



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 490**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 5/07 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02706572 .1**

96 Fecha de presentación : **20.03.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1373502**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Factores de estimulación de la supervivencia neuronal dopaminérgica y sus utilizaciones.**

30 Prioridad: **20.03.2001 US 277516 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2011

73 Titular/es: **CNS PROTEIN THERAPEUTICS, Inc.**
555 Bryant Street 143
Palo Alto, California 94301-1704, US
AMARANTUS THERAPEUTICS, Inc.

72 Inventor/es: **Raibekas, Andrei, A. y**
Commissiong, John, W.

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5

La invención se refiere a composiciones y a procedimientos para incrementar la supervivencia de las neuronas.

10

15

20

25

30

El crecimiento, supervivencia y diferenciación de las neuronas en los sistemas nerviosos periférico y central (SNP y SNC, respectivamente) dependen, en parte, de factores neurotróficos paracrinos y autocrinos derivados de la diana. A la inversa, la falta de factores neurotróficos se cree que desempeña un papel en la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig). En los cultivos de células neuronales, se proporciona el soporte neurotrófico mediante cocultivo con astrocitos o proporcionando medio condicionado (MC) preparado a partir de astrocitos. Los astrocitos de origen mesencefálico ventral presentan una eficacia mucho mayor en la estimulación de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas ventrales que los astrocitos procedentes de otras regiones del SNC, tales como el córtex neocortical y cerebral. En los cultivos mesencefálicos crónicos de 21 días *in vitro* (DIV) o más largos, el porcentaje de neuronas dopaminérgicas se incrementa de 20% a 60%, coincidiendo con la proliferación de una monocapa de astrocitos. En contraste, bajo condiciones en las que se encuentra inhibida la proliferación de los astrocitos, las neuronas dopaminérgicas, pero no las GABAérgicas, resultaron prácticamente eliminadas de los cultivos transcurridos 5 DIV. Estos resultados demuestran la importancia de los astrocitos derivados homotípicamente para la supervivencia y el desarrollo de neuronas dopaminérgicas contiguas, y sugiere que los astrocitos mesencefálicos son una fuente probable de un factor neurotrófico paracrino fisiológico para las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

35

Paschison *et al.* (J. Mol. Neurosci. Vol 11 nº 3 p.209-221) crearon una línea celular mesencefálica ventral de rata y el MC libre de suero procedente de dichas células mostró una actividad que incrementaba la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en cultivo.

40

La demostración repetida de que los astrocitos secretan moléculas que estimulan la supervivencia neuronal los ha convertido en un foco de búsqueda de terapias para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Muchos laboratorios han intentado aislar factores neurotróficos derivados de astrocitos pero se han debido enfrentar a un problema técnico importante: el suero es un componente esencial del medio para el crecimiento óptimo de los astrocitos primarios en cultivo, pero la presencia del suero interfiere con la purificación posterior de los factores que se han secretado al medio condicionado.

45

De esta manera, existe una necesidad de identificación y purificación de nuevos factores neurotróficos, y de identificación de nuevos procedimientos para producir medio condicionado, que resulten compatibles con las técnicas de aislamiento de proteínas.

SUMARIO DE LA INVENCION

Anteriormente se había aislado una línea celular de tipo astrocito de tipo 1
5 inmortalizada espontáneamente, denominada línea celular mesencefálica ventral 1
(VMCL-1). Esta línea celular, depositada en la American Type Culture Collection (ATCC;
Manassas, VA; nº de acceso ATCC PTA-2479; fecha de depósito: 18 de septiembre de
2000), se obtuvo del mesencéfalo ventral y conservaba las características de los astrocitos
10 de tipo 1 primarios, pero crece robustamente en un medio libre de suero. El MC preparado
a partir de dichas células contiene uno o más factores de supervivencia neuronal que
incrementa la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por lo
menos 3 veces, y también estimula su desarrollo.

Mediante la utilización de un procedimiento de purificación multietapa, se identificó
15 una proteína rica en argininas (ARP) como una proteína que se copurifica con la actividad
estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica del MC de la VMCL-1. Debido a
que la proteína y la actividad se copurificaron a través de cinco etapas de purificación, los
presentes inventores concluyeron que esta proteína es uno de los factores implicados en
que el MC de la VMCL-1 presente la actividad estimulante de la supervivencia neuronal
20 dopaminérgica deseada.

Se descubrió asimismo que se produce la ARP en una forma secretada
previamente no reconocida; se hace referencia a esta forma como MANF (factor
neurotrófico derivado de astrocitos maduros). El MANF no presenta la parte N-terminal
25 rica en argininas de la proteína, tal como se muestra en la figura 1 y en SEC ID nº 3.
Basándose en el examen de las secuencias, se crea que esta forma secretada resulta del
corte de una variante de procesamiento previamente no identificada de la ARP (ARP β o
pro-MANF), que presenta la secuencia representada en SEC ID nº 2. MANF y pro-MANF,
y los análogos, derivados y fragmentos biológicamente activos de los mismos, se
denominan colectivamente "polipéptidos MANF".

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un primer aspecto, la invención
proporciona una composición constituida por por lo menos 60% en peso de un polipéptido
factor neurotrófico derivado de astrocitos maduros (MANF) constituido por la secuencia
35 SEC ID nº 3 ó 4, o una secuencia que es por lo menos 90% idéntica a la secuencia SEC
ID nº 3 ó 4. En una forma de realización, el polipéptido MANF presenta la secuencia de
aminoácidos SEC ID nº 3, 4, 6 ó 7. En otra forma de realización, el polipéptido MANF
incluye una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos respecto a la secuencia
de aminoácidos SEC ID nº 3, 4, 6 ó 7, o, además de lo expuesto anteriormente, es
40 sustancialmente idéntica a una proteína que presenta una de dichas secuencias de
aminoácidos. En un aspecto relacionado, la invención proporciona una composición según
la reivindicación 1 para la utilización como medicamento.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un polinucleótido
sustancialmente purificado codificante de un polipéptido MANF, en el que dicho polipéptido
45 MANF está constituido por la secuencia SEC ID nº 3 ó 4, o una secuencia que es por lo
menos 90% idéntica a la secuencia SEC ID nº 3 ó 4. Tal como se ha indicado
anteriormente, el polipéptido MANF puede presentar la secuencia de aminoácidos SEC ID
nº 3, 4, 6 ó 7, o puede presentar una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos
respecto a dichas secuencias de aminoácidos. En una forma de realización, el

polinucleótido codifica una proteína sustancialmente idéntica a una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 3, 4, 6 ó 7. En otra forma de realización, el polinucleótido está constituido por la secuencia SEC ID nº 9 ó 10.

5 En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector de expresión que incluye el polinucleótido según el segundo aspecto. El vector de expresión puede ser, por ejemplo, un vector adenovírico o un vector retrovírico. En una forma de realización particular, el polinucleótido se encuentra operablemente ligado a secuencias reguladoras que permiten la expresión del polinucleótido en una célula neural.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye: (i) una composición según la reivindicación 1, e (ii) un portador que es farmacéuticamente aceptable para la administración en el sistema nervioso central.

15 En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica según el cuarto aspecto que incluye una célula neural. La célula neural puede ser, por ejemplo, una neurona, una célula madre neural o una célula precursora neuronal.

20 En un sexto aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para incrementar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, incluyendo el procedimiento la etapa de poner en contacto las neuronas dopaminérgicas con una cantidad estimulante de la supervivencia de una composición según la reivindicación 1.

25 En un séptimo aspecto, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para cultivar neuronas dopaminérgicas para el trasplante. Este procedimiento incluye la etapa que consiste en cultivar las neuronas, o células progenitoras de las mismas, con una cantidad estimulante de la supervivencia de una composición según la reivindicación 1.

30 En un octavo aspecto, la invención proporciona: i) la utilización de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica destinada a, o ii) una composición según la reivindicación 1 para, el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o trastorno del sistema nervioso. Un procedimiento del tratamiento puede incluir la etapa que consiste en administrar en el paciente una cantidad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de la composición.

35 En un noveno aspecto, la invención proporciona: i) la utilización de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica destinada a, o ii) una composición según la reivindicación 1 para impedir la muerte celular neuronal dopaminérgica en un mamífero. Un procedimiento de prevención puede incluir la etapa que consiste en administrar en el mamífero una cantidad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de la composición.

40 En un décimo aspecto, la invención proporciona: i) la utilización de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica destinada a, o ii) una composición según la reivindicación 1 para, la administración en un mamífero, tal como un ser humano, en donde dicho mamífero ha recibido previamente el trasplante de células en su sistema nervioso, en la que dicha composición farmacéutica se ha concebido para administrarse en el mamífero en una ventana de tiempo de entre dos-cuatro horas antes del trasplante de dichas células y dos-

cuatro horas después del trasplante de dichas células.

Un procedimiento de trasplante de células en el sistema nervioso de un mamífero tal como un ser humano incluye las etapas siguientes: (a) poner en contacto las células con un polipéptido MANF, y (b) trasplantar las células de la etapa (a) en el sistema nervioso del mamífero. Resulta deseable que las etapas (a) y (b) se lleven a cabo separadas por menos de cuatro horas.

Tal como se demuestra en la presente memoria, se evita en gran parte la muerte de las neuronas dopaminérgicas con la presencia de un polipéptido MANF. Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo mueren en pacientes que presentan la enfermedad de Parkinson. La invención proporciona de esta manera composiciones para la utilización en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Además, la utilización de una composición de polipéptido MANF según la reivindicación 1 para el tratamiento de trastornos o enfermedades del sistema nervioso en las que se presenta o se prevé la pérdida de neuronas dopaminérgicas se encuentra comprendido dentro de la invención.

El descubrimiento de que MANF se encuentra implicado en la supervivencia neuronal dopaminérgica permite utilizar MANF en una diversidad de pruebas y ensayos diagnósticos para la identificación de fármacos estimulantes de la supervivencia neuronal dopaminérgica. La expresión de MANF también puede servir como herramienta diagnóstica para determinar si una persona presenta riesgo de padecer un trastorno neurodegenerativo. Este procedimiento diagnóstico puede conducir a personalizar tratamientos farmacológicos de acuerdo con el genotipo del paciente (denominado farmacogenómica), incluyendo la predicción de la respuesta del paciente (por ejemplo una eficacia incrementada o reducida o efectos secundarios no deseados tras la administración de un compuesto o fármaco).

Pueden utilizarse anticuerpos contra un polipéptido MANF tanto de modo terapéutico como diagnóstico. Los anticuerpos se producen mediante el reto inmunológico de un sistema biológico que contiene células B, por ejemplo un animal, tal como un ratón, con un polipéptido MANF, con el fin de estimular la producción de anti-MANF por parte de las células B, seguido del aislamiento del anticuerpo del sistema biológico. Dichos anticuerpos pueden utilizarse para medir el polipéptido MANF en una muestra biológica, tal como suero, mediante la puesta en contacto de la muestra con el anticuerpo y después la medición de complejos inmunológicos a modo de medida del polipéptido MANF en la muestra. También pueden utilizarse los anticuerpos de MANF como terapia para la modulación de la actividad biológica de MANF.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar si un compuesto candidato modula la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica mediada por MANF, incluyendo: (a) proporcionar una composición según la reivindicación 1, (b) poner en contacto la composición con el compuesto candidato, y (c) medir la actividad biológica de MANF, en el que la actividad biológica alterada del polipéptido MANF respecto a la de una actividad biológica alterada de un polipéptido MANF no puesto en contacto con el compuesto, indica que el compuesto candidato modula la actividad biológica de MANF. El polipéptido MANF puede encontrarse en una célula o en un sistema de ensayo libre de células.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para determinar si el compuesto candidato resulta útil para reducir la neurodegeneración, incluyendo el procedimiento las etapas de: (a) proporciona una composición según la reivindicación 1, (b) poner en contacto la composición con el compuesto candidato, y (c) medir la unión del polipéptido MANF, en el que la unión del polipéptido MANF indica que el compuesto candidato resulta útil para reducir la neurodegeneración.

En las formas de realización particulares de los procedimientos de cribado anteriormente proporcionadas de la presente invención, la célula se encuentra en un animal y el polipéptido MANF está constituido por la secuencia SEC ID nº 3, 4, 6 ó 7, o está esencialmente constituida por la secuencia SEC ID nº 3, 4, 6 ó 7.

También se dan a conocer en la presente memoria procedimientos para identificar factores que potencian o imitan la actividad biológica de MANF. En estos procedimientos de cribado de potenciadores, la capacidad de los compuestos candidato de incrementar la expresión, estabilidad o actividad biológica de MANF se somete a ensayo utilizando técnicas estándares. Un compuesto candidato que se une a MANF puede actuar como agente potenciador. Un mimético (por ejemplo un compuesto que se une a un receptor de MANF) es un compuesto capaz de actuar en ausencia de un polipéptido MANF.

