



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 205**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05817611 .6**
96 Fecha de presentación : **14.12.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1969003**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2008**

54 Título: **Usos de una proteína del factor neurotrófico.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2011

73 Titular/es: **LICENTIA Ltd.**
Tukholmankatu 8 A
00290 Helsinki, FI
HERMO PHARMA Ltd.

72 Inventor/es: **Lauren, Juha;**
Tuominen, Raimo;
Lindholm, Paivi;
Timmusk, Tonis y
Saarma, Mart

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 352 205 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).

1
DESCRIPCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de forma general al campo de la ingeniería genética y más particularmente a factores de crecimiento para neuronas, sobre todo para neuronas dopaminérgicas en el SNC (sistema nervioso central) y a genes del factor de crecimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El estudio de los mecanismos de regulación del destino neuronal tiene importancia para entender la determinación, la diferenciación y el mantenimiento de las neuronas. En segundo lugar, la identificación de reguladores extracelulares e intracelulares que son importantes en la determinación del fenotipo neuronal, ha atraído un interés considerable debido a su posible importancia terapéutica en el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas. El papel de las señales extracelulares en la determinación de la diversidad del sistema nervioso en vertebrados se ha estudiado de forma extensiva. Los factores secretados mejor caracterizados implicados en el control del desarrollo y en el sistema nervioso de adultos son las familias del factor de crecimiento nervioso (FCN, NGF por sus siglas en inglés "nerve growth factor") y el factor neurotrófico derivado de una línea celular gliar (GDNF, siglas en inglés) de los factores neurotróficos (revisado en Bibel y Barde, 2000, *Genes Dev* **14**:2919-2937; Airaksinen *et al.* 1999, *Mol Cell Neurosci* **13**:313-325; Airaksinen y Saarma, 2002, *Nat Rev Neurosci* 2002, **3**:383-394). Estos factores neurotróficos promueven la supervivencia, la diferenciación y el mantenimiento de poblaciones neuronales específicas en vertebrados. Posteriormente, se ha demostrado que tienen otras funciones importantes, incluyendo la regulación de la plasticidad sináptica dependiente de la actividad, la estimulación de la producción de neuritas y la protección y reparación de neuronas durante el daño de los tejidos.

El factor promotor de la supervivencia de neuronas dopaminérgicas MANF1 se describe en el documento WO 02/074956. MANF1 es un homólogo de MANF2 (es decir, SEQ ID NO:2) descrito en la presente invención.

El documento WO 02/079246 describe una proteína rica en arginina humana, que es un 100 % idéntica a la proteína según SEQ ID NO:2 de la presente invención. Se supone que existe una relación con el cáncer y los inventores proponen usos diagnósticos y terapéuticos de la proteína y la secuencia de ácido nucleico codificante.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe una nueva proteína del factor neurotrófico, MANF2 y una secuencia genética que codifica a la misma. La molécula será útil en el desarrollo de una variedad de agentes terapéuticos y diagnósticos útiles en el tratamiento, la profilaxis y/o el diagnóstico de afecciones dependientes de MANF2. La molécula de la presente invención es también un efector útil de neuronas primarias y centrales.

Recientemente, se ha identificado un nuevo factor neurotrófico humano, el factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálico (MANF1, denominado en este documento MANF1) y se ha demostrado que protege la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas embrionarias en cultivo (solicitud de patente WO0119851). MANF1 es una proteína secretada de 20 kD sin una homología significativa respecto a otras familias de proteínas conocidas. Las propiedades *in vitro* de MANF1 sugieren que pudiera ser usada para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y posiblemente, para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas. El amplio modelo de expresión de MANF1, sin embargo, (Shridhar *et al.*, 1996, *Oncogene* **12**:1931-1939) también sugiere que puede tener otras funciones aún no descubiertas fuera del sistema nervioso, y efectos en muchos tipos de células diferentes.

MANF1 es, por lo tanto, una molécula importante que la hace una diana potencialmente valiosa para la investigación en agentes terapéuticos, profilácticos y diagnósticos basados en MANF1 o sus actividades. Queda también una necesidad de identificar homólogos o, por otro lado, moléculas relacionadas para uso como una alternativa a MANF1 o junto con MANF1.

Con el trabajo que se ha llevado a cabo hasta el momento en la presente invención, los inventores han descubierto una nueva molécula llamada MANF2 que es un nuevo factor de crecimiento relacionado con MANF1.

En consecuencia, un aspecto preferido de la presente invención comprende una molécula proteica aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 de la FIGURA 7 o sus fragmentos funcionales.

En todavía otro aspecto preferido de la invención se proporciona la molécula en su forma recombinante.

La molécula aislada o recombinante de la presente invención puede estar glicosilada de forma natural o puede comprender un modelo de glicosilación

modificado según qué células se aíslen o sinteticen. Por ejemplo, de ser producida por medios recombinantes en organismos procariotas, la molécula no estaría glicosilada.

También se describen composiciones farmacéuticas del polipéptido de MANF2 opcionalmente formuladas. Las composiciones del polipéptido de la presente invención pueden comprender además a un vehículo aceptable, tal como un vehículo hidrófilo, p.ej., farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones son útiles en el tratamiento de condiciones dependientes de MANF2.

Un aspecto preferido son los anticuerpos que se unen específicamente a MANF2. Los anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales que no son inmunógenos en los seres humanos. Los anticuerpos preferidos se unen a MANF2 con una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-6} M, más preferentemente 10^{-7} M.

Además de lo anterior, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas, vectores de expresión y células huésped que codifican a MANF2 que pueden usarse en la producción recombinante de MANF2 según se describe en este documento. Las moléculas de ácido nucleico aisladas y los vectores son también útiles para preparar animales transgénicos no humanos y para aplicaciones de terapia génica para tratar a pacientes con defectos de MANF2.

La molécula MANF2 de la presente invención será útil en el desarrollo de una variedad de aplicaciones terapéuticas y/o diagnósticas simples o en combinación con otras moléculas tales como MANF1. La presente invención abarca, por lo tanto, a composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula de MANF2 o sus fragmentos funcionales junto con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables y/o diluyentes. Además, la presente invención abarca a vectores que comprenden la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO:1 de la FIGURA 7 y las células huésped que comprenden al mismo.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica la molécula de MANF2 descrita en este documento. Más particularmente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como la expuesta en SEQ ID NO:1 de la FIGURA 7.

Aunque puedan usarse otros métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o análisis de la presente invención, los métodos y materiales adecuados son los descritos a continuación. Los materiales, los métodos y los ejemplos son sólo ilustrativos y no se tiene pretende que sean restrictivos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1. **Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MANF2 y MANF1 en *Homo sapiens*.** El alineamiento fue generada con el programa ClustalX.

5 Los residuos de aminoácidos idénticos son marcados con asterisco; según las características fisicoquímicas de los residuos, la similitud alta está marcada con dos puntos dobles y de forma similar con un punto. Las secuencias señal están subrayadas. Los motivos de hélice alfa de la estructura secundaria son conservados entre MANF1 y MANF2 y se marcan por encima de las secuencias. También están
10 marcadas las ocho cisteínas conservadas (encuadradas).

FIGURA 2. **Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MANF2 en *Homo sapiens* y *Mus musculus*.** Para las explicaciones de los símbolos, véase la FIGURA 1.

FIGURA 3. **Alineamiento de secuencias de aminoácidos de MANF de organismos seleccionados.** Las secuencias fueron adquiridas realizando búsquedas Blast en el servidor de la página del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En algunos casos, la secuencia fue ensamblada a partir de la secuencia genómica y en algunos casos ensamblando el solapamiento de marcadores de secuencias expresadas.

20 FIGURA 4. **Dendrograma de proteínas de la familia de MANF de organismos seleccionados.**

FIGURA 5. **Análisis de la expresión de MANF2 humano en los diferentes tejidos analizados por RT-PCR.** Se usaron cebadores que amplificaban los genes de MANF2 humanos de cadena entera (h-MANF2-atg y h-MANF2-stop-del) en la PCR con la ADN polimerasa de Dynazyma (Finnzymes) y tampón de Dynazyma 10x. El volumen total de la reacción PCR fue 25 µl. Una temperatura de hibridación de 55 grados Celsius y un tiempo de extensión de 30 segundos fueron usados con 35 ciclos totales en la PCR. Se usaron en la FIGURA 5C los cebadores h-MANF2-atg y h-MANF2-int-as.

30 FIGURA 5A: **Bandas:** 1 glándula suprarrenal, 2 médula ósea, 3 cerebro fetal, 4 cerebro adulto, 5 cerebelo, 6 colon, 7 corazón, 8 riñón, 9 hígado fetal, 10 hígado adulto, 11 pulmón, 12 glándula mamaria, 13 músculo, 14 páncreas.

FIGURA 5B: **Bandas:** 1 placenta, 2 próstata, 3 glándula salival, 4 intestino delgado, 5 médula espinal, 6 bazo, 7 estómago, 8 testículo, 9 timo, 10 tiroides, 11
35 tráquea, 12 útero, 13 agua.

FIGURA 5C: **Bandas:** 1 hipocampo, 2 tálamo, 3 amígdala, 4 cuerpo caloso, 5 cerebelo, 6 núcleo caudal, 7 corteza, 8 sustancia negra, 9 cerebro fetal, 10 cerebro, 11 agua.

FIGURA 6. **Análisis de proteína recombinante de MANF2 en humano y ratón según se expresa en células COS7.** Fueron generados constructos de expresión que contienen genes de MANF2 de cadena entera humanos y de ratón con marcadores de hexahistidina del extremo carboxi-terminal y V5 clonando los cADN de codificantes cadena entera sin codones de parada en el vector de expresión de pcADN3.1 (Invitrogen). Las células Cos7 cultivadas en DMEM con FCS al 10 % y antibióticos fueron puestos en placas de 35 mm y se transfectaron con 4 µg del plásmido cuando crecieron hasta una confluencia de aproximadamente el 70 %. Los medios fueron sustituidos por medio sin suero 24 horas después de la transfección. Las células y los sobrenadantes fueron recogidos 72 horas después de la transfección. La proteína del gel SDS-PAGE desnaturalizante al 15 % se transfirió en la membrana de nilón, se bloqueó con BSA al 5 % en TBS-Tween (0,1 %) y se detectó con anticuerpo anti-V5 de ratón (dilución 1:5000) y anticuerpo secundario de inmunoglobulina antiratón de cabra conjugado con HRP (dilución 1:2000) usando el método ECL. **Banda 1** Células transfectadas con el vector de expresión que codifica el gen humano de MANF2, lisado de células; **Banda 2** Células transfectadas con el vector de expresión que codifica para células transfectadas del gen humano de MANF2, sobrenadante; **Banda 3** Células transfectadas con el vector de expresión que codifica para el gen de MANF2 de ratón, lisado de células; **Banda 4** Células transfectadas con el vector de expresión que codifica para el gen de MANF2 de ratón, sobrenadante.

FIGURA 7. **Secuencias de aminoácido y ácido nucleico de MANF2 en *Homo sapiens* y *Mus Musculus*.**

FIGURA 8. **Expresión de mRNA de MANF2 en cerebro de ratón P10 por hibridación *in situ*.** Se hibridaron secciones coronarias con sondas de cARN sentido (A, C) y antisentido (B, D, E, F) y se fotografiaron bajo campo oscuro y campo brillante. El mRNA de MANF2 se detectó principalmente en el tálamo y el hipocampo cuando se comparaba con los controles sentido. F, granos de plata localizados en el tálamo. En el cerebro postnatal y adulto, el modelo de expresión de mRNA de MANF2 es más restringido comparando con la expresión del mRNA de MANF1, y el nivel de expresión era más abajo que el de MANF1. Durante el desarrollo embrionario del ratón, el mRNA

de MANF2 no se expresaba en niveles detectables como se mide por hibridación *in situ*. CTX, corteza cerebral; Th, tálamo; Hc, hipocampo. Escala de medida 1 mm.

FIGURA 9 **Expresión del mRNA de MANF2 en seminiferous tubuli en testículo de ratón adulto como se detecta por hibridación *in situ*.** Las secciones se hibridaron con sondas de cARN sentido (A) y antisentido (B, C, D) y se fotografiaron bajo campo oscuro y campo brillante. Escala de medida 500 μm en A y B, 100 μm en C y D.

FIGURA 10. **La proteína MANF2 recombinante de células COS-7 promueve la supervivencia de neuronas del ganglio de raíz dorsal (DRG) de ratón E16 *in vitro*.** Los sobrenadantes de células COS-7 transitoriamente transfectadas con MANF2 de ratón en pcADN3.1 o MANF1 en pcADN3.1, o con GFP (pGreenLantern, Gibco) fueron recogidos y concentrados. Las proteínas MANF2 y MANF1 se aplicaron a cultivos neuronales a una concentración de 100 ng/ml. Las células se cultivaron durante 6 días, y se contaron las neuronas vivas.

Bandas: 1, NGF (100 ng/ml); 2, ningún factor añadió; 3, COS-7/GFP; 4, MANF1 de COS-7/ratón; 5, MANF2 de COS-7/ratón.

FIGURA 11. **La proteína MANF2 recombinante producida en células COS-7 promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas de rata E14 *in vitro*.** Los sobrenadantes de células COS-7 transitoriamente transfectados con MANF2 de ratón o humano en pcADN3.1, MANF1 de ratón o humano en pcADN3.1 o con GFP (pGreenLantern, Gibco) fueron recogidos y concentrados. Para probar la actividad promotora de la supervivencia, se aplicaron las proteínas MANF a cultivos de células de dopamina a una concentración de 100 ng/ml. El sobrenadante de células transfectadas con GFP y GDNF (100 ng/ml) fue usado como control negativo y positivo, respectivamente. Las células se cultivaron durante 6 días, se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-TH. Tanto el MANF2 de humano como el de ratón promovieron la supervivencia de neuronas dopaminérgicas tan eficazmente como el MANF1 de humano y ratón. Bandas en paneles A y B: 1, ningún factor añadió; 2, GDNF; 3, COS-7/GFP; 4, MANF1 de COS-7/humano; 5, MANF1 de COS-7/ratón; 6, MANF2 de COS-7/humano; 7, MANF2 de COS-7/ratón.

FIGURA 12. **La proteína de MANF2 recombinante producida en células Sf9 promueve la supervivencia de neuronas dopaminérgicas de ratón E13 *in vitro*.** Fue establecida la línea celular de Sf9 estable que secreta al MANF2 humano, y la proteína MANF2 fue purificada a partir de medio condicionado. Se cultivaron neuronas dopaminérgicas con o sin factores durante 6 días, se fijaron y se tiñeron con

anticuerpo anti-TH. El experimento fue repetido con resultados iguales. Bandas: 1, GDNF (10 ng/ml); 2, ningún factor añadió; 3, MANF2 (1000 ng/ml); 4, MANF1 (100 ng/ml).

5 **FIGURA 13. Purificación de la proteína MANF2 a partir de la línea celular estable de Sf9-hMANF2.**

A. Transferencia Northern con anticuerpo anti-V5 que muestra la secreción de proteína.

B. Banda 1, Muestra después de la etapa de purificación 1 y banda 2, después de la etapa 2.

10 **FIGURA 14. Purificación de la proteína MANF2 a partir del sobrenadante de células COS-7.**

A. MANF2 de ratón His- marcado (banda 1) y humano (banda 2) después de la etapa de purificación 1. Las células COS-7 fueron transitoriamente transfectadas con MANF2 de ratón o humano en pcADN3.1, el medio de cultivo fue recuperado y las proteínas His-marcadas fueron precipitadas con Ni-sepharose y se eluyeron con imidazol. La parte del eluato (10 o 20 μ l) se cargó en un gel SDS-PAGE al 15 %, y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie.

B. Proteínas recombinantes MANF1 (banda 1) y MANF2 (banda 2) purificadas por cromatografía de fase inversa y transferidas en una membrana PVDF.

20 **FIGURA 15. Punto de corte de la señal secretora de la proteína MANF2 humano.** La proteína MANF2 recombinante que contiene la secuencia señal original fue producida en células COS-7. La proteína purificada se sometió a digestión trípica, y los fragmentos peptídicos se analizaron por espectrometría de masas de Q-TOF. El análisis verificó el punto de corte de la secuencia señal entre los aminoácidos en la posición 26 y 27.

FIGURA 16 MANF2: Pruebas behaviorísticas. Una inyección sola de MANF2 seis horas antes de la administración de 6-OHDA en el estriado dorsal de ratas adultas redujo considerablemente el comportamiento del giro ipsilateral inducido por anfetaminas a las 2 y 4 semanas después de la lesión.

30 **FIGURA 17. Análisis morfológico.** Una inyección sola de MANF2 seis horas antes de la administración de 6-OHDA en el estriado dorsal de ratas adultas rescató casi completamente las células positivas a tirosina hidroxilasa en la sustancia negra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Realizando búsquedas Blast en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) del servidor de la página web de la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) (Véase Altschul *et al.* " Gapped BLAST(R) and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* **25** (1997): 3389-3402), los inventores identificaron a varios cADN de EST (marcador de la secuencia expresada) en humano y ratón que comparten un nivel alto de similitud de secuencia para MANF1. Sin embargo, ninguno de los EST humanos contenía un marco de lectura completamente abierto de un homólogo de MANF1 obvio ya que muchos de ellos contenían inserciones, deleciones y extremos 5' de longitud diferente que no compartían ninguna homología con MANF1.

Los inventores ensamblaron varios clones de cADN de EST humanos parciales que eran homólogos a MANF1 en un contig y diseñaron cebadores (véase el Ejemplo 1) para la clonación de un cADN de longitud completa de un posible homólogo de MANF1 de humano y ratón. Sorprendentemente, los inventores fueron capaces de clonar a los cADN de cadena entera de ratón y humano por RT-PCR de cerebro y lo llamaron MANF2 de ratón y humano (véase la FIGURA 7 para secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de MANF2 de humano y ratón).

Tanto los cADN de MANF2 de humano como de ratón codifican 187 proteínas de aminoácido (FIGURAS 1 y 2). Las secuencias de aminoácidos totales de MANF1 humano y MANF2 humano, y MANF1 de ratón y MANF2 de ratón comparten aproximadamente una identidad del 65 % respectivamente (véase la Tabla A). Tanto la proteína MANF1 como MANF2 tienen un modelo único de ocho cisteínas conservadas. Los análisis bioinformáticos mostraron que MANF2 humano es codificado por un gen relativamente pequeño codificado por cuatro exones, localizados en el cromosoma 10. La estructura secundaria de las proteínas MANF2 de humano y ratón, de manera similar a la proteína MANF1, es dominada por alfa-helices y colas aleatorias. Además, los análisis bioinformáticos del genoma y las secuencias de EST de varios organismos sugieren que los mamíferos tenían dos genes de MANF, los peces, los anfibios y las aves al menos un gen de MANF y el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* un gen de MANF (FIGURAS 3 y 4).

Los inventores también analizaron la expresión del mRNA de MANF2 por RT-PCR. Los resultados mostraron que el mRNA de MANF2 está ampliamente expresado, pero a niveles relativamente bajos, en 26 tejidos humanos diferentes y en las ocho regiones cerebrales humanas diferentes que fueron analizadas. Los niveles de

expresión variaron algo entre los diferentes tejidos. En el cerebro, los niveles de mRNA de MANF2 son inferiores en el cerebro fetal comparado con el cerebro adulto (FIGURA 5). Se obtuvieron resultados similares para la expresión de MANF2 en ratón.

Para estudiar si la proteína MANF2 es secretada, los inventores generaron constructos de expresión que codificaban las proteínas de fusión de MANF2 humano de V5-His-marcado y analizaron su expresión y secreción en células Cos-7. Los resultados mostraron que MANF2 es una proteína de 20 kDa secretada, con glicosilación potencial y/o procesamiento post-translacional (división) implicados (FIGURA 6).

10

TABLA A

MANF1 vs. MANF2

15 **Identidad de aminoácido (%)***

	Hs-MAMF1	Hs-MANF2	Mm-MANF1	Mm-MANF2
Hs-MANF1	100	-	-	-
Hs-MANF2	65	100	-	-
Mm-MANF1	98	63	100	-
Mm-MANF2	65	80	65	100

Similitud de aminoácido (%)*

	Hs-MAMF1	Hs-MANF2	Mm-MANF1	Mm-MANF2
Hs-MANF1	100	-	-	-
Hs-MANF2	79	100	-	-
Mm-MANF1	98	78	100	-
Mm-MANF2	78	88	78	100

*Secuencias señal omitidas

20

A menos que sean definidos de otra forma, todos los términos técnicos y científicos tienen el mismo sentido que entienda comúnmente cualquier experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Se muestran las definiciones más abajo para una mayor claridad.

25

"Aislado" cuando se refiere a una molécula, se refiere a una molécula que ha sido identificada y separada y/o recuperada a partir de un componente de su ambiente

natural y que por lo tanto está modificada "por la mano del hombre" de su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula, y todavía estar "aislado" porque tal vector, composición de materia, o célula particular no están en el ambiente original del polinucleótido. El término "aislado" no se refiere a genotecas genómicas o bibliotecas de cADN, célula enteras totales o preparaciones de mARN, preparaciones de ADN genómicas (incluyendo las separadas por electroforesis y transferidas por Northern), preparaciones de ADN genómicas de células enteras cortadas u otras composiciones donde la técnica no muestra ningún rasgo de distinción de las secuencias de polinucleótidos de la presente invención.

Como se usa en este documento, un "polinucleótido" se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:1 de la FIGURA 7 o su fragmento o variante, una secuencia de ácido nucleico contenida en SEQ ID NO:3 de la FIGURA 7 o su complementaria. Por ejemplo, el polinucleótido puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de cADN de cadena entera, incluyendo las secuencias no traducidas de 5' y 3', la región codificante, así como los fragmentos, epítomos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. Además, tal como se usa en este documento, un "polipéptido" se refiere a una molécula que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la invención como se define ampliamente. Como se usa en este documento, el término "fragmento" aplicado a un ácido nucleico, puede tener generalmente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, típicamente, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más típicamente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, preferiblemente al menos de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 100 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, incluso todavía más preferiblemente de al menos aproximadamente 300 a aproximadamente 400, y lo más preferiblemente, el fragmento de ácido nucleico tendrá una longitud mayor que aproximadamente 500 nucleótidos.

Como se usa en este documento, el término "fragmento" aplicado a un polipéptido, puede ser generalmente al menos aproximadamente siete aminoácidos contiguos, típicamente, al menos aproximadamente quince aminoácidos contiguos, más típicamente, al menos aproximadamente treinta aminoácidos contiguos, típicamente al menos aproximadamente cuarenta aminoácidos contiguos, preferiblemente al menos aproximadamente cincuenta aminoácidos, aún más

preferiblemente al menos aproximadamente sesenta aminoácidos y lo más preferiblemente, el fragmento peptídico será mayor que aproximadamente setenta aminoácidos contiguos de longitud.

"Molécula de ácido nucleico", incluye moléculas de ADN (p.ej. cADN o ADN genómico), moléculas de ARN (p.ej., mARN), análogos de ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente comprende al ADN bicatenario.

La "molécula de ácido nucleico aislada" está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Preferiblemente, un ácido nucleico aislado no tiene las secuencias que bordean naturalmente al ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. Por ejemplo, en varias realizaciones, las moléculas de ADN de MANF2 aisladas pueden contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que bordean naturalmente a la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula/tejido del cual el ácido nucleico es derivado (p.ej., cerebro, corazón, hígado, bazo, etc.). Además, una molécula de ácido nucleico aislada, tal como una molécula de cADN, puede estar considerablemente sin otro material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas recombinantes, o sin precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza por medios químicos.

