW-XL, 5 micrómetros, 7,8 x 300 mm (TOSOH BIOSEP #08540). Fase móvil: PBS + 350 mM de NaCl, pH 7,4, en un índice de fluidez de 0,5 ml/min durante 35 min. El GDNFv eluye como un único pico en 214 nm con un tiempo de retención de ~16-17 min.

Cromatografía de intercambio de cationes analítica (CEX-HPLC). En columna Dionex, Propac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex #054993). La fase móvil es de 20 mM de fosfato de sodio, acetonitrilo al 10 %, pH 7. El GDNFv eluye como un pico de complejo con un tiempo de retención de 25-30 min mediante un degradado de sal lineal de NaCl de 0,15 a 0,6 M durante 45 minutos con un índice de fluidez de 1 ml/min durante 52 minutos.

Análisis de estabilidad química (LC-MS) de tipo silvestre (GDNF bacteriano de longitud total) vs GDNFv CHO tipo silvestre (GDNF truncado Δ31 terminal N).

Se estresa GDNFv CHO tipo silvestre (GDNF truncado Δ31 terminal N) versus tipo silvestre (GDNF bacteriano de longitud completa) a 37 °C durante 4 semanas para identificar aminoácidos que se pueden asociar con inestabilidad química.

Muestras

1 GDNF de longitud completa de E. coli WT a 4 °C durante 4 semanas, 1,0 mg/ml

2 GDNF de longitud completa de E. coli WT a 37 °C durante 4 semanas, 1,0 mg/ml

3 GDNFv Δ31 de CHO WT a 4 °C durante 4 semanas, 1,0 mg/ml

4 GDNFv Δ31 de CHO WT a 37 °C durante 4 semanas, 1,0 mg/ml

Análisis molecular parcial e intacto. Se mezcla una alícuota de 10 µl de cada muestra (la solución se mezcla con 20 µl de agua o 10 µl de alícuota de cada solución) con 40 µl de 100 mM de regulador tris-HCl, Ph 8, 1,0 µl de 50 mg/ml de DTT a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada muestra se presenta para el análisis LC/MS.

Digestión de Lys-C. Se liofiliza una alícuota de 20 µl de cada muestra hasta secado bajo un sistema de vacío de velocidad y luego se reconstituye el material en 0,5 µl de 50 mg/ml de DTT y 4,5 µl de guanidina-HCl 6 M, regulador tris-HCl 0,5 M, pH 8. La mezcla se incuba a 37 °C durante 30 minutos y cada solución se diluye luego con 93 µl de agua y se trata con 2 µl de 0,2 mg/ml de Lys-C (Wako) a 37 °C durante 2 horas. Para GDNFv de CHO, se tratan 30 µl de digestiones tripticas con 0,5 µl de PNGasa F a 37 °C durante 1 hora (para evaluar el perfil de carbohidratos). La digestión se acidifica con 2 µl de TFA al 10 % en H₂O antes de análisis LC/MS.

Análisis LC/MS. Las soluciones de muestra se analizan mediante un espectrómetro de masa Waters SYNAPT acoplado con un UPLC Waters Acquity o un espectrómetro de masa premier Waters LCT acoplado con un HPLC Waters 2795.

Análisis descendente. Se obtienen productos de división para GDNF tipo silvestre mediante análisis LC-MS para GDNF parcialmente reducido. Se identifican múltiples productos de división y los datos cuantitativos para aquellas divisiones se muestran en la tabla 2. Diversas divisiones (divisiones entre N15/R16, N22/P23, N25/S26 y N38/R39) tienen rutas de degradación similares como desamidación a través de la formación de succinimida. Para el GDNFv Δ31 de CHO tipo silvestre, los primeros 31 residuos de aminoácidos se dividen del terminal N, aunque el GDNFv CHO tiene dos sitios de N-glicosilación potenciales por cadena, solamente se N-glicosila un sitio. Los glicanos principales observados son oligosacáridos di- o tri-antennarios con diferentes galactosilación. De manera interesante, no se detectan glicanos significativamente aislados. (Tabla 3)

Análisis ascendente (mapeo de péptidos). Cromatogramas UV de digestión de Lys-C de muestras de estabilidad de GDNF reducidas muestran que, con la excepción del péptido 126-129 de GDNF, todos los péptidos esperados se detectan. Para material CHO, no se detectan péptidos de terminal N (antes R32). Péptidos 38-60 que contienen N49 se glicosilan y se ocupa más del 95 % del Asn49. El péptido 85-96 que contiene N85 no se glicosila. Estos resultados son consistentes con análisis LC/MS para muestras GDNF reducidas.

En general, el homodímero para materiales CHO y tipo silvestre es el componente principal. El componente menor, que se eluye temprano, es el monómero. De acuerdo con el análisis de espectroscopia de masa, el Cys41 de GDNF Cys41 forma un enlace de disulfuro con un residuo Cys libre para el monómero. El porcentaje relativo para picos de monómero es muy bajo y son <1 % para CHO y <0,5 % para el tipo silvestre mediante análisis ultravioleta. El contenido de monómero no se cambia para los materiales estresados.

Las degradaciones, tal como oxidación, desamidación e isomerización, también se obtienen a partir del mapeo de péptidos. Los resultados se muestran en la tabla 4. El GDNF de longitud completa tipo silvestre de E. coli contiene dos residuo MET, M(-1) y M6, y la oxidación para estos sitios es relativamente baja. El GDNF no contiene ningún residuo de Trp. El GDNF tiene ocho residuos Asp para el monómero de longitud completa. Los sitios de

5 desamidación principales son N25 y N38. En razón a que las desamidación ocurre mucho más rápido en un regulador de pH alto, el porcentaje relativo para aquellos sitios debe ser bajo cuando se estresa en regulador de pH 5 o 6. Un péptido isómero, 85-96, se identifica, pero no es claro debido a la isomerización de Asp a Iso-Asp o racemización del residuo de aminoácido. Es bien sabido que el alto estrés del pH es generalmente la racemización y el bajo estrés del pH es la isomerización de Asp. Para el GDNF de longitud completa tipo silvestre, diversos péptidos muestran las diferentes masas para las muestras de control (4 °C) y de estrés (37 °C). Los más probable es que estén mal incorporadas durante la biosíntesis de *E. coli*.

Tabla 2. Porcentaje relativo de división de GDNF

Péptidos GDNF	GDNF de <i>E. coli</i> WT, 4 semanas, 4 °C	GDNF de <i>E. coli</i> WT, 4 semanas, 37 °C	GDNFv Δ31 de CHO, semanas 4, 37 °C
Met+1 - 134	90,9	57,6	NA
1-134	2,8	4,1	NA
2-134	2,5	4,2	NA
3-134	<0,5	1,5	NA
7-134	0,5	2,4	NA
16-134	<0,5	2,9	NA
Piro E17, 17-134	<0,5	2,9	NA
18-134	0,6	2,0	NA
19-134	1,7	4,1	NA
20-134	<0,5	3,8	NA
26-134	<0,5	2,7	NA
32-134	<0,5	2,9	97,3
39-134	<0,5	4,5	2,7

Tabla 3. GDNFv Δ31 de CHO: Glicanos en sitio N49 de Glicosilación

Fórmula de glicano N49				Porcentaje relativo (%)	
NeuAc	HexNAc	Hex	Fc	4 °C durante 4 semanas	37 °C durante 4 semanas
0	2	3	0	0,5	0,5
0	2	3	1	4,3	4,4
0	3	3	0	1,9	2,2
0	3	3	1	15,1	14,8
0	4	3	0	1,8	1,5
0	3	4	1	2,6	3,1
0	4	3	1	9,4	10,0
0	5	3	0	1,3	1,5
0	4	4	1	3,4	3,5
0	5	3	1	6,6	7,0
0	4	5	1	6,3	6,5
0	5	4	1	3,4	3,7

(continuación)

Fórmula de glicano N49				Porcentaje relativo (%)	
NeuAc	HexNAc	Hex	Fc	4 °C durante 4 semanas	37 °C durante 4 semanas
0	6	3	1	1,3	1,4
0	5	5	1	4,0	4,5
0	5	6	0	3,4	3,1
0	6	4	1	1,5	1,5
0	5	6	1	22,5	20,9
0	6	7	0	0,7	0,6
0	6	7	1	5,1	4,6
0	7	8	1	0,5	0,8
Aglicosilación en N49				4,3	4,1

Tabla 4. Mapeo de péptidos LC-MS.

Residuos/Péptidos	Porcentaje relativo (%)			
	GDNF de <i>E. coli</i> WT		GDNFv Δ 31-de CHO	
	4 °C, 4 semanas	37 °C, 4 semanas	4 °C, 4 semanas	37 °C, 4 semanas
	Oxidación			
Met(-1)	1,4	2,5	na ^a	na ^a
Met6	6,4	11,2	na ^a	na ^a

Desamidación				
N15/N25, N25 Principal	2,8	61,5	na	na
N38	1,9	20,3	6,7	27,6
N89	<0,5	4,0	1,2	3,5
Isomerización				
Péptido 85-96 de GDNF	<0,5	14,4	3,6	17,7
^a No disponible				

5

Estos datos indican que la variante GDNF truncada de terminal N- Δ 31 producida en células CHO tiene estabilidad química mejorada debido a la eliminación de los primeros 31 residuos de aminoácidos que incluyen oxidación desamidación significativa de sitios de incremento de frecuencia de mutación de ADN, según se compara con GDNF humano maduro tipo silvestre longitud completa producido por *E. coli* cuando se estresa durante 4 semanas a 37 °C. Adicionalmente, como se muestra en la tabla 5, la mejora significativa en las propiedades bioquímicas y biofísicas de dos variantes GDNF truncadas de terminal N- Δ 31 mutadas (N38Q y D95E, respectivamente) se observan después de mutación cuando se comparan con el GDNF de *E. coli* tipo silvestre de longitud completa o la variante GDNF truncada de terminal N- Δ 31 antes de mutación.

