



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 595**

51 Int. Cl.:

C12N 15/18 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98907407 .5**

96 Fecha de presentación : **06.02.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0966533**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.1999**

54 Título: **Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad III (ADNF III).**

30 Prioridad: **07.02.1997 US 37404**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.01.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.01.2010

73 Titular/es: **The Government of the United States of America as represented by The Secretary of the Department of Health and Human Services Bethesda, Maryland 20892, US Ramot at Tel-Aviv University Ltd.**

72 Inventor/es: **Gozes, Ilana; Brenneman, Douglas, E. y Bassan, Merav**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 331 595 T3

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

DESCRIPCIÓN

Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad III (ADNF III).

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad III (ADNF III), también conocido como Proteína Neuroprotectora Dependiente de Actividad (ADNP). Más particularmente, la presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ADNF III; los polipéptidos de ADNF
10 III codificados por tales secuencias de ácidos nucleico; anticuerpos para polipéptidos de ADNF III y el uso de tales polipéptidos de ADNF III para el tratamiento de deficiencias neurológicas y para la prevención de muerte celular asociada con (1) gp120, la proteína de envuelta de VIH; (2) ácido *N*-metil-D-aspartico (excito-toxicidad); (3) tetrodo-
toxina (bloqueo de actividad eléctrica) y (4) péptido β -amiloide, una sustancia relacionada con degeneración neuronal en enfermedad de Alzheimer.

15 **Antecedentes de la invención**

La división, supervivencia y diferenciación neuronal dependen durante el desarrollo de un diverso grupo de proteínas y factores de crecimiento peptídico. En este grupo de moléculas reguladoras se incluyen factores tróficos reconocidos, tales como factor de crecimiento nervioso (NGF) (Levi-Montalcini, *Differentiation*, 13: 51-53 (1979)), factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Lin y col., *Science* 24: 1023-1025 (1989)), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Wallicke y col., *J. Neurosci.* 11: 2249-2258 (1991)), factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2 (IGF 1 y 2) (Ishii y col., *Pharmacol. & Ther.* 62: 125-144 (1994)), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Laibrock y col., *Nature* 341: 149-152 (1989)), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) (Lin y col., *Science* 260: 1130-1132
25 (1993)) y neutrofina-3 y neutrofina-4/5 (Henderson y col., *Nature* 363: 266-269 (1993)). Además, las citoquinas también tienen propiedades neurotróficas (Brenneman y col., *J. Neurochem.* 58: 454-460 (1992); Patterson, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 91-97 (1992)). Aunque muchos de los factores de crecimiento clásicos en primer lugar se reconoció que jugaban papeles tróficos importantes en las interacciones neurona/célula diana, actualmente está claro que las células gliales en el sistema nervioso central (SNC) expresan la mayoría de estos factores de crecimiento/citoquinas y que estas células de soporte juegan papeles significativos durante el desarrollo y la reparación/regeneración nerviosa.

Con respecto a esto, se han realizado esfuerzos para apreciar el papel de neuropéptidos en la regulación de la liberación/expresión de sustancias tróficas derivadas de la glía y para identificar nuevas moléculas gliales que contribuyen a la supervivencia de neuronas del SNC en desarrollo. En particular, se han realizado esfuerzos para apreciar el papel
35 del soporte trófico para neuronas dependientes de actividad en el SNC. Las neuronas dependientes de actividad son una clase de neuronas que mueren durante el bloqueo eléctrico debido a una reducción de materiales tróficos solubles en su entorno (Brenneman y col., *Dev. Brain Res.* 9: 13-27 (1993); Brenneman y col., *Dev. Brain Res.* 15: 211-217 (1984)). Se ha demostrado que el bloqueo eléctrico inhibe la síntesis y liberación de materiales tróficos en el medio extracelular de cultivos de SNC (Agostan y col., *Mol. Brain Res.* 10: 235-240 (1991); Brenneman y col., *Peptides* 6
40 (2): 35-39 (1985)). En esta mezcla trófica se incluye péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Brenneman y col., *Peptides*, mencionado anteriormente (1985); Brenneman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 83: 1159-1162 (1986)).