Una molécula de ácido nucleico de la invención, p.ej., una molécula de ácido nucleico de MANF2, o un complemento de esta secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada, puede aislarse usando técnicas de biología molecular estándares y la información de la secuencia proporcionada. Usando todos o una parte de la secuencia de ácido nucleico de MANF2 de interés como una sonda de hibridación, las moléculas de MANF2 pueden aislarse usando hibridación estándar y técnicas de clonación (Ausubel *et al.*, en *Current protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, editores, 1989); Sambrook *et al.*, *supra*).

"Análogos" son secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de aminoácidos que tienen una estructura similar, pero no idénticas, al compuesto natural, pero que se diferencian de éste con respecto a ciertos componentes o cadenas laterales. Los análogos pueden ser sintéticos o de un origen evolutivo diferente y pueden tener una actividad metabólica similar u opuesta comparada con el tipo silvestre.

Los derivados y los análogos pueden ser de longitud completa o de otra longitud, si el derivado o el análogo contienen un ácido nucleico o aminoácido modificado, tal como se describe más abajo. Los derivados o los análogos de los ácidos nucleicos o proteínas mencionadas en este documento incluyen, pero no están limitados, a moléculas que comprenden regiones que son considerablemente homólogas a los ácidos nucleicos o proteínas mencionadas en este documento, en las diversas realizaciones, en al menos aproximadamente una identidad del 70 %, 80 % o 95 % (con una identidad preferida del 80-95 %) respecto a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de tamaño idéntico o cuando se compara con una secuencia alineada en la cual se hace la alineación mediante un programa de homología de ordenador conocido en la técnica, o cuyo ácido nucleico codificante es capaz de hibridarse al complementario de una secuencia que codifica las proteínas anteriormente mencionadas bajo condiciones rigurosas, moderadamente rigurosas o poco rigurosas (Ausubel *et al.*, *supra*).

"Codificación" se refiere a una propiedad inherente de secuencias de nucleótidos específicas en un polinucleótido, tal como un gen, un cADN, o un mARN, que sirven como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen tanto una secuencia de nucleótidos definida (es decir, rARN, tARN y mARN) como una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas que resultan de ésta. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del mARN correspondiente a dicho gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de mARN y que, por lo general, es proporcionada en listados de secuencia, como la cadena no codificante, usada como plantilla para la transcripción de un gen o del cADN, pueden decirse que codifican la proteína u otro producto de dicho gen o cADN.

A menos que se especifique de otra forma, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de cada una y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

Una "región codificante" de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente, a la región codificante de una molécula de mARN que es producida por la transcripción del gen.

Una "región codificante" de una molécula de mRNA también consiste en los residuos de nucleótidos de la molécula de mRNA que son emparejados con una región anticodón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de mRNA o que codifican un codón de parada. La región codificante puede
5 incluir así residuos de nucleótidos correspondientes a residuos de aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de mRNA (p.ej., residuos de aminoácidos en una secuencia señal de exportación de la proteína).

Las "secuencias control" son secuencias de ADN que permiten la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular.
10 Las secuencias control procariotas incluyen a promotores, secuencias operadoras y sitios de unión a ribosoma. Las células eucariotas utilizan a promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El "ácido nucleico operativamente unido" se une operativamente cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un
15 promotor o potenciador se unen operativamente a una secuencia codificante si esto afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión del ribosoma se une operativamente a una secuencia codificante que se coloca para facilitar la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas, y, en caso de un líder secretor, contiguo y en fase de lectura. Sin
20 embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se lleva a cabo por ligado en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores de oligonucleótido sintéticos o enlazantes de acuerdo con la práctica convencional.

Un "ADN genómico" es una cadena de ADN que tiene una secuencia de
25 nucleótidos homóloga con un gen. A modo de ejemplo, tanto un fragmento de un cromosoma como un cADN derivado por la transcripción inversa de un mRNA mamífero son ADN genómicos.

El "oligonucleótido" comprende una serie de residuos de nucleótidos unidos, cuyo oligonucleótido tiene un número de bases de nucleótidos suficientes para usarse
30 en una reacción PCR u otra aplicación. Una secuencia de oligonucleótidos corta puede estar basada, o diseñarse a partir de una secuencia genómica o secuencia de cADN y se usa para amplificar, confirmar o revelar la presencia de un ADN o ARN idéntico, similar o complementario en una célula particular o tejido. Los oligonucleótidos comprenden partes de un ácido nucleico.

"Variante" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se diferencia del polinucleótido o polipéptido de la presente invención, pero que conserva sus propiedades esenciales. Generalmente, las variantes son en su totalidad estrechamente similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido de la presente invención.

"Severidad". Pueden obtenerse homólogos (es decir, los ácidos nucleicos que codifican moléculas de MANF2 derivadas de otras especies distintas de humanos) u otras secuencias relacionadas (p.ej., paralogos) por hibridación con severidad baja, moderada o alta con todos o una parte de la secuencia humana particular como una sonda usando métodos conocidos en la técnica para la hibridación y clonación del ácido nucleico.

La especificidad del ADN monocatenario para hibridar fragmentos complementarios se determina por la "severidad" de las condiciones de reacción. La severidad de la hibridación aumenta según disminuye la propensión a formar dobles hélices de ADN. En reacciones de hibridación de ácido nucleico, la severidad puede ser elegida entre varias para favorecer hibridaciones específicas (severidad alta), que pueden usarse para identificar, por ejemplo, clones de cadena entera de una biblioteca. Pueden usarse hibridaciones menos específicas (severidad baja) para identificar moléculas de ADN relacionadas, pero no exactas, (homólogas, pero no idénticas) o segmentos.

Las dobles hélices de ADN son estabilizadas por: (1) el número de pares de bases complementarias, (2) el tipo de pares de bases, (3) la concentración salina (fuerza iónica) de la mezcla de reacción, (4) la temperatura de la reacción, y (5) la presencia de ciertos disolventes orgánicos, tales como la formamida que disminuyen la estabilidad de la doble hélice de ADN. En general, cuanto más larga sea la sonda, más alta será la temperatura requerida para una hibridación apropiada. Un enfoque común es variar la temperatura: las temperaturas relativas más altas causan condiciones de reacción más rigurosas. (Ausubel *et al.*, *supra*) proporcionan una excelente explicación de la severidad de las reacciones de hibridación.

Para hibridar bajo "condiciones rigurosas" se describen protocolos de hibridación en los cuales la secuencia de nucleótidos es al menos un 60 % homóloga para que permanezca hibridada entre sí. Generalmente, las condiciones rigurosas son seleccionadas entre aproximadamente 5 grados Celsius más abajo que el punto de fusión (T_m) térmico para la secuencia específica a una fuerza iónica definida en el documento WO 01/70174 PCT/US01/0904330. La severidad baja "condiciones

rigurosas bajas" usan soluciones de lavado y condiciones de hibridación que son menos rigurosas que las de severidad moderada (Sambrook, *supra*), tal que un polinucleótido se hibridará a todo de una secuencia diana del MANF2 diana, su fragmentos, derivados o análogos. Un ejemplo no limitante de las condiciones de hibridación de severidad baja es la hibridación en formamida al 35 %, 5x SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02 %, Ficoll al 0,02 %, BSA al 0,2 %, 100 mg/ml de ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado, sulfato de dextrano al 10 % (peso/vol) a 40 grados Celsius, seguido de uno o varios lavados a 2x SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1 % a 50 grados Celsius. Otras condiciones de severidad baja, tales como aquellas para hibridaciones de especies cruzadas son descritas en (Ausubel *et al.*, *supra*; Kriegler M P (1990) "Gene transfer and expression; a laboratory manual"; Shilo y Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6789-6792 (1981)).

Pueden usarse técnicas de amplificación por PCR para amplificar a MANF2 usando cADN, mRNA, o bien, ADN genómico, como plantilla y los cebadores de oligonucleótido apropiados. Dichos ácidos nucleicos pueden clonarse en un vector apropiado y están caracterizados por el análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a las secuencias de MANF2 pueden prepararse por técnicas sintéticas estándares, p.ej., un sintetizador de ADN automatizado.

"Cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse específicamente a una plantilla de polinucleótido designada y proporcionar un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Dicha síntesis se da cuando el cebador del polinucleótido se coloca en condiciones en las cuales la síntesis es inducida, es decir, en presencia de nucleótidos, una plantilla de polinucleótidos complementaria, y un agente para la polimerización tal como la ADN polimerasa. El cebador es típicamente monocatenario, pero puede ser bicatenario.

Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, aunque son útiles una amplia variedad de cebadores sintéticos y naturales para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario a la plantilla para la cual está diseñado para hibridarse para que sirva como un sitio para la iniciación de la síntesis, pero no tiene que reflejar la secuencia exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica del cebador a la plantilla depende de la severidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse, p.ej., mediante restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

Por el término "vector", según se usa en este documento, se entiende cualquier plásmido o virus que codifica un ácido nucleico exógeno. El término también debería ser interpretado para incluir compuestos no plasmídicos ni virales que faciliten la transferencia del ácido nucleico en viriones o células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina y otros similares. El vector puede ser un vector viral que sea adecuado como vehículo de administración para la administración del ácido nucleico que codifica la proteína deseada, o su mutante, a una célula, o el vector puede ser un vector no viral que sea adecuado para la misma diana. Los ejemplos de vectores virales y no virales para la administración del ADN a células y tejidos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ma *et al.* (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:12744-12746). Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan, a un virus de vacuna recombinante, adenovirus recombinante, retrovirus recombinante, un virus adeno-asociado recombinante, un virus de la viruela aviar recombinante, y otros similares (Cranage *et al.*, 1986, *EMBO J.* **5**, 3057-3063; solicitud de patente internacional N°. WO94/17810, publicada el 18 de agosto de 1994; solicitud de patente internacional N°. WO94/23744, publicada el 27 de octubre de 1994). Los ejemplos de vectores no virales incluyen, pero no se limitan, a liposomas, derivados de ADN de poliamina, y otros similares.

Las "sondas" son secuencias de ácido nucleico de longitud variable, preferiblemente entre al menos aproximadamente 10 nucleótidos (nt), 100 nt, o muchos (p.ej., 6000 nt) según el uso específico. Las sondas se usan para detectar secuencias de ácidos nucleicos idénticas, similares o complementarias. Las sondas de longitud más largas pueden ser obtenidas a partir de una fuente natural o recombinante, son muy específicas, y se hibridan mucho más lentamente que las sondas de oligómeros de longitud más corta. Las sondas pueden ser monocatenarias o bicatenarias y se diseñan para proporcionar especificidad en la PCR, tecnologías de hibridación basadas en membranas, o tecnologías del tipo ELISA. Las sondas también se hibridarán a moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, proporcionando así aplicaciones inmediatas en el mapeo de cromosomas, análisis de uniones, identificación de tejidos y/o tipaje, y una variedad de métodos forenses y diagnósticos.

Las sondas son oligonucleótidos sustancialmente purificados que se hibridarán en condiciones rigurosas a al menos óptimamente 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 o 400 secuencias de nucleótidos de cadena sentido consecutivas; o una secuencia de nucleótidos de cadena antisentido; o de un mutante natural de la secuencia de ADN de MANF2 de interés.

Puede usarse el ADN de MANF2 de la secuencia natural de longitud parcial o completa para "obtener" secuencias (homólogas) similares (Ausubel *et al.*, *supra*; Sambrook, *supra*), tales como: (1) cADN de MANF2 de cadena entera o fragmentos de una biblioteca de cADN de cualquier especie (p.ej. humana, murina, felina, canina, bacteriana, viral, retroviral, levadura), (2) de células o tejidos, (3) variantes dentro de una especie, y (4) homólogos y variantes de otras especies. Para encontrar secuencias relacionadas que puedan codificar los genes relacionados, la sonda puede diseñarse para codificar secuencias únicas o secuencias degeneradas. Las secuencias también pueden ser secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de la secuencia natural de MANF2.

Para detectar hibridaciones, las sondas se marcan usando, por ejemplo, radionucleidos tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos tales como la fosfatasa alcalina conectada a la sonda vía sistemas de avidina-biotina. Las sondas marcadas se usan para detectar ácidos nucleicos que tienen una secuencia complementaria a la de MANF2 en bibliotecas de cADN, ADN genómico o mRNA de una especie deseada. Tales sondas pueden usarse como una parte de un kit de ensayo diagnóstico para identificar células o tejidos que sub-expresan a MANF2, tal como midiendo un nivel de MANF2 en una muestra de células de un sujeto p.ej., detectando los niveles de mRNA de MANF2 o determinando si se ha transformado o eliminado el MANF2 genómico.

"Antisentido" se refiere particularmente a la secuencia de ácido nucleico de la cadena no codificante de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la cadena no codificante. Como se define en este documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína. No es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la parte codificante de la cadena codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a secuencias reguladoras especificadas en la cadena codificante de una molécula de ADN que codifica una proteína, cuyas secuencias reguladoras controlan la expresión de las secuencias codificantes.

Los "homólogos" son secuencias de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos de un gen particular que son derivadas de diferentes especies.

Una "secuencia de ácido nucleico homóloga" o "secuencia de aminoácidos homóloga," o sus variaciones, se refiere a secuencias caracterizadas por una homología a nivel del nucleótido o a nivel del aminoácido. Las secuencias de nucleótidos homólogas codifican aquellas secuencias que codifican para las isoformas

de MANF2. Las isoformas se pueden expresar en diferentes tejidos del mismo organismo a consecuencia, por ejemplo, del empalme alternativo del ARN. O bien, diferentes genes pueden codificar isoformas. En la invención, las secuencias de nucleótidos homólogas incluyen secuencias de nucleótidos que codifican para un MANF2 de especies distintas a humanos, incluyendo, pero no limitadas a vertebrados, y así pueden incluir, p.ej., rana, ratón, rata, conejo, perro, gato, vaca, caballo y otros organismos. Las secuencias de nucleótidos homólogas también incluyen, pero no se limitan a variaciones alélicas naturales y mutaciones de las secuencias de nucleótidos expuestas más adelante en este documento. Una secuencia de nucleótidos homóloga no incluye, sin embargo, la secuencia de nucleótidos exacta que codifica a un MANF2 de humano. Las secuencias de ácidos nucleicos homólogas incluyen aquellas secuencias de ácidos nucleicos que codifican sustituciones de aminoácidos conservadoras en una secuencia de MANF2 de interés, así como un polipéptido que posee actividad biológica de MANF2.

"Tanto por ciento (%)" de la identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a MANF2 se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidato que son idénticos con los nucleótidos en dicho MANF2 particular, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo tanto por ciento de identidad de secuencia.

El alineamiento con el fin de determinar el % de identidad de la secuencia de ácido nucleico puede conseguirse de varios modos que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando el software públicamente disponible, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign (DNASTAR) o ClustalX. Los expertos en la técnica pueden determinar qué parámetros son apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesitado para conseguir el alineamiento máximo respecto a la longitud completa de las secuencias comparadas.

Las búsquedas de proteínas con BLAST puede realizarse con el programa XBLAST (denominado "blastn" en el sitio Web NCBI) o el programa "blastp" de NCBI, usando los parámetros siguientes: valor de expectativa 10,0, matriz de tanteo BLOSUM 62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la molécula proteica descrita en este documento.

Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, el Gapped BLAST puede utilizarse según se describe en Altschul *et al.* (1997, *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402). O bien, pueden usarse PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas y relaciones entre

moléculas que comparten un modelo común. Utilizando los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (p.ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

5 El "marco de lectura abierto" (ORF) de un gen de MANF2 codifica a MANF2. Un ORF es una secuencia de nucleótidos que tiene comúnmente un codón de iniciación (ATG) y termina comúnmente con uno de los tres codones de "parada" (TAA, TAG o TGA). En esta invención, sin embargo, un ORF puede ser cualquier parte de una secuencia codificante que puede o no comprender un codón de iniciación y un
10 codón de parada. Para conseguir una secuencia única, los ORF de MANF2 preferibles codifican al menos 50 aminoácidos.

"Polinucleótido recombinante" se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no están naturalmente unidas. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede ser incluido en un vector adecuado, y el vector puede
15 usarse para transformar una célula huésped adecuada.

Un polinucleótido recombinante puede servir como una función no codificante también (p.ej., promotor, origen de replicación, sitio de unión del ribosoma, etc.).

Un "polipéptido recombinante" es aquél que es producido bajo la expresión de un polinucleótido recombinante.

20 "Polipéptido" se refiere a un polímero formado de residuos de aminoácidos, variantes estructurales naturales relacionadas, y sus análogos sintéticos artificiales unidos vía enlaces peptídicos, variantes estructurales naturales relacionadas y sus análogos sintéticos artificiales. Los polipéptidos sintéticos pueden ser sintetizados, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado.

25 Por polipéptido "marcador" se entiende cualquier proteína que, cuando se une por un enlace peptídico a una proteína de interés, puede usarse para localizar la proteína, purificarlo de un extracto celular, inmovilizarlo para su uso en ensayos de unión, o estudiar, por otra parte, sus propiedades biológicas y/o función. Una proteína quimérica (es decir, de fusión) que contiene un epítipo "marcador" puede ser
30 inmovilizada en una resina que se une al marcador. Tales epítipos marcadores y resinas que se unen específicamente son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los epítipos marcadores que comprenden una pluralidad de residuos de histidina secuenciales (His6), que permiten el aislamiento de una proteína quimérica que comprende dicho epítipo sobre níquel-ácido nitrilotriacético-agarosa, un epítipo
35 marcador de hemaglutinina (AH) que permite que una proteína quimérica comprenda

que dicho epítipo se una con una matriz de afinidad del anticuerpo monoclonal anti-HA, un epítipo marcador myc que permita que una proteína quimérica comprenda que dicho epítipo se una con una matriz de afinidad de anticuerpo monoclonal antimyc, un epítipo marcador de glutatona-S-transferasa, y un epítipo marcador de proteína de unión de maltosa (MBP), que puede inducir la unión entre una proteína que comprenda a dicho epítipo y una columna de Sepharose de glutatona o maltosa, respectivamente. La producción de proteínas que comprenden a dichos epítipos marcadores es conocida en la técnica y está descrita en tratados estándares tales como el de Sambrook *et al.*, *supra*, y Ausubel *et al.*, *supra*. Igualmente, los anticuerpos frente al epítipo marcador permiten la detección y la localización de la proteína de fusión, por ejemplo, en transferencias Northern, ensayos ELISA e inmunotinción de células.

El término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio y abarca específicamente a anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos bispecificos, diacuerpos y moléculas de cadena simple, así como a fragmentos de anticuerpos (p.ej., Fab, F(ab') y Fv), siempre que muestren la actividad biológica deseada.

La expresión "anticuerpo monoclonal" según se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítipos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, no contaminados por otra inmunoglobulina. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan pueden prepararse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, **256**: 495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, p.ej., la patente de EE.UU. Nº. 4.816.567 (Cabilly *et al.*)). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de

bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* **352**:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen expresamente a anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase de anticuerpos particulares o subclases, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase de anticuerpo o subclase, así como a los fragmentos de tales anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.*, *supra*; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (p.ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab') u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los cuales los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpos donantes) tales como ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias marco. Estas modificaciones se hacen para refinar más y optimizar el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos un dominio variable, y típicamente dos, en los cuales todas las regiones CDR, o sustancialmente todas, corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas las regiones FR, o sustancialmente todas, son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para ver otros detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, **321**:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, **332**:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**:593-

596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo primatizado en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando a monos macacos con el antígeno de interés.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen a las hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana de N-metionilo y hormona del crecimiento bovina; hormona de paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tal como la hormona estimulantes del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento de hepatocitos; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentar; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores neurotróficos o factores del crecimiento nervioso tales como NGF, NT-3, NT4, NT-6, BDNF, CNTF, GDNF, artemina, neurturina, persefina, AL-1 y otros ligandos de la familia del receptor eph; factor de crecimiento derivado de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor I y II de crecimiento tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón-alfa -beta y -gamma; factores estimulantes de colonia (CSF) tales como de macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando de kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencias naturales. También se incluyen moléculas genéticamente modificadas que regulan la actividad de citoquina tales como TrkA-IgG u otras quimeras solubles del receptor.

"Mamífero", con fines de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y zoo, deportivos, o animales domésticos, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es el ser humano.

Los vehículos, excipientes o estabilizadores "fisiológicamente aceptables" son aquellos que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a éste en las dosis

y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada en un tampón a pH acuoso. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o polietilenglicol (PEG).

"Un polipéptido que tiene actividad biológica" se refiere a un polipéptido que exhibe una actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de un polipéptido de la presente invención, incluyendo formas maduras, tal como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que exista una dependencia con la dosis, no tiene que ser idéntica a la del polipéptido, sino que sustancialmente similar a la dependencia de la dosis a una actividad dada comparado con el polipéptido de la presente invención (es decir, el polipéptido candidato mostrará mayor actividad o no más que aproximadamente 25 veces menos y, preferiblemente, no más que aproximadamente diez veces menos actividad, y lo más preferiblemente, no más que aproximadamente tres veces menos actividad con relación al polipéptido de la presente invención).

"Tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que tienen necesidad de tratamiento incluyen a aquellos que ya padecen el trastorno así como aquellos en los cuales el trastorno deba ser prevenido.

La presente invención está basada en el descubrimiento de MANF2, una proteína que es un homólogo respecto al MANF1 descrito en la solicitud de patente WO0119851. Los experimentos descritos en este documento demuestran que la molécula de MANF2 es una proteína de 187 aminoácidos que se expresaba en todos los tejidos analizados, pero predominantemente en corazón, riñón, hígado, músculo esquelético, próstata, timo y varias regiones diferentes del cerebro. Particularmente, se ha encontrado que la proteína MANF2 está presente en una variedad de tejidos, incluyendo neuronas, indicando así que los agonistas de MANF2 pueden usarse para

estimular la proliferación, el crecimiento, la supervivencia, la diferenciación, el metabolismo o la regeneración de células que contienen el receptor de MANF2.

En una realización, la invención proporciona una proteína purificada que comprende, o bien, que consiste en un polipéptido, un fragmento biológicamente activo, o un fragmento antigénico de MANF2.

Debido a la degeneración del código genético, cualquier experto en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia de al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico del cADN contenido en SEQ ID NO:1 de la FIGURA 7 o sus fragmentos, codificará polipéptidos "que tienen actividad funcional." De hecho, debido a que las variantes degeneradas de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos todas codifican el mismo polipéptido, en muchos casos, esto estará claro para el experto en la técnica. Será reconocido además en la técnica que, para tales moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable también codificará un polipéptido que tenga actividad funcional. Esto es porque el experto en la técnica es totalmente consciente de las sustituciones de aminoácidos que son menos probables o no probables de que efectúen sustancialmente la función de la proteína (p.ej. sustituyendo un aminoácido alifático por un segundo aminoácido alifático), tal como se describe más abajo.

Por ejemplo, las directrices acerca de cómo hacer sustituciones de aminoácidos silenciosas fenotípicamente se proporcionan en Bowie *et al.*, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions," *Science* **247**:1306-1310 (1990), en donde los autores indican que hay dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos que cambia.

La primera estrategia explota la tolerancia de las sustituciones de aminoácidos por selección natural durante el proceso de evolución. Comparando las secuencias de aminoácidos en especies diferentes, pueden identificarse los aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. En contraste, las posiciones de aminoácidos donde han sido toleradas las sustituciones por selección natural indican que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. Así, las posiciones que toleran la sustitución de aminoácidos podrían ser modificadas manteniendo todavía la actividad biológica de la proteína.

Además de las variantes alélicas naturales de MANF2, se pueden introducir cambios por mutación en las secuencias de MANF2 que incurren en modificaciones en las secuencias de aminoácidos del polipéptido de MANF2 codificado. Las sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en residuos de aminoácidos "no esenciales" pueden hacerse en la secuencia de un polipéptido de MANF2. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser modificado de las secuencias tipo silvestre de MANF2 sin cambiar su actividad biológica, siempre que se requiera un residuo de aminoácido "esencial" para tal actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos que son conservados entre las moléculas de MANF2 de la invención se predice que son particularmente no susceptibles de modificación. Los aminoácidos para los cuales pueden hacerse sustituciones conservadoras son conocidos en la técnica. Las sustituciones conservadoras útiles son las mostradas en la Tabla B, "sustituciones preferidas." Las sustituciones conservadoras por las cuales es sustituido un aminoácido de una clase por otro aminoácido del mismo tipo están dentro del ámbito del objeto en este documento siempre que la sustitución no modifique materialmente la actividad biológica del compuesto.