10

Tabla 5. Propiedades biofísicas y bioquímicas mejoradas de las variantes GDNF versus GDNF tipo silvestre después de incubación de 4 semanas a 37 °C con relación a las muestras de 4 °C								
	GDNF <i>E. coli</i> de WT (SEQ ID NO: 3)		GDNFv Δ31 de CHO (SEQ ID NO: 8)		GDNFv D95E-N38Q-Δ31 de CHO (SEQ ID NO: 9)		GDNFv D95E-R90K-R88K-K84A N38Q -Δ31 de CHO (SEQ ID NO: 12)	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
A- De agregado de alto peso molecular								
(SEC) a- 0,5 mg/ml	na	na	1,2 %	2,7 %	0,7 %	1,4 %	0,9 %	1,7 %
b- 0,1 mg/ml	na	na	<2 %	<2 %	<2 %	<2 %	<2 %	<2 %
d- 15 mg/ml	na	na	0,68 %	na	0,43 %	na	0,47 %	na
e- 15 mg/ml (3 congelamiento/descongelamiento)	na	na	0,66 %	na	0,41 %	na	0,43 %	na
B- degradación química (RP, % pico no principal)								
a- 0,5 mg/ml	na	na	4,3 %	5,7 %	0,3 %	1,5 %	0 %	1,9 %
b- 0,1 mg/ml	na	na	na	>90 %	na	>90 %	na	>90 %
C- Estabilidad química y modificación (CEX, % de pico principal)								
a- 0,5 mg/ml	na	8 %	82,3 %	30 %	86 %	57 %	90 %	62 %
b- 0,1 mg/ml	na	na	na	<30 %	na	55 %	na	53 %
D- Acortamiento de terminal N (Secuencia de péptido de GDNF maduro LC-MS, 1 mg/ ml)								
a-Met-1-134	91 %	58 %	na	na	na	na	na	na
b- 1-134	2,8 %	4,1 %	na	na	na	na	na	na
c- 32-134	<0,5 %	3,0 %	98,2 %	92,8 %	99,6 %	96,0 %	98,4 %	94,9 %
d- 33-134	na	na	1,8 %	3,3 %	0,4 %	2,1 %	1,5 %	3,2 %
e-34-134	na	na	0,0 %	1,8 %	0,0 %	1,9 %	0,1 %	1,9 %
f-39-134	na	na	0,0 %	2,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %

(continuación)

Tabla 5. Propiedades biofísicas y bioquímicas mejoradas de las variantes GDNF versus GDNF tipo silvestre después de incubación de 4 semanas a 37 °C con relación a las muestras de 4 °C								
	GDNF <i>E. coli</i> de WT (SEQ ID NO: 3)		GDNFv Δ 31 de CHO (SEQ ID NO: 8)		GDNFv D95E-N38Q- Δ 31 de CHO (SEQ ID NO: 9)		GDNFv D95E-R90K-R88K-K84A N38Q - Δ 31 de CHO (SEQ ID NO: 12)	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
E- Oxidación (LC-MS)								
a- Met (-1)	1,4 %	2,5 %	na	na	na	na	na	na
b- Met (6)	6,4 %	11,2 %	na	na	na	na	na	na
F- Desamidación (LC-MS)								
a- N15/25	2,8 %	61,5 %	na	na	na	na	na	na
b- N38/Q38	1,9 %	20,3 %	3,2 %	25,9 %	0,7 %	0,7 %	0,5 %	0,6 %
c- N89/N85	<0,5 %	4 %	1,3 %	2,2 %	1,0 %	1,7 %	1,2 %	1,9 %
G- Isomerización/ Racemización (LC-MS)								
a- péptido 85-96	<0,5 %	14,4 %	0,9 %	12,0 %	0,0 %	0,2 %	0,1 %	0,8 %
H- Glicosilación (LC-MS)								
a- Ocupación - N49	na	na	99,3 %	99,3 %	99,6 %	99,7 %	98,1 %	97,9 %
b- Acido Siálico (mol/glicano)	na	na	0,9	0,9	0,6	0,6	1,4	1,4
c- Di-antenario	na	na	7,8 %	7 %	10,8 %	10,5 %	9,8 %	9,2 %
d- Tri-antenario	na	na	54,9 %	54,5 %	49,5 %	50,9 %	55,9 %	55,8 %
e- Tetra-antenario	na	na	37,2 %	38,5 %	38,5 %	37,5 %	33,1 %	33,7 %
No disponible (na)								

Ejemplo 3**Actividades de unión in vitro**

- 5 Los siguientes ensayos demuestran que determinadas variantes de GDNF humano reducen la unión a heparina mientras conservan la unión del receptor GFR α 1 para proporcionar una variedad de características de unión de receptor y heparina diferenciales.

• Cinéticas de unión de GDNFv a GFRs en Biacore

- 10 Se pueden expresar variantes de GDNF (GDNFv: troncada Δ 31 terminal N) en células de mamíferos o *E. coli* (bacteriana) (células CHO o células EBNA HEK293) y purificar como se describe en el ejemplo 1. Las secuencias primarias de las variantes permanecen iguales independientemente de qué sistema de expresión se utilice.

Se utiliza un instrumento Biacore® 2000 para medir las cinéticas de unión de GDNFv a los receptores de la familia GDNF humano y de rata (GFR α 1 y GFR α 2). Se realizan mediciones a 25 °C. Las muestras se disuelven en regulador HBS-EP (150 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, surfactante P-20 al 0,005 % (p/v), pH 7,4). Se inmoviliza la proteína A, *Staphylococcus aureus* en células de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM4 (GE Healthcare #BR-1005-39) en un nivel de ~200 unidades de respuesta (RU) utilizando química de acoplamiento de aminas para capturar la quimera GFR Fc (quimera R α -1 fc GDNF/GFR α -1 humana recombinante; quimera R α -2 Fc GDNF/GFR α -2 humana recombinante; quimera R α -1 Fc GDNF/GFR α -1 de rata recombinante; quimera R α -2 GDNF / GFR α -2) de ratón recombinante.

La unión se evalúa utilizando múltiples ciclos. Cada ciclo consiste de las siguientes etapas: 1) inyección de aproximadamente 10 μ L de GFR en una concentración de ~1,0 μ g/ml y un índice de fluidez de 10 μ L/min, dirigido a una captura de 120-150 RU; 2) inyección de 250 μ L de GDNFv en un índice de fluidez de 50 μ L/min., en un rango de concentración final entre 10 nM y 0,04 nM seguido por 20 min. para disociación; y 3) regeneración utilizando aproximadamente 30 μ L de 10 mM de clorhidrato de glicina, pH 1,5. Se evalúan los índices de asociación y disociación para cada ciclo utilizando un modelo de "unión 1:1 (Langmuir)" en el software BIAevaluation, versión 4.1.

Los resultados se muestran en las tablas 6-8 adelante.

Tabla 6. GDNFv: Cinéticas de Unión y Afinidad a GFR α -1 Humano

GDNFv	k_{On} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{Off} (s^{-1})	K_D (pM)
<i>E. Coli</i> -WT-GDNF ^a (SEQ ID NO:3)	$(6,0 \pm 2,3) \times 10^6$	$(3,5 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	64 ± 23
<i>E. Coli</i> - Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	$(4,2 \pm 1,3) \times 10^6$	$(1,7 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	44 ± 30
<i>E. coli</i> - Δ 31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	$(3,9 \pm 1,3) \times 10^6$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	47 ± 25
<i>E. Coli</i> - Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 12)	$(5,0 \pm 1,8) \times 10^6$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	35 ± 18
CHO- Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	$(3,8 \pm 1,5) \times 10^6$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	29 ± 17
CHO- Δ 31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	$(4,5 \pm 2,1) \times 10^6$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	30 ± 14
CHO- Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 12)	$(6,2 \pm 3,2) \times 10^6$	$(1,4 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	29 ± 15

^a Determinado en la presencia de 400 mM de NaCl.

Tabla 7. GDNFv: Cinéticas de Unión y Afinidad a GFR α -2 Humano.

GDNFv	k_{On} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{Off} (s^{-1})	K_D (pM)
<i>E. Coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO:3)	$2,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{-4}$	100
CHO- Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	$5,3 \times 10^6$	$2,5 \times 10^{-4}$	47
CHO- Δ 31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	$7,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^{-4}$	47
CHO- Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO:12)	$9,6 \times 10^6$	$4,2 \times 10^{-4}$	44

Tabla 8. Cinéticas de Unión y Afinidad de GDNFv a GFR α -1 de rata.

GDNFv	k_{On} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{Off} (s^{-1})	K_D (pM)
CHO- Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	$5,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^{-4}$	44
CHO- Δ 31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	$9,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^{-4}$	20
CHO- Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF(SEQ ID NO:12)	$9,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^{-4}$	21

Unión de variantes GDNF humano a GFR α 1 utilizando ELISA

Se prueba GDNF tipo silvestre variantes y en un ensayo ELISA, en el que se mide la unión de las proteínas GDNF al receptor unido a placa (GFR α 1). Se utiliza la condición "no GDNF" y/o una condición de "proteína irrelevante" como controles negativos.

Cada pozo de una placa de 96 pozos (placas ELISA Immunobind Greiner 655081) se recubren con 70 μ l de GFR α 1 humano (quimera GFR α 1-Fc humana recombinante, libre de portador) en 1 μ g/ml en regulador de carbonato, pH 9,6. Si se recubre un receptor irrelevante, es una quimera Fc irrelevante y se recubre en la misma concentración que el GFR α 1. Las placas se sellan y se incuban a 4°C durante la noche. Los pozos se aspiran y se lavan dos veces con regulador de lavado (20 mM Tris (hidroximetilo) aminometano, pH 7,4, NaCl 0,15M, Tween-20 al 0,1 %), utilizando un lavador de placas automático. Las placas se bloquean con 200 μ l de regulador de bloqueo por pozo (leche instantánea de clavel al 3 % en el anterior regulador de lavado) durante por lo menos 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces con regulador de lavado.

Las proteínas GDNF se diluyen en serie en regulador de bloqueo en un rango de concentración adecuado, normalmente empezando en 5 μ g/ml y diluyendo en serie 1:10. Se utiliza control no GDNF, que consiste en regulador de bloqueo solo. Se agrega 50 μ l de cada solución GDNF a pozos recubiertos con GFR α 1 por triplicado. Las placas se incuban durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Los pozos se lavan luego 3 veces con regulador de lavado.

Una alícuota de 50 μ l de anticuerpo GDNF antihumano biotinilado (R&D Systems, anticuerpo policlonal GDNF antihumano de cabra biotinilado, catálogo # BAF212) diluido hasta una concentración de 1 μ g/ml en regulador de bloqueo, se agrega a cada pozo y se incuba durante 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavan los pozos 3 veces con regulador de lavado.

Se agrega una alícuota de 50 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch, catálogo # 016-030-084), diluido 1:1.000 en regulador de bloqueo, a cada pozo y se incuba durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, se puede utilizar una dilución de 1:2.000, con un tiempo de incubación de 30-90 minutos. Luego se lavan los pozos 3 veces con regulador de lavado. Se agrega 50 μ l de sustrato cromogénico (es decir, sustrato OPD) a cada pozo y se deja desarrollar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. La reacción se detiene al agregar 100 μ l de HCl 1N a cada pozo. La absorbancia de los pozos se lee a 490 nm sobre un lector de placas a Molecular Devices SpectraMax250. El promedio de absorbancia para los pozos triplicados para cada condición se determina, y los valores resultantes se procesan para cálculo EC_{50} con software Graph Pad Prism para proporcionar un rango de confianza del 95 %. Aquellos rangos se resumen en la tabla 9 adelante.

•Unión de variantes GDNF humanas a heparina utilizando ELISA

Se prueba GDNF tipo silvestre y variantes en un ensayo ELISA, en el que se mide la unión de las proteínas GDNF a heparina unida a placas. Se utiliza una condición "no GDNF" como un control negativo.