La expresión "sustancialmente purificado" se refiere a que el polipéptido (por ejemplo un polipéptido MANF) ha sido separado de los compuestos que lo acompañan naturalmente. Típicamente, el polipéptido se purifica sustancialmente en el caso de que se encuentre libre por lo menos al 60% en peso, respecto a las proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que se encuentra asociado naturalmente. Preferentemente, el polipéptido se encuentra a una pureza de por lo menos 75%, más preferentemente de por lo menos 90%, y todavía más preferentemente de por lo menos 99% en peso. Puede obtenerse un polipéptido sustancialmente purificado, por ejemplo, mediante extracción a partir de una fuente natural (por ejemplo una célula neural), mediante expresión de un ácido nucleico recombinante codificante del polipéptido, o mediante la síntesis química de la proteína. La pureza puede medirse mediante cualquier procedimiento apropiado, por ejemplo mediante cromatografía de columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

Un polipéptido se encuentra sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente al separarlo de aquellos componentes que lo acompañan en su estado natural. De esta manera, un polipéptido sintetizado o producido químicamente en un sistema celular diferente del de la célula a partir de la que se origina naturalmente se encontrará sustancialmente libre de sus componentes asociados naturalmente. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, entre los polipéptidos sustancialmente purificados se incluyen aquellos presentes naturalmente en los organismos eucarióticos pero que son sintetizados en *E. coli* o en otros procariotas.

El término "polipéptido" o "proteína" se refiere a cualquier cadena de más de dos aminoácidos, con independencia de la modificación postraduccion, tal como glucosilación o fosforilación.

En la presente memoria se define un polipéptido MANF como uno que presenta actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica ("actividad biológica de

MANF") y que se encuentra codificado por un ácido nucleico que se hibrida a una alta astringencia con un ADNc codificante de MANF humano (SEC ID nº 2, 3 ó 4) o que es sustancialmente idéntico a MANF humano. Se encuentran incluidos en esta definición el polipéptido pro-MANF (por ejemplo pro-MANF humano, SEC ID nº 2), MANF humano sintético (SEC ID nº 4), dominios peptídicos de MANF humano (por ejemplo LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDV TFSPATIENELIKFCREA; SEC ID nº 11; RGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLKKKDSQICEL; SEC ID nº 12, y KYDKQIDLS TVDLKKLRVKELKKILDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKY; SEC ID nº 13) que se predice que presentan actividad biológica de MANF, y polipéptidos MANF contrapartidas de especies tales como el ratón (por ejemplo SEC ID nº 5, 6 y 7), vaca (figura 11A; SEC ID nº 14) y cerdo (figura 11B; SEC ID nº 15). Se encuentran específicamente excluidos de la definición de polipéptidos MANF de la invención las proteínas ARP que contienen el extremo amino-terminal rico en argininas (por ejemplo los aminoácidos 1 a 55 de secuencia SEC ID nº 1). De esta manera, la ARP humana (SEC ID nº 1) no se considera un polipéptido MANF de la invención.

Un polinucleótido que forma parte de la invención es uno codificante de un polipéptido MANF, tal como se define en la reivindicación. Los polinucleótidos ejemplificativos se encuentran representados, por ejemplo, por las secuencias SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10.

La expresión "sustancialmente idéntico" se refiere a un polipéptido o polinucleótido que muestra una identidad de por lo menos 90%, más preferentemente 95%, o todavía más preferentemente 97%, respecto a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de por lo menos 16 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 20 aminoácidos, más preferentemente de por lo menos 25 aminoácidos, y todavía más preferentemente de 35 aminoácidos. Para los polinucleótidos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de por lo menos 50 nucleótidos, preferentemente de por lo menos 60 nucleótidos, más preferentemente de por lo menos 75 nucleótidos, y todavía más preferentemente de 110 nucleótidos.

La identidad de secuencias típicamente se mide utilizando software de análisis de secuencias con los parámetros por defecto específicos en el mismo (por ejemplo el paquete de software de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Este programa de software hace corresponder secuencias similares mediante la asignación de grados de homología con diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones. Entre las sustituciones conservadoras típicamente se incluyen sustituciones en los grupos siguientes: glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, serina, treonina, lisina, arginina y fenilalanina, tirosina.

La expresión "condiciones de elevada astringencia" se refiere a la hibridación en 2X SSC a 40°C con una longitud de sonda de ADN de por lo menos 40 nucleótidos. Para otras definiciones de las condiciones de alta astringencia, ver F. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, páginas 6.3.1-6.3.6, John Wiley & Sons, New York, NY, 1994.

El término "compuesto" o "factor" se refiere a una molécula que presenta una

actividad que estimula la supervivencia (o, a la inversa, evita la muerte) de neuronas dopaminérgicas en un ensayo estándar de supervivencia celular.

El término "composición" se refiere a un grupo de polipéptidos que incluye un polipéptido de la presente invención.

La expresión "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente, portador o diluyente que resulta fisiológicamente aceptable para el mamífero tratado y que simultáneamente conserva las propiedades terapéuticas del polipéptido con el que se administra. Un portador farmacéuticamente aceptable ejemplificativo es la solución salina fisiológica. Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones son conocidas por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a edición), editor A.R. Gennaro AR, 2000, Lipencott Williams & Wilkins.

La expresión "actividad estimulante de la actividad neuronal dopaminérgica" referida a un compuesto se refiere a que la presencia del compuesto incrementa la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en por lo menos dos veces en un ensayo de supervivencia neuronal dopaminérgica (tal como el descrito en la presente memoria) respecto a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en ausencia del compuesto. El incremento de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas puede ser de por lo menos tres veces, más preferentemente de por lo menos cuatro veces, y todavía más preferentemente de por lo menos cinco veces. El ensayo puede ser un ensayo *in vitro* o un ensayo *in vivo*.

La presente invención proporciona nuevos procedimientos y reactivos *in vitro* para la prevención de la muerte celular neuronal. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades o trastornos neurológicos en los que la muerte celular neuronal aberrante es una de las causas.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente de las formas de realización preferidas de la misma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una ilustración esquemática que representa el efecto de diferentes cantidades de medio condicionado procedente de cultivos celulares de VMCL-1 sobre la supervivencia de células positivas para tirosina hidroxilasa (panel superior) y de células positivas para MAP2 (panel inferior).

La figura 2 es una ilustración esquemática que representa la ARP humana (SEC ID nº 1), la pro-MANF humana (SEC ID nº 2), la MANF humana (SEC ID nº 3) y una MANF humana sintética que no presenta la secuencia de señal (SEC ID nº 4).

La figura 3 es una ilustración esquemática que representa la pro-MANF de ratón (SEC ID nº 5), la MANF de ratón (SEC ID nº 6) y una MANF de ratón sintético que no presenta la secuencia de señal (SEC ID nº 7).

La figura 4 es una ilustración esquemática que representa la secuencia de polinucleótidos que codifican la ARP humana (SEC ID nº 8), la pro-MANF humana (SEC ID nº 9) y la MANF humana (SEC ID nº 10).

La figura 5 es una ilustración esquemática que representa la actividad biológica de MANF expresada en *E. coli* sobre la supervivencia de células positivas para tirosina hidroxilasa (panel superior) y sobre células positivas para MAP2 (panel inferior). Los carriles eran los siguientes: A1 - control de PCM0; A2 - MC de VMCL-1 (al 25%); B1 - MANF (10 pg/ml); B2 - MANF (50 pg/ml); B3 - MANF (100 pg/ml); B4 - MANF (250 pg/ml); B5 - MANF (500 pg/ml); B6 - MANF (1 ng/ml); B7 - MANF (5 ng/ml); B8 - MANF (10 ng/ml); B9 - MANF (50 pg/ml); B10 - MANF (100 ng/ml).

La figura 6 es una ilustración esquemática que representa la curva de dosis-respuesta para MANF expresado y secretado a partir de células HEK293. Los carriles eran los siguientes: A - control; B1 - control de PCM0; B2 - control de tampón; C1 - MANF (100 pg/ml); C2 - MANF (250 pg/ml); C3 - MANF (500 pg/ml); C4 - MANF (1 ng/ml); C5 - MANF (10 ng/ml); C6 - MANF (25 ng/ml); C7 - MANF (50 pg/ml). Todos los datos se recogieron en DIV3, excepto A, que se recogió en DIV1.

La figura 7 es una ilustración esquemática que representa el rango de orden de potencia de BDNF, GDNF y MANF.

La figura 8 es una ilustración esquemática que representa la actividad de anticuerpo policlonal de MANF en transferencias western de MANF (720 ng).

La figura 9 es una ilustración esquemática que representa la sensibilidad de detección de anticuerpo policlonal de MANF en transferencias western de MANF. Podía detectarse hasta una cantidad tan pequeña como 15,6 ng de MANF.

Las figuras 10A-10C son una serie de ilustraciones esquemáticas que representan que el anticuerpo policlonal de MANF no reaccionó cruzadamente con BDNF o con GDNF. (A) Transferencia western; (B) tinción de plata; (C) tinción de azul de Coomassie.

Las figuras 11A y 11B son ilustraciones esquemáticas que representan la secuencia de pro-MANF de vaca (figura 11A) y de cerdo (figura 11B). El péptido de señal se indica en negrita.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se descubrió que una línea celular de origen mesencefálico (denominada "VMCL-1") secreta un factor que, a su vez, estimula la diferenciación y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Esta línea celular crece robustamente en un medio libre de suero. Además, el MC preparada a partir de dichas células contiene uno o más factores de supervivencia neuronal dopaminérgica incrementa la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por lo menos en 3 veces, y también estimula su desarrollo.

Se purificó la línea celular VMCL-1, una proteína que se identificó como ARP. Se

purificó esta proteína de la manera siguiente. Se preparó un volumen de 3 litros de medio condicionado de VMCL-1 y se sometió a cinco etapas secuenciales de cromatografía de columna. En cada etapa de purificación, se sometió a ensayo cada fracción de la columna para actividad biológica en el bioensayo al que se ha hecho referencia anteriormente. Se obtuvo una estimación del efecto de cada fracción sobre la supervivencia neuronal dopaminérgica a intervalos de 24 horas, durante un periodo de cinco días, y se evaluó en una escala de 1 a 10. Tras quinta etapa de purificación, se analizó mediante SDS-PAGE la actividad biológicamente activa y una fracción inactiva contigua. Los resultados del análisis de SDS-PAGE revelaron una banda claramente distinguible de proteína en el rango de 20 kDa en el carril de fracción activa. Se recortó la banda "activa" y se sometió a digestión trípica y se determinó la masa molecular y la secuencia de cada péptido sobre el fondo mediante análisis de espectrometría de masas. Se identificaron las dos secuencias de péptido siguientes: DVTFSPATIE (SEC ID nº 6) y QIDLSTVDL (SEC ID nº 7). Una búsqueda de la base de datos identificó una correspondencia entre la proteína rica en argininas humana y su ortólogo de ratón. La proteína predicha codificada por la secuencia EST de ratón era aproximadamente 95% idéntica a la proteína humana predicha. Una búsqueda de la base de datos de EST de rata reveló dos secuencias: una (dbEST Id: 4408547, nombre de EST: EST348489) que presentaba homología significativa a nivel de los aminoácidos con las proteínas humana y de ratón. La secuencia de rata de longitud completa no se encontraba en la base de datos GenBank. Además, los presentes inventores descubrieron que la secuencia de la ARP humana en GenBank era incorrecta. La secuencia correcta se ilustra en SEC ID nº 1.

Se descubrió que la ARP humana se corta de manera que el extremo amino-terminal rico en argininas se separa del extremo carboxi-terminal para producir la pro-MANF humana (SEC ID nº 2). El fragmento carboxi-terminal cortado contiene un péptido de señal, resultando en la secreción de MANF humana (SEC ID nº 3) de la célula.

Tanto la forma secretada como la forma no secretada de MANF (denominadas conjuntamente como polipéptidos MANF) presentan actividad neurotrófica y resultan útiles como factor neurotrófico para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Parkinson y para mejorar la supervivencia neuronal dopaminérgica durante o después del trasplante en un ser humano. Los polipéptidos MANF también pueden utilizarse para mejorar la producción *in vitro* de neuronas para el trasplante. En otra utilización, los polipéptidos MANF pueden utilizarse para la identificación de compuestos que modulan o que imitan la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de MANF. Los polipéptidos MANF también pueden utilizarse para identificar receptores de MANF. Se describe cada uno de estos usos con mayor detalle a continuación.

Identificación de moléculas que modulan la actividad biológica de MANF

El efecto de moléculas candidatas sobre la regulación mediada por MANF de la supervivencia neuronal dopaminérgica puede medirse al nivel de la traducción mediante la utilización de técnicas estándares de detección de proteínas, tales como la transferencia western o la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico de MANF.

Los compuestos que modulan el nivel de MANF pueden purificarse, o purificarse sustancialmente, o pueden ser un componente de una mezcla de compuestos, tal como

un extracto o sobrenadante obtenido de las células (Ausubel *et al.*, *supra*). En un ensayo de una mezcla de compuestos, se mide la expresión de MANF en células en las que se administran progresivamente subconjuntos más pequeños del grupo de compuestos (por ejemplo producidos mediante técnicas de purificación estándares, tales como HPLC o FPLC) hasta que se demuestra que un único compuesto o un número mínimo de compuestos efectivos controla la expresión de MANF.

También pueden cribarse directamente los compuestos para su capacidad de modular la supervivencia neuronal dopaminérgica mediada por MANF. En este enfoque, se compara la magnitud de la supervivencia neuronal dopaminérgica en presencia de un compuesto candidato con la magnitud de la supervivencia neuronal dopaminérgica en su ausencia, bajo condiciones equivalentes. Nuevamente puede iniciarse el cribado con un grupo de compuestos candidatos, a partir del que se aísla uno o más compuestos moduladores útiles por etapas. La actividad estimulante de la supervivencia puede medirse mediante cualquier ensayo estándar.