La segunda estrategia usa la ingeniería genética para introducir los cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar las regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, podría usarse mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (introducción de mutaciones de alanina simples en cada residuo en la molécula). Véase Cunningham *et al.*, *Science* **244**:1081-1085 (1989). Las moléculas mutantes resultantes pueden ser analizadas entonces según su actividad biológica. Además de las sustituciones de aminoácidos conservadoras (Véase la Tabla B más abajo), las variantes de las presentes moléculas incluyen (i) sustituciones con uno o varios de los residuos de aminoácidos no conservados, donde los residuos de aminoácidos sustituidos pueden ser o no uno codificado por el código genético, o (ii) sustituciones con uno o varios de los residuos de aminoácidos que tienen un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto que aumente la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol 896I), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, un péptido de fusión de Fc de IgG, albúmina de suero (albúmina de suero, preferiblemente humana) o su fragmento o variante, o la secuencia líder o secretora, o una secuencia que facilite la purificación. Se piensa que

tales polipéptidos de la variante están dentro del ámbito de lo que los expertos en la técnica muestran en este documento.

TABLA B. Sustituciones preferidas

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

5

La descripción se refiere además a polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácidos, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos, aún más preferiblemente, no más de 40 sustituciones de aminoácidos, todavía más preferiblemente, no más de 30 sustituciones de

10

aminoácidos, y todavía aún más preferiblemente, no más de 20 sustituciones de aminoácidos de la secuencia de polipéptidos descrita en este documento. Es muy preferible que un polipéptido tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, una parte, o un complemento de SEQ ID NO:2 de la FIGURA 7 por orden de preferencia creciente, al menos uno, pero no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras.

Las técnicas adecuadas para la producción del polipéptido de MANF2 son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento de MANF2 de una fuente endógena del polipéptido, síntesis de péptidos (usando un sintetizador de péptidos) y técnicas recombinantes (o cualquier combinación de estas técnicas).

La molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en donde la proteína comprende al menos aproximadamente el 45 % de la secuencia de aminoácidos, preferiblemente el 60 %, más preferiblemente el 70 %, 80 %, 90 %, y lo más preferiblemente aproximadamente el 95 % homóloga respecto a la de MANF2.

Las variantes del polipéptido de MANF2 tienen al menos (1) una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 80 % con una secuencia del polipéptido de MANF2 natural de cadena entera mostrada en SEQ ID NO:2 de la FIGURA 7, (2) una secuencia del polipéptido de MANF2 que carece del péptido señal, (3) cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido de MANF2 de cadena entera. Por ejemplo, las variantes del polipéptido de MANF2 incluyen polipéptidos de MANF2 en donde uno o varios residuos de aminoácidos son añadidos o suprimidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos natural de cadena entera. Una variante del polipéptido de MANF2 tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80 %, una identidad de secuencia de aminoácidos preferiblemente de al menos aproximadamente el 81 %, más preferiblemente al menos una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y una identidad de secuencia de aminoácidos lo más preferiblemente de al menos aproximadamente el 99 % con una secuencia de polipéptido de MANF2 de la secuencia natural de cadena entera. Una variante del polipéptido de MANF2 puede tener una secuencia que carezca del péptido señal o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptidos de MANF2 de cadena entera. Generalmente, los polipéptidos de la variante de MANF2 tienen al menos aproximadamente 10

aminoácidos de longitud, a menudo al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, más a menudo al menos aproximadamente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o 150 aminoácidos de longitud, o más.

Un aspecto en este documento proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o bien que consiste en un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos del grupo que consiste en (a) una secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID NO:1 de la FIGURA 7 (b) una secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO:1 parte de la cual codifica un polipéptido de MANF2 maduro; (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento biológicamente activo de MANF2; (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento antigénico de un polipéptido de MANF2; (e) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de la secuencia de nucleótidos en (a), (b), (c), (d) anterior.

La presente descripción describe además moléculas de ácido nucleico que se diferencian de las secuencias de nucleótidos debido a la degeneración del código genético y que por lo tanto codifican la misma proteína MANF2 que se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 2 o 4.

Además pueden existir dentro de una población polimorfismos de secuencia que cambian las secuencias de aminoácidos de MANF2. Por ejemplo, la variación alélica entre individuos exhibirá un polimorfismo genético en MANF2. Los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) que codifican MANF2, preferiblemente un MANF2 de vertebrado. Tales variaciones alélicas naturales pueden causar típicamente una variación del 1-5 % en MANF2.

Además, se contemplan MANF2 de otras especies que tienen una secuencia de nucleótidos que se diferencia de la secuencia humana de MANF2. Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a variantes alélicas naturales y homólogos de cADN de MANF2 pueden aislarse según su homología respecto a MANF2 usando las sondas derivadas de cADN para hibridarse a secuencias de MANF2 homólogas en condiciones rigurosas.

El "polinucleótido de la variante de MANF2" o la "secuencia de ácido nucleico de la variante de MANF2" significan una molécula de ácido nucleico que codifica a un MANF2 activo que (1) tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80 % con una secuencia de ácidos nucleótidos que codifica a un MANF2 natural de cadena entera, (2) un MANF2 natural de cadena entera que carece del péptido señal, o (3) cualquier otro fragmento de MANF2 de cadena entera.

Generalmente, un polinucleótido de la variante de MANF2 tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 80 %, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 5 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y aún más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente el 99 % con la secuencia de ácido nucleico que codifica a un MANF2 natural de cadena entera. Un polinucleótido de variante de MANF2 puede codificar el MANF2 natural de cadena entera que carece del péptido señal con o sin secuencia señal, o cualquier otro 10 fragmento de MANF2 de cadena entera. Las variantes no abarcan a la secuencia de nucleótidos natural.

Generalmente, los polinucleótidos de la variante de MANF2 tienen al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos aproximadamente 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 400 nucleótidos de 15 longitud, más frecuentemente al menos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, o más.

La estructura y la secuencia de la secuencia de cADN de MANF2 mamífera que codifica las secuencias de ratón y humanas descritas en este documento, hacen posible clonar las secuencias de genes de otros mamíferos que codifican a MANF2. 20 De interés particular para la presente invención es la capacidad de clonar las moléculas de MANF2 humano usando las secuencias descritas en este documento. El ADN que codifica a MANF2 puede ser obtenido a partir de cualquier biblioteca de cADN preparada a partir del tejido que se piensa que posee el mRNA de MANF2 y expresarlo a un nivel detectable, tal como se muestra en este documento en los 25 Ejemplos. En consecuencia, el ADN de MANF2 puede ser obtenido cómodamente a partir de una biblioteca de cADN preparada, por ejemplo, de hígado fetal mamífero, cerebro, músculo, intestino, y nervios periféricos. El gen que codifica MANF2 también puede ser obtenido a partir de una biblioteca genómica o por la síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas se rastrean con sondas (tales como anticuerpos frente a 30 MANF2 o oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar al gen de interés o a la proteína codificada por éste. El rastreo de la biblioteca de cADN o genómica con la sonda seleccionada puede ser llevado a cabo usando procedimientos estándares según se describe en los capítulos 10-12 de 35 Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Nueva York: Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 1989) o bien usar la metodología PCR según se describe en la sección 14 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de MANF2 se preparan introduciendo los cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de MANF2, o por la síntesis del polipéptido de MANF2 deseado. Tales variantes representan inserciones, sustituciones y/o deleciones específicas de residuos dentro de o en uno o ambos de los extremos de la secuencia de aminoácidos de MANF2 natural, tal como el MANF2 mostrado en la FIGURA 7, SEQ ID NO: 2 y 4. Preferiblemente, estas variantes representan inserciones y/o sustituciones dentro de o en uno o ambos extremos de la secuencia madura, tales como inserciones, sustituciones y/o deleciones específicas dentro de o en uno o ambos de los extremos de la secuencia señal de MANF2. Cualquier combinación de la inserción, sustitución y/o deleción específica se hace para llegar al constructo final, a condición de que el constructo final posea la actividad biológica deseada como se define en este documento.

Las variaciones en la secuencia natural según se describe antes pueden hacerse usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservadoras y no conservadoras expuestas en la patente de EE.UU. N°. 5.364.934. Éstas incluyen la mutagénesis (dirigida) mediada del oligonucleótido, barrido de alanina y mutagénesis PCR.

El ácido nucleico (p.ej., cADN o ADN genómico) que codifica el MANF2 se inserta en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a uno o varios de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o varios genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

Los MANF2 de esta invención pueden producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un punto de corte específico en el extremo N de la proteína madura o del polipéptido. Las proteínas de fusión pueden ser fácilmente creadas usando métodos recombinantes. Un ácido nucleico que codifica MANF2 puede fusionarse en marco con un ácido nucleico que no codifique MANF2, al extremo N- o COOH- de MANF2, o internamente. También pueden sintetizarse genes de fusión por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Una proteína de fusión de MANF2 puede incluir cualquier parte respecto al MANF2 entero, incluyendo cualquier número de las partes

biológicamente activas. Los polipéptidos de fusión son útiles en estudios de expresión, localización de células, bioensayos y purificación de MANF2.

O bien, la proteína de fusión de MANF2 también puede crearse fácilmente usando amplificación por PCR y cebadores de ancla que dan ocasión a proyecciones complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden ser hibridados posteriormente y amplificados de nuevo para generar una secuencia génica quimérica (Ausubel *et al.*, *supra*).

La secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de MANF2 que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es la que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del MANF2 natural, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de fosfatasa alcalina, penicilinasa o líderes de enterotoxina II termo-estable. Para la secreción de levadura, la secuencia señal natural puede ser sustituida, p.ej., por líder de invertasa de levadura, líder de factor alfa (incluyendo *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, líderes del factor alfa, éste descrito en la patente de EE.UU. Nº. 5.010.182 archivada el 23 de abril de 1991), o líder de fosfatasa ácida, líder de glucoamilasa de *Candida albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990). En la expresión de células mamíferas, la secuencia señal natural (p.ej., la presecuencia de MANF2 que normalmente dirige la secreción de MANF2 de células humanas *in vivo*) es adecuada, aunque otras secuencias señal de mamíferos puedan ser adecuadas, tales como las secuencias señal de otros MANF2 de animales, y secuencias señal de polipéptidos secretados de las mismas especies o relacionadas, así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

Los vectores de expresión y clonación contienen por lo general a un promotor que es reconocido por el organismo huésped y que está operativamente unido al ácido nucleico de MANF2. La elección del vector está dictada por el organismo o las células usadas y el destino deseado del vector. Los vectores pueden replicarse una vez en las células diana, o pueden ser vectores de "suicidio". En general, los vectores comprenden secuencias señal, orígenes de replicación, genes marcadores, elementos potenciadores, promotores, y secuencias de terminación de la transcripción. La elección de estos elementos depende de los organismos en los cuales el vector será usado y se determina fácilmente. Algunos de estos elementos pueden ser

condicionales, tales como el promotor inducible o condicional que se activa cuando las condiciones son apropiadas.

Los vectores pueden ser divididos en dos clases generales: los vectores de clonación que replican el plásmido o el fago con regiones que no son esenciales para la propagación en una célula huésped apropiada, y en cuyo ADN ajeno puede ser insertado; el ADN ajeno se replica y propaga como si fuera un componente del vector. Un vector de expresión (tal como un plásmido, levadura, o genoma del virus animal) se usa para introducir el material genético ajeno en una célula huésped o tejido a fin de transcribir y traducir el ADN ajeno. En vectores de expresión, el ADN introducido se une operativamente a elementos, tales como promotores, que mandan la señal a la célula huésped de que transcriba el ADN insertado. Algunos promotores son excepcionalmente útiles, tales como los promotores inducibles que controlan la transcripción de genes en respuesta a factores específicos. La unión operativa de MANF2 o del constructo antisentido a un promotor inducible puede controlar la expresión de MANF2 o los fragmentos, o el constructo antisentido. Los ejemplos de promotores inducibles clásicos incluyen aquellos que son sensibles a un interferón, a un choque térmico, iones metálicos pesados y esteroides tales como glucocorticoides (Kaufman R J, "Vectors Used for Expression in Mammalian Cells", *Methods in Enzymology, Gene Expression Technology*, David V. Goeddel, editor, 1990, **185**:487-511) y tetraciclina. Otros promotores inducibles deseables incluyen aquellos que no son endógenos para las células en las cuales el constructo se introduce, pero que, sin embargo, son sensibles en aquellas células cuando el agente de inducción es suministrado exógenamente.

Los promotores son secuencias no traducidas localizadas corriente arriba (5') respecto al codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 bp) que controlan la transcripción y traducción de la secuencia de ácido nucleico particular, tal como la secuencia de ácido nucleico de MANF2, a la cual están operativamente unidos. Dichos promotores se dividen típicamente en dos clases, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician mayores niveles de transcripción del ADN en su control como respuesta a algún cambio de las condiciones de cultivo, p.ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. En este momento, se conocen a un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. Estos promotores están operativamente unidos a ADN que codifica MANF2 quitando el promotor de ADN de la fuente por digestión con enzima de restricción e insertando la

secuencia promotora aislada en el vector. Pueden usarse tanto la secuencia promotora del MANF2 natural como muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o la expresión del ADN de MANF2. Sin embargo, los promotores heterólogos son preferidos, ya que permiten generalmente una mayor transcripción y rendimientos más altos de MANF2 comparado con el promotor de MANF2 natural. Existen diversos promotores para su uso con procariontes, eucariotes, levaduras y células huésped mamíferas, y son conocidos por el experto en la técnica.

Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insecto, planta, animal, humano, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones no traducidas de 5' y, de vez en cuando 3', del ADN o cADN eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos tales como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del mRNA que codifica a MANF2.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o varios de los anteriores componentes expuestos emplea las técnicas de hibridación estándar. Los plásmidos aislados o los fragmentos de ADN son divididos, adaptados y religados en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Son particularmente útiles en la práctica de esta invención los vectores de expresión que aseguran la expresión transitoria en células mamíferas del ADN que codifica a MANF2. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que sea capaz de replicarse eficazmente en una célula huésped, tal que la célula huésped acumule muchas copias del vector de expresión y, que a su vez, sintetice niveles altos del polipéptido deseado codificado por el vector de expresión, Sambrook *et al.*, *supra*, pps 16.17-16.22. Los sistemas de expresión transitorios, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, proporcionan una identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por los ADN clonados, así como un rastreo rápido de tales polipéptidos según las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. Así, los sistemas de expresión transitorios son particularmente útiles en la invención para obtener análogos de identificación y variantes de MANF2 que son biológicamente activas.

La propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivos de tejidos) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Véase, p.ej., *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse y Patterson, editores (1973). Los ejemplos de líneas de células huésped mamíferas

útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de ovario de hámster chino /-DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4216 (1980)); células de carcinoma cervical humanas (HELA, ATCC CCL 2); y células de riñón caninas (MDCK, ATCC CCL 34);

5 Las células huésped son transfectadas y preferiblemente transformadas con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de MANF2 y son cultivadas en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir a promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

10 La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped, tanto si las secuencias codificantes se expresan como si no. Se conocen numerosos métodos de transfección de forma general por los expertos en la técnica, por ejemplo, la electroporación. Se reconoce que la transfección tiene éxito generalmente porque aparece alguna indicación de la operación de este vector dentro
15 de la célula huésped.

La transformación significa la introducción del ADN en un organismo de modo que el ADN sea replicable, tal como un elemento extracromosómico o por integrante cromosómico. Según sea la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento de calcio que emplea
20 cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se usa generalmente para procariotas u otras células que contienen sustanciales barreras de la pared celular.

Se han descrito aspectos generales de transformaciones del sistema huésped de la célula mamífera en la patente de EE.UU. N°. 4.399.216 archivada el 16 de
25 agosto de 1983. Las transformaciones en levadura son típicamente realizadas según el método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, **130**:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros métodos para introducir el ADN en las células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas o policationes,
30 p.ej., polibreno, poliomitina, etc. Para profundizar en las diversas técnicas para transformar células mamíferas, véase Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, **185**:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, **336**:348-352 (1988).

Las células procariotas usadas para producir el polipéptido MANF2 de esta invención son cultivadas en medios adecuados según se describe generalmente en
35 Sambrook *et al.*, *supra*. En general, los principios, los protocolos y las técnicas

prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células de mamíferos pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, editor (IRL Press, 1991).

Se puede medir la amplificación y/o la expresión de genes en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:5201-5205 (1980)), transferencia de punto (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basado en las secuencias provistas en este documento. Se pueden emplear diversos marcadores, lo más comúnmente radioisótopos, particularmente ^{32}P . Sin embargo, también se pueden emplear otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados por biotina para la introducción en un polinucleótido o anticuerpos que reconocen dobles hélices específicas, incluyendo dobles hélices de ADN, dobles hélices de ARN, y dobles hélices híbridas de ARN y ADN o dobles hélices de proteína y ADN.

Se puede medir la expresión de genes, o bien, por métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, típicamente por deshidratación y fijación, seguido de la reacción con anticuerpos específicos marcados para el producto génico acoplado, donde los marcadores son, por lo general, visualmente detectables, tales como marcadores enzimáticos, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes y otros similares. Una técnica de tinción particularmente sensible adecuada para su uso en la presente invención es descrita por Hsu *et al.*, *Am. J. Clin. Path.*, **75**:734-738 (1980).

25

Producción recombinante

Cuando se produce MANF2 en una célula recombinante de origen diferente al humano, MANF2 está completamente libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar MANF2 de las proteínas o polipéptidos celulares recombinantes para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas respecto a MANF2. Como una primera etapa, el medio de cultivo o el lisado se puede centrifugar para quitar los restos de partículas de las células. Se puede purificar MANF2 entonces a partir de proteínas solubles contaminantes y polipéptidos con los procedimientos siguientes, que son ejemplares de los procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de

35

intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice; cromatoenfoque; inmutofafinidad; resina de unión epítoto-marcador; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración de gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de Sepharose de proteína A para quitar contaminantes tales como IgG.

Las variantes de MANF2 en las cuales los residuos han sido deletionados, insertados o sustituidos son recuperadas de la misma manera que el MANF2 de la secuencia natural, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial de las propiedades ocasionadas por la variación. Se pueden emplear resinas de inmutofafinidad, tales como la resina anti-MANF2 monoclonica, para absorber la variante de MANF2 uniéndola a al menos un epítoto restante.

Se pueden analizar las variantes como se muestra en este documento. Un cambio del carácter inmutofafínico de la molécula de MANF2, tal como la afinidad para un anticuerpo dado, se puede medir por un inmutofafinamiento del tipo competitivo. Otras modificaciones potenciales de propiedades de la proteína o del polipéptido tales como la estabilidad redox o térmica, hidrofobicidad, susceptibilidad a la degradación proteolítica, o la tendencia de agregarse con vehículos o en multímeros, son analizadas por los métodos conocidos en la técnica.

Esta representación abarca polipéptidos quiméricos que comprenden a MANF2 fusionado a un polipéptido heterólogo. El MANF2 quimérico es un tipo de la variante de MANF2 que se define en este documento. En una realización preferida, el polipéptido quimérico comprende una fusión de MANF2 con un polipéptido marcador que proporciona un epítoto al cual un anticuerpo antimarcador o molécula pueden unirse selectivamente. El epítoto-marcador generalmente se proporciona en el extremo amino o carboxilo de MANF2. Tales formas marcadas de epítoto de MANF2 son deseables, cuando su presencia se puede detectar usando un anticuerpo marcado contra el polipéptido marcador. También, la provisión del epítoto marcador permite que MANF2 se purifique fácilmente mediante una purificación por afinidad usando el anticuerpo antimarcador. Se describen más adelante en este documento técnicas de purificación por afinidad y ensayos diagnósticos que implican a anticuerpos.

Los polipéptidos del marcador y sus anticuerpos respectivos son conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen el polipéptido marcador AH de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **8**:2159-2165 (1988)); los marcadores c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de estos (Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, **5**:3610-3616 (1985)); y el marcador de la glicoproteína D del virus

del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, **3** (6):547-553 (1990)). Se han descrito otros polipéptidos marcadores. Los ejemplos incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, *BioTechnology*, **6**:1204-1210 (1988)); el péptido epítipo de KT3 (Martin *et al.*, *Science*, **255**:192-194 (1992)); un péptido de epítipo de alfa-tubulina (Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**:15163-15166 (1991)); y el marcador del péptido de la proteína del gen de T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:6393-6397 (1990)). Una vez que el polipéptido marcador se ha seleccionado, se puede generar un anticuerpo de éste usando las técnicas descritas en este documento. Se prefiere un marcador de secuencia de polihistidina del extremo C-terminal. Las secuencias de polihistidina permiten el aislamiento de la proteína marcada por cromatografía Ni-NTA según se ha descrito (Lindsay *et al. Neuron* **17**:571-574 (1996)), por ejemplo.

Los métodos generales adecuados para la construcción y la producción del MANF2 marcado por el epítipo son los mismos que los descritos más arriba.

Se puede purificar cómodamente el MANF2 marcado por el epítipo mediante cromatografía de afinidad usando el anticuerpo antimarcador. La matriz a la cual el anticuerpo de afinidad es unida es, lo más frecuentemente, agarosa, pero hay otras matrices disponibles (p.ej., vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno). Se puede eluir el MANF2 marcado por el epítipo de la columna de afinidad variando el pH del tampón o la fuerza iónica o añadiendo agentes caotrópicos, por ejemplo.

Las quimeras construidas a partir de una secuencia de MANF2 unida a una secuencia apropiada del dominio constante de inmunoglobulina (inmuno adhesinas) son conocidas en la técnica. Las inmuno adhesinas descritas en la literatura incluyen fusiones del receptor de linfocitos T (Gascoigne *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2936-2940 (1987)); CD4* (Capon *et al.*, *Nature* **337**: 525-531 (1989); Traunecker *et al.*, *Nature*, **339**: 68-70 (1989); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol USA*, **9**: 347-353 (1990); Byn *et al.*, *Nature*, **344**: 667-670 (1990)); receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 10535-10539 (1991); Lesslauer *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **27**: 2883-2886 (1991); Peppel *et al.*, *J. Exp. Med.*, **174**:1483-1489 (1991)); y receptor de IgE alpha* (Ridgway *et al.*, *J. Cell. Biol.*, **1** 15:resumen 1448 (1991)), donde el asterisco (*) indica que el receptor es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas.

El diseño de inmuno adhesinas más simple y más directo combina la(s) región(ones) de unión de la proteína "adhesina" con las regiones bisagra y Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Generalmente, cuando se preparan quimeras de MANF2 - inmunoglobulina, el ácido nucleico que codifica a MANF2 se fusionará por el

extremo C-terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo las fusiones del extremo N-terminal son posibles también.

5 Típicamente, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado retendrá, al menos funcionalmente, los dominios bisagra y CH2 y CH3 activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se hacen fusiones al extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente del extremo N-terminal al CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera.

10 El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; los sitios particulares son conocidos y se pueden seleccionar a fin de optimizar la actividad biológica, las características de secreción o unión de las quimeras de MANF2 - inmunoglobulina.