El péptido de 28 aminoácidos VIP, aislado originalmente por Said (Said y col. *Ann. NY Acad. Sci.* 527: 1-691 (1988)), se ha asociado con protección celular en neuronas sensoriales, neuronas simpáticas axotomizadas y pulmones y vías respiratorias con lesión aguda (véase, por ejemplo, Gressens y col., *J. Clin. Invest.* 100: 390-397 (1997)). De hecho, la carencia de regulación de expresión de VIP observada en estos sistemas lesionados o inflamados probablemente representa una respuesta adaptativa que limita el daño y promueve la recuperación.

Se ha demostrado que VIP interacciona con receptores de alta afinidad presentes en las células gliales (Gozes y col., *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 257: 959-966 (1991)), dando como resultado la liberación de sustancias promotoras de la supervivencia (Brenneman y col., *J. Cell. Biol.* 104: 1603-1610 (1987); Brenneman y col., *J. Neurosci. Res.* 25: 386-394 (1990), entre las cuales se encuentra una citoquina derivada de la glía IL-1- α (Brenneman y col., *J. Neurochem.* 58: 454-460 (1992); Brenneman y col., *Int. J. Dev. Neurosci.* 13: 137-200 (1995)) y proteasa nexina I, un inhibidor de serina proteasa (Festoff y col., *J. Neurobiol.* 30: 255-26 (1995)). Sin embargo, los efectos promotores de la supervivencia neuronal del medio acondicionado con VIP se observaron en concentraciones muy bajas que podrían no atribuirse a IL-1 o proteasa nexina I liberada de la astrogliá. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para identificar otras proteínas promotoras de la supervivencia liberadas a partir de células gliales estimuladas mediante VIP.

Al hacer esto, se ha descubierto una proteína neuroprotectora novedosa secretada por la astrogliá en presencia de VIP (Brenneman & Gozes, *J. Clin. Invest.* 97: 2299-2307 (1996); Gozes y Brenneman, *J. Molec. Neurosci.* 7: 235-244 (1996)). La proteína neurotrófica se aisló mediante procedimientos cromatográficos secuenciales que combinan intercambio de iones, separación por tamaño e integración hidrófoba. Esta proteína neuroprotectora (masa molar, 14 kD y pl, 8,3 $\pm$ 0,25) se denominó factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF o ADNF I) por dos razones: (1) era necesario un bloqueo de actividad eléctrica espontánea para detectar la acción neuroprotectora de esta sustancia en cultivos de médula espinal disociados; y (2) VIP, un secretagogo para ADNF, se liberaba durante la actividad eléctrica, haciendo que la presencia de ADNF en el medio extracelular dependiera indirectamente de actividad espontánea. Se observó que ADNF mostraba neuroprotección en concentraciones sin precedentes. Más particularmente, se observó que concentraciones femtomolares de ADNF protegían a las neuronas de muerte asociada con una amplia variedad

de toxinas, incluyendo las relacionadas con enfermedad de Alzheimer, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), excitotoxicidad y bloqueo eléctrico (véase, por ejemplo, Gozes y col., Dev. Brain Res. 99: 167-175 (1997)).

A lo largo de estudios dirigidos a las características estructurales de ADNF, se descubrió un fragmento peptídico activo de ADNF. Este péptido activo, 9 aminoácidos obtenidos de ADNF (ADNF-9), se observó que tenían homología marcada, pero no identidad, con una proteína de estrés intracelular: proteína de choque térmico 60 (hsp60). Además, se demostró que ADNF-14 imitaba la potencia de la proteína precursora, mientras que mostraba un intervalo más amplio de concentraciones eficaces en comparación con la proteína precursora. Además, ADNF-14, similar a ADNF, ha demostrado evitar la muerte de células neuronales asociada con la proteína de envuelta (gp120) de VIH (véase Dibern y col., J. Clin. Invest. 99: 2837-2841 (1997)), con excitotoxicidad (*N*-metil-D-aspartato), con el péptido β -amiloide (citotoxina putativa en enfermedad de Alzheimer) y con tetrodotoxina (bloqueo eléctrico) (véase Breneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996)).