Otro procedimiento para detectar compuestos que modulan la actividad de MANF es cribar para encontrar compuestos que interactúan físicamente con MANF. Estos compuestos pueden detectarse mediante la adaptación de sistemas de expresión de trampa de interacción conocidos de la técnica. Estos sistemas detectan las interacciones de las proteínas utilizando un ensayo de activación transcripcional y han sido descritos generalmente por Gyuris *et al.* (Cell 75:791-803, 1993) y Field *et al.* (Nature 340:245-246, 1989). Alternativamente, puede marcarse MANF o un fragmento biológicamente activo de la misma con reactivo de Bolton-Hunter-¹²⁵I (Bolton *et al.*, Biochem. J. 133:529, 1973). Las moléculas candidatas organizadas previamente en los pocillos de una placa multipocillo se incuban con el MANF marcado, y después se lavan; se somete a ensayo cualquier pocillo con complejo de MANF marcado. Los datos obtenidos utilizando diferentes concentraciones de MANF pueden utilizarse para calcular valores para el número, afinidad y asociación de MANF con las moléculas candidatas.

Los compuestos o moléculas que funcionan como moduladores de la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de MANF pueden incluir moléculas peptídicas y no peptídicas, tales como las presentes en extractos celulares, suero de mamífero o medio de crecimiento en el que se han cultivado células de mamífero.

Una molécula que modula la expresión de MANF o actividad biológica mediada por MANF de manera que se produzca un incremento de la supervivencia celular neuronal se considera útil; este tipo de molécula puede utilizarse, por ejemplo, como agente terapéutico, tal como se indica a continuación.

Terapia

El descubrimiento de MANF como factor neurotrófico que estimula la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas permite su utilización para el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson.

Para añadir un polipéptido MANF a células con el fin de impedir la muerte neuronal, resulta preferible obtener cantidades suficientes de un polipéptido MANF recombinante a

partir de sistemas celulares en cultivo que puedan expresar la proteína. Un polipéptido MANF preferente es el MANF humano, aunque también pueden utilizarse polipéptidos MANF derivados de otros animales (por ejemplo de cerdo, rata, ratón, perro, babuino, vaca y similares). La administración de la proteína en el tejido afectado a continuación puede conseguirse utilizando sistemas de empaquetamiento o administración apropiados. Alternativamente, pueden utilizarse análogos de molécula pequeña y administrarse para que actúen como agonistas de MANF y de esta manera producir un efecto fisiológico deseado.

La terapia génica es otro enfoque terapéutico potencial en el que se introducen copias normales del gen codificante de un polipéptido MANF (o un polinucleótido codificante de ARN de sentido de MANF) en las células para producir con éxito el polipéptido MANF. El gen debe administrarse en aquellas células en una forma en la que pueda resultar asimilado y codificar suficiente proteína para proporcionar una actividad estimulante efectiva de la supervivencia neuronal dopaminérgica.

Pueden utilizarse vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores víricos asociados a adenovirus u otros vectores víricos con el tropismo apropiado para las células neurales como un sistema de administración de transferencia génica para un constructo terapéutico de MANF. Son conocidos de manera general numerosos vectores que resultan útiles para este fin (Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis y Anderson, BioTechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev y Anderson, Curr. Opin. Biotech. 155-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; Miller *et al.*, Biotech. 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle *et al.*, Science 259:988-990, 1993; y Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995). Los vectores retrovíricos se encuentran particularmente bien desarrollados y han sido utilizados en contextos clínicos (Rosenberg *et al.*, N. Engl. J. Med. 323:370, 1990; Anderson *et al.*, patente US nº 5.399.346). También pueden utilizarse enfoques no víricos para la introducción de ADN terapéutico en las células deseadas. Por ejemplo, puede introducirse un polinucleótido codificante de MANF en una célula mediante lipofección (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987; Ono *et al.*, Neurosci. Lett. 117:259, 1990; Brigham *et al.*, Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger *et al.*, Meth. Enzymol. 101:512, 1983), conjugación asialorosonucoide-polilisina (Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 264:16985, 1989) o, menos preferentemente, microinyección bajo condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, Science 247:1465, 1990).

La transferencia génica también puede conseguirse utilizando medios no víricos que requieran la infección *in vitro*. Esto podría incluir el fosfato de calcio, DEAE-dextrano, la electroporación y la fusión de protoplasto. Los liposomas también pueden beneficiar potencialmente la administración de ADN en una célula. Aunque estos procedimientos se encuentran disponibles, muchos de ellos presentan una menor eficiencia.

En los constructos indicados, la expresión de ADNc de MANF o de pro-MANF puede dirigirse a partir de cualquier promotor adecuado (por ejemplo los promotores del citomegalovirus humano (CMV), del virus 40 del simio (SV40) o metalotioneína) y regularse mediante cualquier elemento regulador de mamífero apropiado. Por ejemplo, si se desea, pueden utilizarse intensificadores que es conocido que dirijan preferentemente

la expresión génica en células neurales para dirigir la expresión del polipéptido MANF. Entre los intensificadores utilizados podrían incluirse de manera no limitativa los que se caracterizan porque presentan una expresión específica de tejido o de célula.

5 Pueden modificarse moléculas de ARN para incrementar la estabilidad y semivida intracelulares. Entre las posibles modificaciones se incluyen de manera no limitativa la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o la utilización de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa dentro del esqueleto de la molécula. Este concepto puede extenderse a todas dichas moléculas
10 mediante la inclusión de bases no tradicionales, tales como inosina, queosina y wibutosina, así como formas acetilo, metilo, tio y modificadas de manera similar, de adenina, citidina, guanina, timidina y uridina que no resulten fácilmente reconocidas por las endonucleasas endógenas.

15 Otro enfoque terapéutico implica la administración de un polipéptido MANF recombinante, directamente en el sitio de una pérdida celular potencial o real (por ejemplo mediante inyección) o sistémicamente (por ejemplo mediante cualquier técnica convencional de administración de proteínas recombinantes).

20 Una exposición adicional en la presente memoria se refiere a la administración de una composición farmacéutica, conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos comentados anteriormente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden estar constituidas por polipéptidos AMNF, anticuerpos contra polipéptidos MANF y/o miméticos y agonistas de polipéptidos MANF.
25 Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con por lo menos otro agente, tal como un compuesto estabilizador, que puede administrarse en cualquier portador farmacéutico estéril biocompatible, incluyendo, aunque sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse en un paciente por sí solas, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.
30

 En un ejemplo, se administra un polipéptido MANF en un sujeto en el sitio en el que se trasplantan células. La administración del polipéptido MANF puede llevarse a cabo antes, durante o después del trasplante de las células. Preferentemente las dos etapas se
35 llevan a cabo separadas por aproximadamente cuatro horas. En caso deseable, el polipéptido MANF puede administrarse repetidamente en el sujeto en diversos intervalos antes y/o después del trasplante de las células. Esta administración protectora del polipéptido MANF puede realizarse meses o incluso años después del trasplante de las células.

40 Además de su administración en un ser humano o en otro mamífero, también puede utilizarse un polipéptido MANF en cultivo para mejorar la supervivencia de las neuronas durante su producción en cualquier momento previo al trasplante. En un ejemplo, se suspenden las células que deben trasplantarse en un portador farmacéutico que también incluye una cantidad estimulante de la supervivencia de un polipéptido
45 MANF. También puede administrarse un polipéptido MANF en los cultivos en etapas anteriores del procedimiento (por ejemplo durante la primera diferenciación de las neuronas). Se entiende que las neuronas no son necesariamente neuronas dopaminérgicas primarias. Pueden cultivarse neuronas (por ejemplo neuronas

dopaminérgicas) que se diferencian, *in vitro* o *in vivo*, a partir de células madre o de cualquier otra célula capaz de producir neuronas, en presencia de un polipéptido MANF durante su producción y mantenimiento.

5 Las formulaciones parenterales pueden encontrarse en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden encontrarse en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

10 Pueden encontrarse procedimientos bien conocidos de la técnica para preparar formulaciones en, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20^a edición), editor A.R. Gennaro AR., 2000, Lippencott Williams & Wilkins. Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener, por ejemplo, como excipientes, agua o solución salina, polialquilenglicoles, tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, o
15 naftalenos hidrogenados, o polímero láctido biodegradable biocompatible, o pueden utilizarse copolímeros polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los presentes factores. Entre otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles se incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden
20 contener como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contengan, por ejemplo, éter polioxietilén-9-laurílico, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones aceitosas para la administración en forma de gotas nasales, o en forma de un gel para la aplicación intranasal.

25 Los presentes factores pueden utilizarse a modo de únicos agentes activos, o pueden utilizarse en combinación con otros ingredientes activos, por ejemplo otros factores de crecimiento que puedan facilitar la supervivencia neuronal dopaminérgica en enfermedades neurológicas, o inhibidores de peptidasa o de proteasa.

30 La concentración de los presentes factores en las formulaciones de la invención puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo la dosis que debe administrarse y la vía de administración.

35 En términos generales, los factores de la presente invención pueden proporcionarse en una solución acuosa tampón fisiológica que contenga entre aproximadamente 0,1 y 10% p/v de polipéptido para la administración parenteral. Los intervalos de dosificación generales son de entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 1 g/kg de peso corporal al día; un intervalo de dosis preferido es de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal al día. La dosis
40 preferida que debe administrarse probablemente depende del tipo y grado de progresión de la condición fisiopatológica bajo tratamiento, del estado general de salud del paciente, de la composición de la formulación y de la vía de administración.

45 Aunque el MANF humano resulta de utilización preferida en los procedimientos descritos en la presente memoria, se ha identificado MANF en numerosas especies, incluyendo la rata, el ratón y la vaca. El experto en la materia apreciará que la identificación de MANF de otros animales puede llevarse a cabo fácilmente utilizando procedimientos estándares. Cualquier proteína según la reivindicación 1 y que presente actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica y codificada por un

ácido nucleico que se hibride al ADNc codificante de la ARP humana se considera parte de la invención.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

EJEMPLO 1: Producción y análisis de las células VMCL-1

Se preparó la línea celular VMCL-1 de la manera siguiente. Se incubaron células mesencefálicas E14 de rata, aproximadamente 2 a 3% de las cuales eran glioblastos, en medio que contenía 10% de suero de feto bovino (v/v) durante 12 horas y posteriormente se expandieron en un medio libre de suero que contenía factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF) como mitógeno. Tras más de 15 DIV, se observaron varios islotes de células proliferantes de tipo glial. Tras el aislamiento y subcultivo, las células (denominadas células VMCL-1 en la presente memoria) proliferaron rápidamente en un medio de crecimiento libre de suero o que contenía suero. Los análisis inmunocitoquímicos posteriores demostraron que presentaban tinción positiva para dos marcadores astrocíticos, GFAP y vimentina, y que eran negativos para marcadores de los linajes oligodendroglial o neuronal, incluyendo A2B5, O4, GalC y MAP2. Los presentes inventores han depositado la línea celular VMCL-1 en la ATCC (nº de acceso PTA-2479; fecha de depósito: 18 de septiembre de 2000).

El MC libre de suero, preparado a partir de células VMCL-1, causó una supervivencia y diferenciación incrementadas de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas E14 en cultivo. Estas acciones son similares a las ejercidas por el MC derivado a partir de astrocitos de tipo 1 mesencefálicos primarios. La expresión de genes específicos de la región mesencefálica (por ejemplo *wnt-1*, *en-1*, *en-2*, *pax-2*, *pax-5* y *pax-8*) era similar entre las células VMCL-1 y los astrocitos de tipo 1 primarios de origen mesencefálico ventral E14. En ambos, *wnt-1* se expresaba fuertemente, y *en-1* menos fuertemente, indicando un patrón de expresión esperado por su origen mesencefálico. Un análisis cromosómico demostró que 70% de las células eran heteroploides, y de éstas, 50% eran tetraploides. No se observó un declive aparente de la capacidad proliferativa tras más de veinticinco pases. Las propiedades de esta línea celular eran consistentes con las de un astrocito de tipo 1 inmortalizado.

Las células VMCL-1 presentan una morfología de tipo glial claramente no neuronal, pero no presentan la forma agrandada grande típica de los astrocitos de tipo 1 en cultivo. El análisis inmunocitoquímico demostró que teñían positivamente para GFAP y vimentina, y negativo para MAP2, A2B5 y O4. Por lo tanto, las células no eran del linaje oligodendrocítico. Basándose en la reacción negativa frente a A2B5 y sus características morfológicas, tampoco eran astrocitos de tipo 2. La clasificación indicada por la evidencia inmunocitoquímica es de astrocitos de tipo 1, aunque, tal como se ha indicado, estas células no presentan las características morfológicas clásicas de los astrocitos de tipo 1 primarios en cultivo.

EJEMPLO 2: Acción del MC de VMCL-1 sobre las neuronas dopaminérgicas E14 en cultivo

Se sometió a ensayo el MC de VMCL-1 a una proporción de 0, 5, 20 y 50% v/v para su capacidad de influir sobre la supervivencia y desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas E14 en cultivo. Los cultivos se prepararon con suero de feto bovino (FBS) al 10% durante 12 horas, después se cultivaron en un medio de crecimiento libre de suero, y se tiñeron y analizaron, tras 7 DIV. Se produjo una acción dependiente de la dosis del MC sobre la supervivencia incrementada de las neuronas dopaminérgicas. El MC incrementó la supervivencia en 5 veces. En contraste, no se produjo ningún incremento significativo de la supervivencia de las neuronas no dopaminérgicas. El perfil de acción biológica de este factor putativo es bastante diferente del derivado del MC procedente de la línea celular de glioma B49, la fuente de GDNF (Lin *et al.*, Science 260:1130-1132).