La elección de la línea celular del huésped para la expresión de inmunoadhesinas de MANF2 depende principalmente del vector de expresión. Otra
15 consideración es la cantidad de proteína que es requerida. Se pueden producir a menudo cantidades en miligramos usando transfecciones transitorias, por ejemplo, con fosfato de calcio o por el método de DEAE-dextrano (Aruffo *et al.*, *Cell*, **61**:1303-1313 (1990); Zettmeissl *et al.*, *DNA Cell Biol. USA*, **9**:347-353 (1990)). Si se desean cantidades más grandes de proteínas, la inmunoadhesina se puede expresar después
20 de la transfección estable de una línea celular de huésped, por ejemplo, introduciendo los vectores de expresión en células de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica dihidrofolato reductasa.

Anticuerpos

25 El ácido nucleico de MANF2 es útil para la preparación del polipéptido de MANF2 por técnicas recombinantes ejemplificadas en este documento que pueden usarse después para la producción de anticuerpos anti-MANF2 con las diversas utilidades descritas más abajo.

Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/ o el ensayo de
30 fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales.

Esta descripción describe además un anticuerpo que se une expresamente con MANF2, o su fragmento. En una realización preferida, la invención incluye un anticuerpo que inhibe la actividad biológica de MANF2. El anticuerpo es útil para la identificación para MANF2 en un ensayo diagnóstico para la determinación de los
35 niveles de MANF2 en un mamífero con una enfermedad asociada a los niveles de

MANF2. Además, un anticuerpo que se una específicamente a MANF2 es útil para bloquear la interacción entre MANF2 y su receptor, y es útil por lo tanto en un programa terapéutico para el tratamiento de una enfermedad relacionada con MANF2, como se describe en este documento.

5 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales dirigidos contra fragmentos de longitud completa o péptidos de una proteína o péptido MANF2 usando cualquier procedimiento de preparación del anticuerpo monoclonal conocido, tales como aquellos descritos, por ejemplo, en Harlow *et al.* (1988, En: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York). Se pueden preparar anticuerpos
10 monoclonales anti-MANF2 usando métodos de hibridomas que comprenden al menos cuatro etapas: (1) inmunización de un huésped, o de los linfocitos de un huésped; (2) recolección de los linfocitos que secretan el anticuerpo monoclonal (o que lo secretan potencialmente), (3) fusión de los linfocitos a células inmortalizadas, y (4) selección de aquellas células que secretan al anticuerpo monoclonal (anti-MANF2) deseado. Los
15 anticuerpos monoclonales pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o de fluidos ascéticos por procedimientos de purificación de Ig convencionales tales como proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis de gel, diálisis, precipitación con sulfato de amonio o cromatografía de afinidad (Harlow *et al.*, *supra*).

Se inmuniza un ratón, una rata, un conejillo de indias, hámster u otro huésped
20 apropiado para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán expresamente al inmunógeno. O bien, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Si se desean células humanas, se usan generalmente linfocitos de sangre periférica; sin embargo, se prefieren los linfocitos de células de bazo o de otras fuentes
25 mamíferas.

El inmunógeno típicamente incluye a MANF2 o una proteína de fusión de MANF2.

Esta descripción además describe anticuerpos anti-MANF2 humanizados y humanos.

30 Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos son Igs quiméricas, cadenas de Ig o fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab') u otras subsecuencias que se unen al antígeno de los anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la Ig no humana.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene incorporados uno o varios
35 residuos de aminoácidos de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácidos no

humanos se denominan a menudo residuos "de importación", que son típicamente tomados de un dominio variable "de importación". La humanización se lleva a cabo sustituyendo las CDR del roedor o las secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones *et al.*, *Nature* **321**:522-525 (1986);
5 Riechmann *et al.*, *Nature* **332**:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* **239**:1534-1536, (1988). Dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. Nº. 4.816.567, 1989), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente
10 anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR, y posiblemente algunos residuos FR, son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos humanizados incluyen las Igs humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del recipiente son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana
15 (anticuerpo donante) tal como de ratón, rata o conejo, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos no humanos correspondientes sustituyen a los residuos marco Fv de la Ig humana. Los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor, ni en la CDR importada o las secuencias marco. En general, el anticuerpo humanizado
20 comprende sustancialmente todo de al menos un dominio variable, y típicamente dos dominios variables, en los cuales, la mayor parte, si no todas las regiones CDR, corresponden a aquellas de una Ig no humana y la mayor parte, si no todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de Ig humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprende al menos una parte de una región
25 constante de Ig, típicamente la de una Ig humana (Jones *et al.*, *supra*; Presta L G, *Curr Opin Biotechnol* **3**:394-398 (1992).

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas, incluyendo bibliotecas de expresión de fago (Hoogenboom *et al.*, *Nucleic Acids Res* **19**:4133-4137 (1991); Marks *et al.*, *Biotechnology* (NY) **10**:779-83 (1991) y
30 la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Boerner *et al.*, *J Immunol* **147** (1):86-95 (1991); Reisfeld y Sell, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc, Nueva York (1985). Del mismo modo, puede ser explotada la introducción de genes de Ig humanos en animales transgénicos en los cuales los genes de Ig endógenos han sido parcialmente o completamente inactivados para sintetizar
35 anticuerpos humanos. En la exposición, se observa la producción de anticuerpos

humanos, que se parece mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reagrupación de genes, el ensamblado y el repertorio de anticuerpos (patente de EE.UU. N^o. 5.545.807, 1996; patente de EE.UU. N^o. 5.545.806, 1996; patente de EE.UU. N^o. 5.569.825, 1996; patente de EE.UU. N^o. 5.633.425, 1997; patente de EE.UU. N^o. 5.661.016, 1997; patente de EE.UU. N^o. 5.625.126, 1997; Fishwild *et al.*, *Nat Biotechnol* **14**:845-51 (1996); Lonberg y Huszar, *Int Rev Immunol* **13**:65-93 (1995); Lonberg *et al.*, *Nature* **368**:856-9 (1994); Marks *et al.*, *Biotechnology* (NY) **10**:779-783 (1992)).

La presente descripción también describe anticuerpos monoclonales biespecíficos que son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una especificidad de unión es MANF2; la otra es para cualquier antígeno de elección, preferiblemente una proteína de superficie de la célula o receptor o una subunidad del receptor.

Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de Ig, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature* **305**:537-540 (1983)). A causa del surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de Ig, los hibridomas resultantes (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica deseada. El anticuerpo deseado puede ser purificado usando cromatografía de afinidad u otras técnicas (documento WO 93/08829, (1993); Traunecker *et al.*, *Trends Biotechnol* **9**:109-113 (1991)).

Para preparar un anticuerpo biespecífico (Suresh *et al.*, *Methods Enzymol.* **121**:210-228 (1986)), los dominios variables con los sitios de combinación del anticuerpo-antígeno deseados se fusionan a las secuencias del dominio constante de Ig. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está en, al menos una, de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de Ig y, de ser deseado, la cadena ligera de Ig, se insertan en vectores de expresión separados y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado.

Los fragmentos Fab pueden ser recuperados directamente de *E. coli* y conectarse por medios químicos para formar los anticuerpos biespecíficos. Por

ejemplo, se pueden producir anticuerpos F(ab') biespecíficos totalmente humanizados (Shalaby *et al.*, *J Exp Med.* **175**:217-225 (1992)). Cada fragmento Fab se secreta por separado de *E. coli* y se une directamente por medios químicos *in vitro*, formando el anticuerpo biespecífico.

5 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se pueden explotar los motivos cremallera de leucina (Kostelny *et al.*, *Immunol.* **148**:1547-1553 (1992)). Los péptidos de las proteínas Fos y Jun se unen a las partes de Fab de dos anticuerpos diferentes por la fusión de los genes. Los
10 homodímeros del anticuerpo se reducen en la región bisagra para formar monómeros y luego se oxidan de nuevo para formar heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede producir homodímeros del anticuerpo.

La tecnología del "diacuerpo" (Holliger *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**:6444-6448 (1993)) proporciona un método alternativo para generar fragmentos de
15 anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por un enlace que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Se obliga a que los dominios VH y VL de un fragmento se apareen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando dos sitios de
20 unión del antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos es el uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv) (Gruber *et al.*, *Immunol.* **152**:5368-5374 (1994)). También se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias, tales como los anticuerpos tri-específicos (Tutt *et al.*, *J Immunol.* **147**:60-69 (1991)).

25 Se pueden generar anticuerpos policlónicos en un huésped mamífero, por ejemplo, con una o varias inyecciones de un inmunógeno y, de ser deseado, un adyuvante. Típicamente, el inmunógeno y/o el adyuvante son inyectados en el mamífero con inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples. El inmunógeno puede incluir a MANF2 o una proteína de fusión de MANF2.

30 Los ejemplos de adyuvantes incluyen medio de Freund completo y dicorinomicolato de monofosforil-Lípido A sintética-trehalosa (MPL-TDM). Para mejorar la respuesta inmune, se puede conjugar un inmunógeno a una proteína que es inmunógena en el huésped de MANF2, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los
35 protocolos para la producción del anticuerpo son descritos por (Harlow *et al.*, *supra*). O

bien, pueden prepararse anticuerpos policlonales en pollos, produciendo moléculas de IgY (Schade *et al.*, *The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop. Alternatives to Laboratory Animals NAILA*). **24:925-934** (1996)).

5

Tratamiento

Se piensa que la proteína MANF2 y el gen de MANF2 encuentran uso terapéutico *ex vivo* o *in vivo* para la administración a un mamífero, particularmente seres humanos, en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la actividad de MANF1 o MANF2 o beneficiados por la respuesta de MANF2/MANF1 (véase el documento WO0119851). Son particularmente preferidos los trastornos neurológicos, preferiblemente trastornos del sistema nervioso central, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer.

Al paciente se administra una cantidad eficaz de la proteína MANF2, o el fragmento peptídico funcional de la invención. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína MANF2, o el fragmento peptídico funcional, en un vehículo farmacológico adecuado. La proteína MANF2, el fragmento peptídico, o la variante se pueden administrar sistémicamente o localmente. Aplicable a los métodos traídos a este documento, la proteína MANF2 puede administrarse opcionalmente antes, después, o preferiblemente al mismo tiempo que (o en complejo con) MANF1.

Se piensa que una enfermedad o un trastorno médico es un daño nervioso si la supervivencia o la función de las neuronas y/o sus procesos axonales están comprometidos. Dicho daño nervioso ocurre como resultado de las condiciones incluyendo (a) daño físico, lo que causa la degeneración de los procesos axonales y/o cuerpos neuronales cerca del sitio del daño; (b) isquemia, tal como una apoplejía; (c) exposición a neurotoxinas, tales como agentes quimioterapéuticos del cáncer y SIDA tales como cisplatina y didesoxicidina (ddC), respectivamente; (d) enfermedades metabólicas crónicas, tales como diabetes o disfunción renal; y (e) enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS), que causan la degeneración de las poblaciones neuronales específicas. Las condiciones que implican el daño nervioso incluyen la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, apoplejía, polineuropatía diabética, neuropatía tóxica y daño físico al sistema nervioso como el causado por daño físico al cerebro y médula espinal o daño

por aplastamiento o corte a brazos y manos u otras partes del cuerpo, incluyendo el cese temporal o permanente del flujo sanguíneo a partes del sistema nervioso, tal como en la apoplejía.

Se contempla que MANF2 se puede emplear para tratar neuropatías, y sobre todo neuropatías periféricas. La "neuropatía periférica" se refiere a un trastorno que afecta al sistema nervioso periférico, que se manifiesta más frecuentemente como una disfunción neuronal motora, sensorial, sensomotora o autonómica, o una combinación de éstas. La amplia variedad de morfologías expuestas por las neuropatías periféricas puede ser atribuida cada una únicamente a un número igualmente amplio de causas. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden adquirirse genéticamente, pueden resultar de una enfermedad sistémica o se pueden inducir por un agente tóxico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a neuropatía periférica diabética, neuropatía sensomotora distal o neuropatías autonómicas tales como motilidad reducida del tracto gastrointestinal o atonía de la vejiga urinaria. Los ejemplos de neuropatías asociadas a una enfermedad sistémica incluyen el síndrome post-polio o la neuropatía asociada al SIDA; los ejemplos de neuropatías hereditarias incluyen la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, la enfermedad de Tangier, la enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Fabry y el síndrome de Dejerine-Sottas; y los ejemplos de neuropatías causadas por un agente tóxico incluyen a aquellas causadas por el tratamiento con un agente quimioterapéutico tal como vincristina, cisplatino, metotrexato o 3'-azido-3'-desoxitimidina. Igualmente, se esperaría que los antagonistas de neurotrimina tendrían utilidad en las enfermedades caracterizadas por una actividad neuronal excesiva.

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por una neurodegeneración extendida en el cerebro incluyendo una pérdida grave de las neuronas colinérgicas que residen en el cerebro anterior basal. La pérdida de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal contribuye a déficits cognoscitivos de la memoria y espaciales en los pacientes afectados por Alzheimer (Gilmor *et al.*, 1999; Lehericy *et al.* 1993). La restauración y la modulación de la función colinérgica en los pacientes de Alzheimer es un tratamiento candidato para la enfermedad (Sramek y Cutler, 1999; Mufson *et al.*, 1998). También pueden estar implicadas en la enfermedad otros tipos de células nerviosas.

Se puede tratar a un paciente que padece la enfermedad de Parkinson en los signos más tempranos de los síntomas de la enfermedad, tal como una función motora perjudicada o una función cognoscitiva perjudicada, a fin de parar la progresión de la

neurodegeneración. También se contempla que las células cultivadas de MANF2 sean administradas a individuos en las etapas tardías de la enfermedad para reducir la marcha de la progresión del daño al sistema nervioso.

5 También se contempla mediante la invención que la administración del producto de MANF2 en combinación con un agente neuroterapéutico comúnmente usado para tratar la enfermedad de Parkinson creará una sinergia de los dos tratamientos, causando así una importante mejora de los pacientes que reciben una terapia de combinación comparado con los individuos que reciben sólo una única terapia.

10 El pramipexol (mirapex) y la levodopa son medicamentos eficaces para tratar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (EP) temprana. En los estudios *in vitro* y en los estudios con animales se sugiere que el pramipexol puede proteger y que la levodopa puede tanto proteger como dañar a las neuronas dopaminérgicas. Las técnicas de imagenología neurológica ofrecen el potencial de una diana biomarcadora de
15 la degeneración de neuronas dopaminérgicas en pacientes con la EP. La coenzima Q10, un neurotransmisor que se expresa a bajos niveles en los pacientes de Parkinson, también se usa para el tratamiento de la EP. La levodopa se puede combinar con otro fármaco, tal como la carbidopa, para ayudar al alivio de los efectos secundarios de la L-dopa. Otras medicaciones usadas para tratar la enfermedad de
20 Parkinson, como agentes simples o como en combinación, son sinemet, selegilina, (comercializada como eldepryl) pueden ofrecer algún alivio de los síntomas tempranos del Parkinson. La amantadina (symmetrel) es un fármaco antiviral que también proporciona un efecto anti-Parkinson, y con frecuencia se usa para ensanchar la "ventana terapéutica" para la levodopa cuando se usa en combinación con el sinemet.

25 Se contempla que el tratamiento con MANF2 antes, después o simultáneamente con cualquiera de los anteriores agentes neuroterapéuticos realzará el efecto del agente neuroterapéutico, reduciendo así la cantidad de agente requerido por un individuo y reduciendo los efectos secundarios no deseados producidos por dosis neuroterapéuticas múltiples o grandes.

30 El gen de MANF2 se expresa en células musculares. En consecuencia, la presente invención se refiere a métodos para tratar los trastornos de células musculares que comprende administrar a un paciente en necesidad de dicho tratamiento los compuestos de la invención. Los trastornos de las células musculares que pueden beneficiarse de dicho tratamiento incluyen, pero no se limitan a las
35 siguientes distrofias musculares progresivas: Duchenne, Becker, Esmeril-Dreifuss,

Landouzy-Dejerine, escapulohumeral, cinturas, Von Graefe-Fuchs, oculofaríngea, miotónica y congénita. Además, dichas moléculas pueden usarse en el tratamiento de miopatías congénitas (corazón central, nemalina, centronuclear y desproporción del tipo fibrilar congénita) y adquiridas (tóxicas, inflamatorias).

5 También se contemplan expresamente las manipulaciones genéticas para conseguir la modulación de la expresión o la actividad de proteínas. Por ejemplo, cuando se contempla la administración de proteínas, también se contempla la administración de un vector de terapia génica que cause la producción de la proteína de interés *in vivo*. Cuando se contempla la inhibición de proteínas (p.ej., por el uso de anticuerpos o inhibidores de moléculas pequeñas), se contempla la inhibición de la expresión de la proteína *in vivo* por técnicas genéticas, tales como técnicas de desactivación genética o terapia antisentido.

Puede usarse cualquier vector adecuado para introducir un transgen de interés en un animal. Los vectores ejemplares que se han descrito en la bibliografía incluyen
15 vectores retrovirales deficientes de replicación, incluyendo, pero no limitados a vectores lentivirus [Kim *et al.*, *J. Virol.*, **72** (1): 811-816 (1998); Kingsman y Johnson, *Scrip Magazine*, octubre de 1998, págs. 43-46.]; adenovirales (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º. 5.824.544; patente de EE.UU. N.º. 5.707.618; patente de EE.UU. N.º. 5.792.453; patente de EE.UU. N.º. 5.693.509; patente de EE.UU. N.º. 5.670.488; patente de EE.UU. N.º. 5.585.362; Quantin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 2581-2584, 1992); Stratford-Perricadet *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **90**: 626-630 (1992); y Rosenfeld *et al.*, *Cell*, **68**: 143-155 (1992)), retrovirales (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N.º. 5.888.502; patente de EE.UU. N.º. 5.830.725; patente de EE.UU. N.º. 5.770.414; patente de EE.UU. N.º. 5.686.278; patente de EE.UU. N.º. 4.861.719), adeno-asociado virales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.474.935; patente de EE.UU. N.º. 5.139.941; patente de EE.UU. N.º. 5.622.856; patente de EE.UU. N.º. 5.658.776; patente de EE.UU. N.º. 5.773.289; patente de EE.UU. N.º. 5.789.390; patente de EE.UU. N.º. 5.834.441; patente de EE.UU. N.º. 5.863.541; patente de EE.UU. N.º. 5.851.521; patente de EE.UU. N.º. 5.252.479; Gnatenko *et al.*, *J. Investig. Med.*, **45**: 87-98 (1997), un híbrido viral adenoviral-adeno-asociado (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.856.152) o una vacuna viral o un herpes viral (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º. 5.879.934; patente de EE.UU. N.º. 5.849.571; patente de EE.UU. N.º. 5.830.727; patente de EE.UU. N.º. 5.661.033; patente de EE.UU. N.º. 5.328.688); transferencia de genes mediada por lipofectina (BRL); los vectores liposómicos [Véase, p.ej., la patente de EE.UU. N.º. 35

5.631.237 (liposomas que comprenden proteínas del virus de Sendai)]; y sus combinaciones. Los vectores adenovirales deficientes por replicación, los vectores virales adeno-asociados y lentivirus constituyen las realizaciones preferidas.

En las realizaciones que emplean un vector viral, los polinucleótidos preferidos incluyen a un promotor adecuado y la secuencia de poliadenilación para promover la expresión en el tejido diana de interés. Para muchas aplicaciones de la presente invención, los promotores/potenciadores adecuados para la expresión de células en mamíferos incluyen, p.ej., promotor/potenciador de citomegalovirus [Lehner *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, **29**:2494-2502 (1991); Boshart *et al.*, *Cell*, **41**:521-530 (1985)]; promotor del virus del sarcoma de Rous [Davis *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, **4**:151 (1993)]; promotor del virus símico 40, repetición terminal larga (LTR) de retrovirus, promotor de queratina 14, y promotor de cadena pesada de α -miosina.

En las aplicaciones de la terapia génica, se introducen los genes en células a fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo para el reemplazo de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto perdurable con un solo tratamiento, tal como la administración de agentes terapéuticos genéticos, lo que implica la administración única o repetida de un ADN terapéuticamente eficaz o mARN. Pueden usarse ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha demostrado que pueden importarse oligonucleótidos antisentido cortos en células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por la captación restringida de estos por la membrana celular. (Zamecrik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:4143-4146 (1986)). Los oligonucleótidos pueden modificarse para realzar su captación, p.ej., sustituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos no cargados.

Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían según si el ácido nucleico es transferido en células cultivadas *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos en células mamíferas *in vitro* incluyen el uso de liposomas (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, **721**:185-190 (1982); Fraley, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:3348-3352 (1979); Felgner, *Sci. Am.*, **276** (6):102-6 (1997); Felgner, *Hum. Gene Ther.*, **7** (15):1791-3, (1996)), electroporación (Tur-Kaspa, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **6**:716-718, (1986); Potter, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**:7161-7165, (1984)), microinyección directa (Harland y

Weintraub, *J. Cell Biol.*, **101**: 1094-1099 (1985)), fusión de células, DEAE-dextrano (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, **5**:1188-1190 (1985), el método de precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, **52**:456-467 (1973); Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, **7**:2745-2752, (1987); Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **10**:689-695 (1990),
5 sonicación de células (Fechheimer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:8463-8467 (1987)), bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:9568-9572 (1990)). Las técnicas de transferencia de genes *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores virales (típicamente retrovirales) y la transfección mediada por proteína-liposoma de cubierta
10 viral (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology*, **11**:205-210 (1993)). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que reconozca las células diana, tal como un anticuerpo específico para la proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana. Cuando se emplean liposomas, se pueden usar proteínas que se unen a una proteína
15 de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para el reconocimiento y/o para facilitar la captación, p.ej. proteínas de la cápside o sus fragmentos tróficos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que sufren la internalización en el ciclo, y proteínas que reconocen la localización intracelular y potencian el período de semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por el
20 receptor se describe, por ejemplo, en Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **262**:4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje de genes actualmente conocidos y terapias génicas, véase Anderson *et al.*, *Science*, **256**:808-813 (1992).

En una realización particular de la invención, el constructo de expresión (o de
25 hecho los péptidos mencionados anteriormente) puede ser atrapados en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolípídica y un medio acuoso interior. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas lipídicas separadas por el medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos son suspendidos en un exceso de solución acuosa. Los
30 componentes lipídicos sufren auto-reagrupamiento antes de la formación de estructuras cerradas y de atrapar el agua y los solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat "In Liver Diseases, Targeted Diagnosis And Therapy Using Specific Receptors And Ligands," Wu, G., Wu, C., editor, Nueva York: Marcel Dekker, págs. 87-104 (1991)). La adición del ADN a liposomas catiónicos causa una
35 transición topológica de liposomas a glóbulos condensados líquidos y cristalinos

ópticamente birrefringentes (Radler, *et al.*, *Science*, **275** (5301):8 810-4, (1997)). Estos complejos de ADN-lípido son vectores no virales potenciales para uso en terapia y administración génica.

5 También se contempla en la presente invención varios intentos comerciales que se basan en la tecnología de la "lipofección". En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede estar complejado con un virus hemaglutinante (HVJ). Esto ha demostrado que facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada de células del ADN encapsulado por el liposoma (Kaneda, *et al.*, *Science*, **243**:375-378 (1989)). En otras realizaciones, el liposoma puede estar complejado o ser
10 empleado junto con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **266**:3361-3364 (1991)). En otras realizaciones adicionales, el liposoma puede estar complejado o puede emplearse tanto junto con HVJ como junto con HMG-1. En ésta, dichos constructos de expresión se han empleado con éxito en la transferencia y expresión de ácidos nucleicos *in vitro* y *in vivo*, luego son aplicables
15 para la presente invención.

Otros sistemas de administración de vectores que se pueden emplear para administrar un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico en células incluyen a los vehículos de administración mediados por receptores. Éstos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por el receptor en casi todas las
20 células eucariotas. A causa de la distribución específica por el tipo de célula de diversos receptores, la administración puede ser muy específica (Wu y Wu (1993), *supra*).