Cada pozo de una placa de Unión de Heparina de 96 pozos (Placas de Unión de Heparina BD BioSciences, catálogo # 354676) con 70 μ l de heparina ((heparina de peso molecular mixto de Sigma, Sal de Sodio de Heparina de Mucosa Intestinal de Porcino, catálogo # H-3149) en 5 μ g/ml en PBS. Las placas se sellan e incuban a temperatura ambiente durante la noche, protegidas de la luz. Los pozos se aspiran y lavan tres veces con regulador de lavado utilizando un lavador de placas automático. Las placas se bloquean con 200 μ l de regulador de bloqueo por pozo durante 90-120 minutos a 37 °C (las placas se sellan durante esta incubación). Las placas se lavan dos veces con regulador de lavado.

Proteínas GDNF se diluyen en serie en regulador de bloqueo en un rango de concentración apropiado, normalmente empezando en 5 μ g/ml y diluyendo serialmente, 1:10. Se utiliza un control de "no GDNF", que consiste de solo regulador de bloqueo. Se agrega una alícuota de 50 μ l de cada solución de GDNF a pozos recubierto con heparina por triplicado. Las placas se incuban durante 1,5-2 horas a temperatura ambiente. Los pozos se lavan 3 veces con regulador de lavado.

Se agrega una alícuota de 50 µl de anticuerpo GDNF antihumano biotinilado, diluido a una concentración de 1 µg/ml en regulador de bloqueo, a cada pozo y se incuba durante 45 minutos hasta 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavan los pozos 3 veces con regulador de lavado.

- 5 Se agrega una alícuota de 50 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano, se diluye 1:1.000 en regulador de bloqueo, a cada pozo y se incuba durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Alternativamente, se puede utilizar una dilución 1:2.000, con un tiempo de incubación de 30-90 minutos. Los pozos se lavan luego 3 veces con regulador de lavado. Se agrega una alícuota de 50 µl de sustrato cromogénico (es decir, sustrato OPD) a cada pozo y se deja desarrollar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. La reacción se detiene al agregar 100 µl de HCl 1N a cada pozo. La absorbancia de los pozos se lee en 490 nm sobre un lector de placas. Se determina la absorbancia promedio para los pozos triplicados para cada condición, y los valores resultantes se procesan para cálculo EC₅₀ con el software Graph Pad Prism para proporcionar un rango de confianza de 95 %. Aquellos rangos se resumen en la tabla 9 adelante.

Tabla 9

Variantes	# de Experimentos (n)	Unión GFRα1, EC₅₀ rango de confianza de 95 %	# de Experimentos (n)	Unión a heparina, EC₅₀ rango de confianza del 95 %
<i>E. Coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO:3)	8	0,3 – 0,4 nM	10	0,2 – 0,4 nM
CHO Δ31 GDNF (SEQ ID NO:8)	14	0,3 – 0,6 nM	16	2,0 – 5,0 nM
CHO Δ31-N38Q-D95E GDNF (SEQ ID NO:9)	4	0,3 – 1,9 nM	3	19,8 – 41,3 nM
CHO Δ31-N38Q-K84A-R88KR90K-D95E GDNF (SEQ ID NO: 12)	5	No se puede determinar; no hay meseta máxima para 4 de 5 experimentos	5	No se puede determinar; no hay meseta máxima para 4 de 5 experimentos
CHO Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-K125E-R130E GDNF (SEQ ID NO:15)	1	Poca a ninguna unión vista mediante este ELISA	1	Poca a ninguna unión vista mediante este ELISA
*se hicieron 2 experimentos individuales, ningún compuesto				

- 15 Estos datos muestran que la eliminación de los 31 aminoácidos de terminal N (variante denominada “GDNF Δ31 de CHO”) del GDNF tipo silvestre (denominado “GDNF de E. Coli WT”) pueden reducir significativamente la unión a heparina (aproximadamente 10 veces) mientras que mantiene la unión del receptor GFRα1, y estos datos indican adicionalmente que una variedad de características de unión de receptor y heparina diferenciales se pueden alcanzar a través de variantes adicionales de GDNF humano.

20 **Ejemplo 4**

Actividades in vitro

•Ensayo de crecimiento de Neuritas NS-1

- 25 Se evalúa la actividad GDNF para diferenciación neuronal utilizando células Neuroscreen-1 de rata (subclon PC12). Las células se mantienen en medio basal F-12K, suero de caballo inactivado por calor al 12,5 %, suero bovino fetal inactivado por calor al 2,5 % (FBS), GlutaMAX™ 1X (Invitrogen, CAT. # 35050061) y anti-anti 1X (Invitrogen, Cat. #15240) a 37 °C, 95 % de humedad en frascos recubiertos con colágeno. Para medir el crecimiento de neuritas, se siembran células Neuroscreen-1 en placas de 96 pozos collagen I en 2.200 células por pozo en medio de cultivo utilizando solamente 60 pozos interiores. Después de 24 horas de adhesión celular, se retira el medio y el medio de

crecimiento nuevo que contiene GFR α 1-Fc en 1 μ g/ml más GDNF se diluye en una serie de dilución de 8 puntos se agrega a la placa en pozos triplicados, o seis pozos por concentración. Se incluye el medio más 1 μ g/ml de GFR α 1-Fc como un control negativo, y el medio más 25 ng/ml de factor de crecimiento de neurita se incluye como un control positivo para la respuesta celular en el ensayo. Las placas se incuban durante 96 horas a 37 °C, 95 % de humedad y se fijan luego al agregar 45 μ l de solución fijadora a cada pozo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavan dos veces con regulador de lavado 1X de Neurite Outgrowth Kit™ (Celómica, Cat. #K07-0001-1) y se lava luego dos veces con regulador 1X del kit. Las células se inmuno-tiñen con reactivos de crecimiento de neuritas del kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas se cargan en un Arrayscan Instrument y se analizan utilizando el software Arrayscan y el algoritmo Neuronal Profiling de Cellomics. Se procesan los datos generados mediante el algoritmo para el cálculo EC50 con el software Graph Pad Prism.

Se prueban múltiples variantes para actividad en diferenciación neuronal y se observan EC50 para cada variante que se enumera en la tabla 10A.

Table 10A. GDNFv: Crecimiento de Neuritas NS-1

GDNFv	Repeticiones	EC ₅₀ (rango de confianza del 95 %)
<i>E. Coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO:3)	3	33 - 200 pM
CHO- Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	17	42 - 82 pM
CHO- Δ 31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	5	47 - 227 pM
CHO- Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO:12)	5	52 - 384 pM
CHO- Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-K125E-R130E-GDNF (SEQ ID NO:15)	2	nd ^a

^a No determinado debido a su baja potencia o falla al alcanzar la meseta máxima.

Todas las muestras GDNF aquí han tenido actividad en el ensayo de crecimiento de neuritas, en grados variables. Las curvas de dosis para la variante Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-K125E-R130E no alcanzan una meseta en una dosis máxima en los dos experimentos realizados, de tal manera que no se puede calcular EC50. Los intervalos de confianza de 95 % de EC₅₀ para las otras cuatro variantes GDNF se superponen en rango, demostrando niveles de actividad similares en este ensayo.

• Fosforilación del Receptor C-ret

Se puede utilizar el ensayo de fosforilación del receptor c-Ret para demostrar la inducción de fosforilación del receptor c-Ret en la posición Y1016. Se evalúa la actividad GDNF para fosforilación del receptor c-Ret en células de la estirpe de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) que han sido transfectadas establemente para sobreexpresión del c-Ret humano. Las células se mantienen en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), FBS al 10 %, 3 μ g/ml de Blastidina. Para fosforilación c-Ret, las células se siembran en 5 x 10⁵ por pozo en placas recubiertas de colágeno de 24 pozos en medio de crecimiento sin Blastidina y se dejan unir durante la noche. El medio se cambia a DMEM bajo en glucosa + BSA al 0,25 % (albúmina de suero bovino) durante 24 horas. Se elimina el medio de inanición, y las células se tratan con GDNF en DMEM sin glucosa, BSA al 0,25 %, μ g/ml GFR α 1 Fc durante 30 minutos a 37 °C. Cada variante GDNF se prueba en múltiples concentraciones. El medio de tratamiento se retira, y las células se raspan de la superficie de la placa en regulador de lisis enfriado con hielo de reactivo de extracción M-Per + cóctel Inhibidor de Proteasa, Inhibidor Fosfatasa 1, cóctel Inhibidor de Fosfatasa 2, y cóctel Inhibidor de Fosfatasa 3 (Sigma™). Las suspensiones celulares se centrifugan para completar la lisis, se centrifugan a 14.000 x g para sedimentar residuos celulares, y se cuantifica el sobrenadante para determinar la concentración de proteínas utilizando reactivos de ensayo de ácido bicinonínico (BCA). Para cada lisato GDNF, 10 μ g de proteína se separan mediante geles NuPAGE® Novex® Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, cat. # NP0322) y se transfieren por transferencias PVDF. Se detecta tirosina 1016 Fosfo-Ret con anticuerpo policlonal de conejo y anticuerpo de cabra anti-conejo-HRP; y se detecta c-Ret con un anticuerpo monoclonal de ratón y un anticuerpo de cabra-anti-ratón-HRP. Las transferencias se desarrollan con reactivos Supersignal West Pico™ (Thermo Scientific, CAT. # 34081) y se exponen a películas de rayos x. Se prueban cinco variantes GDNF (WTE.coliGDNF CHO Δ 31 GDNF, CHO Δ 31-N38Q-D95E GDNF, GDNF Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E CHO y CHO Δ 31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-K125E-R130E GDNF) en DMEM sin glucosa, medio BSA al 0,25 % + 1 μ g/ml de GFR α 1-Fc para actividad de fosforilación c-Ret en cuatro concentraciones de 0,8, 2,0, 4,0, 10, 20, 50 y 100 ng/ml. También se prueba el medio solo, medio + μ g/ml GFR α 1-Fc, y medio 100 ng/ml de GDNF Δ 31 de CHO como controles negativos. Cada una de las cinco variantes GDNF inducen fosforilación con c-Ret con un EC₅₀ de 8-15 ng/ml. Estos

datos demuestran que todas las cinco variantes GDNF inducen fosforilación c-Ret en Y1016 en una forma dependiente de dosis.

- 5 Como se resume en la Tabla 10B, las variantes GDNF truncadas de terminal N-Δ31 diseñadas con ingeniería que muestran mejora significativa en propiedades biofísicas y bioquímicas (tablas 5, 6, 9, y 10A) conservan propiedades biológicas optimizadas, por ejemplo, en comparación con la unión del receptor GFRα1, reducen la unión a heparina, y el crecimiento de neuritas comparable, después de 4 semanas de incubación a 37 °C.