El descubrimiento de ADNF ha proporcionado conocimiento adicional con respecto a la acción neuroprotectora de VIP (Gozes & Breneman, Mol. Neurobiol. 3: 201-236 (1989), Said, J. Clin Invest. 97: 2163-2164 (1996)). Además, las propiedades neurotróficas del polipéptido de ADNF tienen implicaciones terapéuticas y de diagnóstico significativas. Se prevé que el descubrimiento de que un péptido de 14 aminoácidos puede imitar la actividad de ADNF facilite el diseño de fármaco innovador para el tratamiento de síntomas neurológicos asociados con infección de VIH, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas frecuentes. Aunque ADNF y ADNF-14 tienen potencial ilimitado como neuroprotectores, todavía sería provechoso identificar otras proteínas promotoras de la supervivencia liberadas a partir de células gliales estimuladas por VIP.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de ADNF III que evita la muerte de células neuronales, en el que dicho ácido nucleico aislado hibrida específicamente, en condiciones rigurosas, a un gen de ADNF III en presencia de una biblioteca genómica humana, teniendo dicho gen de ADNF III una secuencia de ácido nucleico que comprende SEC ID N°: 2.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de ADNF III que evita la muerte de células neuronales, en el que el ácido nucleico se amplifica mediante cebadores que hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a la misma secuencia que un conjunto de cebadores que comprende cebadores seleccionados entre el grupo constituido por:

sentido 5' TCCAATGTTACCTGCAG 3' (SEC ID N°: 7)

35 sentido 5' ACCTGCAGCAAAACAATAT 3' (SEC ID N°: 9) y

antisentido 5' GCTCGTTACAGATTGTAC 3' (SEC ID N°: 8).

40 También se proporciona un polipéptido de ADNF III aislado que evita la muerte de células neuronales, dicho ADNF III codificado por un ácido nucleico de la presente invención.

Además, también se proporciona un polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III, comprendiendo dicho polipéptido la siguiente secuencia de aminoácidos:

(R¹)_x-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-(R²)_y (SEC ID N°: 10),

en el que:

50 R¹ es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos en el que cada aminoácido se selecciona independientemente;

55 R² es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos donde cada aminoácido se selecciona independientemente; y

x e y se seleccionan independientemente y son iguales a cero o uno.

60 También se proporciona el uso de los polipéptidos de ADNF III de la presente invención en terapia. En particular, el uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y la prevención de muerte neuronal en un paciente infectado con virus de inmunodeficiencia humana.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el polipéptido de ADNF III de la presente invención.

65 La presente invención se refiere al descubrimiento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido neuroprotector novedoso, es decir, Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad III (ADNF III), también denominado Proteína Neuroprotectora Dependiente de Actividad (ADNP). Al igual que el ADNF I descrito previamente, ADNF III mues-

tra efectos neuroprotectores potentes, estando la CE_{50} de tales efectos neuroprotectores en el intervalo femtomolar. Basándose en la homología reconocida entre ADNF I y hsp60, una proteína de choque térmico y PIF1, una proteína reparadora de ADN, se utilizaron estos dos epítopes para preparar anticuerpos que, a su vez, se usaron para seleccionar una biblioteca de expresión de ADNc de ratón para identificar el polipéptido neuroprotector nuevo de ADNF III. El ADNc de ADNF III de ratón está constituido por aproximadamente 2418 pares de bases de un marco de lectura abierta, que codifica un polipéptido de ADNF III de aproximadamente 806 aminoácidos, pl. 5,85. También se ha clonado ADNF III humano. Basándose en la homología entre el ADNF I y hsp60 con ADNF III, se ha sintetizado un polipéptido de ocho ADNF III que mostraba homología estructural con hsp60 y con el péptido activo obtenido de ADNF descrito previamente SALLRSIPA (SEC ID N°: 5). Este polipéptido de ADNF III tiene una longitud de 8 aminoácidos y tiene la secuencia NAPVSIPQ, es decir, Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEC ID N°: 6). Tanto los polipéptidos de ADNF III “expresados” (de longitud completa) como los polipéptidos de ADNF III obtenidos de NAPVSIPQ de la presente invención son extraordinariamente poderosos para evitar la muerte celular neural. Se ha observado que tales polipéptidos de ADNF III muestran neuroprotección frente a neurotoxinas asociadas con infección por VIH, bloqueo eléctrico, excitotoxicidad y enfermedad de Alzheimer.