En otra realización de la invención, los constructos de expresión pueden consistir simplemente en ADN recombinante desnudo o plásmidos. La transferencia
25 del constructo se puede realizar por cualquiera de los métodos mencionados anteriormente que permeabilizan físicamente o por medios químicos la membrana celular. Esto es aplicable particularmente para la transferencia *in vitro*, sin embargo, esto se puede aplicar al uso *in vivo* también. Dubensky, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**:7529-7533 (1984) inyectaron con éxito el ADN de poliomavirus en la forma de precipitados de CaPO₄ en hígado y bazo de ratones adultos y recién nacidos que
30 mostraban replicación viral activa e infección aguda. Benvenisty y Neshif, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**:9551-9555 (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de los plásmidos precipitados de CaPO₄ causa la expresión de los genes transfectados.

Otra realización de la invención para transferir un constructo de expresión de ADN desnudo en células puede implicar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad de acelerar los microproyectiles revestidos de ADN a una velocidad alta que les permite perforar las membranas celulares y entrar en las células sin matarlas (Klein, *et al.*, *Nature*, **327**:70-73 (1987)). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Un dispositivo tal se basa en una descarga de alta tensión para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza motriz (Yang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**:9568-9572 (1990)). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes como tungsteno o perlas de oro.

Los técnicos expertos en la técnica son conscientes de cómo aplicar la administración de genes en situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para vectores virales, se preparará generalmente una disolución madre del vector viral. Según el tipo de virus y el título alcanzable, se administrará 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} o 1×10^{12} partículas infecciosas al paciente. Se pueden extrapolar figuras similares para formulaciones liposómicas u otras no virales comparando la eficiencia de la captación relativa. Se muestra más abajo la formulación como una composición farmacéuticamente aceptable.

Se contemplan varias rutas para los diversos tipos de células. Para prácticamente cualquier tipo de célula, tejido o órgano, se contempla la administración sistémica. En otras realizaciones, se puede realizar una variedad de aproximaciones directas, locales y regionales. Por ejemplo, a la célula, al tejido o al órgano se les puede inyectar directamente el vector de expresión o la proteína.

En una realización diferente, se contempla la terapia génica *ex vivo*. En una realización *ex vivo*, las células del paciente son retiradas y mantenidas fuera del cuerpo durante al menos algún período de tiempo. Durante este período, se administra una terapia, después la cual las células se introducen de nuevo en el paciente.

Esta descripción también describe a antagonistas de la activación de MANF2 (p.ej., ácido nucleico antisentido de MANF2, anticuerpos neutralizantes). Se contempla la administración del antagonista de MANF2 a un mamífero que tiene niveles mayores o en exceso de la activación de MANF2 endógena, preferiblemente en una situación en la que tales mayores niveles de MANF2 conduzcan a un trastorno patológico.

Composiciones farmacéuticas y terapéuticas y formulaciones

Las moléculas de ácido nucleico de MANF2, los polipéptidos de MANF2 y anticuerpos anti-MANF2 (compuestos activos), y sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos, se pueden incorporar en las composiciones farmacéuticas.

5 Dichas composiciones de MANF2 se preparan para su almacenamiento mezclando la molécula de ácido nucleico de MANF2, la proteína, o el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes, o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A., editor, (1980)), en la forma de una torta liofilizada o de soluciones
10 acuosas. Los vehículos aceptables, los excipientes, o los estabilizadores no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o
15 inmunoglobulina; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como el sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween,
20 Pluronic o polietilenglicol (PEG).

La molécula de ácido nucleico de MANF2, la proteína, o los anticuerpos también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-
25 (metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas son descritas en el *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*.

La ruta de administración de la molécula de ácido nucleico, proteína, o
30 anticuerpo de MANF2 está de acuerdo con los métodos conocidos, p.ej., aquellas rutas expuestas anteriormente para indicaciones específicas, así como las rutas generales de inyección o infusión por medios intravenosos, intraperitoneales, intracerebrales, intramusculares, intraoculares, intraarteriales o intralesionales o sistemas de liberación sostenidos como se indica más abajo. La molécula de ácido nucleico, la proteína, o el
35 anticuerpo de MANF2 se administran continuamente por infusión o por inyección de

bolo. Generalmente, cuando el trastorno lo permite, se debería formular y medicar la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo de MANF2 para la administración específica en el sitio. La administración puede ser continua o periódica. La administración se puede llevar a cabo mediante una bomba implantable a flujo constante o programable o por inyecciones periódicas. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, por inyección intravenosa, administración local (Nabel y Nabel, patente de EE.UU. Nº. 5.328.470, 1994), o por inyección estereotáctica (Chen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3054-3057 (1994)). La preparación farmacéutica de un vector de liberación lenta en la cual se incruste el vehículo de administración de genes.

O bien, cuando se puede producir el vector de administración de genes completo intacto de las células recombinantes, p.ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o varias células que producen el sistema de administración de genes.

Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en la forma de artículos conformados, p.ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles según se describe por Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **15**:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, **12**:98-105 (1982) o alcohol polivinílico, polilactidas (patente de EE.UU. Nº. 3.773.919, documento EP 58,481), o acetato de etilen-vinilo no degradable (Langer *et al.*, *supra*).

Las composiciones de MANF2 de liberación sostenida también incluyen moléculas de ácido nucleico, proteína o anticuerpo de MANF2 liposómicamente atrapadas. Los liposomas que contienen moléculas de ácido nucleico, proteína, o anticuerpos de MANF2 se preparan por los propios métodos conocidos: Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:40304034 (1980); documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; patentes de EE.UU. Nºs. 4.485.045 y 4.544.545; y el documento EP 102.324. Generalmente, los liposomas son del tipo uni-laminar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) cuyo contenido de lípidos es mayor que aproximadamente el colesterol al 30 % mol, estando ajustada la proporción

seleccionada para la terapia óptima de la molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo de MANF2.

Mientras que polímeros tales como el acetato de etilen-vinilo y ácido láctico - ácido glicólico permite la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogel liberan las proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar a consecuencia de la exposición a la humedad a 37°C, causando la pérdida de la actividad biológica y cambios posibles de la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización de proteínas según el mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación del enlace S-S intermolecular por el intercambio de tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando los aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Los dispositivos de membrana implantables y semipermeables son útiles como medios para administrar fármacos en ciertas circunstancias. Por ejemplo, las células que secretan MANF2 soluble, quimeras o anticuerpos pueden ser encapsuladas, y tales dispositivos pueden implantarse en un paciente. Por ejemplo, en el cerebro de pacientes que padecen la Enfermedad de Parkinson. Véase, la patente de EE.UU. Nº. 4.892.538 de Aebischer *et al.*; patente de EE.UU. Nº. 5.011.472 de Aebischer *et al.*; patente de EE.UU. Nº. 5.106.627 de Aebischer *et al.*; solicitud PCT WO 91/10425; solicitud PCT WO 91/10470; Winn *et al.*, *Exper. Neurology*, **113**:322-329 (1991); Aebischer *et al.*, *Exper. Neurology*, **111**:269-275 (1991); y Tresco *et al.*, *ASAIO*, **38**:17-23 (1992).

En consecuencia, también se incluye un método para prevenir o tratar el daño a un nervio o el daño a otras células sensibles a MANF2, que comprende la implantación de células que secretan MANF2, sus agonistas o antagonistas como pueda ser requerido para la condición particular, en el cuerpo de pacientes en necesidad del mismo. Finalmente, la presente descripción describe un dispositivo para prevenir o tratar el daño de un nervio o el daño a otras células como se muestra en este documento mediante su implantación en un paciente que comprende una membrana semipermeable, y una célula que secreta MANF2 (o sus agonistas o antagonistas como se pueda requerir para la condición particular) encapsulado dentro de dicha membrana y siendo dicha membrana permeable a MANF2 (o sus agonistas o

antagonistas) e impermeable frente a factores del paciente perjudiciales para las células. Las propias células del paciente, transformadas para producir MANF2 *ex vivo*, podrían ser implantadas directamente en el paciente, opcionalmente sin dicha encapsulación. La metodología para la encapsulación en la membrana de células vivas es familiar para los expertos en la técnica, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden llevarse a cabo sin experimentación.

La presente descripción describe, por lo tanto, un método para prevenir o tratar el daño de nervios implantando células en el cuerpo de un paciente en necesidad del mismo, células seleccionadas por su capacidad natural de generar, o modificadas para secretar, el anticuerpo de MANF2 o MANF2. Preferiblemente, el MANF2 secretado o el anticuerpo humano de MANF2 maduro es soluble, cuando el paciente es un ser humano. Las implantaciones son preferiblemente no inmunógenas y/o impiden que las células implantadas inmunógenas sean reconocidas por el sistema inmunológico. Para la administración al SNC, una posición preferida para la implantación es el fluido cerebro-espinal de la médula espinal.

La cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo de MANF2 que se emplee terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de las dianas terapéuticas, la ruta de administración y de la condición del paciente. En consecuencia, será necesario que el terapeuta titule la dosis y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará la proteína MANF2 o el anticuerpo hasta que sea alcanzada una dosis que consiga el efecto deseado. Una dosis diaria típica para el tratamiento sistémico podría estar en el intervalo de aproximadamente 1 microgramo/kilogramo hasta 10 mg/kilogramo o más, según los factores mencionados anteriormente. Como una proposición general alternativa, la molécula de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo de MANF2 se formula y administra al sitio diana o tejido en una dosis capaz de establecer en el tejido un nivel de MANF2 que sea eficaz, pero no indebidamente tóxico. Esta concentración intra-tejido debería ser mantenida de ser posible por infusión continua, liberación mantenida, aplicación tópica, implantación de células que expresan MANF2 o inyección a frecuencias empíricamente determinadas. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante ensayos convencionales.

La eficacia de los polinucleótidos de MANF2 viralmente administrados o no viralmente administrados se puede probar en cualquiera de los diversos modelos

animales de la enfermedad de Parkinson, conocidos en la técnica. Por ejemplo, los modelos animales más extensivamente usados de la enfermedad de Parkinson reproducen la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas, por lo general, por la administración de toxinas. La inyección unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en la sustancia negra de ratones o ratas causa la pérdida neuronal en el estriado ipsilateral y la parte compacta de la sustancia negra con poco cambio del hemisferio contralateral. Del mismo modo, la neurotoxicidad inducida por la metanfetamina causa la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas y los expertos en la técnica piensan que están estrechamente alineadas respecto a la condición humana. La eficacia de un agente terapéutico se puede evaluar por el resultado behaviorístico usando el comportamiento rotatorio inducido por apomorfina.

Otro modelo de la enfermedad de Parkinson se construye usando la neurotoxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6,-tetrahidropiridina (MPTP). La MPTP se administra a mamíferos, tales como ratones, ratas y monos. La administración de MPTP a monos no sólo causa la pérdida de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas en la parte compacta de la sustancia negra y el estriado, sino que también en las manifestaciones behaviorísticas similares a las observadas en los pacientes con enfermedad de Parkinson humano, tales como aquinesia y rigidez. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. Nº. 6.362.319.

En contraste con los modelos de animal descritos anteriormente de la enfermedad de Parkinson, varias cepas innatas de ratones están disponibles que demuestran una decadencia gradual en los números de células dopaminérgicas. Por ejemplo, se ha generado un ratón deficiente del receptor D2 por recombinación homóloga cuyas características behaviorísticas se parecen a las de los pacientes aquejados con la enfermedad de Parkinson. Fitzgerald *et al.* (1993) *Brain Res.* **608**:247-258. Un segundo ejemplo es el ratón mutante Weaver que muestra una decadencia gradual en los números de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en un tiempo de hasta un 40 %. Verina *et al.* (1997) *Exp. Brain Res.* **113**:5-12; Adelsbrecht *et al.* (1996) *Mol. Brain Res.* **43**:291-300; Mitsumoto *et al.* (1994) *Science* **265**:1107-1110.

Los presentes ejemplos usaron el modelo PD parcial de Sauer y Oertel (Sauer y Oertel, *Neuroscience* (1994) **59**:401-415). En este modelo, la inyección intraestriatal de 6-OHDA induce la degeneración retrógrada progresiva de neuronas DA que comienza entre 1 y 2 semanas después de la lesión y sigue durante 8 y 16 semanas. Esta reducción continua de neuronas DA puede ser más similar al proceso de la

enfermedad PD y más apropiado que un modelo de animal para el estudio terapéutico que el modelo completo, que se construye destruyendo el bulto del cerebro anterior medio, causando así una degeneración más rápida de las neuronas DA. En los experimentos detallados más abajo, las ratas habían exhibido déficits behaviorísticos consecuentes antes de la inyección del vector. Se asume generalmente que la aparición de rotaciones inducidas por apomorfina representa una reducción del 90 % del contenido de dopamina estriatal (Hudson *et al.*, *Brain Res.* (1993) **626**:167-174). Sin embargo, los estudios en pacientes con PD y modelos de animales han indicado que podría haber más neuronas DA supervivientes que los niveles de dopamina sugeridos (Javoy-Agid *et al.*, *Neuroscience* (1990) **38**:245-253; Feamley y Lees, *Brain* (1991) **114**:2283-2301; Schulzer *et al.*, *Brain* (1994) **117**:509-516). En el modelo usado en este documento, el número de neuronas positivas de CTB en el lado lesionado del SN tenía un 28,9 % del valor contralateral 4 semanas después de la lesión. Esto es consecuente con los estudios anteriores usando el marcaje retrógrado con Fluorogold (FG) que mostró un 28,8 % (después de una lesión de 35 días) (Kozlowski *et al.*, *Exp. Neurol.* (2000) **166**:1 15) o un 34 % (después de una lesión de 4 semanas) (Sauer y Oertel, *Neuroscience* (1994) **59**:401-415) de células FG-positivas en el SN lesionado. Además, la mayor parte de las neuronas marcadas con CTB fueron TH-positivas, sugiriendo que la parte de la proyección nigroestriatal permanecía intacta en el momento de la inyección del vector AAV. Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, estas partes restantes de proyecciones nigroestriatales intactas y de neuronas DA pueden servir como sustrato para la regeneración y recuperación funcional después de la administración del gen de MANF2.

Se han descrito modelos de animales de otras enfermedades neurodegenerativas y son útiles para evaluar la eficacia terapéutica de polinucleótidos de MANF2 viralmente administrados en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos además de la PD. Por ejemplo, Martin *et al.* (1995) *Brain Res.* **683**:172-178 describen un modelo animal de epilepsia, Matheson *et al.* (1997) *NeuroReport* **8**:1739-1742 y Oppenheim *et al.* (1995) *Nature* **373**:344-346 describen modelos de neurodegeneración que resultan de traumas físicos, y Sagot *et al.* (1996) *J. Neurosci.* **16**:2335-2341 describen un modelo de degeneración de neuronas motoras en animales.

Diagnósticos

La presente descripción también describe kits diagnósticos o pronósticos para uso en la detección de la presencia de MANF2 o su variante alélica en una muestra biológica. El kit proporciona medios para el diagnóstico de condiciones dependientes de MANF2 según se describe más arriba o para evaluar la predisposición de un individuo a padecer afecciones mediadas por la variación o la disfunción de MANF2. El kit puede comprender un compuesto marcado capaz de detectar el polipéptido de MANF2 o el ácido nucleico (p.ej. mRNA) en una muestra biológica. El kit también puede comprender cebadores de ácido nucleico o sondas capaces de hibridarse específicamente a al menos partes del gen de MANF2 o su variante alélica. El kit se puede envasar en un recipiente adecuado y preferiblemente contiene las instrucciones para usar el kit.

Purificación del receptor

En aún otro aspecto más de la invención, puede usarse MANF2 o su análogo para la purificación de la afinidad del receptor que se une a MANF2. MANF2 es un ligando preferido para la purificación. Brevemente, esta técnica implica: (a) poner en contacto una fuente del receptor de MANF2 con MANF2 inmovilizado en condiciones bajo las cuales el receptor de MANF2 que se purifica se adsorbe selectivamente en el MANF2 inmovilizado; (b) lavar el MANF2 inmovilizado y su soporte para eliminar el material no adsorbido; y (c) eluir las moléculas del receptor de MANF2 del MANF2 inmovilizado al cual son adsorbidas con un tampón de elución. En una realización particularmente preferida de la purificación de afinidad, se une MANF2 covalentemente a una matriz inerte y porosa o resina (p.ej., agarosa reaccionada con bromuro de cianógeno). Sobre todo se prefiere una inmunoadhesina de MANF2 inmovilizada en una columna de proteína-A. Entonces se pasa una solución que contiene el receptor de MANF2 por material cromatográfico. El receptor de MANF2 se adsorbe a la columna y se libera posteriormente cambiando las condiciones de elución (p.ej. cambiando el pH o la fuerza iónica).

La técnica preferida para identificar a las moléculas que se unen a MANF2 utiliza a un MANF2 quimérico (p.ej., inmunoadhesina de MANF2 o MANF2 marcado con el epítipo) unido a una fase sólida, tal como el pocillo de una placa de ensayo. Se puede medir la unión de las moléculas candidato, que están opcionalmente marcadas (p.ej., radiomarcadas), al MANF2 inmovilizado. O bien, se puede medir la competición para unirse a MANF1, marcado con 125 .

Producción de animales transgénicos

Pueden usarse los ácidos nucleicos que codifican a MANF2, preferiblemente de especies no humanas, tales como la proteína murina o de rata, para generar animales transgénicos o animales "genéticamente modificados" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el rastreo de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico no humano (p.ej., un ratón) es un animal que tiene células que contienen un transgen, cuyo transgen fue introducido en el animal o en un antepasado del animal en una etapa prenatal, p.ej., embrionaria. Un transgen es un ADN que se integra en el genoma de una célula de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el cADN de humano y/o ratón que codifica a MANF2, o su secuencia apropiada, puede usarse para clonar el ADN genómico que codifica a MANF2 de acuerdo con técnicas establecidas y las secuencias genómicas pueden usarse para generar animales transgénicos que contienen a las células que expresan el ADN que codifica a MANF2. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N^{os}. 4.736.866 y 4.870.009. Típicamente, se reconocerían células particulares para la incorporación del transgen de MANF2 con potenciadores específicos de tejido, que podrían causar el efecto deseado del tratamiento. Pueden usarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgen que codifica MANF2 presentado en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria para examinar el efecto de una mayor expresión del ADN que codifica a MANF2. Dichos animales pueden usarse como animales de ensayo para analizar los reactivos que se supone que confieren la protección, por ejemplo, de las enfermedades relacionadas con MANF2. De acuerdo con esto, se trata a un animal con un reactivo de modo que una frecuencia reducida de la enfermedad, comparado con los animales no tratados que llevan el transgen, indicaría una potencial intervención terapéutica para la enfermedad.

Está bien establecido en la actualidad que los transgenes se expresan más eficazmente si contienen intrones en el extremo 5', y si éstos son los intrones naturales (Brinster *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:836-840 (1988); Yokode *et al., Science* **250**:1273-1275 (1990)).

La descendencia transgénica se identifica demostrando la incorporación del transgen microinyectado en su genoma, preferiblemente preparando el ADN a partir de secciones cortas de la cola y analizando por transferencia Southern la presencia del

transgen ("Transferencias de cola"). Una sonda preferida es un segmento de un constructo de fusión del transgen que está únicamente presente en el transgen y no en el genoma de ratón. O bien, la sustitución de una secuencia natural de codones en el transgen con una secuencia diferente que todavía codifica el mismo péptido produce una región única identificable en los análisis de ARN y ADN. Los ratones "fundadores" transgénicos identificados de esta manera se cruzan con ratones normales para producir heterocigotos, que son cruzados de nuevo para crear una línea de ratones transgénicos. Las transferencias de cola de cada ratón de cada generación se examinan hasta que sea establecida la cepa y homocigótica. Cada ratón fundador creado con éxito y su cepa difieren de otras cepas en la posición y el número de copia de los transgenes insertados en el genoma de ratón, y por eso tienen niveles ampliamente variantes de la expresión del transgen. Los animales seleccionados de cada línea establecida son sacrificados a los 2 meses de edad y la expresión del transgen se analiza por transferencia Northern a partir del ARN de hígado, músculo, grasa, riñón, cerebro, pulmón, corazón, bazo, gónada, glándula suprarrenal e intestino.

Producción de animales "genéticamente modificados"

De forma alternativa, se pueden usar homólogos de MANF2 no humanos para construir un animal "genéticamente modificado" con MANF2, es decir, que tiene un gen defectuoso o modificado que codifica a MANF2, a consecuencia de la recombinación homóloga entre el gen de MANF2 endógeno y un ADN de MANF2 genómico modificado introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el cADN de MANF2 murino puede usarse para clonar el ADN de MANF2 genómico de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN de MANF2 genómico se puede suprimir o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para monitorizar la integración. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN inalterado flanqueante (tanto en los extremos 5' como 3') en el vector (véase p.ej., Thomas y Capecchi, *Cell* **51**:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos). El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (p.ej., por electroporación) y se seleccionan las células en las cuales el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno (véase p.ej., Li *et al.*, *Cell* **69**:915 (1992)). Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (p.ej., un ratón) para formar quimeras de agregación (véase p.ej., Bradley, en "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", E. J. Robertson, editor (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152). Un

embrión quimérico se puede implantar entonces en un animal adoptivo femenino pseudoembarazado adecuado y el embrión se lleva a término para crear a un animal "genéticamente modificado". La progenie que alberga el ADN homológamente recombinado en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándares y usarse para criar a animales en los cuales todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Se pueden caracterizar los animales genéticamente modificados según su capacidad de imitar los trastornos neurológicos humanos y los defectos.

10 Equivalentes

Aunque hayan sido descritas en este documento detalladamente las realizaciones particulares, esto se ha hecho de forma ilustrativa con fines demostrativos solamente, y no se requiere que limiten el alcance de las reivindicaciones añadidas que siguen. Particularmente, es contemplado por los inventores que se pueden hacer varias sustituciones, alteraciones y modificaciones a la invención sin abandonar el alcance de la invención según se define por las reivindicaciones. Se piensa que la elección del material inicial de ácido nucleico, el clon de interés o el tipo de biblioteca es un asunto de rutina para cualquier experto en la técnica con conocimiento de las realizaciones descritas en este documento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones pensadas están dentro del ámbito de las reivindicaciones siguientes.

Habiendo descrito de forma general la invención, la misma será más fácilmente entendida en cuanto a los ejemplos siguientes, que son proporcionados solo con fines ilustrativos y no como una limitación.

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonación de los cADN de MANF2 y análisis de la expresión del mRNA de MANF2 por RT-PCR

30

Los inventores fueron capaces de clonar los cADN de cadena entera de ratón y humano por RT-PCR a partir de células cerebrales de ratón (usando los cebadores m-MANF2-ATG y m-MANF2-STOP-del) y humano (usando los cebadores h-MANF2-ATG y h-MANF2-STOP-del). El ARN total de ratón fue aislado usando el kit de extracción de ARN (Ambion), los ARN humanos fueron obtenidos de Clontech. Primero, los cADN de cadena fueron sintetizados con transcriptasa inversa (Superscript^{II}, Invitrogen)

35

usando el ARN total cebado de oligo(dT) (Promega) (5 µg) o poly(A) + ARN (1 µg) de tejidos diferentes como plantilla.