EJEMPLO 3: Análisis de la expresión génica de las células VMCL-1

Con el fin de investigar adicionalmente la similitud entre la línea celular VMCL-1 y astrocitos en cultivo primario, se midió la expresión de seis genes marcadores característicos de la región mesencefálica. El análisis de *wnt-1*, *en-1*, *en-2*, *pax-2*, *pax-5* y *pax-8* demostró que todos los genes se expresaban en tejido neural del mesencéfalo ventral tanto E13 como E14, con la excepción de *pax-2*, que se expresó en tejido neural E13 pero no E14. Tanto astrocitos primarios como células VMCL-1 expresaron *wnt-1* a niveles comparables a los del tejido neural mesencefálico ventral de E13 y de E14. El grado de expresión de *en-1* era similar en astrocitos primarios y en células VMCL-1, aunque a un nivel inferior que la expresión en tejido mesencefálico ventral E13 y E14. En contraste, *en-2*, *pax-5* y *pax-8* no se expresaban en astrocitos primarios o VMCL-1. *Pax-2* se expresó en mesencéfalo ventral E13, pero no E14, y en astrocitos primarios, pero no en VMCL-1.

EJEMPLO 4: Análisis cromosómico de células VMCL-1

Se contaron los cromosomas en 34 células. De entre éstas, 9 presentaban un recuento de 42, el número diploide de la rata. De las 25 células que eran heteroploides, 12/25 (48%) se encontraban en el rango tetraploide. Tanto las células hiperdiploides (recuentos de 43 a 48) como hipodiploides (recuentos de 39 a 41) suponían, cada una, 20% de la población, mientras que 12% de las células presentaba cromosomas estructuralmente reorganizadas.

La acción selectiva del MC de VMCL-1 en el incremento de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en cultivo proporciona un uso clínico potencial para la molécula o moléculas producidas por esta línea celular. La falta de una acción tóxica del MC de VMCL-1 a una concentración de 50% v/v indica que el factor neurotrófico putativo activo no es tóxico. La acción ejercida por el MC de VMCL-1 es prácticamente idéntica a la del MC preparado a partir de astrocitos de tipo 1 mesencefálicos primarios (Takeshima *et al.*, J. Neurosci. 14:4769-4779, 1994). La observación de que la supervivencia neuronal general no resulta significativamente incrementada mientras que la supervivencia de las

neuronas dopaminérgicas se incrementó en 5 veces (figura 1) es fuertemente indicativa de un elevado grado de especificidad del factor putativo procedente de VMCL-1 para las neuronas dopaminérgicas. Se ha demostrado que los astrocitos de tipo 1 primarios expresan ARNm de GDNF, pero no han detectado proteína GDNF mediante transferencia western en el MC a una sensibilidad de 50 pg. Además, se ha demostrado que, bajo las presentes condiciones experimentales, la supervivencia incrementada de las neuronas dopaminérgicas mediada por una concentración óptima de GDNF nunca es superior a 2 veces. Estas observaciones por sí solas indican que el factor responsable de las acciones neurotróficas del MC de VMCL-1 no es GDNF.

EJEMPLO 5: Producción de medio condicionado por astrocitos de tipo 1

Se filtró MC de astrocitos de tipo 1 E16 (10 l) y se aplicó a una columna CL-6B de heparina-sefarosa (volumen de lecho: 80 ml) que había sido previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM (Mallinckrodt Chemical Co., Paris, KY), pH 7,6, que contenía NaCl 0,2 M. Tras lavar con tampón de equilibrado, las proteínas unidas se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de NaCl 0,2 M a 2 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 (400 ml de volumen total, caudal de 100 ml/h). Las fracciones se recogieron utilizando un recolector de fracciones LKB de Pharmacia y la absorbancia se midió a 280 nm (espectrofotómetro UV/VIS Sargent-Welch PU 8600). Se obtuvo una alícuota de 1 ml de cada fracción, se agrupó en grupos de cuatro (4 ml de volumen total) y se desaló utilizando concentradores de membrana Centricon-10[®] (Millipore, Bedford, MA). Las muestras se diluyeron 1:4 en medio definido y se sometieron a bioensayo para la actividad dopaminérgica. Las fracciones activas se agruparon (80 ml de volumen total) y después se aplicaron a una columna G-75 Sephadex[®] (70x2,5 cm, Pharmacia Biotechnology Ltd., Cambridge, Reino Unido) que había sido preequilibrada con formato amónico 50 mM, pH 7,4. Las proteínas se separaron con el mismo tampón (caudal: 75 ml/h) y se midió la absorbancia a 280 nm. Se obtuvo una alícuota de 1 ml de cada fracción, se agruparon en grupos de cuatro (volumen total de 4 ml), se concentraron mediante liofilización y se reconstituyeron en 1 ml de volumen de agua destilada. A continuación, las muestras se diluyeron 1:4 en medio definido para el bioensayo dopaminérgico. Las que presentan actividad neurotrófica se sometieron adicionalmente a bioensayo en forma de fracciones individuales.

Una característica distintiva importante del MC de VMCL-1 es que estimula predominantemente la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, en comparación con la supervivencia de las GABAérgicas, serotoninérgicas y otros fenotipos neuronales presentes en el cultivo. Esta reivindicación de especificidad también se realiza para GDNF. Los resultados de extensivos ensayos han demostrado, sin embargo, que el compuesto derivado de VMCL-1 no es GDNF.

EJEMPLO 6: Aislamiento y purificación de una proteína que presenta actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica

Se llevó a cabo el protocolo de purificación de la manera siguiente. Todas las sales utilizadas eran de la pureza más alta y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Todos los tampones se prepararon frescos y se filtraron con un filtro de 0,2 µM (sistema de vacío GP Express de Millipore).

Etapas 1: cromatografía de columna de heparina-sefarosa (4°C)

Se diluyeron tres litros de medio condicionado de VMCL-1 con un volumen igual de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,2, a temperatura ambiente, se filtraron y se concentraron hasta un volumen de 550 ml con un cartucho 5K PREP/SCALE-TFF de 2,5 pies² (Millipore). El material concentrado se cargó en una columna de heparina-sefarosa de 10 ml ensamblada en 2 columnas HiTrap de heparina de 5 ml (Pharmacia Biotech) y se preequilibraron con por lo menos 100 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,2 (tampón A). Tras completar la carga, la columna se lavó con 100 ml de tampón A. Se eluyó un total de 10 fracciones con tampón B (tampón A más cloruro sódico 1 M) en volúmenes de aproximadamente 3 ml cada una. Se extrajo una muestra de 300 µl para el análisis.

Etapas 2: cromatografía de columna de Superosa 12 (4°C)

Se agruparon todas las fracciones de la etapa 1, después se concentraron a 4,5 ml utilizando un concentrador Centricon Plus-20 (corte de PM (MWCO): 5.000, Millipore), se cargaron en 16 columnas de 600 mm de filtración en gel empaquetadas con medio de Superosa 12 (grado preparativo, Sigma Chemical Co.) y se preequilibraron con por lo menos 300 ml de tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,2, que contenía cloruro sódico 0,6 M (tampón GF). La elución de las proteínas se llevó a cabo en tampón GF. Se recogieron fracciones de dos mililitros y se analizaron para la actividad. La proteína activa se eluyó en un volumen de 15 ml tras pasar 84 ml de tampón GF a través de la columna y correspondía a una región de elución de aproximadamente 20 a 30 kDa, basada en los datos de calibración de la columna obtenidos utilizando estándares de proteína (Bio-Rad).

Etapas 3: cromatografía de columna de hidroxipatito cerámica (temperatura ambiente; sistema FPLC)

Las fracciones activas de la etapa 2 que correspondían a la región de elución de 20 a 30 kDa se agruparon y se concentraron a 7,5 ml, utilizando un concentrador Centricon Plus-20 (corte de PM 5.000), se dializaron durante la noche a 4°C frente a 2 l de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,2 (tampón A) y se cargaron (mediante sistema Superloop) en una columna cerámica de hidroxipatito (tipo 1, Bio-Rad) preempaquetada de 1 ml equilibrada con tampón A. Tras lavar el exceso de proteína no unida (flujo continuo) de la columna con tampón A, se aplicó el gradiente lineal de tampón A que contenía NaCl 1,0 M de 0% a 100%. Se recogieron fracciones de un mililitro y se analizaron para la actividad. Se eluyó la proteína activa como pico amplio dentro de la región de gradiente correspondiente a concentraciones de NaCl de 0,4 a 0,8 M.

Etapas 4: cromatografía de columna de intercambio aniónico (temperatura ambiente; sistema FPLC)

Las fracciones correspondientes al pico amplio se agruparon (volumen total=15 ml) y se concentraron a 6 ml utilizando un Centricon Plus-20 (corte de PM: 5.000), se dializaron durante la noche a 4°C frente a 2 l de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (tampón A), se cargaron (mediante sistema Superloop) en una columna FPLC de intercambio aniónico de 1 ml (Uno, Bio-Rad) y se equilibraron con tampón A. Tras lavar el exceso de

proteína no unida de la columna con tampón A, se aplicó un gradiente lineal de 0% a 100% de NaCl 1 M (en tampón A). Se recogieron fracciones de un mililitro y se analizaron para la actividad. Se encontró la proteína activa en el eluido (es decir, en la fracción de proteína no unida).

5

Etapas 5: cromatografía de columna BioSil 125 (temperatura ambiente, sistema HPLC)

La fracción de proteína activa de la Etapa 4 (7 ml de volumen total) se concentró hasta un volumen de prácticamente cero (aproximadamente 1 µl) utilizando un concentrador Centricon Plus-20 (corte de PM: 5.000) y se reconstituyó en 0,6 ml de tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,2. El material reconstituido (70 µl, serie analítica) se cargó en una columna HPLC de filtración en gel BioSil 125 (Bio-Rad) equilibrada con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,2 (tampón GF). La cromatografía se llevó a cabo utilizando el sistema de HPLC HP 1100 Series (Hewlett-Packard). El eluido se recogió en fracciones de 120 µl y se analizó para la actividad y contenido de proteínas (SDS-PAGE). Se encontró la actividad en fracciones asociadas con el pico principal de absorbancia a 280 nm eluido de la columna, que se encontraba representado por una proteína de 45 kDa según el análisis de SDS-PAGE. Sin embargo, no se encontró actividad en las fracciones laterales del pico de proteína de 45 kDa, indicando que la actividad podría deberse a la presencia de otra proteína que se coeluyó con la proteína de 45 kDa, aunque a una concentración mucho menor que no pudo detectarse en el gel de SDS-PAGE al 12% teñido con plata. Por lo tanto, el material concentrado restante de la etapa 5 se concentró adicionalmente a un volumen de 80 µl utilizando un concentrador Centricon-3 (Millipore) y se cargaron y se separaron 60 µl en la columna bajo las mismas condiciones que la serie analítica anteriormente indicada. Se extrajeron alícuotas de 8 µl de cada fracción de 120 µl del eluido y se analizaron mediante SDS-PAGE (gel al 12%) en combinación con tinción de plata. Este análisis indicó que otras dos proteínas adicionales (que presentaban pesos moleculares de aproximadamente 18 y 20 kDa) se encontraban asociadas a las fracciones activas y coeluyeron con la proteína principal de 45 kDa. Las fracciones activas se dializaron frente a 1 litro de tampón de acetato amónico, pH 8,0 (4°C) y se agruparon para crear dos grupos activos: P-1 y P-2, de manera que P-1 contenía la proteína de 20 kDa y la proteína de 45 kDa, y P-2 contenía la proteína de 18 kDa y la proteína de 45 kDa. Cada grupo se secó en un concentrador de vacío SpeedVac (Savant) y se reconstituyó separadamente en 15 µl de tampón de acetato amónico 0,1 M, pH 6,9. Se extrajeron alícuotas de cada muestra y se sometieron a ensayo para la actividad. Además, se sometieron alícuotas de 1 µl a análisis de SDS-PAGE al 12% seguido de tinción de plata.

Los resultados del análisis anteriormente indicado indican claramente que P-1, pero no P-2, contenía la actividad estimulante de la supervivencia deseada. En la etapa siguiente, se secaron tanto P-1 como P-2 en SpeedVac, se reconstituyeron (cada uno) en 10 µl de tampón reductor para muestras de SDS-PAGE recién preparado (Bio-Rad), se incubaron durante un minuto en un baño de agua hirviendo y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12%. Tras completar la electroforesis, el gel se fijó en solución de metanol/ácido acético/agua (50:10:40) durante 40 minutos a temperatura ambiente, se lavó tres veces con agua nanopura y se tiñó durante la noche con reactivo de tinción azul GelCode (Pierce) a temperatura ambiente. Tras completar la tinción y eliminar mediante lavado la solución GelCode, se recortaron las bandas de proteína visibles correspondientes a la proteína de 45 kDa (tanto P-1 como P-2) y la proteína de 20 kDa (P-1 únicamente) del gel utilizando una cuchilla. Cada rodaja del gel que contenía una banda correspondiente

45

se introdujo en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml hasta el momento de la digestión dentro del gel.