Como tal, en una realización, la presente invención proporciona ácidos nucleico aislados que codifican los polipéptidos de ADNF III de la presente invención, los polipéptidos de ADNF III incluyendo, por ejemplo, los que se unen específicamente a anticuerpos generados frente a inmunógenos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3. Los polipéptidos de ADNF III de la presente invención también incluyen los que tienen secuencia de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3. Los ácidos nucleicos ejemplares incluyen los expuestos en SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Otros ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de ADNF III de la presente invención incluyen los que tienen sustituciones silentes de codón con relación a SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que hibridan específicamente, en condiciones rigurosas, a los ácidos nucleicos ejemplares, es decir, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Por ejemplo, un ácido nucleico complementario a una secuencia proporcionada por SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 hibrida específicamente a SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, respectivamente. De forma similar, los ácidos nucleicos que tienen subsecuencia sustancial complementaria a SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4 también hibridan específicamente a SEC ID N°: 2 o SEC ID N°: 4, respectivamente. Otros ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de ADNF III de la presente invención incluyen los que se amplifican mediante cebadores que hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a la misma secuencia que un conjunto de cebadores seleccionado entre el grupo constituido por: sentido 5' TCCAATGTTACCTGCAG 3' (SEC ID N°: 7), sentido 5' ACCTGCAGCAAAACAACACTAT 3' (SEC ID N°: 9) y antisentido 5' GCTCGTTACAGATTGTAC 3' (SEC ID N°: 8).

En una realización preferida en el presente documento, los ácidos nucleicos aislados de la presente invención son opcionalmente ácidos nucleicos de vector, que comprenden un casete de transcripción. Más particularmente, los vectores incluyen preferiblemente los ácidos nucleicos descritos anteriormente unidos operativamente a (bajo el control de) un promotor; ya sea constitutivo o inducible. El vector también puede incluir codones de inicio y de terminación. El casete de transcripción opcionalmente codifica un polipéptido. Típicamente, la parte del casete de transcripción que codifica el polipéptido hibrida específicamente, en condiciones rigurosas, a un ácido nucleico seleccionado entre el grupo constituido por SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Tras la transducción del casete de transcripción en una célula, se produce un ARNm que hibrida específicamente, en condiciones rigurosas, a un ácido nucleico seleccionado entre el grupo constituido por SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. El ARNm se traduce en la célula en un polipéptido de ADNF III, tal como los polipéptidos de ADNF III que comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas.

En otra realización, la presente invención proporciona polipéptidos de ADNF III. Tales polipéptidos de ADNF III incluyen los codificados por ácidos nucleicos que hibridan específicamente, en condiciones rigurosas, a SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Tales polipéptidos de ADNF III también incluyen los que se unen específicamente a un anticuerpo generado frente a un inmunógeno que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2.

Los polipéptidos de ADNF III ejemplares incluyen polipéptidos de ADNF III que tienen las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3.

En otra realización, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos:



En la fórmula anterior, R^1 es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos, donde cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo constituido por aminoácidos de origen natural. La expresión “se selecciona independientemente” se usa en el presente documento para indicar que los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^1 pueden ser idénticos o diferentes (por ejemplo, todos los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos pueden ser treonina, etc.). Además, como se ha explicado previamente, los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^1 pueden ser aminoácidos de origen natural. Los aminoá-

cidos adecuados que se pueden usar para formar la secuencia de aminoácidos R^1 incluyen, pero sin limitación, los que se enumeran en la Tabla I, mencionada anteriormente. Los índices “x” e “y” se seleccionan independientemente y pueden ser iguales a uno o cero.

- 5 Como con R^1 , R^2 , en la fórmula anterior, es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos, en la que cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo constituido por aminoácidos de origen natural.