Los cebadores usados en la clonación y el análisis de la expresión de MANF2 de ratón (m-MANF2) y MANF2 humano (H-MANF2) fueron:

5

m-MANF2-ATG

ACC ATG CGG TGC ATC AGT CCA ACT GC (SEQ ID NO:5)

m-MANF2-int-as

CTC ATG GGA CGA GTG ACT TCT CC (SEQ ID NO:6)

m-MANF2-STOP

GTC AGA GCT CCG TTT GGG GGT ATA TC (SEQ ID NO:7)

m-MANF2-STOP-del

GAG CTC CGT TTG GGG GTA TAT C (SEQ ID NO:8)

h-MANF2-ATG

ACC ATG TGG TGC GCG AGC CCA GTT GC (SEQ ID NO:9)

h-MANF2-int-as

GCA CAC TCA TTG GGC GAG TGA CTT C (SEQ ID NO:10)

h-MANF2-stop

GAT CAG AGC TCT GTT TTG GGG TGT GTC (SEQ ID NO:11)

h-MANF2-stop-del

GAG CTC TGT TTT GGG GTG TGT C (SEQ ID NO:12)

10 Las reacciones PCR fueron realizadas en un volumen de 25 µl conteniendo 1/10 de la reacción RT como plantilla y 0,25 unidades de ADN polimerasa termoestable (Dinazima, Finnzymes Ltd), el kit del Sistema PCR de Expand® Long Distance o rico en GC (Roche) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue

amplificado usando las condiciones siguientes: 94°C (2 minutos); 35 ciclos de 94°C (40 s), 55°C (40 s), 72°C (60 s). Para todas las combinaciones de cebadores la temperatura de hibridación fue 55°C y el número de ciclos fue 30-35. Los productos RT-PCR amplificados fueron resueltos en gel de agarosa al 1,5 %, se clonaron en los
5 vectores pCRII y pcADN3-His-V5 (Invitrogen) y se verificaron por secuenciación.

Ejemplo 2

Cultivo celulares

Se cultivaron células COS-7 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)
10 que contenía suero bovino fetal al 10 % (Gibco). Las células fueron transfectadas con el vector de expresión pcADN3.1 (Invitrogen) que contiene un cADN de MANF2 de humano o ratón de longitud completa usando el protocolo de transfección de Fugene 6 (Roche). Después de 12 h, el medio fue retirado y sustituido por DMEM sin suero. Las células se recuperaron 48 horas más tarde y se prepararon los extractos de proteína
15 de las células. Las proteínas secretadas (medio) fueron concentradas. Los extractos de proteína se resolvieron en gel de poliacrilamida y se analizaron por transferencia Western usando los anticuerpos de V5 (Invitrogen).

Ejemplo 3

20 Hibridación *in situ*. Se linearizó el cADN de cadena entera de MANF2 de ratón en el vector pCRII antes de sintetizar la sonda de ARN. Las sondas de ARN monocatenario fueron transcritas *in vitro* usando 50 µCi de ³⁵S-UTP y las polimerasas T3 o T7. Después de la digestión de DNAsa, las sondas fueron precipitadas y suspendidas de nuevo en formamida al 50 %, DTT 10 mM. Las secciones sagital y coronarias de los
25 cerebros de ratón fueron cortadas en un criostato y se transfirió en portaobjetos gelatinados. Las secciones fueron secadas, fijadas en paraformaldehído al 4 % y se hibridaron en un tampón que contenía formamida al 50 %, NaCl 0,3 M, Tris 10 mM, Na PO4 10 mM (pH 6,8), EDTA 5 mM, 1x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, DTT 10 mM, 1 mg/ml de tARN y la sonda específica). La hibridación se hizo
30 durante la noche a 50°C. El lavado se hizo en formamida al 50 %, 2xSSC a 37°C seguido de digestión con ARNsa. Los portaobjetos fueron expuestos a una película de rayos X o se bañaron en una emulsión NTB-2 de Kodak y se desarrollaron después de 14-30 días.

35 Ejemplo 4

Análisis de expresión de MANF2 por hibridación *in situ*Sondas

5 El cADN de MANF2 de cadena entera clonado en el TA-vector pCRII-TOPO (Invitrogen) fue usado para preparar sondas de cARN antisentido y sentido de control. El plásmido se linearizó con las enzimas apropiadas, y se generaron sondas marcadas con ³⁵S por transcripción *in vitro* usando UTP (Amersham) marcado con ³⁵S y el sistema de transcripción SP6 o T7 (Promega). Los nucleótidos no incorporados se
10 eliminaron por filtración de gel con Sephadex G-50 (columna NICK, Pharmacia Biotech). Las sondas se precipitaron con etanol y se disolvieron en tampón de hibridación (formamida (FA) desionizada al 60 %, NaCl 0,3M, Tris-HCl 20 mM, pH8,0, EDTA 5 mM, dextransulfato al 10 %, solución 1xDenhardt, ditiotreitól 100 mM, tARN de levadura a 0,5 mg/ml) a una concentración final de 32.000-36.000 cpm/μl.

15

Muestras de tejido

Se montaron el cerebro de ratones NMRI postnatales (P1, P5, P10 y adulto) en Tissuetek sobre hielo seco, y se almacenaron a -70°C. Las secciones coronarias del tejido congelado se cortaron en un criostato. Los testículos de embriones de ratón
20 (E11, E12, E15) y de ratones adultos se fijaron en paraformaldehído al 4 % (PFA) durante la noche a 4°C, se deshidrataron en series de etanol, se limpiaron con tolueno, y se embebieron en parafina. Las secciones sagitales se cortaron y se adhirieron sobre portaobjetos de vidrio silanizados.

25 Hibridaciones *in situ*

Se fijaron criosecciones (descongeladas y secadas al aire) en PFA al 4 % a TA durante 15 minutos, se aclararon con PBS y se trataron con proteinasa K (1 μg/ml, Sigma), se aclararon y fijaron de nuevo con PFA al 4 %. Después de aclarar con PBS, las secciones se incubaron en FA al 50 %, 2xSSC durante 10 minutos, se aclararon
30 con agua, se acetilaron y se sumergieron en FA al 50 %, 2xSSC durante 10 minutos. Las secciones se prehibridaron con tampón de hibridación a 52°C durante 1,5-2 h, y se hibridó con una sonda (120-150 μl) durante una noche a 52°C.

Las secciones de parafina se desparafinaron en xileno, se rehidrataron en una serie decreciente de etanol (absoluto, etanol del 94 %, 70 %, 50 % y 30 %) y se fijaron
35 en PFA al 4 %. Los portaobjetos se lavaron con PBS, se trataron con proteinasa K (20

µg/ml, Sigma), se aclararon con PBS y se fijaron de nuevo con PFA al 4 %. Para la acetilación, las secciones se colocaron en trietanolamina 0,1M, pH8,0, y se añadió anhídrido acético (2,5 ml/L). Después de 10 minutos de incubación, los portaobjetos se aclararon con PBS, se deshidrataron en una serie creciente de etanol y se secaron al
5 aire. La sonda (120-150 µl) fue aplicada en cada portaobjeto, y se realizó la hibridación durante una noche a 52°C en una cámara húmeda.

Después de la hibridación, las secciones se lavaron con DTT 10 mM en 5xSSC a 50°C durante 30 minutos, y en 2xSSC, DTT 30 mM, FA al 50 % a 55°C durante 30 minutos (lavado de severidad baja), se aclaró tres veces en tampón NTE (NaCl 0,5M,
10 EDTA 5 mM, Tris 10 mM, pH8,0) a 37°C durante 10 minutos, se trató con ribonucleasa A (20 µg/ml) durante 30 minutos y se aclaró. Fue realizado un segundo lavado de severidad baja, y las secciones se aclararon en 2xSSC y 0,1xSSC durante 15 minutos cada uno, se deshidrataron en una serie de etanol (acetato de amonio 0,3M en etanol al 30 %, 60 %, 80 %, 95 %, etanol absoluto), se secaron al aire y se expusieron a una
15 película de rayos X durante 5-6 días. Los portaobjetos se bañaron en una emulsión NTB-2 (Kodak), se expusieron a 5-6 semanas y se desarrollaron. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en Permount.

Ejemplo 5

20 Producción de proteína de MANF2 recombinante en células Sf9 de insecto

Se clonó cADN de MANF2 humano sin una secuencia señal supuesta en el vector de expresión pMIB/V5-His (sistema InsectSelect, Invitrogen), en marco con la señal de secreción de melitina de abeja del N-terminal y el marcador V5-6xHis del extremo C-terminal. Las células Sf9 cultivadas en medio SF-900 II (Gibco) con
25 antibiótico antimicótico (Gibco) fueron puestas en una placa de seis pocillos (9x10⁵ células/pocillo) y cuando se unieron, se transfectaron con 2 µg del plásmido usando 6 µl del reactivo Cellfectin (Invitrogen). Después de 48 h a 28°C, las células se dividieron 1:5, se unieron durante una noche, y se les añadió blasticidina S (50 µg/ml, Invitrogen). Se cultivaron colonias resistentes hasta confluencia para formar una línea
30 celular policlónica (Sf9-hMANF2). Las células estables fueron mantenidas en 10 µg/ml de blasticidina. La secreción de MANF2 recombinante al medio de cultivo se verificó por transferencia Western con anticuerpo monoclonal anti-V5 de ratón (1:5000, Invitrogen).

Un cultivo en suspensión de células Sf9-hMANF2 fue comenzado con células
35 adherentes en fase logarítmica. Las células se sembraron en 1x10⁶ células/ml en

medio SF-900 II con 10 µg/ml de gentamicina y 10 µg/ml de blastidina S. El cultivo fue cultivado a 28°C a 120 revoluciones por minuto, y se subcultivó cuando la densidad alcanzó aproximadamente 2×10^6 células/ml para mantener el crecimiento logarítmico.

5

Purificación de la proteína de MANF2 a partir de medios de cultivo

Para la producción de proteína, los cultivos en suspensión de Sf9-hMANF2 (volumen 250 ml) se cultivaron durante 4-6 días a la fase post-logarítmica. Las células se eliminaron por centrifugación a 1200 revoluciones por minuto durante 10 minutos, y se purificó el MANF2 de IL de los medios clarificados a 4°C.

10

Etapa 1. Purificación de Níquel-Sepharose por centrifugación

Para ajustar las condiciones de unión para las proteínas marcadas con His, el medio se diluyó (1:2) con PBS, y se añadió imidazol (Sigma) a la concentración final 5 mM. Se cargó la Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) con NiCl_2 0,1M, se lavó, y se suspendió de nuevo en un volumen de gel de PBS. Para 50 ml de medio, se añadió 1 ml de mezcla Ni-sepharose y la muestra se mantuvo con rotación de final sobre final a 4°C durante 1 hora. El gel se sedimentó por centrifugación a 500xg durante 2 minutos y se lavó cuatro veces con KCl 0,5M, imidazol 5 mM en PBS. Las proteínas se eluyeron con imidazol 0,5M en PBS, pH7,4, usando un volumen igual al volumen del gel. Los eluatos se combinaron y concentraron con dispositivos de filtro de YM-10 Centricon (Millipore) a un volumen final de 50-100 µl. Las alícuotas se corrieron en SDS-PAGE en gel al 15 % y se visualizaron con azul de Coomassie.

15

20

Etapa 2. Se cargó la columna HiTrap Chelating HP (5 ml, Pharmacia Biotech) con níquel y se equilibró en tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, pH7,4). La muestra de la etapa 1 fue diluida en 5 ml de tampón de unión y se aplicó a la columna. La elución se realizó con imidazol 0,5M, NaCl 0,5M en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH7,4, usando un gradiente lineal (0-100 %) a un caudal de 0,8 ml/min. Las fracciones (1 ml) se recogieron y se analizaron por transferencia Western con el anticuerpo anti-V5. Las fracciones que contenían MANF2 se concentraron con filtros de YM-10 a 100 µl. Se añadió PBS (1 ml), y la muestra se concentró después a un volumen final de 50 µl.

25

30

35

Ejemplo 6

5 Secuenciación del extremo N-terminal y análisis de masas de las proteínas MANF2 humanas recombinantes

Se pusieron células COS-7 en tres placas de 9 cm y se transfectaron con 10 µg de hMANF2-pcADN3.1 con reactivo de Fugene 6 (Roche). Después de 24 h, el medio se sustituyó con DMEM sin suero y las células se incubaron durante 48 h adicionales.

10 El medio de cultivo (24 ml) se recuperó y el MANF2 recombinante se purificó como en la etapa de purificación 1 (véase más arriba).

De la etapa 1, se usaron 250 µl de eluato (volumen total 500 µl) para la cromatografía de fase inversa. La muestra se aplicó en una columna C1 (1 mm x 20 mm, Pharmacia Biotech) en una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo de 0-100 % en TFA al 0,1 %. Se recogió un pico separado que contenía 3 µg de MANF2, se corrió en gel de SDS-PAGE al 12 % y se transfirió sobre una membrana PVDF. La transferencia se tiñó, una banda que contenía MANF2 se dividió, se extrajo y se aplicó a la secuenciación del extremo N-terminal.

20 La masa molecular del MANF2 humano recombinante se determinó por análisis de electropulverización Q-TOF. Parte de la muestra fue digerida en fragmentos peptídicos y las masas del fragmento se determinaron por Q-TOF.

La secuenciación del extremo N-terminal del MANF2 humano recombinante producido en células COS-7 falló, por lo visto porque la glutamina (Q) del extremo N-terminal en la secuencia predicha de la proteína madura (QEAGG...) fue modificada a ácido piroglutamínico cíclico. El análisis de masas de los fragmentos peptídicos de MANF2 verificó que la secuencia señal se dividió entre aminoácidos en la posición 26 y 27. La proteína se determinó que contenía 3 o 4 puentes de cisteína.

30 Se analizó de la misma manera el MANF2 de la línea celular estable Sf9-hMANF2. La secuencia de la proteína recombinante del extremo N-terminal se determinó que era correcta. Basado en el análisis de masas, las ocho cisteínas conservadas forman cuatro puentes de cisteína en la proteína madura.

Ejemplo 7

35 Actividad biológica de proteínas MANF2 recombinantes

Cultivos de neuronas dopaminérgicas

5 Para las preparaciones de neuronas dopaminérgicas, se disecaron los suelos del cerebro medio de ratas E14 o ratones E13. El tejido se digirió con tripsina al 0,5 % en HBSS durante 20 minutos a 37°C. La actividad de tripsina fue bloqueada añadiendo suero de ternero fetal (FCS). Se añadió Dnasa I (1 mg/ml), y la muestra se trituró con una pipeta de vidrio siliconizada. Las células se lavaron dos veces con medio completo
10 (DMEM-F12 conteniendo HC-3 al 10 %, glucosa al 0,6 % (Sigma) y 1x Glutamax I (Gibco)), y se pusieron en placa en cubreportas revestidos de poli-L-ornitina/laminina a una densidad de 150.000 células de cubreportas. Al día siguiente, se añadieron los factores de proteína y las células se cultivaron durante 6 días. Los cultivos se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante 10 minutos a RT, se lavaron tres veces con PBS, se
15 post-fijaron con acetona helada durante 15 minutos a -20°C y se lavaron. Los cultivos fijados se bloquearon con HS al 10 % en PBS durante 1 hora a RT, y el anticuerpo de antitirosina hidroxilasa (TH) de oveja (1:200, Chemicon Internacional) se aplicó durante una noche a 4°C. Los cultivos se lavaron tres veces con PBS y se aplicó el anticuerpo secundario Cy3-anti-sheep (1:500) durante 45 minutos a TA. Los cultivos se lavaron y
20 se montaron en medio de montaje.

Cultivos de neuronas del ganglio de la raíz dorsal

 Para las preparaciones de neuronas DRG, se digirió tejido de ratones E16 con tripsina al 1 % en HBSS durante 45 minutos a 37°C. El tejido se trató como para los
25 cultivos de dopamina, y las células aisladas se pusieron en placas en medio completo (medio F14 de Ham con SATO). Las células se cultivaron con o sin factores de proteína durante 6 días y se contaron.

Ejemplo 8

Diseño experimental

 Todas las ratas se expusieron a una microinfusión estereotáxica dos veces; primero les dieron tanto vehículo (4 µl), MANF2 (10 µg) como GDNF (10 µg), y 6 horas más tarde cada animal recibió 6-OHDA (8 µg) en el mismo sitio en el estriado dorsal izquierdo. Las coordenadas en el estriado izquierdo con relación al bregma y duramadre fueron A/P+1.0, L/M+2.7, D/V-4 según el atlas de Paxinos y Watson
35

(Paxinos y Watson, 1997, "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic Press, San Diego). El estudio consistió en los grupos siguientes: PBS+6-OHDA intraestriatal, GDNF+6-OHDA intraestriatal y MANF2 intraestriatal +6-OHDA.

5 *Comportamiento Rotatorio*

Se realizaron pruebas behaviorísticas después de una lesión de 2 y 4 semanas. A las ratas se les permitió habituarse a la cámara de ensayo durante 30 minutos antes de que les fuera administrada la D-anfetamina (University Pharmacy, Helsinki, Finlandia; 2,5 mg/kilogramos i.p). El número de giros completos (360°)
10 ipsilaterales y contralaterales fue registrado durante un periodo de 2 h. Los giros ipsilaterales completos frente a la lesión se calcularon restando los giros a la izquierda de los giros a la derecha.

Inmunohistoquímica

15 4 semanas después de la lesión, las ratas se anestesiaron con una sobredosis de natriumpentobarbital (90 mg/kilogramos, i.p, Orion Pharma, Finlandia) y se perfusieron intracardialmente con solución salina tamponada de fosfato (PBS) seguido de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Los cerebros se retiraron, se fijaron después durante 4 h y se almacenaron en tampón fosfato de sodio
20 que contenía sacarosa al 20 % a 4°C. Se cortaron criosecciones coronarias consecutivas de 40 µm en un microtomo corredizo. Seis juegos de secciones se recogieron en una solución crioprotectora (PB 0,5M, glicerol al 30 % y etilenglicol al 30 %) y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento inmunohistoquímico. Las secciones sin flotantes se trataron para la TH-inmunohistoquímica. Después de tres
25 aclarados en PBS, la actividad de peroxidasa endógena se inactivó durante 5 minutos en H₂O₂ al 3 % /metanol al 10 % / PBS. Después de 3 aclarados en PBS, las secciones se preincubaron con suero de caballo normal (NHS)/ Tritón al 0,3 % X-100 en PBS a fin de bloquear la tinción no específica. A partir de entonces las secciones se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con una dilución 1:2000 de
30 ratón-anti-TH biotinilado (Chemicon, Temecula, California). Esto fue seguido de incubaciones con una dilución 1:200 de caballo-anti-ratón biotinilado (Vector, BA2001) y por la incubación en el complejo de peroxidasa de avidina-biotina usando el kit de ABC Vectastain de Elite (Laboratorios Vector). Las reacciones se visualizaron usando DAB como un cromogen.

Análisis morfológico

5 *Recuentos de células SN*

Se usaron procedimientos de recuento de células estereológicas insesgadas para contar las células TH-positivas en los pares de sustancia negra compacta (SNpc) usando el método de fraccionamiento óptico en combinación con el principio disector y las reglas de recuento insesgadas (West *et al.*, 1991, *Anat. Rec.* **231**, 482-497; Mouton
10 *et al.*, 2002, *Brain Res.* **956**, 30-35). Se analizó todo el SNpc con la plataforma de Stereo Investigator (MicroBrightField, Alemania) unido al microscopio BX51 de Olympus. De cada animal, se seleccionaron 3 secciones de la parte central del SNpc, cuando el núcleo terminal medio (MTN) estaba presente (nivel A/P-5.3), para su análisis cuantitativo. El método de valoración del fraccionamiento óptico fue optimizado
15 para dar el coeficiente de error menor que el % x por muestra cerebral individual. Cada espacio de referencia fue perfilado a baja potencia (4 x), y las células se contaron usando un objetivo de gran aumento (60 x, inmersión en aceite).

Resultados

20 En ratas macho de Wistar, una sola inyección de MANF2 (10 µg) en el estriado fue capaz de prevenir la degeneración inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 8 µg) de nervios dopaminérgicos del tracto Nigro-Estriatal. Con anestesia, las ratas fueron expuestas a una microinyección estereotáxica dos veces; primero se les proporcionó vehículo (PBS, 4 µl, grupo de control) o MANF2 (10 µg, grupo de tratamiento) y 6
25 horas más tarde cada animal recibió 6-OHDA (8 µg) en el mismo sitio en el estriado dorsal izquierdo. Las coordenadas en el estriado izquierdo con relación al bregma y duramadre fueron A/P +1.0, L/M +2.7, D/V-4 según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1997, "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic press, San Diego).

30

Se realizaron pruebas behaviorísticas dos veces en todas las ratas. Dos y 4 semanas después de la lesión a cada rata le fue administrada D-anfetamina (2,5 mg/kilogramos, i.p.) a fin de inducir un comportamiento de giro ipsilateral (al lado de la lesión), que fue registrado durante un periodo de 2 h. A las dos semanas después de la lesión de
35 anfetamina (2,5 mg/kilogramos, i.p.) se indujo un giro ipsilateral significativo del

comportamiento en el grupo de control. Por el contrario, ningún aumento de giros ipsilaterales fue observado en el grupo de tratamiento (tratado con MANF2 antes de 6OHDA). A las cuatro semanas después de la lesión, MANF2 fue capaz de invertir sustancialmente el giro ipsilateral inducido por anfetamina, y el análisis inmunohistoquímico demostró una protección significativa de las células dopaminérgicas por el factor neurotrófico. Los resultados de las pruebas behaviorísticas se muestran en la FIGURA 16.

TH-inmunohistoquímica. A las 4 semanas después de la lesión, siguiendo un segundo experimento behaviorístico, las ratas se anestesiaron con una sobredosis de sodio pentobarbital (90 mg/kilogramos) y se perfusionó intracardialmente con solución salina tamponada de fosfato (PBS) seguido de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Las secciones sin flotantes se trataron para TH-inmunohistoquímica. Se usaron procedimientos de recuento de células estereológicas insesgado para contar las células TH-positivas en los pares de sustancia negra compacta (SNpc) usando el método de fraccionamiento óptico en combinación con el principio disector y las reglas de recuento insesgadas (West *et al.* 1991, *Anat. Rec.* **231**, 482-497; Mouton *et al.* 2002, *Brain Res.* **956**, 30-35). El SNpc entero fue analizado con la plataforma de Stereo Investigator (MicroBrightField, Alemania) unido a un microscopio BX51 de Olympus. La pérdida de células TH-positivas en los pares de sustancia negra compacta del grupo de control y el grupo de tratamiento fue del 30 % y del 4 %, respectivamente. Una representación gráfica de los resultados se muestra en la FIGURA 17.

Se observó transporte retrógrado de MANF2 del estriado dorsal a la sustancia negra en ratas macho Wistar. Se inyectó MANF2 yodado por medio de la inyección estereotáxica al estriado dorsal. Veinticuatro horas más tarde las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de sodio pentobarbital (90 mg/kilogramos) y se perfusieron intracardialmente con solución salina tamponada de fosfato (PBS) seguido de paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. El cerebro se retiró y se cortó en secciones coronarias de 1 mm de espesor. Se tomaron tres milímetros en punciones de diámetro del estriado dorsal, corteza frontal, hipocampo y sustancia negra. La radiactividad en las punciones fue medida por contador gamma (Perkin Elmer). Algunos cerebros se cortaron en secciones coronarias de 40 mm y las rebanadas se colocaron para la autoradiografía en la película de rayos X.

Discusión

En la enfermedad de Parkinson, que es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad, se pierden gradualmente neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Los factores neurotróficos tienen un potencial terapéutico significativo en el tratamiento de enfermedades cerebrales degenerativas. Los factores neurotróficos que podrían reducir o invertir la progresión de la degeneración neuronal, o realzar la recuperación del daño a los nervios son moléculas diana potenciales para el desarrollo de fármacos. El factor neurotrófico derivado de una línea celular de la glía (GDNF) es el factor trófico derivado de diana más potente para neuronas dopaminérgicas descritas hasta ahora (Lin *et al.*, 1993, *Science* **260**, 1130-2). La administración de GDNF en el putamen de pacientes de Parkinson humanos causó mejoras clínicas (Gill *et al.*, 2003, *Nat. Med.* **9**, 589-95), pero los datos más recientes de Amgen indican un riesgo serio de los efectos secundarios. Esto garantiza la búsqueda de nuevos factores neurotróficos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Las conclusiones de los inventores indican que MANF2 es posiblemente el primer factor neurotrófico evolutivamente conservado. El MANF2 puede, al ser eficazmente y posiblemente más selectivo que GDNF, rescatar neuronas dopaminérgicas del cerebro medio *in vivo* en un modelo 6-OHDA de rata de la enfermedad de Parkinson. Una sola inyección de MANF2 seis horas antes de la administración de 6-OHDA en el estriado dorsal de ratas adultas redujo sustancialmente el comportamiento del giro ipsilateral inducido por anfetamina después de una lesión de 2 y 4 semanas (véase la FIGURA 16), y células positivas de tirosina hidroxilasa se rescataron casi completamente en la sustancia negra (FIGURA 17).