5 **EJEMPLO 7: Análisis mediante nESI-MS/MS de los fragmentos digeridos dentro del gel**

10 Las bandas de gel de las proteínas se incubaron con bicarbonato amónico 100 mM en acetonitrilo al 30% (aq.) a temperatura ambiente durante 1 hora con el fin de eliminar la tinción de azul de Coomassie coloidal. La solución decolorante se sustituyó varias veces hasta eliminar por completo el pigmento. A continuación, se cubrieron los trozos de gel con agua desionizada (~200 µl) y se agitaron durante 10 minutos. Los trozos de gel se deshidrataron en acetonitrilo y, tras eliminar el exceso de líquido, se secaron por completo en un evaporador de centrifuga. Las bandas de gel se rehidrataron con 20 µl de bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,3, que contenía 200 ng de tripsina modificada (Promega, Madison, WI). Se recuperaron los trozos de gel con bicarbonato amónico 50 mM, pH 8,3 (aproximadamente 50 µl) y se incubaron durante la noche a 37°C. A continuación, se transfirieron las soluciones de digerido a tubos Eppendorf limpios y se sonicaron los trozos de gel durante 30 minutos en 50 a 100 µl de ácido acético al 5% (aq.). Las soluciones de extracto se agruparon con las soluciones de digerido y se evaporaron a sequedad en un evaporador de centrifuga.

25 Los extractos digeridos dentro del gel en primer lugar se analizaron mediante desorción/ionización por láser asistida por matriz-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOFMS) utilizando un instrumento de MALDI-TOFMS Voyager Elite STR (Applied Biosystems Inc., Framingham, MA). Los extractos se disolvieron en 5 µl de acetonitrilo al 50%, ácido acético al 1%. Se utilizó ácido dihidroxibenzoico como la matriz y se captaron los espectros en modo reflectron-ión positivo. Se utilizó aproximadamente un quinto de cada muestra para este análisis. Estos espectros proporcionaron las masas de los péptidos en los extractos de digerido que después se utilizaron para buscar en una base de datos de secuencias de proteínas no redundantes del propio laboratorio de los presentes inventores, un procedimiento denominado de "huella peptídica". El resto de las muestras se utilizó para el análisis de secuenciación peptídica mediante ionización por nanoelectropulverización-espectrometría de masas en tándem (nESI-MS/MS). Los extractos se desalaron en primer lugar utilizando C18 ZipTips (Millipore) y se redisolviéron en metanol al 75% (aq.) y ácido acético al 0,1% (5 µl). Se cargó aproximadamente una mitad de las muestras en capilares de vidrio de nanoelectropulverización (Micromass). Se llevaron a cabo análisis de nESI-MS/MS utilizando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo de tiempo de vuelo Q-star (PE SCIEX, Concord, ON). La totalidad de los análisis de MS/MS se llevó a cabo en modo de ión positivo. El gas de colisión era nitrógeno y la energía de colisión, de 40 a 60 eV. Los espectros de MS/MS se captaron típicamente cada segundo durante un periodo de dos minutos. Se utilizaron los espectros de MS/MS para la búsqueda en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes propia de los presentes inventores utilizando etiquetas de secuencia parciales (es decir, únicamente se utilizó la masa peptídica y unos cuantos iones fragmentarios para la búsqueda en la base de datos). En el caso de que no se identificase la proteína mediante este procedimiento, se determinaban las secuencias de aminoácidos de dos o más péptidos tan completamente como resultase posible a partir de los espectros de MS/MS. Se utilizaron estas secuencias para llevar a cabo las búsquedas e

BLAST en las bases de datos de proteínas, nucleótidos y secuencias EST del NCBI.

EJEMPLO 8: Identificación de MANF, una forma secretada de ARP

Con el fin de que ARP sea un factor responsable por lo menos parcialmente de la actividad neurotrófica observada del MC de VMCL-1, la proteína debe ser liberada de la célula. Sin embargo, el extremo amino-terminal predicho de la ARP presenta cargas básicas, una propiedad que favorecería la retención en el núcleo celular. De todos modos, se planteó la hipótesis de que también debía existir una forma secretada.

Se encontró evidencia positiva para la hipótesis en el contexto de la presente invención en una publicación de Goo *et al.* (Molecules and Cells 9:564-568, 1999), quienes identificaron un ADNc codificante de una proteína de tipo ARP en *Drosophila melanogaster* durante el cribado de una biblioteca de ADNc utilizando una técnica de trampa de secuencias de señal de levadura. La proteína de tipo ARP putativa codificada por este ADNc no presenta el extremo amino-terminal rico en argininas. Utilizando el programa SignalP, se identificó un péptido de señal (residuos 1 a 22) y un sitio de corte de peptidasa de señal entre la alanina-22 y la leucina-23 de la proteína de tipo ARP de *Drosophila*, proporcionando evidencia adicional de que se secreta la proteína de tipo ARP de *Drosophila*.

Basándose en la alineación entre la ARP humana y la proteína de tipo ARP de *Drosophila*, se postuló que la ARP humana presentaría una secuencia de señal y un sitio de corte de peptidasa de señal. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se utilizó el programa SignalP para analizar la ARP humana que no presenta el extremo amino-terminal rico en arginina (aminoácidos 1 a 55); este polipéptido en la actualidad se denomina pro-MANF. En el presente ejemplo, la metionina de la posición 56 es el codón de inicio. El programa SignalP predijo un péptido de señal consistente de los residuos 1 a 21 de la secuencia SEC ID nº 2 y un sitio de corte entre la alanina-21 y la leucina-22, lo que es consistente con los resultados del análisis de la proteína de tipo ARP de *Drosophila*. La proteína MANF humana procesada predicha se ilustra en la figura 2 y en la SEC ID nº 3. Este polipéptido y otros polipéptidos MANF ejemplificativos se muestran en las figuras 2 y 3. Se muestran polinucleótidos de MANF ejemplificativos en la figura 4.

Basándose en parte en el análisis de la presente memoria de la proteína de tipo ARP de *Drosophila* (nº de acceso de GenBank AF132912_1) y la ARP humana, se predijo que la traducción se iniciaría en la metionina de la posición 1 o en la metionina de la posición 56 de la ARP humana. En este último caso, la proteína que contiene el péptido de señal (pro-MANF) es capaz de ser secretada de la célula en forma de MANF, en donde la proteína actúa como un factor neurotrófico. El descubrimiento de la existencia de MANF no excluye, sin embargo, la posibilidad de una función intracelular para la ARP que contiene la región amino-terminal rica en argininas.

EJEMPLO 9: Actividad biológica de MANF expresada en *E. coli*

Se llevó a cabo la expresión de proteína recombinante en células bacterianas *E. coli* utilizando pTriEx que contenía un polinucleótido codificante de MANF humano (SEC

ID nº 3). Se obtuvo un total de 4 mg de MANF recombinante purificado a partir de 350 ml de cultivo celular bacteriano; se confirmó su identidad a partir de la secuenciación mediante espectrometría de masas. Se sometió a ensayo esta proteína para su capacidad de proteger las neuronas DA. Tal como se muestra en la figura 5, MANF expresado en *E. coli* fue capaz de proteger las neuronas DA de la muerte celular en el mismo grado que el medio condicionado de VMCL-1.

EJEMPLO 10: Respuesta a dosis de MANF eucariótico expresado en células HEK293

Se sometió a ensayo la relación de dosis del MANF humano (pureza del 99%, producido en células HEK293) frente a la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas utilizando un sistema de ensayo de cultivo de células dopaminérgicas que contenía 20% de neuronas dopaminérgicas. Las ratas gestantes E14 se sacrificaron mediante narcosis con CO₂. Se sumergió el torso en EtOH al 70%, se llevó a cabo una laparatomía y se extirpó el saco uterino y se transfirió a un tubo de 50 ml que contenía 20 ml de HBSS frío, pH 7,4. Cada saco uterino se transfirió, a su vez, a una placa de Petri de 10 cm que contenía 15 ml de HBSS frío. Se extrajeron los fetos intactos y se aisló cada cerebro intacto y se transfirió a una nueva placa de Petri de 10 cm que contenía 15 ml de HBSS frío. Se diseccionó el mesencéfalo ventral medial (VM) en el techo de la flexión mesencefálica para obtener un trozo de 1,0 mm³ de tejido a una densidad de empaquetamiento de 1,0 x 10⁵ células/mm³. El tejido de VM se transfirió a un tubo de 15 ml que contenía 10 ml de PCM10 frío. El tejido de VM agrupado se lavó con PCM10 (DMEM/F12 con glutamina 2 mM, insulina 5 mg/ml, transferrina 5 mg/ml, selenito sódico 5 mg/ml; progesterona 20 nM, tiroxina 30 nM y suero de feto bovino al 10%) (tres lavados), seguido de un único lavado en medio libre de suero (PCM0, igual que PCM10 excepto en que no presenta suero fetal bovino) y se digirió en 2,0 ml de PCM0 que contenía papaína (10 U/ml) durante 15 minutos a 37°C. A continuación, se enjuagó el tejido (3x5 ml) con PCM10 para inactivar la actividad de proteasa. Se realizó la trituración en 2,0 ml de PCM0 utilizando una micropipeta P-1000 ajustada a 500 µl. El punto final era una suspensión lechosa sin indicios de masas de tejido. Las células dispersadas se centrifugaron (1.000 rpm, 2 minutos, 4°C), se realizó un recuento, y después se resuspendieron a una densidad de 6,25 x 10⁵ células/ml en PCM10. Se sometió a ensayo la viabilidad celular en esta etapa, y habitualmente era >95%.

Las células se sembraron en placa en forma de gotas de 25 µl de microislas (MI) (1,56 x 10⁴ células/MI) en portaobjetos con cámara de 8 pocillos, y se recubrieron con poli-D-lisina. Una gota de 25 µl de MI ocupa un área de 12,5 mm². La densidad celular media final de la MI de promedio es, por lo tanto, 1,25 x 10⁵ células/cm². La densidad celular media en el centro de la MI es aproximadamente 2,0 x 10⁵/cm², cayendo a <1,0 x 10⁴ en la periferia de la MI. Las MIs se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ con una humedad de 100% durante 45 minutos para permitir que las células se engancharan a la superficie recubierta. Tras la unión, se añadieron 375 µl de PCM10 a cada pocillo y las células se expusieron a suero durante 4 horas. Al final de la exposición, se aspiró el 100% del PCM10 y se substituyó por PCM0 libre de suero.

Se preparó MANF de la manera siguiente. Se clonó pro-MANF humano (SEC ID nº 2) en un vector de expresión pTriEx. La expresión de proteínas recombinantes se llevó a cabo en células HEK293. Se obtuvieron veinte microgramos de MANF recombinante

purificado que no presentaba la secuencia de señal a partir de 800 ml de medio condicionado con células HEK293. Se confirmó su identidad mediante análisis de secuencia por espectrometría de masas.

Los cultivos se trataron en el primer, tercer y quinto días con la cantidad indicada de MANF. Los cultivos se fijaron y se tiñeron en DIV6 o DIV7, utilizando el procedimiento del vector ABC o inmunofluorescencia indirecta.

Incluso en DIV3 se observó una diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de MANF sometidas a ensayo (ANOVA, $p < 0,001$) (figura 6). Las comparaciones apareadas utilizando el procedimiento Tukey de análisis indicaron que MANF a una concentración de 250 y de 500 pg/ml, y de 1,0 y 10 ng/l, era significativamente diferente de los controles ($p < 0,05$).

EJEMPLO 11: Rango de orden de potencia de BDNF, GDNF y MANF

Tal como se ilustra en la figura 7, al someter a ensayo tres dosis equivalentes de BDNF, GDNF y MANF, el rango de orden de potencia fue: MANF>GDNF>BDNF, indicando que las dos concentraciones inferiores de MANF eran más selectivas para las neuronas DA que las dosis bajas de BDNF o de GDNF. A la dosis más alta, el rango de orden de potencia fue: GDNF>MANF>BDNF. En general, BDNF tendía a ser el más potente, pero menos específico para la protección de las neuronas DA. A concentraciones más bajas, MANF tendió a ser el más selectivo en la protección de las neuronas DA.

EJEMPLO 12: Dominios de MANF que se predice que son activos

Se identificaron tres péptidos de MANF que predijeron que podrían presentar actividad biológica de MANF (es decir, de protección de las neuronas DA frente a la muerte celular). Los péptidos humanos eran: LRPGDCEVCISYLGRFYQDLKDRDVTFSPATIENELIKFCREA, SEC ID nº 11; RGKENRLCYYIGATDDAATKIINEVSKPLAHHIPVEKICEKLKKKDSQICEL, SEC ID nº 12 y KYDKQIDLS TVDLKKLRVKELKKI LDDWGETCKGCAEKSDYIRKINELMPKY, SEC ID nº 13. Los péptidos contrapartida pudieron identificarse fácilmente utilizando programas de alineación de secuencias estándares. En la presente memoria se proporcionan las secuencias de MANF de ratón, vaca y cerdo. Estos péptidos pueden utilizarse en cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria, y se consideran expresamente "polipéptidos MANF".

EJEMPLO 13: Selectividad de la capacidad de respuesta frente a MANF

Se sometió a ensayo la capacidad de MANF de proteger las neuronas procedentes de otras regiones cerebrales. No se observó protección de las neuronas granulares de cerebelo de rata, neuronas sensoriales nodosas o neuronas noradrenérgicas simpáticas. De manera similar, en los cultivos mesencefálicos ventrales, aparentemente no existía actividad sobre las neuronas GABAérgicas y serotoninérgicas en cultivos en los que MANF era demostrablemente protector de las neuronas DA. En contraste con los resultados

anteriormente proporcionados, MANF era protector de un subconjunto de células ganglionares de la raíz dorsal en cultivo. Los ganglios de la raíz dorsal consisten de por lo menos tres subpoblaciones de neuronas. Se ha demostrado que NGF, BDNF y NT-3, todos miembros de la familia de la neurotrofina de factores neurotróficos, actúan, cada uno, sobre un subconjunto diferente de dichas neuronas. La acción de MANF sobre este subconjunto de neuronas ganglionares de la raíz dorsal, por lo tanto, es consistente con las propiedades neuroprotectoras generales de los factores neurotróficos.