Tabla 10B: Comparación de Bioactividad de GDNF de *E. coli* WT y variantes de GDNF truncadas terminal N-Δ31 Después de 4 Semanas de Incubación a 37 °C con Relación a las muestras de 4 °C

	WT- <i>E. coli</i> GDNF (SEQ ID NO: 3)		CHO-Δ31- GDNFv (SEQ ID NO: 8)		CHO-Δ31-N38Q- D95E-GDNFv (SEQ ID NO: 9)		CHO-Δ31-N38Q- K84AR88K-R90K- D95EGDNFv (SEQ ID NO:12)	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
GFRα-1 (Biacore, K _d , pM)	64 ± 23	nc	29 ± 17	nc	30 ± 14	nc	29 ± 14	nc
GFRα-1 (ELISA, EC ₅₀ , nM)	0,4	nc	0,6	nc	0,8	nc	nd	nd
Heparina (ELISA, EC ₅₀ , nM)	0,3	0,4	2,7	5,1	18,0	nc	nd	nd
Crecimiento de Neuritas (rango EC ₅₀ , pM)	33-200	nc	42-82	nc	47-227	nc	52-384	na
No disponible (na); No determinado (nd); y sin cambio (nc)								

Ejemplo 5

Actividad de la variante GDNF en ensayos de recambio de DA

- 10 Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho utilizando isoflurano (3 % en O₂). Se afeita la cabeza y se esteriliza con solución de yodo antes que se posicione al animal en una estructura estereotáxica con una manta de temperatura controlada. Se protegen los ojos con gel oftálmico y se conserva la anestesia utilizando isoflurano (1-2 % en O₂).

- Se realiza una incisión en la línea media sobre la cabeza del animal, el cuero cabelludo y el tejido subyacente se retraen y se seca el cráneo para visualizar el bregma. Se miden las coordenadas para el núcleo caudado del bregma y la superficie dural para infusión de GDNF. Se desciende lentamente una cánula de infusión calibre 28 hasta esta posición, y empieza la infusión un minuto después utilizando una bomba. Se infunde un bolo de 2 μl del GDNF de prueba dentro del hemisferio izquierdo durante 4 minutos en 0,5 μl/min, y la cánula permanece en el lugar durante 3 minutos adicionales una vez termina la infusión. Después que se ha retirado la cánula se cierra el sitio de incisión, se administra un analgésico posoperatorio y se deja que se recupere el animal en una jaula a temperatura controlada antes de transferir a una jaula casera. Los animales se controlan posoperatoriamente de acuerdo con las directrices éticas locales. En un intervalo adecuado luego de la infusión, se sacrifica al animal, se retira el cerebro y se disecciona precisamente el núcleo caudado, se pesa y congela pendiente de análisis HPLC de metabolitos y dopamina. El tejido congelado se deja descongelar rápidamente y se homogeneiza en 0,5 ml de regulador de homogenización (ácido perclórico 0,1 M (PCA), 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 2,5 mg/L de ácido ascórbico) antes de centrifugación en 20.000 g durante 15 minutos. Se retira el sobrenadante y se filtra a través de un dispositivo de filtración sin jeringas. Se lleva a cabo análisis de dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) utilizando HPLC acoplado para detección electroquímica. Se inyecta una alícuota de 20 μl de cada muestra y se cuantifica contra una curva de calibración externa (LC4C, BAS, USA). La fase móvil consiste de 100 mm de NaH₂PO₄, 100 mm de H₃PO₄, 2 mm de OSA, 1mm de EDTA, metanol al 13 % (MeOH), pH 2,8 utilizando un Hypersil BDS (Base Deactivated Silica) (Thermo Scientific, Cat. # 28105) 150 x 3,0 mm C18 columna de partículas de 3μ a 40 °C. Se recolectan datos utilizando un software de cromatografía Empower. Se realiza ajuste logístico de 4 parámetros en todos los datos antes de expresión como tejido en peso húmedo ng/g. La
- 15
- 20
- 25
- 30

medición de recambio de dopamina se expresa como (DOPAC+HVA)/DA y se realizan comparaciones con hemisferio izquierdo (Tratado) versus hemisferio derecho (intacto).

Tabla 11

Variante	Recambio de dopamina	Recambio de dopamina
	<i>Tratado (izquierda)</i>	<i>Intacto (derecha)</i>
<i>E. coli</i> -WT GDNF (SEQ ID NO:3)	0,25 ± 0,025 ***	0,15 ± 0,008
CHO- Δ 31-GDNF (SEQ ID NO:8)	0,25 ± 0,016 ***	0,14 ± 0,006
CHO-Δ31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 9)	0,25 ± 0,018 ***	0,13 ± 0,007
CHO-Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E -GDNF (SEQ ID NO: 12)	0,20 ± 0,015 ***	0,13 ± 0,012
CHO-Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-K125E-R130EGDNF (SEQ ID NO:15)	0,19 ± 0,021 **	0,14 ± 0,011
Los valores son media ± e.e.m. n=5 por grupo ** p<0,01 o *** p<0,001 vs lado intacto		

- 5 Los datos demuestran que cada una de las variantes GDNF mencionadas en la tabla 11 aumentan significativamente el recambio de dopamina en el hemisferio tratado, en comparación con el hemisferio intacto.

Ejemplo 6

Ensayos in vivo

• Modelo de lesión retrógrada inducida por 6-Hidroxi dopamina (6-OHDA)

- 10 Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho utilizando isoflurano (3 % en O₂). Se afeita la cabeza y se esteriliza con solución de yodo antes que se posicione al animal sobre un marco estereotáxico con esterilla de temperatura controlada. Se protegen los ojos con gel oftálmico y se conserva la anestesia utilizando isoflurano (1-2 % en O₂).

- 15 Se hace una incisión en la línea media en la cabeza del animal, se retira el cuero cabelludo y el tejido subyacente y se seca el cráneo para visualizar el bregma. Se miden las coordenadas para el núcleo caudado desde el bregma y la superficie dural para infusión de 10 ug de 6-Hidroxidopamina (6-OHDA). Se baja lentamente la cánula de infusión del calibre 28 a esta posición y comienza la infusión 1 minuto después. Se infunde un bolo de 2 µl de 6-OHDA dentro del hemisferio izquierdo durante 4 minutos a 0,5 µl/min y la cánula permanece en el lugar durante 3 minutos adicionales una vez termina la infusión.

- 20 A 30 minutos después de la infusión de 6-OHDA se infunde el GDNF de prueba utilizando el mismo protocolo. Las coordenadas para la infusión GDNF son Anterior-Posterior + 1,0, LM-2,5, DV-4,5 mm desde el bregma y la superficie dural como se hizo anteriormente.

- 25 Una vez se ha retirado la cánula se cierra el sitio de incisión, se administra un analgésico posoperativo y se permite al animal recuperarse en una jaula de temperatura controlada antes de transferencia a una jaula doméstica. Los animales se controlan posoperativamente de acuerdo con las directrices de ética local. En un intervalo adecuado después de la infusión se sacrifica el animal, se extrae el cerebro y el núcleo y la substantia nigra disecados en forma precisa, pesados y congelados, pendiente análisis HPLC de dopamina y metabolitos.

- 30 El tejido congelado se deja descongelar rápidamente y se homogeneiza en 0,5 ml de regulador de homogenización (PCA 0,1 M, 0,1 mM de EDTA, 2,5 mg/L de ácido ascórbico) antes de centrifugación a 20.000 xg durante 15 minutos. El sobrenadante se retira y filtra a través de dispositivos de filtración sin jeringa. Se lleva a cabo análisis de dopamina (DA), DOPAC y HVA utilizando HPLC acoplado para detección electroquímica. Se inyecta una alícuota de 20 µl de cada muestra y se cuantifica contra una curva de calibración externa. La fase móvil consiste de 100 mM de NaH₂PO₄, H₃PO₄ de 100 mM, 2 mM OSA, 1 mM EDTA, MeOH al 13 %, pH 2,8 utilizando un BDS Hypersil 150 x 3,0 mm C18 columna de 3 µ de partícula a 40 °C. Los datos se recolectan utilizando software de cromatografía

Empower. Se realiza ajuste logístico de 4 parámetros en todos los datos antes de expresión como tejido pesado en húmedo ng/g. Se realizan comparaciones con el hemisferio izquierdo (Tratado) versus hemisferio derecho (intacto).

Tabla 12: núcleo caudado

Variante	Dopamina (ng/g)	Dopamina (ng/g)	% de agotamiento
	<i>Tratado (izquierda)</i>	<i>Intacto (derecha)</i>	
Vehículo	2617,59 ± 526,91 ***	14033,40 ± 408,75	81,35
<i>E.coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO:3)	2707,72 ± 725,92 ***	14805,36 ± 536,71	81,71
CHO-Δ31-GDNF (SEQ ID NO:8)	2023,86 ± 818,03 ***	14456,09 ± 691,53	86,00
CHO-Δ31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO:9)	2676,57 ± 558,37 ***	14986,15 ± 931,85	82,14
CHO-Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 12)	3112,14 ± 717,45 ***	13730,74 ± 1238,50	77, 33
Los valores son media ± e.e.m. n=8 por grupo ***p<0,001 vs lado intacto			

5

Tabla 13: Sustancia Negra

Variante	Dopamina (ng/g)	Dopamina (ng/g)	% de agotamiento
	<i>Tratado (izquierdo)</i>	<i>Intacto (derecho)</i>	
Vehículo	571,33 ± 90,65 ***	990,73 ± 134,48	42,33
<i>E.Coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO: 3)	836,51 ± 97,15 ** #	1167,38 ± 62,07	28,34
CHO-Δ31-GDNF (SEQ ID NO: 8)	856,48 ± 75,45 ** #	1160,82 ± 100,56	26,22
CHO-Δ31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 9)	903,68 ± 52,60 * #	1152,24 ± 115,61	21,57
CHO-Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E -GDNF (SEQ ID NO: 12)	970,06 ± 108,05 ##	1174,45 ± 134,94	17,40
Lo valores son media ± e.e.m. n=8 por grupo *p<0,05, ** p< 0,01 o *** p<0,001 vs lado intacto # p<0,05, ## p<0,01 vs vehículo (lado tratado)			

La administración de 6-OHDA en el núcleo caudado resulta en una reducción significativa en los niveles de dopamina en el lado tratado en comparación con el lado intacto (tabla 12). También se observa un déficit significativo en la sustancia negra (Tabla 13), que se evita mediante la administración de GDNF. Todas las variantes de GDNF probadas aquí son significativamente diferentes del vehículo, en comparación con los lados tratados.

5 • Biodistribución aguda en cerebro de ratas

Se anestesian ratas Sprague-Dawley macho utilizando isoflurano (3 % en O₂). Se afeita la cabeza y se esteriliza con solución de yodo antes que el animal se posicione sobre un marco estereotáxico con esterilla de temperatura controlada. Los ojos se protegen con gel oftálmico y se mantiene la anestesia utilizando isoflurano (1-2 % en O₂).