MANF2 tiene un gran potencial como proteína terapéutica o como una base para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. MANF2 es también un efector útil de varias neuronas centrales y se puede considerar como un fármaco para diversos trastornos neurodegenerativos y enfermedades neurológicas y psiquiátricas.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 o su fragmento funcional para uso en terapia génica de una neuropatía periférica.

2. El ácido nucleico purificado y aislado para uso en terapia génica de una neuropatía periférica según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

3. El ácido nucleico purificado y aislado para uso en terapia génica de una neuropatía periférica según la reivindicación 1, en el que dicha neuropatía periférica es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

4. El ácido nucleico purificado y aislado para uso en terapia génica de una neuropatía periférica según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento funcional es un polipéptido de MANF2 sin un péptido señal, en el que dicho punto de corte de la secuencia señal está entre los aminoácidos de la posición 26 y 27 de SEQ ID NO:2.

5. Un constructo de expresión que comprende el ácido nucleico que se define en la reivindicación 1, operativamente unido a una secuencia de control de la expresión, siendo dicho constructo de expresión capaz de codificar un polipéptido de MANF2 o sus fragmentos funcionales para uso en terapia génica de una neuropatía periférica.

6. El constructo de expresión para uso en terapia génica de una neuropatía periférica según la reivindicación 5, en el que dicha neuropatía periférica es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

7. Un polipéptido de MANF2 aislado y purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o su fragmento funcional para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica.

8. El polipéptido de MANF2 aislado y purificado para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica según la reivindicación 7, en el que dicha neuropatía periférica es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

5 9. El fragmento funcional de un polipéptido de MANF2 para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica según la reivindicación 7, en el que dicho fragmento funcional es un polipéptido de MANF2 sin un péptido señal, en el que el punto de corte de la secuencia señal está entre los aminoácidos en la posición 26 y 27 de SEQ ID NO:2.

10

10. El uso de un animal transgénico no humano que contiene el gen de MANF2 humano o murino expuesto en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 como un transgen para analizar reactivos que se piensan que confieren protección de una neuropatía periférica, en el que dicho animal es tratado con el reactivo, y la frecuencia reducida de la enfermedad, comparado con animales no tratados que llevan el transgen, indicaría una intervención terapéutica potencial para la neuropatía periférica.

15

11. El uso de un animal transgénico no humano que contiene un transgen o una inserción que rompe la expresión de un gen de MANF2 expuesto en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3 para caracterizar la capacidad de dicho animal transgénico no humano de imitar una neuropatía periférica.

20

12. Un compuesto farmacéutico que comprende la proteína MANF2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o su fragmento funcional, o la molécula de ácido nucleico de MANF2 expuesta en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica.

25

13. El compuesto farmacéutico para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica según la reivindicación 12, en el que dicho fragmento funcional es un polipéptido de MANF2 sin un péptido señal, en el que el punto de corte de la secuencia señal está entre los aminoácidos en la posición 26 y 27 de SEQ ID NO:2.

30

14. El compuesto farmacéutico para uso en el tratamiento de una neuropatía periférica según la reivindicación 12, en el que dicha neuropatía periférica es la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

35

Figura 3

Mus_musculus-MANF1	CEVCI SYLGRFYQDLKDRDVT FSPATIEEELIKFCREARGKENRLCY YIG
Rattus_norvegivus-MANF1	CEVCI SYLGRFYQDLKDRDVT FSPATIEEELIKFCREARGKENRLCY YIG
Homo_sapiens-MANF1	CEVCI SYLGRFYQDLKDRDVT FSPATIEENELIKFCREARGKENRLCY YIG
Bos_Taurus-MANF	CEVCI SYLGRFYQDLKDRDVT FSPASIEKELIKFCREARGKENRLCY YIG
Gallus_gallus-MANF	CEVCVTFLGRFYQSLKDNVVEFTPASIEKELMKSCREAKGKENRLCY YIG
Xenopus_laevis-MANF	CEVCVFLSRFYQSLKERQVEFKPDAVEKELKTCNDARGKENRLCY YIG
Fugu_rubribes-MANF	CPVCTAFLGRFYDSLKDNVAFNNVDIEKALTKSCNDAKGKENRQCY YIG
Danio_rerio-MANF	CEVCVGLQRLYQTIQENNVKFDSDSIEKALLKSCDAKGKENRRCY YIG
Homo_sapiens-MANF2	CEVCKEFLNRFYKSLDRGVNFSLDTIEKELISFCLDTKGKENRLCY YLG
Mus_musculus-MANF2	CEVCKEFLDRFYNSLLSRGIDFSADTIEKELNFCSDAKGKENRLCY YLG
Drosophila_melanogaster-MANF	CEVCVKTVRRFADSLDDS-TKKDYKQIETAFKKFKCAQKNKEHRFCY YLG
Canorhabditis_elegans-MANF	CEVCCKVLDVMAKVPAGDKSKP-DAIGKVIREHCETTRNKENKFCY YIG
	* ** : . : : : . : . * : . : * : * : * : *
Mus_musculus-MANF1	ATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Rattus_norvegivus-MANF1	ATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Homo_sapiens-MANF1	ATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Bos_Taurus-MANF	ATEDAATKIINEVSKPLSHHIPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Gallus_gallus-MANF	ATSDAATKIINEVSKPMSHHIPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Xenopus_laevis-MANF	ATSDAATKITNEVSKPLSHHIPAEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Fugu_rubribes-MANF	ATSDAATKIINEVSKPMSHHVPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Danio_rerio-MANF	ATSDAATKITNEVSKPMSYHVPVEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Homo_sapiens-MANF2	ATKDAATKILSEVTRPMSVHMPAMKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Mus_musculus-MANF2	ATDDAATKILGEVTRPMSVHIPAVKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Drosophila_melanogaster-MANF	GLEESATGILNELSKPLSWSMPAEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
Canorhabditis_elegans-MANF	ALPESATSIMNEVTKPLSWSMPTEKIC-EKLKKKDSQICELKYDKQIDLS
	. : : * : . : * : : : . : * : * : * : * : * : * : * : *
Mus_musculus-MANF1	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Rattus_norvegivus-MANF1	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Homo_sapiens-MANF1	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Bos_Taurus-MANF	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Gallus_gallus-MANF	TADLRKLRVKELRRILDDWGEACXGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Xenopus_laevis-MANF	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Fugu_rubribes-MANF	TVDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
Danio_rerio-MANF	SVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACAEKTDYVNLIRELAPKYA--ATHP
Homo_sapiens-MANF2	SVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACAEKTDYVNLIRELAPKYA--EYYP
Mus_musculus-MANF2	SVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACAEKTDYVNLIRELAPKYA--EYYP
Drosophila_melanogaster-MANF	SVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACAEKTDYVNLIRELAPKYA--EYYP
Canorhabditis_elegans-MANF	TIDLKCLRKVKELKKILDDWGEMCKGCAEKSDYIRKINELMPKYAPKAASA
	: * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
Mus_musculus-MANF1	RTDL
Rattus_norvegivus-MANF1	RTDL
Homo_sapiens-MANF1	PTDL
Bos_Taurus-MANF	RTDL
Gallus_gallus-MANF	RADL
Xenopus_laevis-MANF	RTDL
Fugu_rubribes-MANF	RTEL
Danio_rerio-MANF	RTDL
Homo_sapiens-MANF2	KTEL
Mus_musculus-MANF2	QTEL
Drosophila_melanogaster-MANF	RSEL
Canorhabditis_elegans-MANF	KEEL
	: *

Figura 4

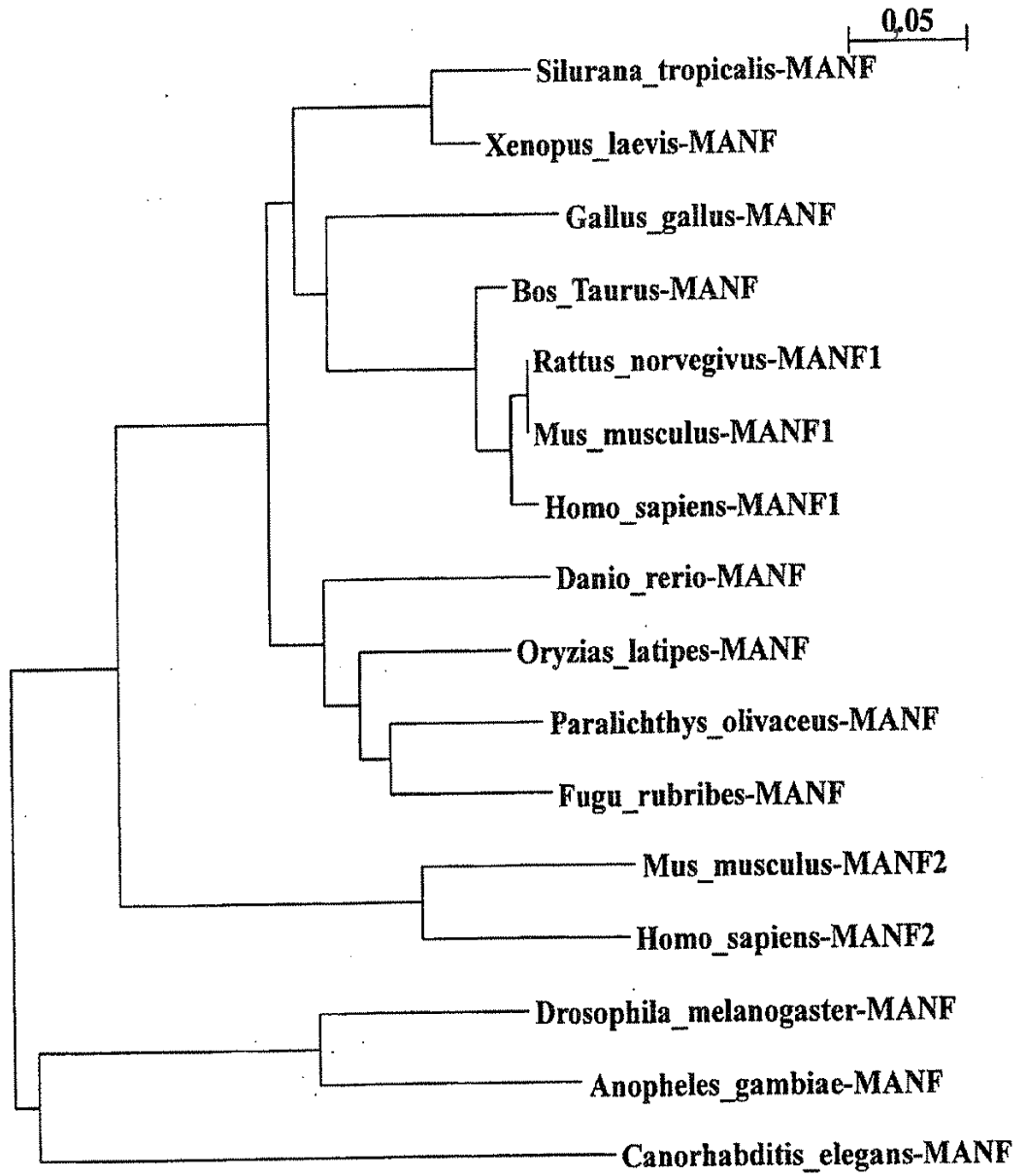


Figura 5

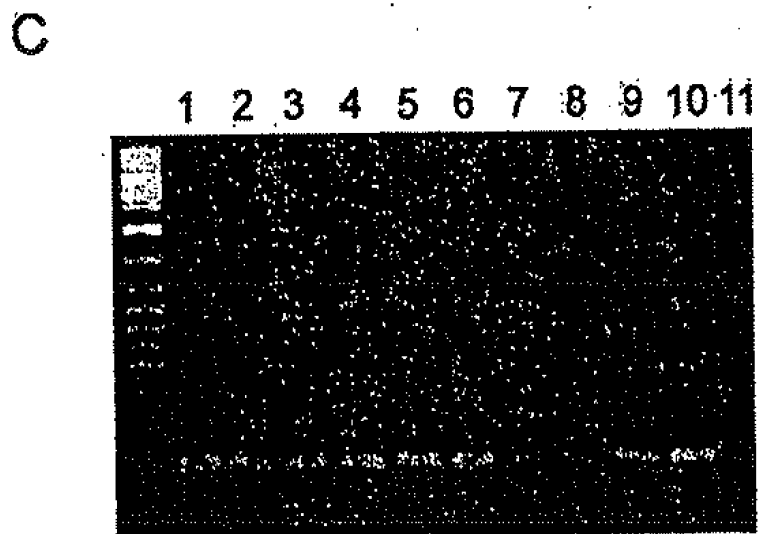
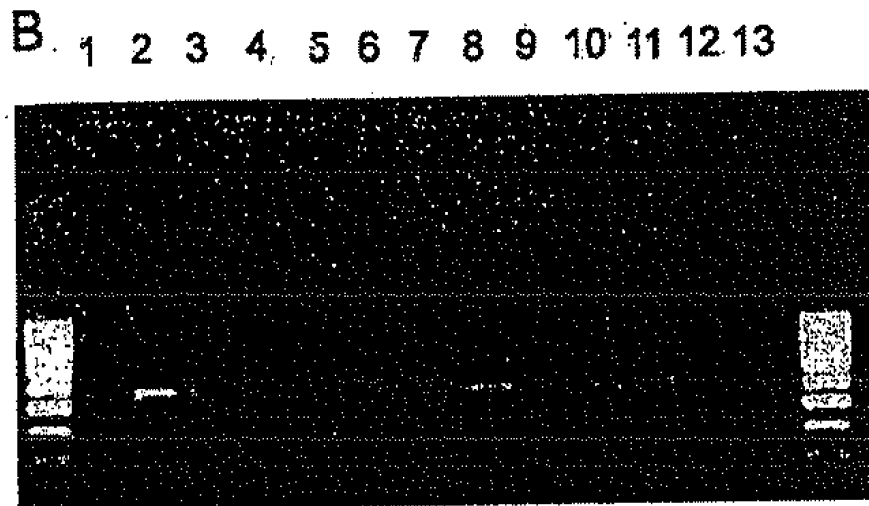
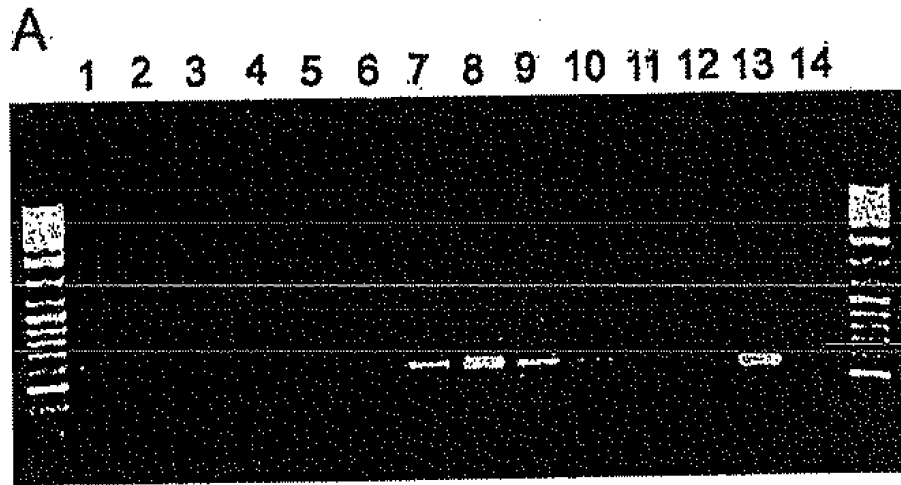


Figura 6

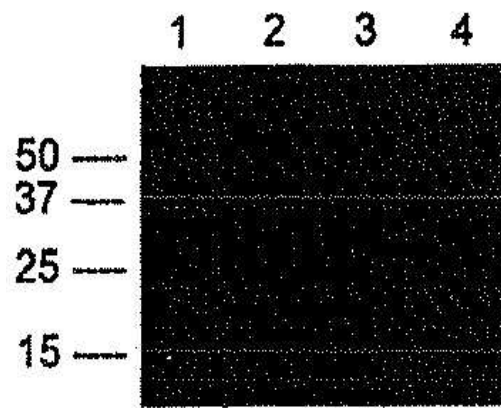


Figura 7

Seq ID NO 1:

> cDNA de MANF2 de *Homo sapiens*

atgtggtgcgcgagcccagttgctgtggtggccttttgcgccgggcttttggctctcaccocggctgacgcagggccaggaggc
 cggggggcgccagggggcgactgtgaagtaigttaaagaattctgaaccgattctacaagtcactgatagacagaggagtaac
 ttttcgctggacactatagaaaagaattgatcagttttgctggacaccaaaggaaaagaaaaccgcctgtgctattatctaggag
 ccacaaaagacgcagccacaaagatcctaagtgaagtcacitgcccaatgagigtgcatatgcctgcaatgaagatttgtgagaa
 gctgaagaagttggatagccagatctgtgagctgaaatatgaaaaaacactggactggcatcagttgacctgcggaagatgaga
 gtggcagagctgaagcagatccigcatagctggggggaggagtgaggggcctgtgcagaaaaactgactatgtaatctcattc
 aagagctggccccaagtatgcagcgacacaccccaaacagagctctga

Seq ID NO 2:

> proteína MANF2 de *Homo sapiens*

MWCASPVAVVAFCAQLLVSHPVLTQEQEAGGRPGADCEVCKEFLNRFYKSLIDR
 GVNFLDITIEKELISFCLDTKGKENRLCYLLGATKDAATKILSEVTRPMSVHMPAM
 KICEKLLKLDLSQICELKYEKTLDLASVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACAECT
 DYVNLIELAPKYAATHPKTEL

Seq ID NO 3:

> cDNA de MANF2 de *Mus musculus*

atgcggtgcatcagccaactgctctggtgaccttttgcgccgggtttgtatctcgaaccctgfgctggcgcagggcctggaggcc
 ggtgtggggccgagggctgactgtgaagatgtaaagaattcttagaccgattctacaactccctgctaagcagaggcatagacttt
 tctcgggacaccatagagaaaagagctgctcaacttttgcctagatgccaaaggaaaagaaaaccgcctgtgctattatctgggggc
 caccacagatgcagccaccaagatcctaggagaagtcactgctccatgaggtgtacacatacctgccgtgaagatttgtgagaag
 ctaaagaagatggacagccagatctgtgagctgaaatacgggaagaagctggacttggcgtcgggtggacctgtggaagatgaga
 gtggcagagctaagcagatcctcagagatggggggaagagtgaggggcatgtgcggagaaaagtactacgtgaacctcatt
 agagagctggccccaatatgtagagatataccccaaacggagctctga

Seq ID NO 4:

> proteína MANF2 de *Mus musculus*

MRCISPTALVTFCAQFCISNPVLAQGLEAGVGPADCEVCKEFLDRFYNSLLSRGI
 DFSADTIEKELNFCSDAKGKENRLCYLLGATDAATKILGEVTRPMSVHIPAVKI
 CEKLLKMDSQICELKYGKKLDLASVDLWKMRVAELKQILQRWGEECRACAEEKS
 DYVNLIRELAPKYVEIYPQTEL