EJEMPLO 14: Producción de anticuerpos policlonales de MANF

Se prepararon anticuerpos policlonales de la manera siguiente. Se preparó MANF de longitud completa etiquetado con His en *E. coli*. Se llevaron a cabo seis inyecciones de antígeno de 200 µg de proteína MANF purificada por inyección en cada conejo (una cada uno los días 1, 21, 35, 49, 63 y 70). Se recogió el suero el día 84 (100 ml de suero/conejo).

Se utilizó el análisis de transferencia western para someter a ensayo la actividad de MANF-pAb. Se utilizó una cantidad relativamente alta de MANF (720 ng) para el ensayo inicial de la actividad de MANF-pAb, que siguió siendo activo a una dilución de 1:12.800 (figura 8, carril 9). En el ensayo siguiente, se fijó la dilución de MANF a 5.000 y se modificó la cantidad de MANF de 1.000 a 15,6 ng. La cantidad más baja de MANF, 15,6 ng, resultó de fácil detección (figura 9, carril 9). En los ensayos para reactividad cruzada con BDNF y GDNF, los resultados demostraron que incluso a tres veces la cantidad de MANF (32 ng), MANF-pAb no reaccionó cruzadamente con BDNF o con GDNF (figuras 10A-10C).

Los resultados proporcionados anteriormente se obtuvieron utilizando los procedimientos siguientes.

Cultivos mesencefálicos

Se preparó un cultivo celular mesencefálico primario a partir de ratas Sprague-Dawley gestantes de fecha de gestación conocida (Taconic Farms, Germantown, NY), tal como se ha descrito con anterioridad (Shimoda *et al.*, Brain Res. 586:319-323, 1992; Takeshima *et al.*, J. Neurosci. 14:4769-4779, 1994; Takeshima *et al.*, Neuroscience 60:809-823, 1994; Takeshima *et al.*, J. Neurosci. Meth. 67:27-41, 1996). Se recogió el tejido diseccionado y se agrupó en HBSS oxigenado frío (4°C) o en medio que contenía suero de feto bovino al 10% (Biofluids Laboratories, Rockville, MD), dependiendo del propósito del experimento. Se sacrificaron las ratas gestantes mediante exposición a CO₂ el día gestacional decimocuarto (es decir, E14); se lavó la región abdominal con EtOH al 70%, se llevó a cabo una laparatomía y se recogieron los fetos y se agruparon en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) fría, pH 7,4, sin Ca²⁺ ni Mg²⁺. A continuación, se extirpó el cerebro intacto, se realizó un corte entre el diencefalon y el mesencéfalo, y se cortó el tectum medialmente y se extendió lateralmente. Se aisló el bloque de tejido de 1,0 mm³ medial ventral que comprendía la región dopaminérgica mesencefálica. Los bloques de tejido diseccionados se agruparon en medio oxigenado frío (4°C). El tejido se trituró sin digestión previa. Alternativamente, las células se incubaron en medio de crecimiento L-15 que contenía papaína (Sigma Chemical Co.), 10 U/ml, a 37°C

durante 15 minutos, se lavaron (3x2 ml) con medio y se trituraron utilizando únicamente la aguja y la jeringa. Las células dispersadas se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 ml (1,0 ml/tubo) y se centrifugaron a ~600 g durante 2 minutos. La utilización de velocidades de centrifugación más altas durante periodos más largos resulta en la contaminación de los cultivos con residuos y, como resultado, en un crecimiento subóptimo de las células. Se aspiró cuidadosamente el medio y las células se resuspendieron en medio fresco y se realizó un recuento utilizando un hemocitómetro. Todos los procedimientos, desde la laparatomía hasta la siembra en placa, se completaron dentro de las 2 horas. En un experimento típico, una camada de 10 a 15 fetos rinde $1,0 \times 10^5$ células/feto, o entre $1,0 \times 10^6$ y $1,5 \times 10^6$ células/camada.

Cultivos de microislas mesencefálicas

Para preparar los cultivos de microislas mesencefálicas, se prepararon células tal como se ha indicado anteriormente, y se resuspendieron a una densidad final de $5,0 \times 10^5$ /ml. Se sembró una gota de 25 μ l de la suspensión ($1,25 \times 10^4$ células) utilizando una pipeta de 100 μ l sobre portaobjetos con cámara de 8 pocillos con poli-D-lisina (50 μ g/ml). El área de la gota era ~12,5 mm², para una densidad celular media final de $1,0 \times 10^5$ /cm². La gota se dispensó uniformemente, y se retiró la punta de pipeta verticalmente para evitar el manchado. El área ocupada por el cultivo de microisla permaneció uniforme durante toda la duración del cultivo. Los cultivos se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 5% de CO₂ a una humedad del 100%, para permitir que las células se enganchasen, y después se añadieron 375 μ l de medio de crecimiento a cada pocillo. Se cambió el medio tras las primeras 12 horas y posteriormente se cambió aproximadamente la mitad del medio cada dos días.

Ensayo de viabilidad celular

Se utilizó un kit de ensayo fluorescente de dos colores de viabilidad celular (kits de ensayo de vida/muerte viabilidad/citotoxicidad, nº L-3224, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) para identificar las células vivas y muertas antes de la siembra en placa y en cultivos. Las células vivas y muertas presentan fluorescencia verde y roja, respectivamente, proporcionando dos indicadores positivos de viabilidad. Se diluyeron homodímero de etidio y calceína-AM con DPBS, proporcionando concentraciones finales de 3,8 μ M y 2,0 μ M, respectivamente. Se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad celular antes de la siembra en placas. Se incubó una suspensión celular durante 15 minutos con un volumen igual de pigmento (típicamente 20 μ l) en portaobjetos de vidrio a temperatura ambiente en una cámara oscura húmeda, se cubrieron con cubreobjetos y después se examinaron con un microscopio de fluorescencia utilizando óptica FITC. La viabilidad celular inmediatamente antes de la siembra en placa era aproximadamente del 95%.

Medio de cultivo

El medio libre de suero estaba constituido por volúmenes iguales de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y F12 de Ham (Gibco, Grand Island, N.Y., 320 a 1.320 AJ), 1,0 mg/ml de fracción V de albúmina bovina (Sigma Chemical Co., A-4161), 0,1 μ g/ml de apo-transferrina (Sigma, T-7786), 5 μ g/ml de insulina (Sigma, I-1882), L-tirosina 30 nM (Sigma, T-0397), progesterona 20 mM (Sigma, P-6149), selenita sódica 30 nM (Sigma, S-5261), glutamina 4,5 mM (Gibco, 320-5039AF), 100 U/ml de penicilina y

100 µg/ml de estreptomicina (Gibco, P-100-1-91).

Preparación de medio condicionado a partir de la línea celular VMCL-1

5 Para preparar medio condicionado a partir de la línea celular VMCL-1, se sembraron en placa $2,0 \times 10^6$ células en una placa de cultivo no recubierta de 15 cm en 20 ml de medio de crecimiento que contenía 1,0% de FBS. A una confluencia de 80%, el medio se aspiró y las células se lavaron una vez con medio libre de suero. Se añadieron 20 ml de medio N2 libre de suero sin albúmina y se permitió que continuase el
10 condicionamiento durante 48 horas. Durante este tiempo, las células habitualmente se expandieron hasta una confluencia del 100%. Se aspiró el medio, se agrupó en tubos de 50 ml, se centrifugó (15.000 rpm durante 20 minutos) y posteriormente se agrupó en una botella de plástico de 1,0 l. Habitualmente 5 ml de cada lote de MC se esterilizó mediante filtración utilizando un filtro de 0,22 µm, se almacenó en alícuotas de 5 ml, a -70°C, y se
15 utilizó para determinar la potencia neurotrófica, antes de agruparse con la reserva más grande MC. En caso de desearse, puede prepararse MC de VMCL-1 en grandes cantidades utilizando técnicas de cultivo celular industriales estándares conocidos por el experto en la materia.

20 *Producción de medio condicionado para astrocitos de tipo 1*

 Se prepararon astrocitos de tipo 1 de la manera siguiente. Se diseccionó tallo cerebral fetal de rata E16 en DPBS frío y se transfirió la región mesencefálica a medio de cultivo de astrocitos (DMEM/F12 de Ham, 1:1, FBS al 15%, glutamina 4,0 mM, selenita
25 sódica 30 nM, penicilina y estreptomicina). Las células se dispersaron mediante trituración en 2 ml de medio fresco utilizando una aguja de calibre 18 incorporada en una jeringa. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm en una centrífuga, se resuspendieron en medio y se trituraron nuevamente. El sedimento celular final se dispersó y se sembró en placa a una densidad de 1×10^6 células/matraz de 75 cm² en
30 15 ml de medio. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono y 95% de aire durante 24 horas, y se extrajeron las células no enganchadas mediante aspiración. Las células se cultivaron durante nueve días adicionales y después los matraces se agitaron vigorosamente durante 16 horas para eliminar cualquier tipo celular contaminante. Las monocapas de astrocitos se lavaron tres veces con DPBS, se
35 tripsinizaron y se sembraron nuevamente en placa (densidad de 1×10^6 células/matraz). En este momento, se sembró una proporción reducida de las células en portaobjetos con cámara de ocho pocillos (Nunc Inc., Naperville, IL); estos cultivos paralelos se trataron tal como se ha descrito para los cultivos en matraz. Al alcanzar la confluencia, se sustituyó el medio por medio que contenía 7,5% de PBS y las células se incubaron durante 48 horas.
40 En el siguiente intercambio, se añadió medio libre de suero definido (DMEM/F-12 de Ham, 1:1, glutamina 4,0 mM, selenita sódica 30 nM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 U/ml) y las células se incubaron durante 48 horas adicionales. Se sustituyó el medio y, tras cinco días, se recolectó medio condicionado y se mezcló con leupeptina (10 mM; Bachem, Torrance, CA) y hidrocloreuro de fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo
45 (1,0 mM; ICN Biochemicals, Aurora, OH) para inhibir la proteólisis. En el momento de la recolección, las monocapas de astrocitos cultivadas sobre los portaobjetos con cámara se inmunotñieron con el fin de evaluar el fenotipo del cultivo.

Cultivo de células VMCL-1

Durante el cultivo de VMCL-1 y la preparación de MC de VMCL-1, se sembraron en placa 2,0x10⁶ células en una placa de cultivo no recubierta de 15 cm en 20 ml de medio de crecimiento que inicialmente contenía FBS al 10%. Al alcanzarse el 80% de confluencia, se aspiró el medio y las células se lavaron una vez con medio libre de suero. Habitualmente se añadieron 20 ml de medio libre de suero sin albúmina y se continuó el condicionamiento durante 48 horas. El medio N2 demostró resultar particularmente adecuado para la utilización en la recolección de medio condicionado. Durante dichas 48 horas, las células habitualmente se expandieron hasta el 100% de confluencia. Se aspiró el medio, se agrupó en tubos de 50 ml, se centrifugó (15.000 rpm, 20 minutos) y se agrupó en una botella de plástico de 1,0 l. Se esterilizaron aproximadamente 5 ml de cada lote de MC utilizando un filtro de 0,22 µm, se almacenaron en alícuotas de 0,5 ml, a -70°C, y se utilizaron para determinar la potencia neurotrófica, antes de agruparse con la reserva de mayor tamaño de MC. La línea celular VMCL-1 ya se ha subcultivado más de 50 veces.

Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica de MAP2 y de TH, los cultivos se lavaron (2x250 µl) con DPBS frío, se fijaron con formaldehído al 4% en PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron utilizando CH₃COOH al 1%/EtOH al 95% a -20°C, durante 5 minutos, y después se lavaron (3x250 µl) con PBS. Se bloqueó la unión no específica con albúmina de suero bovino al 1% en PBS (BSA-PBS) durante 15 minutos. Se aplicó en cada pocillo anticuerpo anti-TH (50 µl) (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) o anticuerpo anti-MAP2 (Boehringer-Mannheim) y los portaobjetos se incubaron en una cámara oscura húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. Se realizó la tinción de control utilizando suero de ratón a la misma dilución que el anticuerpo anti-TH. Tras el lavado (2x250 µl) con PBS, se aplicó anti-IgG de ratón-FITC (50 µl) y los portaobjetos se incubaron durante 1 hora adicional. Tras el lavado con PBS (2x250 µl), se aspiró el exceso de fluido, se extrajeron las paredes de las cámaras y se aplicó una única gota de medio de montaje VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA), seguido de un cubreobjetos de vidrio, que se selló con barniz de uñas. En algunos experimentos, se identificó TH utilizando anticuerpos secundarios biotinilados y se reveló el producto de reacción diaminobenzidina (DAB) potenciado con níquel utilizando el complejo de peroxidasa biotinilada-avidina (kit ABC, Vector Laboratories).

Para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, Boehringer-Mannheim, nº 814369), se realizó la fijación y permeabilización en una etapa utilizando CH₃COOH al 5%/C₂H₅OH al 95% a -20°C. Los procedimientos siguientes fueron los mismos que aquellos utilizados para visualizar la TH. Para A2B5 y O4, los cultivos se lavaron con DPBS frío (2x250 µl) y se bloquearon con BSA al 1%-PBS durante 10 minutos. Se aplicó el anticuerpo de A2B5 (50 µl) en cada pocillo, y se incubó durante 1 hora. Tras lavar con DPBS (2x250 µl), se aplicó el anticuerpo secundario, anti-IgM-FITC, durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron con DPBS (2x250 l). Para el contrateñido de los núcleos celulares, las células se incubaron con 0,5 µg/ml de pigmento de ácidos nucleicos H33258 (Hoechst, Kansas City, MO) en bicarbonato sódico 10 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente, y después se enjuagó en PBS durante 2x10 minutos. Tras un lavado final con DPBS frío (2x250 µl), se montaron tal como se ha indicado anteriormente.