- 10 Se realiza una incisión en la línea media sobre la cabeza del animal, se retira el cuero cabelludo y el tejido subyacente y se seca el cráneo para visualizar el bregma. Las coordenadas del núcleo caudado se miden desde el bregma y la superficie dural para infusión de GDNF (Anterior-Posterior + 0,5, Lateral Medial -3,0, DorsalVentral-5,5 mm). Se baja lentamente una cánula de infusión calibre 30 hasta esta posición, y comienza la infusión 1 minuto después (utilizando una bomba). Se infunde un bolo de 2 µl del GDNF de prueba en el hemisferio izquierdo durante 4 minutos a 0,5 µl/min, y la cánula permanece en el lugar durante 3 minutos adicionales una vez termina la infusión.
- 15 Una vez se ha retirado la cánula se cierra el sitio de incisión, se administra un analgésico posoperativo, luego se deja recuperar al animal en una jaula de temperatura controlada. En un intervalo adecuado después de infusión, se sacrifica el animal y se extrae el cerebro y congela pendiente de crio seccionamiento para inmunohistoquímica.

• Inmunohistoquímica GDNF (IHC) en cerebro de rata

- 20 Se prueba la biodistribución de GDNF infundido en un ensayo de inmunohistoquímica, en el que se mide la unión del anticuerpo al antígeno infundido (GDNF y variantes de GDNF) en cerebros de rata. Se utiliza un anticuerpo de control de isotipo como un control negativo.

- 25 El crio-seccionamiento de los cerebros de rata congelados comienza con el recorte del cerebelo mientras está dentro de un criostato a -20 grados C, utilizando una matriz de cerebro de rata para hacer una superficie plana. Optimal cutting Temperature™ (OCT, Sakura u otros vendedores similares) se coloca sobre un portaobjetos de criostato enfriado. Cuando el OCT empieza a congelar, la superficie plana del caudado del cerebro de rata se coloca sobre el portaobjetos utilizando fórceps a -20 grados C, de tal manera que el OCT vire el cerebro en su lugar con el cerebro rostral orientado lejos del portamuestras. El portamuestras se coloca en el portaobjetos y se ajusta. Después de que se ha insertado una cuchilla de micrótopo en el portacuchillas, la función de corte en el criostato se utiliza para descartar el bulbo olfatorio, así como el cerebro, rostralmente a la pista de infusión. Se toman secciones de 8µm de espesor a intervalos de 300 µm y se colocan en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Se colocan dos a tres secciones de intervalos adyacentes en cada portaobjeto de vidrio para cada cerebro de rata. Luego se colocan los portaobjetos en paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente durante 20 minutos y se enjuaga en regulador de lavado tween-20 de solución salina tris regulada (TBST). Utilizando una solución de tinción a temperatura ambiente, se incuban los portaobjetos durante 10 minutos con un bloque de enzima endógena Dual, enjuagada con regulador de lavado TBST, se incuba durante 15 minutos cada uno del bloque avidina y biotina, se lava con regulador de lavado TBST, se bloquea con bloque de proteína durante 60 minutos y se sopla el portaobjetos utilizando una cuchilla de aire. El GDNF anti humano biotinilado o un IgG de cabra biotinilado se diluye en Diluyente de Anticuerpo con agentes de reducción de fondo hasta 2 µg/ml y se incuba en el portaobjetos durante 60 minutos, luego se enjuaga con regulador de lavado TBST 3 veces. Los portaobjetos se incuban con biotina 2 estreptavidina etiquetada (LSAB2) (Dako, CAT. # K0609) durante 10 minutos y se enjuaga con regulador de lavado TBST. Los portaobjetos se incuban con DAB+ (2 gotas de DAB en diluyente DAB durante 5 minutos, luego se enjuagan con regulador de lavado TBST, seguido por un enjuague con agua destilada. Después se retiran los portaobjetos del sistema de tinción automática luego se contratiñen con Hematoxylin™ y se cubren con Cytoseal XYL™ (Stephens Scientific, CAT # 8312-4). Se dejan secar y luego se analizan utilizando Aperio XT para cuantificar la biodistribución.

45 • Cuantificación de biodistribución de GDNF en cerebro de rata

Se adquieren imágenes de portaobjetos en la configuración de magnificación 20X en un Aperio ScanScope XT (que ejecuta v10.00.00.1805 del software del controlador). Los metadatos acerca del portaobjetos se almacenan en el software basado en red de Aperio, Spectrum (v10.0.1346.1806).

- 50 Cada sección de cerebro se subraya manualmente utilizando el software de visor de imagen de Aperio, ImageScope (v10.0.36.1805). Para el primer estudio, la sección de cerebro completa con la última cantidad de artefacto de seccionamiento visible se subraya. Para el segundo estudio, la sección de cerebro completa más cercana a la etiqueta de portaobjetos se subraya. Cada región subrayada se analiza utilizando el algoritmo "Conteo de Píxel Positivo" de Aperio (v9) [con todos los parámetros mantenidos en su configuración predeterminada, excepto Image Zoom =,01 y Umbral de Intensidad DÉBIL (Límite Superior) = 235].

- 55 El área de distribución GDNF en mm² para cada rata se calcula al sumar las áreas positiva y positiva fuerte generadas del algoritmo de píxel positivo. Se utiliza la prueba t de Student pareada para determinar la significancia estadística.

Table 14. GDNFv: Biodistribución de Cerebro de Rata

GDNFv	Promedio de Área de Distribución (mm ²)
<i>E. Coli</i> -WT-GDNF (SEQ ID NO: 3)	7,05 ± 2,92 Experimento 1 9,16 ± 4,19 Experimento 2
CHO-Δ31-GDNF (SEQ ID NO: 8)	16,07 ± 5,69* Experimento 1 20,88 ± 6,56** Experimento 2
CHO-Δ31-N38Q-D95E-GDNF (SEQ ID NO: 9)	17,91 ± 1,47** Experimento 2
CHO-Δ31-N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E-GDNF (SEQ ID NO:12)	20,86 ± 3,54** Experimento 2
Vehículo (PBS, control negativo)	0,41 ± 0,25 Experimento 1
IgG (control negativo)	0,01 ± 0,03 Experimento 1

*Para Δ 31, $p < 0,003$ con respecto al vehículo, IgG y *E.coli*-WT-GDNF,

**Estadísticamente significativo con respecto a *E. coli* WT-GDNF, $p < 0,05$

5 Los datos ELISA en unión a heparina (Tabla 9) demuestran que las modificaciones al GDNF tipo silvestre pueden reducir la Unión a heparina en comparación con GDNF de *E.coli*-WT. Estos datos, junto con los datos de biodistribución mostrados anteriormente en la tabla 14, confirman que las variantes que reducen la Unión a heparina pueden resultar en un aumento en la biodistribución en el cerebro de rata. N38Q-D95E y variantes N38Q-K84A-R88K-R90K-D95E enumeradas en la tabla anterior tienen aumento de biodistribución en comparación con GDNF de *E.coli*-WT.

10 Las variantes GDNF novedosas de la presente invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas mediante una variedad de rutas. Más preferiblemente, dichas variantes GDNF son para administración parenteral o intracraneal. Dichas composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et. al., eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995).

15 Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de la variante GDNF novedosa de la presente invención necesaria para impartir un beneficio terapéutico al paciente. Se entenderá que la cantidad de variante GDNF actualmente administrada será administrada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, que incluyen la afección que se va a tratar, la ruta de administración seleccionada, el principio activo actual administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la severidad de los síntomas del paciente.

Lista de secuencias

20 <SEQ ID No: 1; PRT1; Homo sapiens>

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMP
EDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGR
RGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL
SRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI

<SEQ ID No: 2; ADN; Homo sapiens>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTTTCCCACTGCCAGCCGGCAAGAGACCCCCAGAGGCCCCAGCCGAGGA
CAGAAGCCTGGGCAGGCGGAGGGCCCCATTTCGCCCTGAGCAGCGACAGCAAC
ATGCCAGAGGACTACCCCGACCAGTTTCGACGACGTCATGGACTTCATCCAGG
CCACCATCAAGAGGCTGAAGAGGTCACCCGACAAGCAGATGGCCGTGCTGCC
CAGGCGGGAGAGGAACAGGCAGGCCGCCGCCGCCAACCCAGAGAATTCCAG
GGGCAAGGGCAGAAGGGGTCAACGGGGCAAGAACAGGGGGCTGCGTGCTGAC
CGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAG
GAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCT
ACGACAAGATCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCTGGTCTCCGACAA
GGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTC
CTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGAT
GCGGCTGCATC

<SEQ ID No: 3; PRT1; Homo sapiens>

SPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDL
GLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFD
DDLFLDDNLVYHILRKHSKRRCGI

5 <SEQ ID NO: 4; PRT1; Homo sapiens> MKLWDVAVCLVLLHTASA

<SEQ ID NO: 5; PRT1; Homo sapiens>

FPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDYDPDQFDDVMDFIQATIKRL
KR

<SEQ ID NO: 6; DNA; Cebador> TATACATATGCGTGGACAACGTGGTAAAAACCGTGGTTGTGTGCTG

<SEQ ID NO: 7; DNA; Cebador> GGTGCTCGAGTTATTAAATGCAGCCGCAACGTTTCGCGCT

10 <SEQ ID No: 8; PRT1; Homo sapiens>

RGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL
SRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDLFLDDNLVYHILRKHSKRRCGI

<SEQ ID No: 9; PRT1; Secuencia Artificial>

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL
SRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLFLDDNLVYHILRKHSKRRCGI

<SEQ ID No: 10; ADN; Secuencia Artificial >

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTTTCCCACTGCCAGCCGGCAAGAGACCCCCAGAGGCCCCAGCCGAGGA
CAGAAGCCTGGGCAGGCGGAGGGCCCCATTTCGCCCTGAGCAGCGACAGCAAC
ATGCCAGAGGACTACCCCGACCAGTTTCGACGACGTCATGGACTTCATCCAGG
CCACCATCAAGAGGCTGAAGAGGTCACCCGACAAGCAGATGGCCGTGCTGCC
CAGGCGGGAGAGGAACAGGCAGGCCGCCGCCGCCAACCCAGAGAATTCCAG
GGGCAAGGGCAGAAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGGGCTGCGTGCTGAC
CGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAG
GAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCT
ACGACAAGATCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCTGGTCTCCGAGA
AGGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTT
CCTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGA
TGCGGCTGCATC

15

<SEQ ID No: 11; PRT1; Secuencia Artificial >

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMP
EDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENS RGKGR
RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNL
SRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI

<SEQ ID No: 12; PRT1; Secuencia Artificial >

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI

<SEQ ID No: 13; ADN; Secuencia Artificial>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTTTCCCACTGCCAGCCGGCAAGAGACCCCCAGAGGCCCCAGCCGAGGA
CAGAAGCCTGGGCAGGCGGAGGGGCCCCATTTCGCCCTGAGCAGCGACAGCAAC
ATGCCAGAGGACTACCCCGACCAGTTCGACGACGTCATGGACTTCATCCAGG
CCACCATCAAGAGGCTGAAGAGGTCACCCGACAAGCAGATGGCCGTGCTGCC
CAGGCGGGAGAGGAACAGGCAGGCCGCGCCGCCAACCAGAGAATTCCAG
GGGCAAGGGCAGAAGGGGTCAACGGGGGCAAGCAGAGGGGGCTGCGTGCTGAC
CGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAG
GAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCGGAGACCACCT
ACGACAAGATCCTGGCCAACCTGAGCAAGAACAAGCGGCTGGTCTCCGAGAA
GGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTC
CTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGAT
GCGGCTGCATC