Figura 8

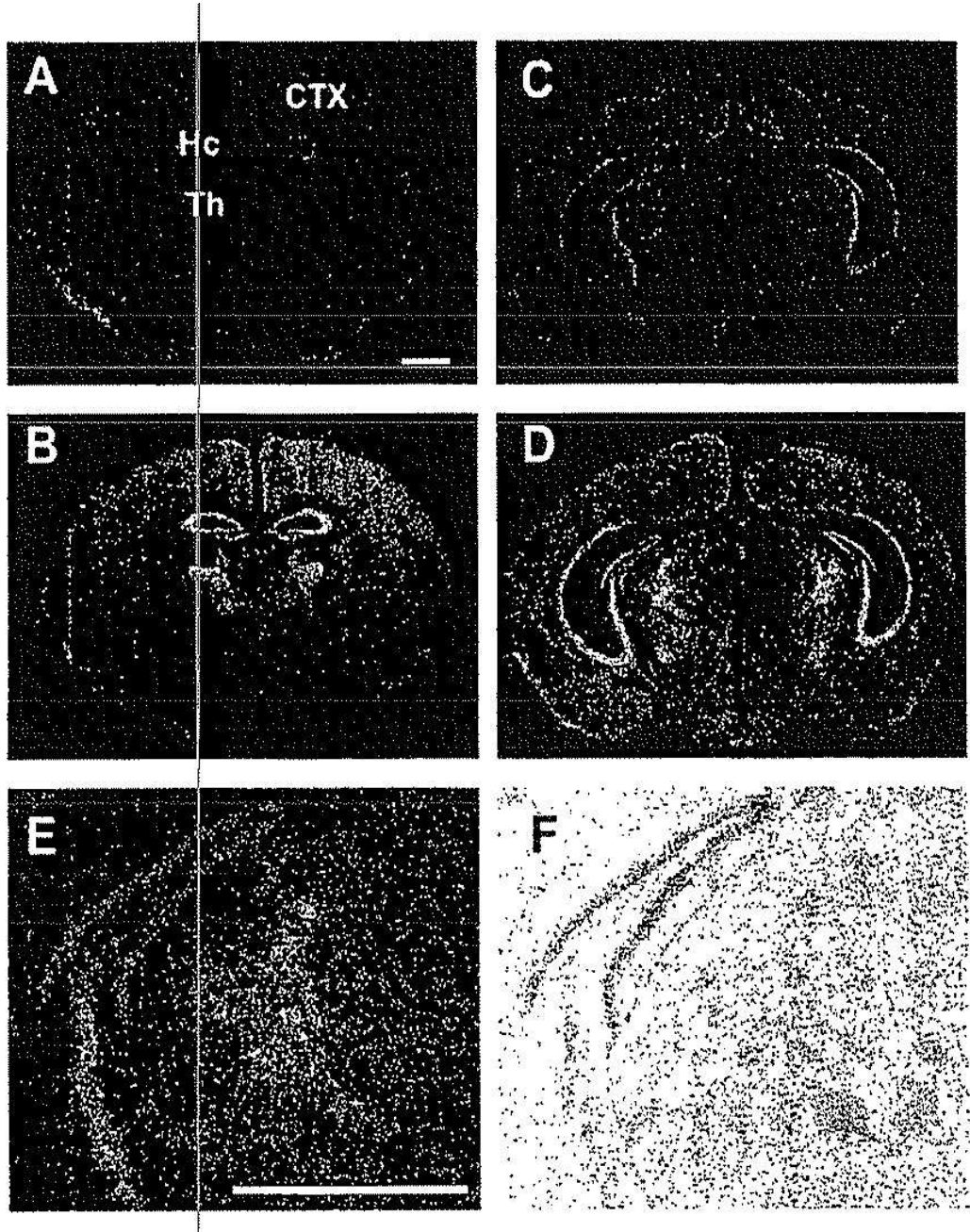


Figura 9

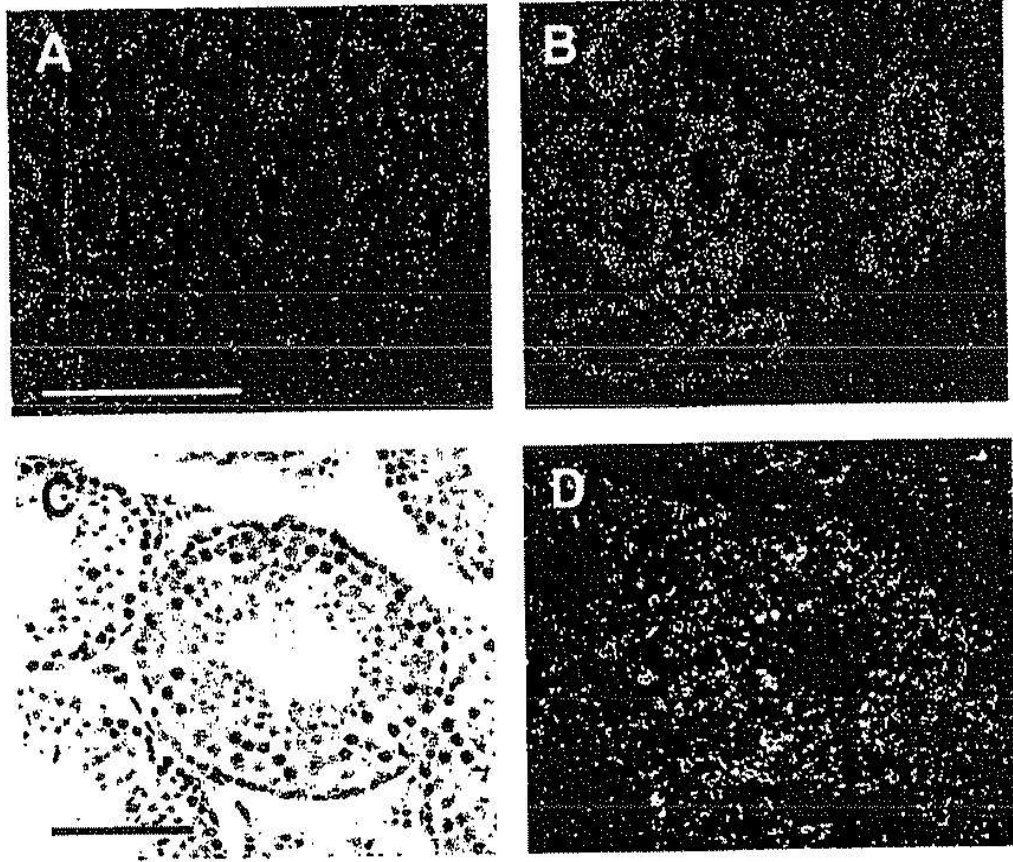
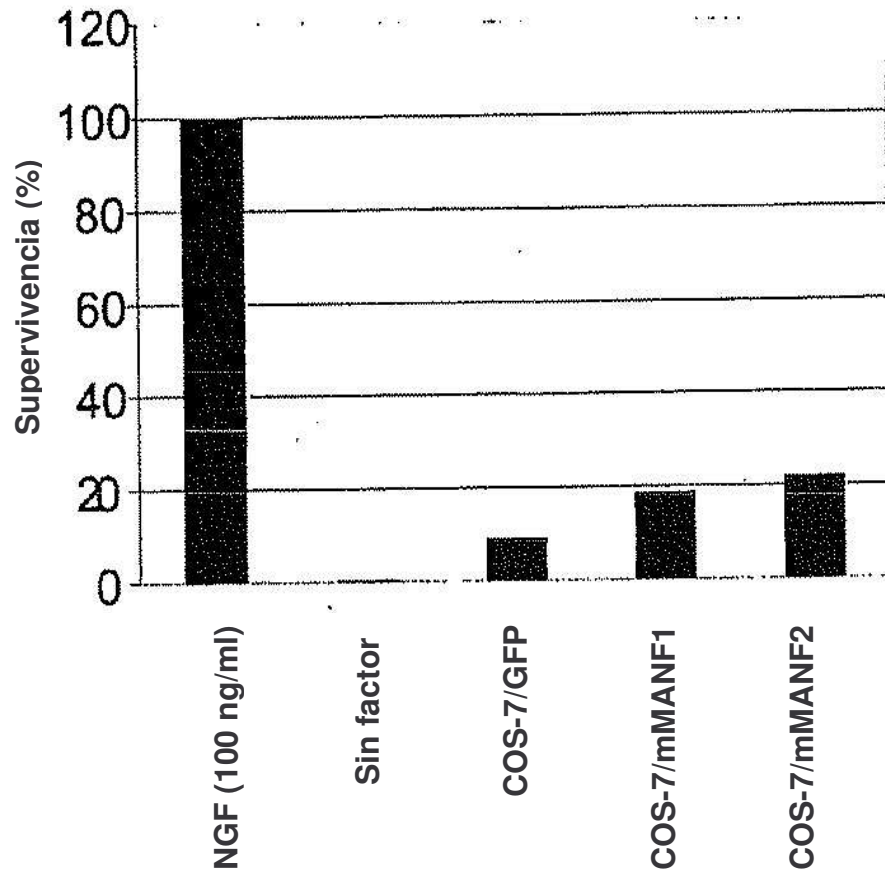


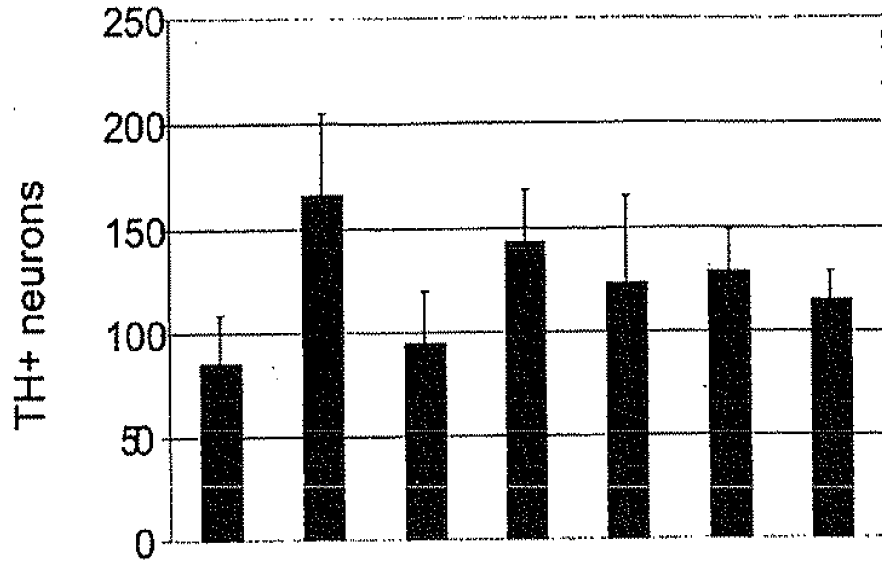
Figura 10



11/17

Figura 11

A



B

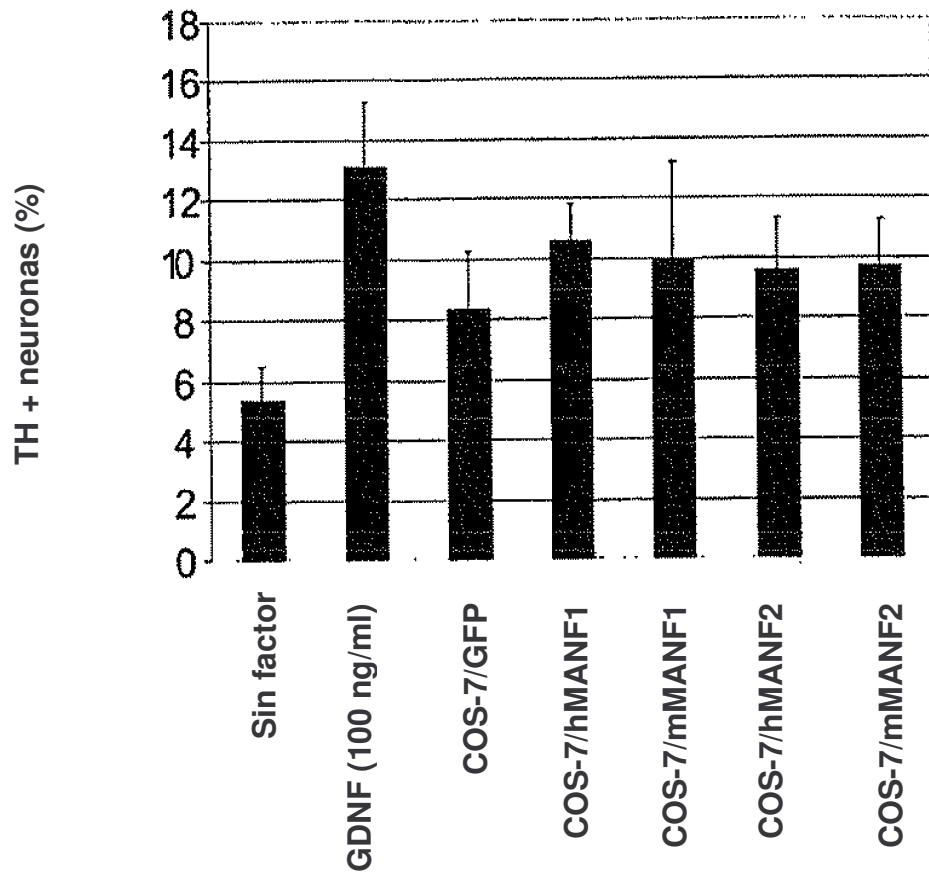


Figura 12

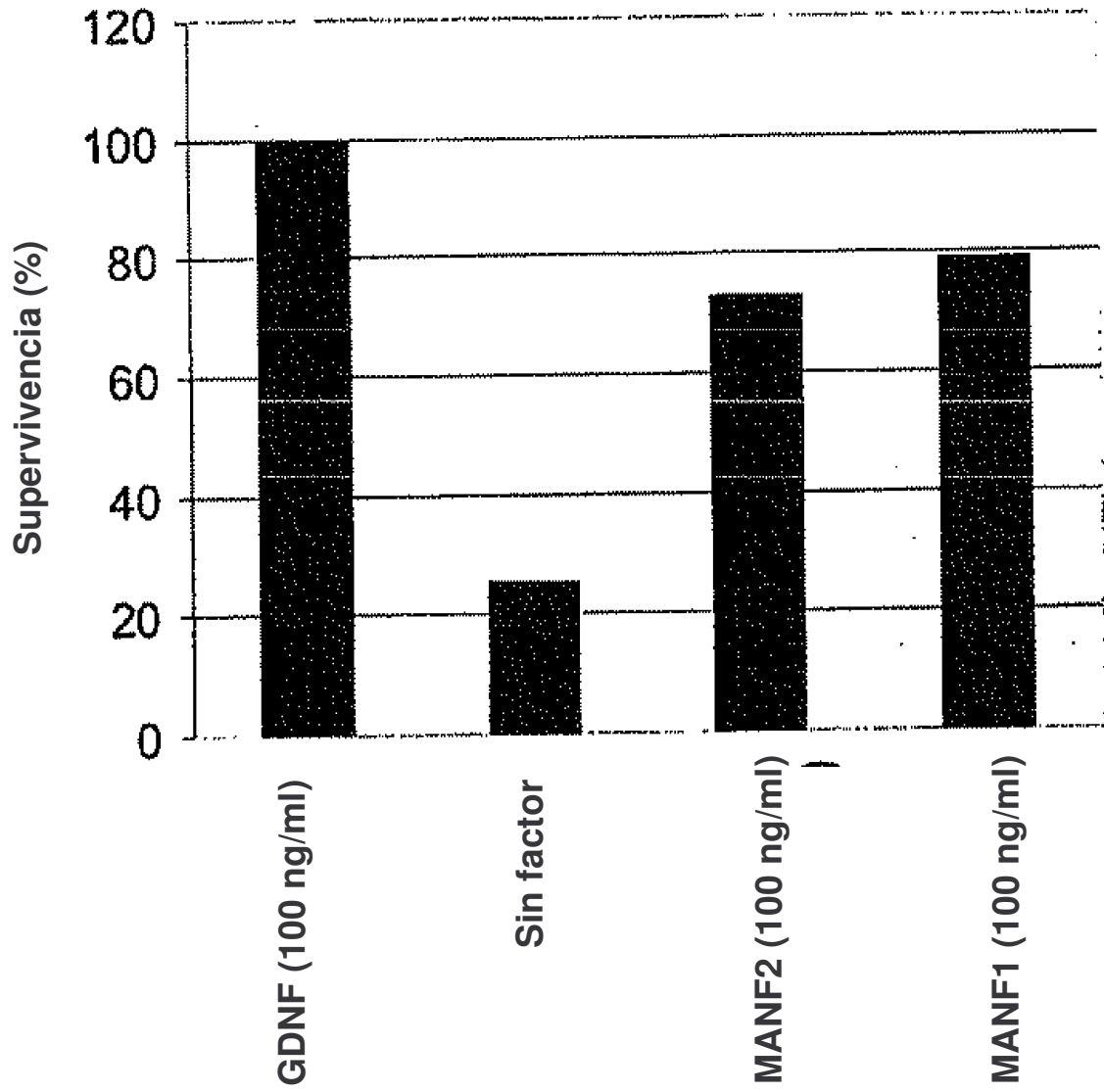
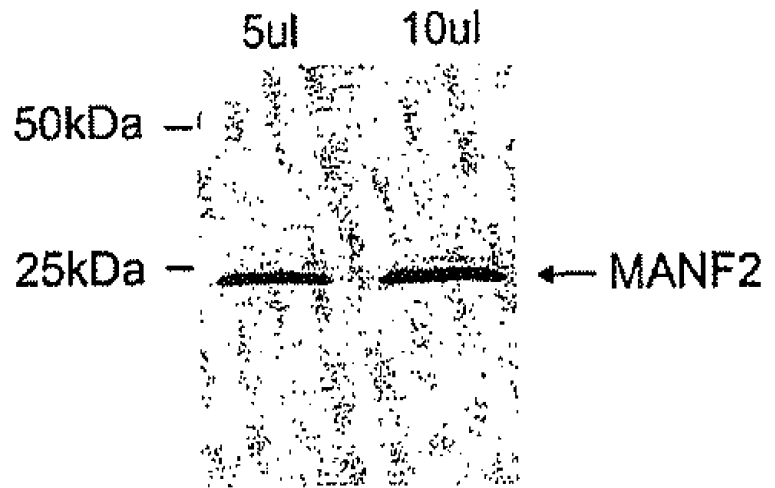


Figura 13

A



B

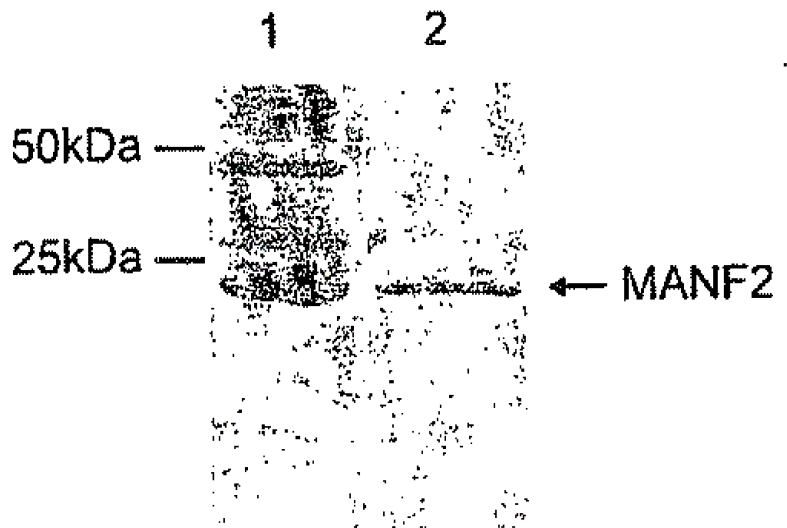
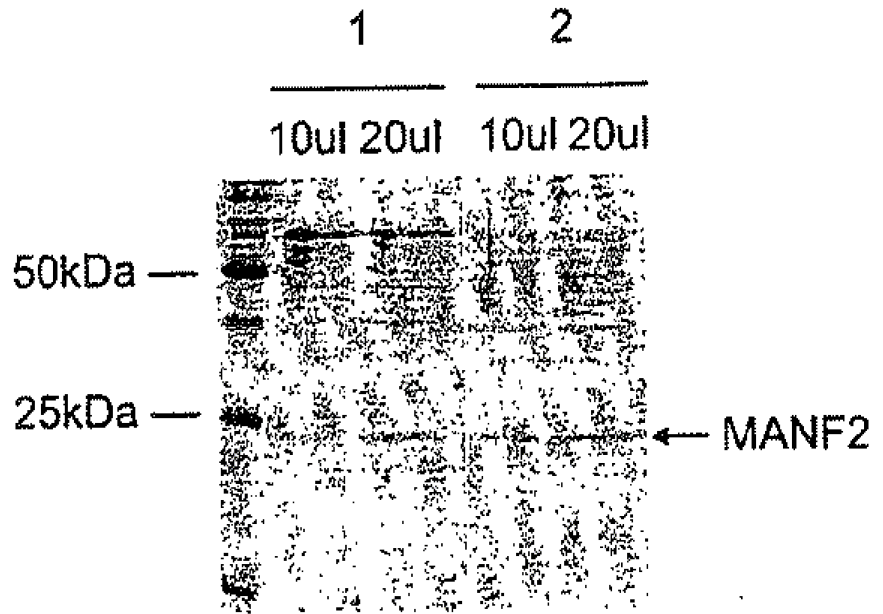


Figura 14

A



B

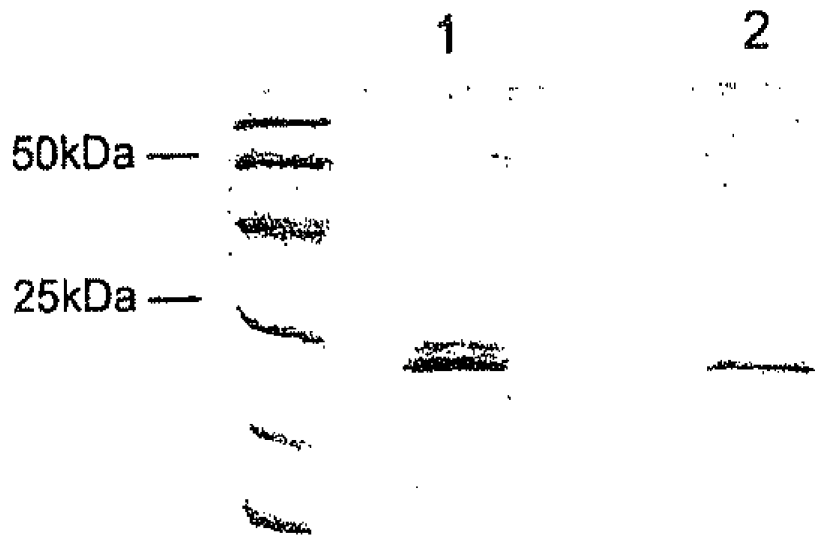


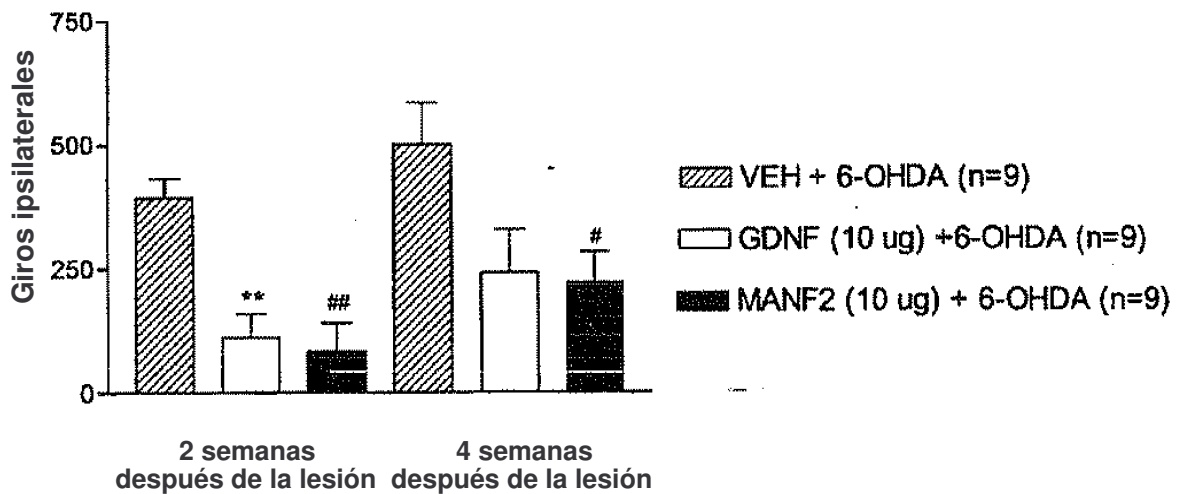
Figura 15

> proteína de MANF2 de *Homo sapiens*

MWCASPVAVVAFCAGLLVSHPVLTQGQEAGGRPGADCEVCKEFLNRFYKSLID
RQVNFSLDTIEKELISFCLDTKGKENRLCYYLGATKDAATKILSEVTRPMSVHMPA
MKICEKLLKLDLDSQICELKYEKTLDLASVDLRKMRVAELKQILHSWGEECRACA
TDYVNLIQELAPKYAATHPKTEL

MANF2: Análisis behaviorístico

Rotación inducida por amfetamina
 Noviembre de 2005
 2 y 4 semanas después de la lesión
 (giros acumulativos/120 min)



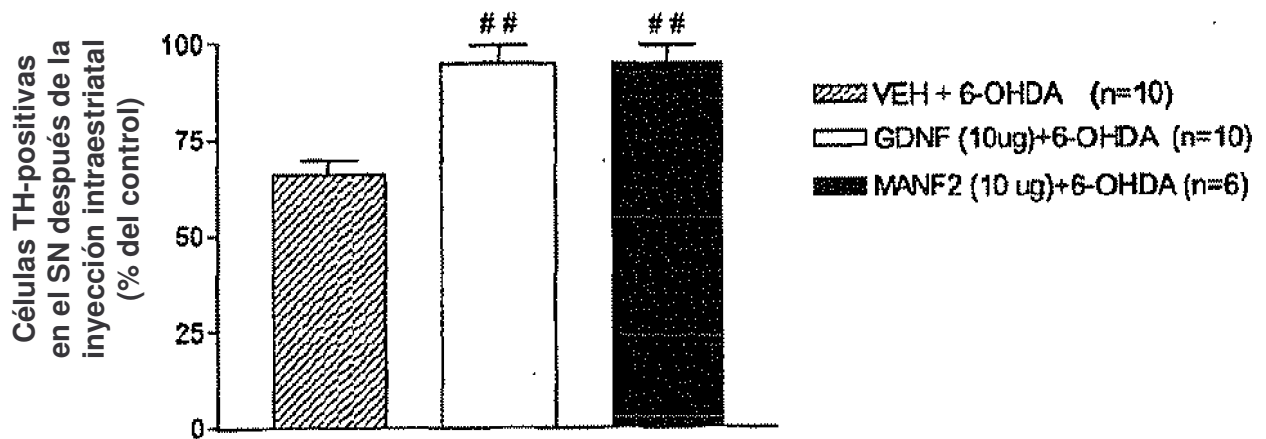
□□ y ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo de control (VEH+6-OHDA) 2 semanas después de la lesión

* $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (VEH+6-OHDA) 4 semanas después de la lesión (ANOVA y prueba post hoc de Tukey/Kramer)

Figure 1 6

Análisis morfológico

Protección de células TH-positivas en el SN



$p < 0,01$ en comparación con el grupo de control (VEH+6-OHDA)
(ANOVA y análisis post hoc de Tukey/Kramer)

Se hicieron recuentos de células de la sustancia negra con estereología insesgado usando la columna de fraccionamiento óptico (Stereo Investigator)

Figura 17