Análisis de RT-PCR

Se extrajo el ARN total de tejido mesencefálico ventral E13 ó E14 de rata o a partir de 1×10^9 astrocitos o a partir de 1×10^9 células VMCL-1 utilizando reactivo RNA-STAT (TelTest, University of Maryland, Baltimore, MD). Se generó ADNc de primera cadena a partir del ARN y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando los procedimientos del fabricante.

Los productos de reacción se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar el tamaño y abundancia relativa de los fragmentos. Los resultados de la PCR para la β -actina y la GAPDH se incluyeron como controles con el fin de confirmar la carga equivalente de ADNc.

Análisis cromosómico

Las células se cultivaron en medio DMEM/F-12 1:1 suplementado con FBS al 2,5%, D-glucosa (2,5 g/l) y suplemento ITS, diluido 1:100. Veinticuatro horas después, se detuvieron subcultivos en metafase utilizando colchicina (10 μ g/ml). Las células se tripsinizaron y se sometieron a choque hipotónico (KCl 75 mM). A continuación, las células se fijaron en tres cambios de MeOH/CH₃COOH, 3:1, y se secaron al aire. A continuación, las células se tiñeron utilizando Giemsa al 4%, y se examinaron microscópicamente.

Depósito

El solicitante realizó un depósito de por lo menos 25 viales que contenían la línea celular VMCL-1 en la American Type Culture Collection, Manassas VA, 20110 U.S.A., nº de depósito ATCC PTA-2479. Las células se depositaron en la ATCC el 18 de septiembre de 2000.

Otras formas de realización

Diversas modificaciones y variaciones del procedimiento y del sistema descritos de la invención resultarán evidentes para el experto en la materia. Aunque la invención ha sido descrita haciendo referencia a las formas de realización preferidas específicas, diversas modificaciones de los modos descritos para poner en práctica la invención están comprendidas según las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición constituida por lo menos por 60% en peso de un polipéptido factor neurotrófico derivado de astrocitos maduros (MANF), que está constituido por la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4, o una secuencia que es idéntica por lo menos 90% a la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4.
- 10 2. Polinucleótido sustancialmente purificado codificante de un polipéptido MANF, en el que dicho polipéptido MANF está constituido por la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4, o una secuencia que es idéntica por lo menos 90% a la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1 para la utilización como medicamento.
- 20 4. Composición farmacéutica que comprende: (i) una composición según la reivindicación 1, e (ii) un portador que resulta farmacéuticamente aceptable para la administración al sistema nervioso central.
- 25 5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, que comprende además una célula neural.
- 30 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que dicha célula neural es una neurona, una célula madre neural o una célula precursora neuronal.
- 35 7. Procedimiento *in vitro* para incrementar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, comprendiendo dicho procedimiento la etapa que consiste en poner en contacto dichas neuronas dopaminérgicas con una cantidad estimulante de la supervivencia de una composición según la reivindicación 1.
- 40 8. Procedimiento *in vitro* para el crecimiento de neuronas dopaminérgicas para trasplante, comprendiendo dicho procedimiento la etapa que consiste en cultivar dichas neuronas, o las células progenitoras de las mismas, con una cantidad estimulante de la supervivencia de una composición según la reivindicación 1.
- 45 9. Vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de un polipéptido MANF, en el que dicho polipéptido MANF está constituido por la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4, o de una secuencia que es idéntica por lo menos 90% a la secuencia de SEC ID nº 3 ó 4.
10. Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que dicho vector es un

vector adenovírico o vector retrovírico.

5 11. Procedimiento para determinar si un compuesto candidato modula la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica mediada por MANF, que incluye:

(a) proporcionar una composición según la reivindicación 1;

10 (b) poner en contacto dicha composición con el compuesto candidato; y

(c) medir la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de MANF, en el que la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de MANF alterada respecto a la de dicho polipéptido MANF no puesto en contacto con el compuesto indica que el compuesto modula la actividad estimulante de la supervivencia neuronal dopaminérgica de MANF.

20 12. Procedimiento para determinar si un compuesto candidato resulta útil para reducir la neurodegeneración, incluyendo el procedimiento las etapas siguientes:

(a) proporcionar una composición según la reivindicación 1;

(b) poner en contacto dicha composición con el compuesto candidato; y

25 (c) medir la unión del polipéptido MANF, en el que la unión del polipéptido MANF indica que el compuesto candidato resulta útil para reducir la neurodegeneración.

30 13. Utilización de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o trastorno del sistema nervioso o a la prevención de la muerte celular neuronal dopaminérgica en un mamífero.

35 14. Utilización según la reivindicación 13, en la que dicha enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

40 15. Utilización de una composición según la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para la administración en un mamífero, habiendo dicho mamífero previamente presentado células trasplantadas en su sistema nervioso, en la que dicha composición farmacéutica se ha concebido para administrarse a dicho mamífero en una ventana de tiempo de cuatro horas antes de dicho trasplante de dichas células a cuatro horas después de dicho trasplante de dichas células.

45 16. Utilización según la reivindicación 15, en la que dicha ventana de tiempo es de dos horas antes de dicho trasplante de dichas células a dos horas después de dicho trasplante de dichas células.

17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que dicho mamífero es un humano.

5

18. Composición según la reivindicación 1 para el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad o trastorno del sistema nervioso o para la prevención de la muerte celular neuronal dopaminérgica en un mamífero.

10

19. Composición según la reivindicación 18, en la que dicha enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

15

20. Composición según la reivindicación 1 para la administración a un mamífero, habiendo dicho mamífero previamente presentado células trasplantadas en su sistema nervioso, en la que dicha composición farmacéutica se ha concebido para administrarse a dicho mamífero en una ventana de tiempo de cuatro horas antes de dicho trasplante de dichas células a cuatro horas después de dicho trasplante de dichas células.

20

21. Composición según la reivindicación 20, en la que dicha ventana de tiempo es de dos horas antes de dicho trasplante de dichas células a dos horas después de dicho trasplante de dichas células.

25

22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en la que dicho mamífero es un humano.

30

FIG. 1A

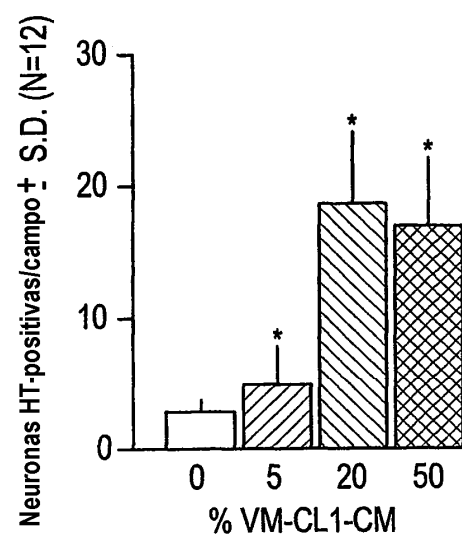


FIG. 1B

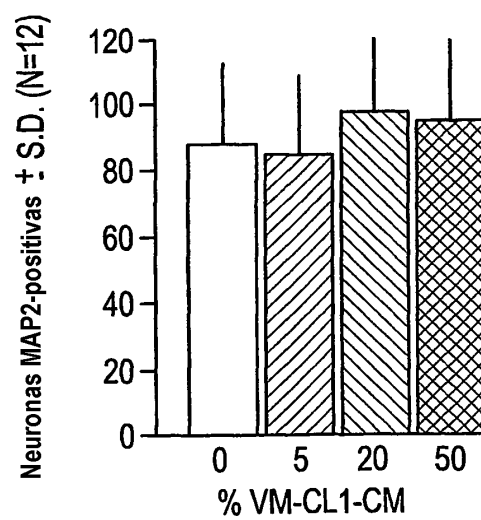


Fig. 2

MGKWHVGGRR GAPRQWGATA RGRDLEAVRR GGCGSVGRRR QRRRRRRRRM
RRMRRMWATQ GLAVALALSV LPGSRALRPG DCEVCISYLG RFYQDLKDRD
VTFSPATIEN ELIKFCREAR GKENRLCYII GATDDAATKI INEVSKPLAH
HIPVEKICEK LKKKDSQICE LKYDKQIDLS TVDLKKLRVK ELKKILDDWG
ETCKGCAEKS DYIRKINELM PKYAPKAASA PTDL (SEC ID NO: 1)

MWATQGLAVA LALSVLPGSR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP
ATIENELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE
KICEKLKKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG
CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASAPTDL (SEC ID NO: 2)

LRPGDCEVCI SYLGRFYQDL KDRDVTTFSPA TIENELIKFC REARGKENRL
CYIIGATDDA ATKIINEVSK PLAHHIPVEK ICEKLKKKDS QICELKYDKQ
IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGETCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK
AASAPTDL (SEC ID NO: 3)

MLRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP ATIENELIKF CREARGKENR
LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE KICEKLKKKD SQICELKYDK
QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG CAEKSDYIRK INELMPKYAP
KAASAPTDL (SEC ID NO: 4)

Fig. 3

MWATRGLAVA LALSVLPDSR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP
ATIEEELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE
KICEKLKKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGEMCKG
CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASARTDL (SEC ID NO: 5)

LRPGDCEVCI SYLGRFYQDL KDRDVTTFSPA TIEEELIKFC REARGKENRL
CYYIGATDDA ATKIINEVSK PLAHHIPVEK ICEKLKKKDS QICELKYDKQ
IDLSTVDLKK LRVKELKKIL DDWGEMCKGC AEKSDYIRKI NELMPKYAPK
AASARTDL (SEC ID NO: 6)

MLRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP ATIEEELIKF CREARGKENR
LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE KICEKLKKKD SQICELKYDK
QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGEMCKG CAEKSDYIRK INELMPKYAP
KAASARTDL (SEC ID NO: 7)

Fig. 4

```

atggggaagt ggcatgtggg agggcgccgg ggggcccccc gccaatgggg
agctacggcg cgcggccggg acttgagggc ggtgcggcgc ggcgggtgcg
gttcagtcgg tcggcgccgg cagcggagga ggaggaggag gaggaggatg
aggaggatga ggaggatgtg ggccacgcag gggctggcgg tggcgtggc
tctgagcgtg ctgccgggca gccgggcgct gcggccgggc gactgcgaag
tttgtatttc ttatctggga agattttacc aggacctcaa agacagagat
gtcacattct caccagccac tattgaaaac gaacttataa agttctgccg
ggaagcaaga ggcaaagaga atcggttgtg ctactatatc ggggccacag
atgatgcagc caccaaaatc atcaatgagg tatcaaagcc tctggccac
cacatccctg tggagaagat ctgtgagaag cttaagaaga aggacagcca
gatatgtgag cttaagtatg acaagcagat cgacctgagc acagtggacc
tgaagaagct ccgagttaaa gagctgaaga agattctgga tgactggggg
gagacatgca aaggctgtgc agaaaagtct gactacatcc ggaagataaa
tgaactgatg cctaaatatg cccccaaggc agccagtgca ccgaccgatt tgtag
(SEC ID NO: 8)

```

```

atgtgggcca cgcaggggct ggcgggtggcg ctggctctga gcgtgctgcc
gggcagccgg gcgctgcggc cgggcgactg cgaagtttgt atttcttacc
tggaagatt ttaccaggac ctcaaagaca gagatgtcac attctcacca
gccactattg aaaacgaact tataaagttc tgccgggaag caagaggcaa
agagaatcgg ttgtgctact atatcggggc cacagatgat gcagccacca
aaatcatcaa tgaggtatca aagcctctgg cccaccacat ccctgtggag
aagatctgtg agaagcttaa gaagaaggac agccagatat gtgagcttaa
gtatgacaag cagatcgacc tgagcacagt ggacctgaag aagctccgag
ttaaagagct gaagaagatt ctggatgact ggggggagac atgcaaaggc
tgtgcagaaa agtctgacta catccggaag ataaatgaac tgatgcctaa
atatgcccc aaggcagcca gtgcaccgac cgatttgtag
(SEC ID NO: 9)

```

```

atgctgcggc cgggcgactg cgaagtttgt atttcttacc tggaagatt
ttaccaggac ctcaaagaca gagatgtcac attctcacca gccactattg
aaaacgaact tataaagttc tgccgggaag caagaggcaa agagaatcgg
ttgtgctact atatcggggc cacagatgat gcagccacca aaatcatcaa
tgaggtatca aagcctctgg cccaccacat ccctgtggag aagatctgtg
agaagcttaa gaagaaggac agccagatat gtgagcttaa gtatgacaag
cagatcgacc tgagcacagt ggacctgaag aagctccgag ttaaagagct
gaagaagatt ctggatgact ggggggagac atgcaaaggc tgtgcagaaa
agtctgacta catccggaag ataaatgaac tgatgcctaa atatgcccc
aaggcagcca gtgcaccgac cgatttgtag
(SEC ID NO: 10)