- 10 Además, como con R^1 , los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^2 pueden ser idénticos o diferentes y pueden ser cualquiera de los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos adecuados que se pueden usar para formar R^2 incluyen, pero sin limitación, los que se enumeran en la Tabla I, mencionada anteriormente.

- 15 En una realización adicional, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de ADNF III. En una realización preferida, los anticuerpos se unen específicamente a un polipéptido de ADNF III, teniendo el polipéptido de ADNF III una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas.

- 20 Sorprendentemente, se ha descubierto que el polipéptido de ADNF III de la presente invención se puede usar para el tratamiento de deficiencias neurológicas y para la prevención de muerte de células neuronales. Tales polipéptidos de ADNF III se pueden usar, por ejemplo, para evitar la muerte de células neuronales incluyendo, pero sin limitación, neuronas de la médula espinal, neuronas del hipocampo, neuronas cerebrales y neuronas colinérgicas. Más particularmente, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden usar para evitar la muerte celular asociada con (1) gp120, la proteína de envuelta de VIH; (2) ácido *N*-metil-D-aspartico (excito-toxicidad); (3) tetrodotoxina (bloqueo de actividad eléctrica); y (4) péptido β -amiloide, una sustancia relacionada con degeneración neuronal en enfermedad de Alzheimer.

- 30 Como tal, la presente divulgación proporciona procedimientos para evitar muerte de células neuronales. Más particularmente, en un aspecto, se proporcionan procedimientos para usar los polipéptidos de ADNF III de la presente invención para evitar muerte de células neuronales inducida por gp120 en un paciente infectado con VIH. En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para usar los polipéptidos de ADNF III de la presente invención para evitar muerte de células neuronales asociada con excito-toxicidad inducida por estimulación con *N*-metil-D-aspartato. En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para usar los polipéptidos de ADNF III de la presente invención para evitar muerte de células neuronales inducida por el péptido β -amiloide en un paciente aquejado o afectado con enfermedad de Alzheimer. En otro aspecto, se proporcionan procedimientos para usar los polipéptidos de ADNF III de la presente invención para aliviar el deterioro del aprendizaje producido por el bloqueo colinérgico en un paciente afectado o aquejado con enfermedad de Alzheimer.

- 40 Otras características, objetos y ventajas de la invención y sus realizaciones preferidas se harán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 45 La Figura 1 ilustra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de ADNF III de ratón. La secuencia de ácido nucleico contiene 2418 pares de bases de marco de lectura abierto. El polipéptido de ADNF III está constituido por 806 aminoácidos con un peso molecular calculado de aproximadamente 90 kDa y un pI de aproximadamente 5,85. La Figura 1 también ilustra las homologías con hsp60 (subrayado sencillo) y PIF1 (subrayado de puntos), sitios de glicosilación (subrayado doble), así como el motivo de sitio activo de glutarredoxina y el motivo de dedos de cinc presente en ADNF III (en negrita y en cursiva).

- 50 La Figura 2 ilustra los resultados de usar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar ARNm de ADNF III en astrocitos de rata. El producto de PCR de ADNF III está enriquecido en astrocitos en comparación con fibroblastos. El tamaño del transcrito de ARN de longitud completa en hibridación de transferencia de northern era de aproximadamente 5300 ± 200 pares de bases, sugiriendo una cola poli (A) larga (no mostrada). El ARNm se identificó en astrocitos así como en la corteza cerebral, cerebelo y el rombencéfalo. En el riñón, bazo y pulmón se detectaron cantidades bajas.

- 60 La Figura 3 muestra los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa mimética. La expresión de ARNm se determina en embriones, embriones de 9,5 días de edad de ratón incubados *in vitro* durante cuatro horas como anteriormente (Gressens y col., Nature 326: 155-158 (1993)). Los resultados muestran un aumento de aproximadamente dos veces en ARNm de ADNF III a continuación de tratamiento con VIP, como se determinó examinando el producto de PCR. Los experimentos de hibridación *in situ* localizaron la expresión al sistema nervioso en desarrollo del embrión de ratón (no mostrados).