5

<SEQ ID No: 14; PRT1; Secuencia Artificial>

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMP
EDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENS RGKGR
RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI

<SEQ ID No: 15; PRT1; Secuencia Artificial>

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILREHSAKECGCI

10

<SEQ ID No: 16; ADN; Secuencia Artificial>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTTTCCCACTGCCAGCCGGCAAGAGACCCCCAGAGGCCCCAGCCGAGGA
CAGAAGCCTGGGCAGGCGGAGGGGCCCCATTTCGCCCTGAGCAGCGACAGCAAC
ATGCCAGAGGACTACCCCGACCAGTTCGACGACGTCATGGACTTCATCCAGG
CCACCATCAAGAGGCTGAAGAGGTCACCCGACAAGCAGATGGCCGTGCTGCC
CAGGCGGGAGAGGAACAGGCAGGCCGCGCCGCCAACCAGAGAATTCCAG
GGGCAAGGGCAGAAGGGGTCAACGGGGGCAAGCAGAGGGGGCTGCGTGCTGAC
CGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAG
GAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCGGAGACCACCT
ACGACAAGATCCTGGCCAACCTGAGCAAGAACAAGCGGCTGGTCTCCGAGAA
GGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTC
CTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGGAGCACAGCGCCAAGGAGT
GCGGCTGCATC

<SEQ ID No: 17; PRT1; Secuencia Artificial>

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMP
EDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGR
RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANL
SKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVYHILREHSAKECGCI

<SEQ ID No: 18; ADN; Homo sapiens>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCT

SEQ ID No: 19; ADN; Secuencia Artificial>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGGCTGCGTGCTGACCGCCATCCA
CCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAGGAGCTGATC
TTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCTACGACAAGA
TCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCTGGTCTCCGAGAAGGTGGGCCA
GGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTCCTGGACGAC
AACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGATGCGGCTGCA
TC

5

<SEQ ID No: 20; PRT1; Secuencia Artificial>

MKLWDVVAVCLVLLHTASARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVY
HILRKHSKRRCGI

<SEQ ID No: 21; ADN; Secuencia Artificial>

ATGAAGCTGTGGGACGTGGTGGCCGTGTGCCTGGTGCTGCTGCACACCGCCA
GCGCTAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGGCTGCGTGCTGACCGCCATCCA
CCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAGGAGCTGATC
TTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCTACGACAAGA
TCCTGGCCAACCTGAGCAAGAACAAGCGGCTGGTCTCCGAGAAGGTGGGCCA
GGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTCCTGGACGAC
AACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGATGCGGCTGCA
TC

10

<SEQ ID No: 22; PRT1; Secuencia Artificial>

MKLWDVVAVCLVLLHTASARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVY
HILRKHSKRRCGI

<SEQ ID No: 23; PRT1; Secuencia Artificial>

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄
NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDLNFLDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAXaa₁₃₀
CGCI,

En la que:

15

- i) Xaa₈₄ es K o A;
- ii) Xaa₈₈ es R o K;
- iii) Xaa₉₀ es R o K;
- iv) Xaa₁₂₅ es K o E; y

v) Xaa₁₃₀ es R o E.

<SEQ ID No: 24; PRT1; Secuencia Artificial>

MKLWDVVAVCLVLLHTASARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSE
LDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI

En la que:

5 i) Xaa₈₄ es K o A;

ii) Xaa₈₈ es R o K;

iii) Xaa₉₀ es R o K;

iv) Xaa₁₂₅ es K o E; y

v) Xaa₁₃₀ es R o E.

10 <SEQ ID No: 25; PRT1; Mus musculus> METDTLLLWVLLWVPGSTG

<SEQ ID No: 26; ADN; Mus musculus>

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGATC
TACCGGT

<SEQ ID No: 27; ADN; Secuencia Artificial>

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGATC
TACCGGTAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGGCTGCGTGCTGACCGCCATC
CACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAGGAGCTGA
TCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCTACGACAA
GATCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCTGGTCTCCGAGAAGGTGGGC
CAGGCCTGCTGCAGGCCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTCCTGGACG
ACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGATGCGGCTG
CATC

15 <SEQ ID No: 28; PRT1; Secuencia Artificial>

METDTLLLWVLLWVPGSTGRGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSEFLDDNLVY
HILRKHSAKRCGCI

<SEQ ID No: 29; ADN; Secuencia Artificial>

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGATC
TACCGGTAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGGCTGCGTGCTGACCGCCATC
CACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTACGAGACCAAGGAGGAGCTGA
TCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCGCCGAGACCACCTACGACAA
GATCCTGGCCAACCTGAGCAAGAACAAGCGGCTGGTCTCCGAGAAGGTGGGC
CAGGCCTGCTGCAGGCCCCATCGCCTTCGACGACGACCTGAGCTTCCTGGACG
ACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACAGCGCCAAGAGATGCGGCTG
CATC

<SEQ ID No: 30; PRT1; Secuencia Artificial>

METDTLLLWVLLWVPGSTGRGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSEFLDDNLVY
HILRKHSAKRCGCI

20

<SEQ ID No: 31; PRT1; Secuencia Artificial>

METDTLLLWVLLLWVPGSTGRGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIF
RYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSE
LDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI

En la que:

i) Xaa₈₄ es K o A;

5 ii) Xaa₈₈ es R o K;

iii) Xaa₉₀ es R o K;

iv) Xaa₁₂₅ es K o E; y

v) Xaa₁₃₀ es R o E.

<SEQ ID No: 32; PRT1; Homo sapiens> MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSA

10 <SEQ ID No: 33; ADN; Homo sapiens>

ATGGCTACCGGCAGCAGGACCTCTCTGCTGCTGGCCTTCGGCCTGCTGTGCCT
GCCCTGGCTGCAGGAAGGCAGCGCCAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGG

<SEQ ID No: 34; ADN; Secuencia Artificial>

ATGGCTACCGGCAGCAGGACCTCTCTGCTGCTGGCCTTCGGCCTGCTGTGCCT
GCCCTGGCTGCAGGAAGGCAGCGCCAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGG
CTGCGTGCTGACCGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTAC
GAGACCAAGGAGGAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCG
CCGAGACCACCTACGACAAGATCCTGAAGAACCTGAGCAGGAACAGGCGGCT
GGTCTCCGAGAAGGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGAC
GACCTGAGCTTCCTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACA
GCGCCAAGAGATGCGGCTGCATC

<SEQ ID No: 35; PRT1; Secuencia Artificial>

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYET
KEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSE
15 DNLVYHILRKHSARKCGCI

<SEQ ID No: 36; ADN; Secuencia Artificial>

ATGGCTACCGGCAGCAGGACCTCTCTGCTGCTGGCCTTCGGCCTGCTGTGCCT
GCCCTGGCTGCAGGAAGGCAGCGCCAGGGGTCAACGGGGCAAGCAGAGGGG
CTGCGTGCTGACCGCCATCCACCTGAACGTGACCGACCTGGGCCTGGGCTAC
GAGACCAAGGAGGAGCTGATCTTCAGGTACTGCAGCGGCAGCTGCGACGCCG
CCGAGACCACCTACGACAAGATCCTGGCCAACCTGAGCAAGAACAAGCGGCT
GGTCTCCGAGAAGGTGGGCCAGGCCTGCTGCAGGCCCATCGCCTTCGACGAC
GACCTGAGCTTCCTGGACGACAACCTGGTGTACCACATCCTGAGGAAGCACA
GCGCCAAGAGATGCGGCTGCATC

<SEQ ID No: 37; PRT1; Secuencia Artificial>

MATGSRTSLLAFGLLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYET
KEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSE
20 DNLVYHILRKHSARKCGCI

<SEQ ID No: 38; PRT1; Secuencia Artificial>

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYET
KEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILXaa₈₄NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAF
DDDLSFLDDNLVYHILRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI

En la que:

i) Xaa₈₄ es K o A;

ii) Xaa₈₈ es R o K;

5 iii) Xaa₉₀ es R o K;

iv) Xaa₁₂₅ es K o E; y

v) Xaa₁₃₀ es R o E.

<SEQ ID NO: 39; DNA; Cebador> TATACATATGCGTGGACAACGTGGTAAACAACGTGGTTGTGTGCTG

<SEQ ID NO: 40; DNA; Cebador> GGTGCTCGAGTTATTAAATGCAGCCGCAACGTTTCGCGCT

10 <SEQ ID NO: 41; DNA; Cebador> GTCTGGTGAGCGAGAAAGTGGGTCAG

<SEQ ID NO: 42; DNA; Cebador> CTGACCCACTTTCTCGCTCACCAGAC

<SEQ ID No: 43; ADN; Cebador>

CCTATGATAAAATCCTGGCAAACCTGAGCAAGAACAACGTCTGGTGAGCGA
GAAAG

<SEQ ID No: 44; ADN; Cebador>

15 CTTTCTCGCTCACCAGACGTTTGTCTTGCTCAGGTTTGCCAGGATTTTATCAT
AGG

SEQ ID NO: 1: AA - GDNF Humano tipo silvestre de longitud completa

SEQ ID NO: 2: ADN - GDNF Humano tipo silvestre de longitud completa

SEQ ID NO: 3: AA - GDNF tipo silvestre Maduro Humano

SEQ ID NO: 4: AA - péptido de señal de secreción natural GDNF Humano

20 SEQ ID NO: 5: AA - Pro-dominio GDNF Humano

SEQ ID NO: 6: ADN - Δ31- cebador for

SEQ ID NO: 7: DNA - Δ31- cebador rev

SEQ ID NO: 8: AA - GDNF Variante 1: Delta-31

SEQ ID NO: 9: AA - GDNF variante 2: proteína (103aa) Δ31+N38Q+D95E (clon D9)

25 SEQ ID NO: 10: secuencia de construcción de ADN - variante GDNF 2: Δ31+N38Q+D95E (clon D9) ADN
(pEE12.4) SEQ ID NO: 11: AA - Variante GDNF 2: Δ31+N38Q+D95E (clon D9) construcción de proteína (211aa).