```

Fig. 5

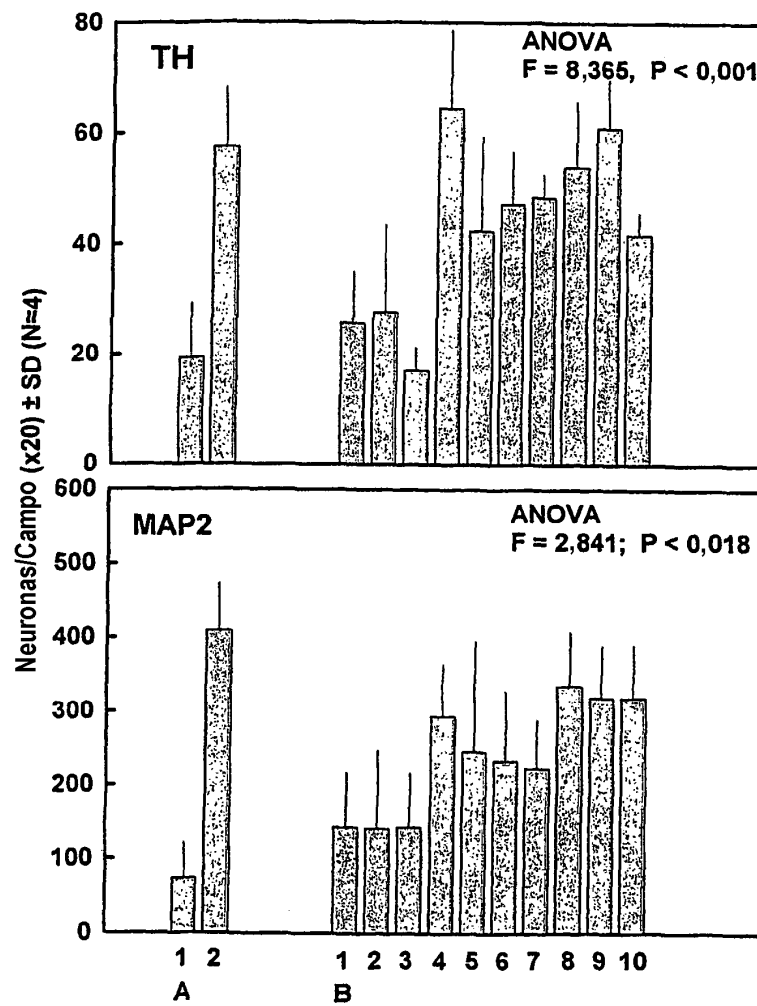


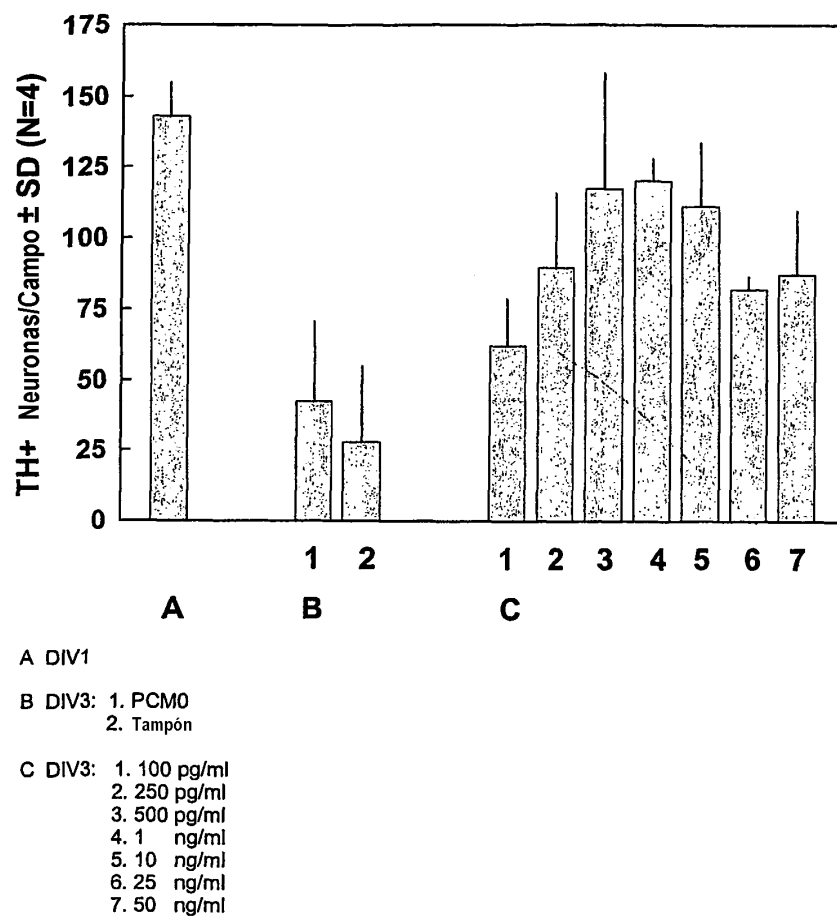
Fig. 6

Fig. 7

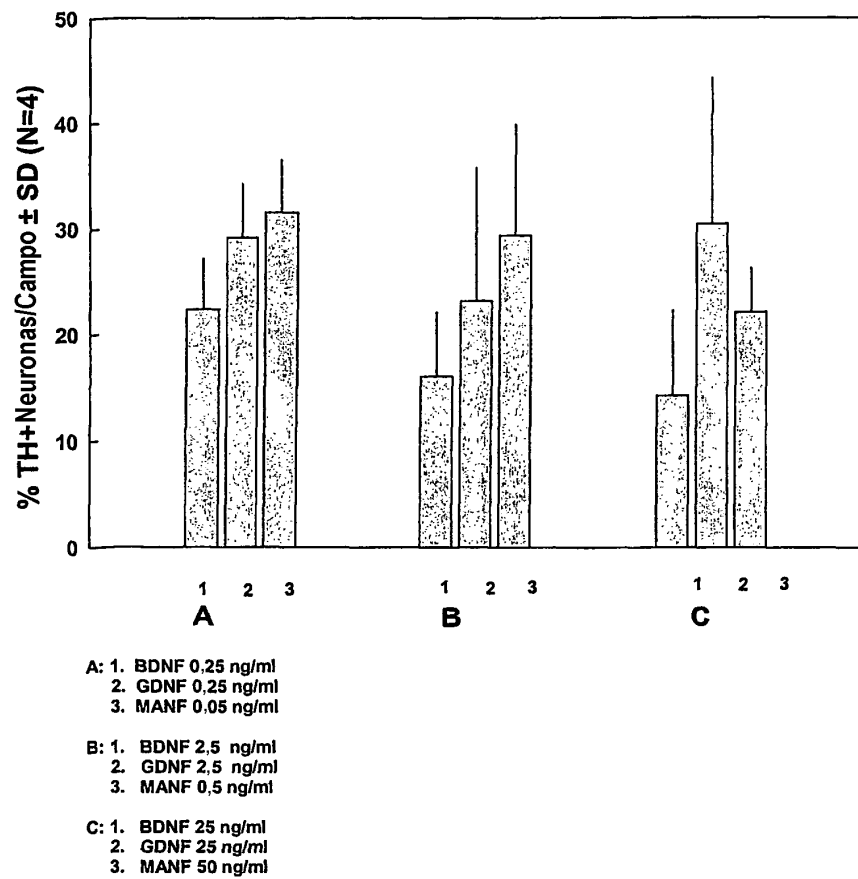
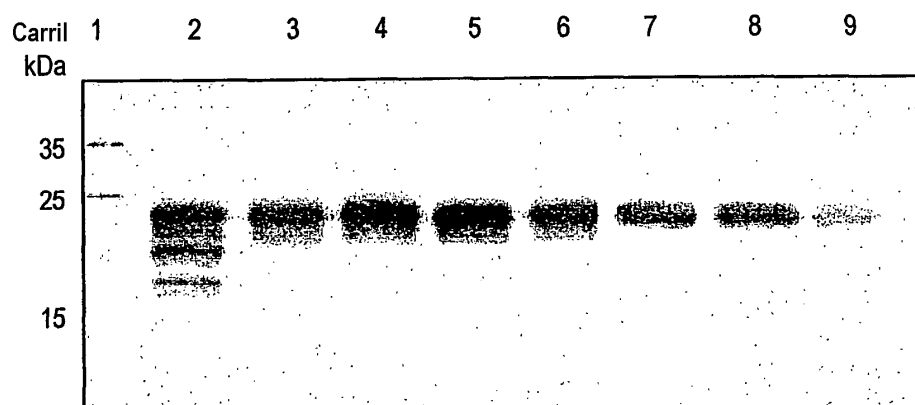
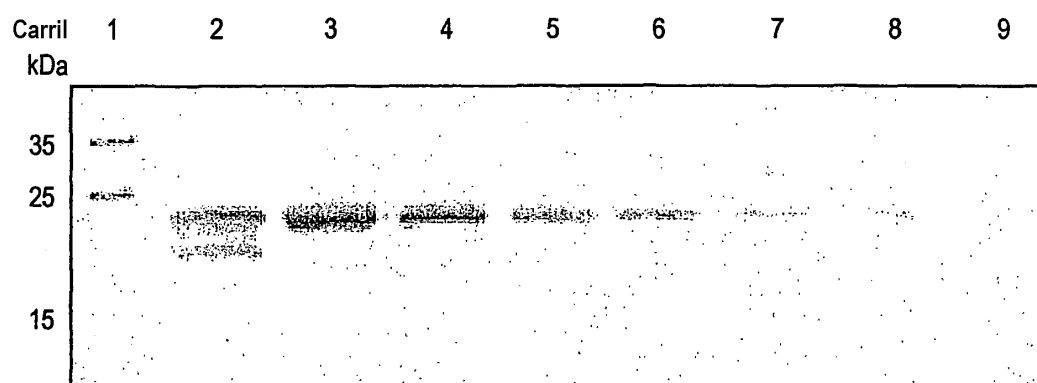


FIG. 8



Carril 1 Marcador
Carril 2 PRE-MANF
Carril 3 1:100
Carril 4 1:200
Carril 5 1:800
Carril 6 1:1600
Carril 7 1:3200
Carril 8 1:6400
Carril 9 1:12800

FIG. 9



Carril 1 Marcador
 Carril 2 PRE-MANF
 Carril 3 1000 ng
 Carril 4 500 ng
 Carril 5 250 ng
 Carril 6 125 ng
 Carril 7 62,5 ng
 Carril 8 32,3 ng
 Carril 9 15,6 ng

FIG. 10A

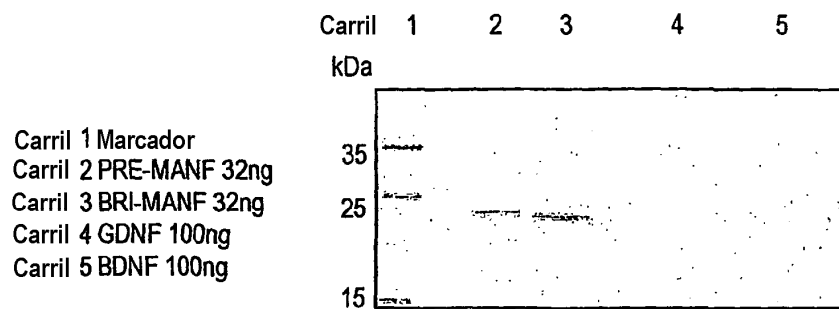


FIG. 10B

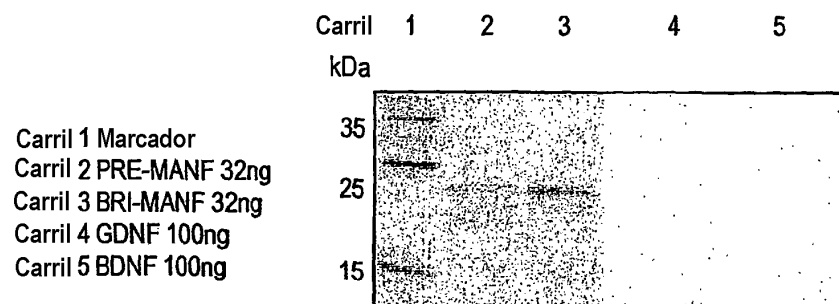


FIG. 10C

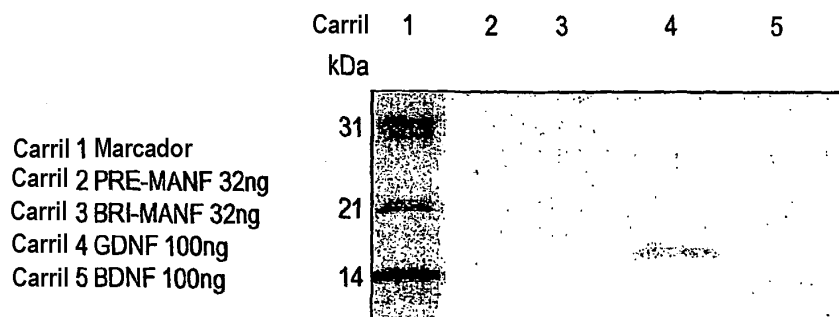


Fig. 11A

pro-MANF bovino

MWATHGLAVA LALSVLPASR ALRQGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP ASIEKELIKF
CREARGKENR LCYYIGATED AATKIINEVS KPLSHHIPVE KICEKLKKKD SQICELKYDK
QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASSRTDL
(SEC ID NO: 14)

Fig. 11B

pro-MANF porcino

MWFTHGLAVA LALSVLPASR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTTFSP ASIEKELTKF
CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE KICEKLMKKD SQICELKYDK
QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCXG CAEKSDYIRK INELMPXYAP KAASSRTDL
(SEC ID NO: 15)