- 65 Figuras 4A-4B. La Figura 4A ilustra la hibridación de transferencia de western para detección inmunológica de la proteína ADNF III clonada a partir de extractos bacterianos. Los extractos bacterianos que expresan el clon p25 se sometieron a electroforesis en gel de SDS al 10%-poliacrilamida seguido de análisis de transferencia de western con los anticuerpos usados para clonación. Anti-SALLRSIPA= α 1, diluido a 1:250 y detectado con kit de Amersham Life Science ECL+Plus; pBS=extracto bacteriano de un cultivo de control transformado con el fagémido pBluescript SK;

p25=extracto bacteriano de un cultivo transformado con fagémido pBluescript SK que contiene el inserto del clon 25; ϵ 1=p25, una proteína de fusión que contiene secuencias parciales de la β -galactosidasa, se enriqueció (15 veces) en una columna de afinidad. CBB=tinción de Azul Brillante de Coomassie (proteína) de los mismos carriles que se sometieron a análisis de transferencia de western. La transferencia puntual exhibida muestra que el anticuerpo (α 1) reconoció antígenos de SALLRSIPA (SEC ID N°: 5) y NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) (1= SALLRSIPA, NAP=NAPVSIPQ), pero no reconoció un péptido de control LGGS (SEC ID N°: 11). Como se ha ilustrado en la Figura 4A, una proteína de peso molecular alto (aproximadamente 90 kDa, carril p25) se identificó como la molécula de ADNF III. La Figura 4B ilustra la identificación inmunológica de una proteína de ADNF III secretada en medio acondicionado de astrocitos. El medio acondicionado de astrocitos se preparó como se ha descrito anteriormente (véase Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2337 (1996)), con una proteína de un peso molecular alto identificada como la molécula de ADNF III mediante hibridación de transferencia de western. Se realizó electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida como se ha indicado en la referencia citada anteriormente. Se utilizaron cultivos astrogiales obtenidos a partir de corteza cerebral de ratas recién nacidas. Los extractos celulares y medio acondicionado de astrocitos que se trataron o no se trataron con VIP (+, -) se sometieron a electroforesis a través de una placa de gel de poliacrilamida al 10% que contenía SDS al 0,1%. El análisis de transferencia de western se realizó con anticuerpos utilizados para la clonación (anti-SALLRSIPA= α 1). El primer carril muestra proteínas intracelulares identificadas por el anticuerpo. La especificidad se determinó mediante incubación de los anticuerpos con la transferencia en presencia de la proteína clonada enriquecida (ϵ 1) que dio como resultado desaparición de la unión del anticuerpo. Se determinó especificidad adicional en lo referente a que el anticuerpo no reaccionó frente a hsp60 (StressGen Biotechnologies Corp, Victoria, Canadá). α 2 es un anticuerpo específico generado frente a la proteína secretada similar a ADNF III de 89 kD extraído del gel de poliacrilamida. α 3 es un anticuerpo específico generado frente a la proteína similar a ADNF III (~60 kDa) inferior extraído del gel de poliacrilamida.

Figuras 5A-C. La Figura 5 ilustra PCR de ADNc de ADNF III humano a partir de un neuroblastoma humano (Lilling y col., J. Molec. Neurosci. 5: 231-239 (1995)). Se muestra (véase la Figura 5B) el tamaño esperado correcto del producto (similar al esperado en ratones). El material humano expresa el ARNm de ADNF III y el análisis de secuencia, en comparación con la secuencia de ratón, reveló una similitud del 86% en el nivel de nucleótido y una similitud del 93% y una identidad el 92% en el nivel de aminoácido (véase la Figura 5C).