SEQ ID NO: 12: AA - Variante GDNF 3: Δ31+N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E (clon F2.1) Secuencia de proteína
(103aa) SEQ ID NO: 13: Secuencia de construcción de ADN-Variante GDNF 3: Δ31 + N38Q+K84A-R88K-R90K-
D95E (clon F2.1) Secuencia de ADN

30 SEQ ID NO: 14: AA - Variante GDNF 3: Δ31+N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E (clon F2.1) construcción de proteína
(211aa)

SEQ ID NO: 15: AA - Variante GDNF 4: Δ31+N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E + K125E + R130E (clon 4.3)
Secuencia de proteína (103aa):

35 SEQ ID NO: 16: Secuencia de construcción de ADN- Variante GDNF 4: Δ31 + N38Q+ K84A-R88K-R90K-D95E +
K125E + R130E (clon 4.3) Secuencia de ADN

SEQ ID NO: 17: AA - Variante GDNF 4: Δ 31 + N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E + K125E + R130E (clon 4.3) construcción de proteína

SEQ ID NO: 18: ADN - Péptido señal de secreción natural de GDNF Humano

SEQ ID NO: 19: ADN - Péptido Natural -Delta-31 Construcción N38Q+D95E

5 SEQ ID NO: 20: AA - Péptido Natural-Delta-31 N38Q+D95E (122aa):

SEQ ID NO: 21: ADN - Péptido Natural-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E

SEQ ID NO: 22: AA - Péptido Natural-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E (122aa):

SEQ ID NO: 23: AA - secuencia consensus de variantes

SEQ ID NO: 24: AA - Péptido Natural- secuencia consensus de variantes

10 SEQ ID NO: 25: AA – Péptido señal de Secreción Líder Kappa de Murino (MKL)

SEQ ID NO: 26: ADN - Péptido señal de secreción líder Kappa de Murinos (MKL)

SEQ ID NO: 27: ADN - Construcción MKL-Delta-31 N38Q+D95E

SEQ ID NO: 28: AA- MKL-Delta-31 N38Q+D95E (123aa):

SEQ ID NO: 29: ADN - Construcción MKL-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E

15 SEQ ID NO: 30: AA-MKL-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E (123aa):

SEQ ID NO: 31: AA-secuencia consensus líder de variantes Kappa de murinos

SEQ ID NO: 32: AA- Péptido señal de Secreción de Hormona de Crecimiento Humano (hGH)

SEQ ID NO: 33: ADN - Péptido señal de Secreción de Hormona de Crecimiento Humano (hGH)

SEQ ID NO: 34: ADN - Construcción hGH-Delta-31 N38Q+D95E

20 SEQ ID NO: 35: AA- hGH-Delta-31 N38Q+D95E (129aa):

SEQ ID NO: 36: DNA - Construcción hGH-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E

SEQ ID NO: 37: AA- hGH-Delta-31 N38Q+K84A-R88K-R90K-D95E (123aa):

SEQ ID NO: 38: AA-hGH-secuencia consensus de variantes

SEQ ID NO: 39: ADN - Cebador Δ 31-N38Q-for

25 SEQ ID NO: 40: ADN - Cebador Δ 31-N38Q-rev

SEQ ID NO: 41: ADN - Cebador Δ 31-N38Q-D95E-for

SEQ ID NO: 42: ADN - Cebador Δ 31-N38Q-D95E-rev

SEQ ID NO: 43: ADN - Cebador Δ 31-N38Q-KAKKE-for

SEQ ID NO: 44: ADN - Cebador Δ 331-N38Q-KAKKE-rev

30 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company

<120> Variantes de GDNF Humano

<130> X19073

35 <150> 61/474024

<151> 2011-04-11

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 656 020 T3

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

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

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln

165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 2

<211> 633

<212> ADN

ES 2 656 020 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgaagctgt gggacgtggt ggccgtgtgc ctggtgctgc tgcacaccgc cagcgctttc      60
ccactgccag ccggcaagag acccccagag gccccagccg aggacagaag cctgggcagg      120
cggaggggcc cattcgccct gagcagcgac agcaacatgc cagaggacta ccccgaccag      180
ttcgacgacg tcatggactt catccaggcc accatcaaga ggctgaagag gtcacccgac      240
aagcagatgg ccgtgctgcc caggcgggag aggaacaggc aggccgccgc cgccaacca      300
gagaattcca ggggcaaggg cagaaggggt caacggggca agaacagggg ctgctgctg      360
accgccatcc acctgaacgt gaccgacctg ggctgggct acgagaccaa ggaggagctg      420
atcttcaggt actgcagcgg cagctgcgac gccgccgaga ccacctacga caagatcctg      480
aagaacctga gcaggaacag gcggctggtc tccgacaagg tgggccaggc ctgctgcagg      540
cccatcgctt tcgacgacga cctgagcttc ctggacgaca acctggtgta ccacatcctg      600
aggaagcaca gcgccaagag atgcggctgc atc                                     633

```

<210> 3

5 <211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Ser Pro Asp Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
1          5          10          15

Gln Ala Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
          20          25          30

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu
35          40          45

```

Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
50 55 60

Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp
65 70 75 80

Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys
85 90 95

Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
100 105 110

Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
115 120 125

Lys Arg Cys Gly Cys Ile
130

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala

<210> 5

<211> 58

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser Ser Asp Ser
20 25 30

Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val Met Asp Phe
35 40 45

Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg
50 55

<210> 6

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 6

tatacatatg cgtggacaac gtggtaaaaa ccgtggtgt gtgctg 46

<210> 7

10 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 7

ggtgctcgag ttattaaatg cagccgcaac gtttcgcgt 40

<210> 8

<211> 103

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
1 5 10 15

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
20 25 30

Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
35 40 45

Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp
50 55 60

Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
65 70 75 80

Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
85 90 95

Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

<210> 9

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 9

ES 2 656 020 T3

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
1 5 10 15

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
20 25 30

Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
35 40 45

Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Glu
50 55 60

Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
65 70 75 80

Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
85 90 95

Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

<210> 10

<211> 309

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 10

```

aggggtcaac ggggcaagca gaggggctgc gtgctgaccg ccatccacct gaacgtgacc      60
gacctggggcc tgggctacga gaccaaggag gagctgatct tcaggtactg cagcggcagc      120
tgcgacgccg ccgagaccac ctacgacaag atcctgaaga acctgagcag gaacaggcgg      180
ctgggtctccg agaaggtggg ccaggcctgc tgcaggccca tcgccttoga cgacgacctg      240
agcttcctgg acgacaacct ggtgtaccac atcctgagga agcacagcgc caagagatgc      300
ggctgcatc                                     309

```

10 <210> 11

<211> 211

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 11

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

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

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln
165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 12

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
1 5 10 15

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
20 25 30

Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
35 40 45

Asp Lys Ile Leu Ala Asn Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu Val Ser Glu
50 55 60

Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
65 70 75 80

Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser
85 90 95

Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
100

<210> 13

5 <211> 633

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 13

```

atgaagctgt gggacgtggt ggccgtgtgc ctggtgctgc tgcacaccgc cagcgctttc      60
ccactgccag ccggcaagag acccccagag gcccagccg aggacagaag cctgggcagg      120
cggaggggccc cattcgccct gagcagcgac agcaacatgc cagaggacta ccccgaccag      180
ttcgacgacg tcatggactt catccaggcc accatcaaga ggctgaagag gtcacccgac      240
aagcagatgg ccgtgctgcc caggcgggag aggaacaggc aggccgccgc cgccaacca      300
gagaattcca ggggcaaggg cagaaggggt caacggggca agcagagggg ctgctgctg      360
accgccatcc acctgaacgt gaccgacctg ggcctgggct acgagaccaa ggaggagctg      420
atcttcaggt actgcagcg cagctgcgac gccgccgaga ccacctacga caagatcctg      480
gccaacctga gcaagaacaa gcggtggtc tccgagaagg tgggccaggc ctgctgcagg      540
cccatcgctt tcgacgacga cctgagcttc ctggacgaca acctggtgta ccacatcctg      600
aggaagcaca gcgccaagag atgcggctgc atc                                     633

```

<210> 14

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

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

Ala Asn Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln
165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 15

<211> 103

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 15

Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His
1 5 10 15

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu
20 25 30

Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr
35 40 45

Asp Lys Ile Leu Ala Asn Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu Val Ser Glu
50 55 60

Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu
65 70 75 80

Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Glu His Ser
85 90 95

Ala Lys Glu Cys Gly Cys Ile
100

<210> 16

5 <211> 633

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 16

atgaagctgt	gggacgtggt	ggccgtgtgc	ctggtgctgc	tgcacaccgc	cagcgctttc	60
ccactgccag	ccggcaagag	acccccagag	gccccagccg	aggacagaag	cctgggcagg	120
cggagggccc	cattcgccct	gagcagcgac	agcaacatgc	cagaggacta	ccccgaccag	180
ttcgacgacg	tcatggactt	catccaggcc	accatcaaga	ggctgaagag	gtcacccgac	240
aagcagatgg	ccgtgctgcc	caggcgggag	aggaacaggc	aggccgccgc	cgccaacca	300
gagaattcca	ggggcaaggg	cagaaggggt	caacggggca	agcagagggg	ctgcgtgctg	360

accgccatcc acctgaacgt gaccgacctg ggcctgggct acgagaccaa ggaggagctg	420
atcttcaggt actgcagcgg cagctgcgac gccgccgaga ccacctacga caagatcctg	480
gccaacctga gcaagaacaa gcggtctggtc tccgagaagg tgggccaggc ctgctgcagg	540
cccatcgctt tcgacgacga cctgagcttc ctggacgaca acctggtgta ccacatcctg	600
agggagcaca gcgccaagga gtgcggctgc atc	633

<210> 17

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 17

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

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

Ala Asn Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln

165

170

175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Glu His Ser Ala Lys Glu Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 18

<211> 57

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 18

atgaagctgt gggacgtggt ggccgtgtgc ctggtgctgc tgcacaccgc cagcgct 57

<210> 19

5 <211> 366

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 19

atgaagctgt gggacgtggt ggccgtgtgc ctggtgctgc tgcacaccgc cagcgctagg	60
gggtcaacggg gcaagcagag gggctgcgtg ctgaccgcca tccacctgaa cgtgaccgac	120
ctgggcctgg gctacgagac caaggaggag ctgatcttca ggtactgcag cggcagctgc	180
gacgccgccg agaccaccta cgacaagatc ctgaagaacc tgagcaggaa caggcggctg	240
gtctccgaga aggtgggcca ggcctgctgc aggcccatcg ccttcgacga cgacctgagc	300
ttcctggacg acaacctggt gtaccacatc ctgaggaagc acagcgcaa gagatgcggc	360
tgcatac	366

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 20

Met	Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Val	Ala	Val	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	His	Thr
1				5					10					15	

Ala Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr

ES 2 656 020 T3

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

<210> 21

<211> 366

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 21

atgaagctgt gggacgtggt ggccgtgtgc ctggtgctgc tgcacaccgc cagcgctagg	60
ggtcaacggg gcaagcagag gggctgctg ctgaccgcca tccacctgaa cgtgaccgac	120
ctgggcctgg gctacgagac caaggaggag ctgatcttca ggtactgcag cggcagctgc	180
gacgccgccg agaccaccta cgacaagatc ctggccaacc tgagcaagaa caagcggctg	240
gtctccgaga aggtgggcca ggctgctgc aggcccatcg ccttcgacga cgacctgagc	300
ttcctggacg acaacctggt gtaccacatc ctgaggaagc acagcgccaa gagatgcggc	360
tgcac	366

10 <210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 22

```

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
 1           5           10           15

Ala Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr
          20           25           30

Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys
          35           40           45

Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu
 50           55           60

Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Ala Asn Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu
65           70           75           80

Val Ser Glu Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp
          85           90           95

Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg
          100          105          110

Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
          115          120

```

<210> 23

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (53)..(53)

<223> Xaa en la posición 53 es Lys o Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (57)..(57)

<223> Xaa en la posición 57 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (59)..(59)

20 <223> Xaa en la posición 59 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (94)..(94)

<223> Xaa en la posición 94 es Lys o Glu

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (99)..(99)

<223> Xaa en la posición 99 es Arg o Glu

<400> 23

Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Gln	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala	Ile	His
1				5					10					15	

Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys	Glu	Glu	Leu
			20					25					30		

Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala	Glu	Thr	Thr	Tyr
		35					40					45			

Asp	Lys	Ile	Leu	Xaa	Asn	Leu	Ser	Xaa	Asn	Xaa	Arg	Leu	Val	Ser	Glu
	50					55					60				

Lys	Val	Gly	Gln	Ala	Cys	Cys	Arg	Pro	Ile	Ala	Phe	Asp	Asp	Asp	Leu
65					70					75					80

Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Val	Tyr	His	Ile	Leu	Arg	Xaa	His	Ser
				85					90					95	

Ala	Lys	Xaa	Cys	Gly	Cys	Ile
			100			

10

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (72)..(72)

20 <223> Xaa en la posición 72 es Lys o Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (76)..(76)

<223> Xaa en la posición 76 es arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

5 <222> (78)..(78)

<223> Xaa en la posición 78 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (113)..(113)

10 <223> Xaa en la posición 113 es Lys o Glu

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (118)..(118)

<223> Xaa en la posición 118 es Arg o Glu

15 <400> 24

Met	Lys	Leu	Trp	Asp	Val	Val	Ala	Val	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	His	Thr
1				5					10					15	

Ala	Ser	Ala	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Gln	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr
			20					25					30		

Ala	Ile	His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys
		35					40					45			

Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala	Glu
	50					55					60				

Thr	Thr	Tyr	Asp	Lys	Ile	Leu	Xaa	Asn	Leu	Ser	Xaa	Asn	Xaa	Arg	Leu
65					70					75				80	

Val	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Gln	Ala	Cys	Cys	Arg	Pro	Ile	Ala	Phe	Asp
			85						90					95	

Asp	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Val	Tyr	His	Ile	Leu	Arg
		100						105					110		

Xaa	His	Ser	Ala	Lys	Xaa	Cys	Gly	Cys	Ile
		115					120		

<210> 25

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 26

5 <211> 60

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 26

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atctaccggt 60

10 <210> 27

<211> 369

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 27

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atctaccggt	60
aggggtcaac ggggcaagca gaggggctgc gtgctgaccg ccatccacct gaacgtgacc	120
gacctgggcc tgggctacga gaccaaggag gagctgatct tcaggtactg cagcggcagc	180
tgcgacgccg ccgagaccac ctacgacaag atcctgaaga acctgagcag gaacaggcgg	240
ctgggtctccg agaaggtggg ccaggcctgc tgcaggccca tgccttcga cgacgacctg	300
agcttcctgg acgacaacct ggtgtaccac atcctgagga agcacagcgc caagagatgc	360
ggctgcac	369

<210> 28

<211> 123

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 28

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu
 20 25 30

Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr
 35 40 45

Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala
 50 55 60

Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe
 85 90 95

Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu
 100 105 110

Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 115 120

<210> 29

<211> 369

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 29

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg atctaccggt 60

aggggtcaac ggggcaagca gaggggctgc gtgctgaccg ccatccacct gaacgtgacc 120

gacctggggc tgggctacga gaccaaggag gagctgatct tcagggtactg cagcggcagc 180

tgcgacgccg ccgagaccac ctacgacaag atcctggcca acctgagcaa gaacaagcgg 240

ctgggtctccg agaaggtggg ccaggcctgc tgcaggccca tcgccttoga cgacgacctg 300

agcttcctgg acgacaacct ggtgtaccac atcctgagga agcacagcgc caagagatgc 360

ggctgcatc 369

10 <210> 30

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Arg Gly Gln Arg Gly Lys Gln Arg Gly Cys Val Leu
20 25 30

Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr
35 40 45

Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala
50 55 60

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

Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe
85 90 95

Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu
100 105 110

Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile

5 115 120

<210> 31

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (73)..(73)

15 <223> Xaa en la posición 73 es Lys o Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (77)..(77)

<223> Xaa en la posición 77 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (79)..(79)

5 <223> Xaa en la posición 79 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (114)..(114)

<223> Xaa en la posición 114 es Lys o Glu

10 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (119)..(119)

<223> Xaa en la posición 119 es Arg o Glu

<400> 31

Met	Glu	Thr	Asp	Thr	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Trp	Val	Pro
1				5				10					15		

Gly	Ser	Thr	Gly	Arg	Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Gln	Arg	Gly	Cys	Val	Leu
			20					25					30		

Thr	Ala	Ile	His	Leu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr
		35					40					45			

Lys	Glu	Glu	Leu	Ile	Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala
	50					55					60				

Glu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Lys	Ile	Leu	Xaa	Asn	Leu	Ser	Xaa	Asn	Xaa	Arg
65					70					75					80

Leu	Val	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Gln	Ala	Cys	Cys	Arg	Pro	Ile	Ala	Phe
				85					90					95	

Asp	Asp	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Asp	Asp	Asn	Leu	Val	Tyr	His	Ile	Leu
			100					105					110		

Arg	Xaa	His	Ser	Ala	Lys	Xaa	Cys	Gly	Cys	Ile
		115					120			

15

<210> 32

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 32

ES 2 656 020 T3

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 33

<211> 78

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

<211> 78

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 33

atggctaccg gcagcaggac ctctctgctg ctggccttcg gcctgctgtg cctgccctgg 60

ctgcaggaag gcagcgcc 78

<210> 34

<211> 387

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 34

atggctaccg gcagcaggac ctctctgctg ctggccttcg gcctgctgtg cctgccctgg 60

ctgcaggaag gcagcgccag gggtaaacgg ggcaagcaga ggggctgcgt gctgaccgcc 120

atccacctga acgtgaccga cctgggcctg ggctacgaga ccaaggagga gctgatcttc 180

aggtactgca gcggcagctg cgacgccgcc gagaccacct acgacaagat cctgaagaac 240

ctgagcagga acaggcggtt ggtctccgag aaggtgggcc aggcctgctg caggcccatc 300

gccttcgacg acgacctgag cttcctggac gacaacctgg tgtaccacat cctgaggaag 360

cacagcgcca agagatgcgg ctgcatc 387

20 <210> 35

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<400> 35

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

Ile

<210> 36

<211> 387

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 36

atggctaccg	gcagcaggac	ctctctgctg	ctggccttcg	gcctgctgtg	cctgccctgg		60
ctgcaggaag	gcagcgccag	gggtcaacgg	ggcaagcaga	ggggctgctg	gctgaccgcc		120
atccacctga	acgtgaccga	cctgggcctg	ggctacgaga	ccaaggagga	gctgatcttc		180
aggtactgca	gcggcagctg	cgacgcgcc	gagaccacct	acgacaagat	cctggccaac		240
ctgagcaaga	acaagcggt	ggtctccgag	aaggtgggcc	aggcctgctg	caggcccatc		300
gccttogacg	acgacctgag	cttctctggac	gacaacctgg	tgtaccacat	cctgaggaag		360
cacagcgcca	agagatgcgg	ctgcatac					387

10

<210> 37

<211> 129

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 37

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Lys
20 25 30

Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu
35 40 45

Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser
50 55 60

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

Leu Ser Lys Asn Lys Arg Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln Ala Cys
85 90 95

Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn
100 105 110

Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys
115 120 125

Ile

<210> 38

<211> 129

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (79)..(79)

<223> Xaa en la posición 79 es Lys o Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (83)..(83)

<223> Xaa en la posición 83 es Arg o Lys

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (85)..(85)

<223> Xaa en la posición 85 es Arg o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (120)..(120)

<223> Xaa en la posición 120 es Lys o Glu

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (125)..(125)

15 <223> Xaa en la posición 125 es Arg o Glu

<400> 38

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Lys
20 25 30

Gln Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu
35 40 45

Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser
50 55 60

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

Leu Ser Xaa Asn Xaa Arg Leu Val Ser Glu Lys Val Gly Gln Ala Cys
85 90 95

Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn
100 105 110

Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Xaa His Ser Ala Lys Xaa Cys Gly Cys
115 120 125

Ile

<210> 39

<211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Construcción sintética
 <400> 39
 tatacatatg cgtggacaac gtggtaaaca acgtggtgt gtgctg 46
 <210> 40
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 40
 15 ggtgctcgag ttattaaatg cagccgcaac gtttcgcgt 40
 <210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 41
 gtctggtgag cgagaaagtg ggtcag 26
 <210> 42
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30 <400> 42
 ctgaccact ttctgctca ccagac 26
 <210> 43
 <211> 57
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 43

cctatgataa aatcctggca aacctgagca agaacaaacg tctggtgagc gagaaag 57

<210> 44

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 44

10 ctttctcgct caccagacgt ttgtcttgc tcaggttgc caggatttta tcatagg 57

REIVINDICACIONES

1. Una variante GDNF humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 23:

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILXaa₈₄NLSXaa₈₈NXaa₉₀RLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHI
LRXaa₁₂₅HSAKXaa₁₃₀CGCI

en la que:

- 5 i) Xaa₈₄ es K o A;
- ii) Xaa₈₈ es R o K;
- iii) Xaa₉₀ es R o K;
- iv) Xaa₁₂₅ es K o E; y
- v) Xaa₁₃₀ es R o E.

10 2. La variante GDNF humana de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicha variante se selecciona del grupo que consiste en

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAK
RCGCI (SEQ ID NO: 9),

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAK

RCGCI (SEQ ID NO: 12),

y

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILREHSAK
ECGCI (SEQ ID NO: 15).

15 3. La variante GDNF humana de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que dicha variante es

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAK
RCGCI (SEQ. ID: 9).

4. La variante GDNF humana de acuerdo con la Reivindicación 2, en la el que dicha variante es

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYL
KILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDL SFLDDNLVYHILRKHSAK
RCGCI (SEQ ID NO: 12).

5. La variante GDNF humana de acuerdo con la Reivindicación 2, en la que dicha variante es

RGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYD
KILANLSKNKRLVSEKVGQACCRPIAFDDDLSFLDDNLVYHILREHSAK
ECGCI (SEQ ID NO: 15).

6. Un intermedio para preparar una variante GDNF truncada de terminal N-Δ31 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

METDTLLLWVLLLWVPGSTGRGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDLGLGYET
KEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACCRPIAFDD

5 DLSFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI (SEQ ID NO: 28);

y

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDL
GLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACC
RPIAFDDDLSFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI (SEQ ID NO: 35).

7. Un intermedio de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la secuencia de aminoácidos es

MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSARGQRGKQRGCVLTAIHLNVTDL
GLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSEKVGQACC
RPIAFDDDLSFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI (SEQ ID NO: 35).

10 8. Una composición farmacéutica que comprende una variante GDNF humana de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en un paciente humano.

15 10. Una variante GDNF humana de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, para su uso como un medicamento.

11. Una variante GDNF humana de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.