Las Figuras 6A-C ilustran que el extracto bacteriano a partir de bacterias que expresan clon 25 (la "proteína expresada") proporciona neuroprotección en una diversidad de entornos. La Figura 6A ilustra neuroprotección contra bloqueo eléctrico con una neurotoxina (círculos cerrados) y frente a neurotoxicidad asociada con β -amiloide (círculos abiertos) en cultivos de corteza cerebral (los experimentos se realizaron como se ha descrito por Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)). El extracto bacteriano que contenía el fagémido sin un inserto es inactivo (cuadrados cerrados). Para el tratamiento de β -amiloide, se sintetizó el fragmento 25-35 como anteriormente (Gozes y col. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)) y se añadió a los cultivos en una concentración de 25 μ M. La Figura 6B ilustra que en una repetición del experimento descrito anteriormente en la Figura 6A, un péptido de 8 aminoácidos (NAP) imitó la actividad de ADNF III. Los círculos cerrados son protección frente a tetrodotoxina; los círculos abiertos, frente a β -amiloide; y los cuadrados cerrados, un péptido inactivo de control, (SVRLGLGGNAPVSIPQQS, (SEC ID N°: 12)). La Figura 6C ilustra los ejemplos de neuroprotección mediante NAP frente a gp120 (aislado de RFII) 1 pM (Brenneman y col., Nature 335: 639-642 (1988); Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996)); NMDA (10 μ M); y muerte celular de origen natural. Los experimentos que utilizan cultivos de corteza cerebral obtenidos de ratas recién nacidas se realizaron como se ha descrito previamente. Para bloqueo eléctrico, se realizó incubación con tetrodotoxina 1 μ M (Brenneman & Eiden, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 83: 1159-1162 (1986)). Para tratamiento de β -amiloide, se sintetizó el fragmento 25-35 como anteriormente (Gozes y col. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)) y se añadió a los cultivos en una concentración de 25 μ M. Se añadieron toxinas a cultivos de nueve días de edad y se incubaron durante cinco días adicionales. El extracto de proteína de ADNF III expresado se añadió junto con la toxina en diluciones indicadas. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. El número de neuronas sembradas en placas = 300.000/placa; el número que sobrevivió al procedimiento de disociación y siembra en placas es aproximadamente el 88% y el número que sobrevive al final del experimento es el 75% (sin ninguna toxina adicional). Con toxinas adicionales, el número de neuronas supervivientes sería de aproximadamente el 50%. Se obtuvo neuroprotección significativa por ADNF III (indicado clon 25) en diluciones de 10^{-15} - 10^{-13} (de 1 mg/ml de solución de proteína diluida en PBS) frente a tetrodotoxina y en diluciones $>10^{-15}$ frente a β -amiloide ($P < 0,001$). La neuroprotección significativa por NAP frente a tetrodotoxina fue en concentraciones de 10^{-18} - 10^{-14} M, frente a β -amiloide a 10^{-16} - 10^{-15} M, frente a NMDA a $>10^{-16}$ M y frente a gp120 a 10^{-15} - 10^{-10} M ($P < 0,01$).

Las Figuras 7A y 7B representan estudios de estructura-actividad e identifican NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) como el péptido más activo, que muestra dos concentraciones óptimas de pico, es decir, 10^{-16} - 10^{-14} M y 10^{-11} - 10^{-10} M.

La Figura 8 ilustra los efectos de NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) ("NAP") sobre el aprendizaje y la memoria.

La Figura 9 ilustra identificación de transferencia de northern de ARNm de ADNF III. Se extrajo ARN de los cerebros de ratones de 28 días de edad deficientes en apolipoproteína E (E) tratados con solución salina durante las dos primeras semanas de vida o con NAP (E+N), ratones de control (C) se trataron con solución salina. El ARN se sometió a hibridación de transferencia de northern con una sonda específica de ADNF III marcada por PCR (α - ^{32} P-dCTP, Amersham, 3000 Ci/mmol) (véase la Figura 2) en comparación con una sonda específica de actina (Gozes y col., Mol. Brain Res. 2: 137-148 (1987)).

La Figura 10 ilustra ratones deficientes en ApoE que muestran un deterioro en el aprendizaje y la memoria, que mejora mediante tratamiento profiláctico con NAP. Se realizaron dos experimentos de laberinto de agua diarios en animales de tres semanas de edad. Los grupos ensayados fueron: 1. animales de control inyectados con vehículo durante las primeras dos semanas de vida (35 animales de seis camadas diferentes, con 5-7 animales de cada camada, círculos abiertos); 2. animales deficientes en ApoE inyectados con vehículo durante las dos primeras semanas de vida (18 animales obtenidos de tres camadas diferentes, con 5-7 crías por camada, círculos cerrados); 3. animales de control tratados crónicamente con NAP durante las dos primeras semanas de vida (14 animales obtenidos de tres camadas diferentes, triángulos abiertos) y 4. ratones deficientes en ApoE tratados crónicamente con NAP durante las dos primeras semanas de vida (19 animales obtenidos de tres camadas diferentes, rectángulos abiertos). La figura representa la latencia (del segundo experimento diario), medida en segundos, para conseguir la plataforma oculta de 0,5 min después de estar en la misma. Se realizaron ensayos durante cinco días consecutivos y después con un retardo de dos días se ensayaron durante un día adicional. ApoE= animales deficientes en ApoE. No hubo diferencias entre los animales tratados con vehículo y los animales no tratados (datos no mostrados). Las comparaciones estadísticas mostradas se realizaron: 1. entre deficientes en ApoE y controles; 2. entre ApoE tratados con NAP y ApoE tratados con vehículo y 3. entre controles tratados con NAP y controles tratados con vehículo (*P<0,001; **P<0,03; ***P<0,002).

Definiciones

“Péptidos”, “polipéptidos” y “oligopéptidos” son cadenas de aminoácidos (típicamente L-aminoácidos) cuyos carbonos α se enlazan a través de enlaces peptídicos formados por una reacción de condensación entre el grupo carboxilo del carbono α de un aminoácido y el grupo amino del carbono α de otro aminoácido. El aminoácido terminal en un extremo de la cadena (es decir, el amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (es decir, el carboxi terminal) tiene un grupo carboxilo libre. Como tal, la expresión “extremo amino” (abreviada extremo N) se refiere al grupo α -amino libre en el aminoácido en el extremo amino del péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otro emplazamiento dentro del péptido. De forma similar, la expresión “extremo carboxi” (abreviado extremo C) se refiere al grupo carboxilo libre en el aminoácido en el extremo carboxi de un péptido o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otro emplazamiento dentro del péptido.

Típicamente, los aminoácidos que forman un polipéptido se enumeran en orden, comenzando en el extremo amino y aumentando en la dirección del extremo carboxi del polipéptido. Por tanto, cuando un aminoácido se dice que “sigue” a otro, ese aminoácido está posicionado más cerca del extremo carboxi del polipéptido que el aminoácido “anterior”.

El término “resto” se usa en este documento para referirse a un aminoácido o un mimético de aminoácido que se incorpora en un polipéptido mediante un enlace amida o un mimético de enlace amida. Como tal, el aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural. Además, un mimético de enlace amida incluye modificaciones a la estructura peptídica bien conocidas por los especialistas en la técnica.

Las expresiones “aislados”, “purificados” o “biólogicamente puros” se refieren a material que está sustancialmente o básicamente libre de componentes que normalmente acompañan al mismo en su estado nativo.

La expresión “ácido nucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de hélice única o de doble hélice y, a menos que se limite de otra manera, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que hibridan a ácidos nucleicos de una manera similar a nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular incluye opcionalmente la secuencia complementaria de la misma.

El término “subsecuencia” en el contexto de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a una región del ácido nucleico igual a o más pequeña que el ácido nucleico especificado.

Dos ácidos nucleicos de hélice única “hibridan” cuando los mismos forman un dúplex de doble hélice. La región de doble hélice puede incluir la longitud completa de uno o ambos ácidos nucleicos de hélice única o todo un ácido nucleico de hélice única y una subsecuencia del otro ácido nucleico de hélice única o la región de doble hélice puede incluir una subsecuencia de cada ácido nucleico. Una visión de conjunto de la hibridación de ácidos nucleicos se observa en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” (1993).

La expresión “sonda de ácido nucleico” se refiere a una molécula que se une a una secuencia específica o subsecuencia de un ácido nucleico. Una sonda preferiblemente es un ácido nucleico que se une a través de formación de pares de bases complementaria a la secuencia completa o a una subsecuencia de un ácido nucleico diana. Un especialista en la técnica apreciará que las sondas se pueden unir a secuencias diana que carezcan de complementariedad completa con la secuencia de sonda dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas preferiblemente se marcan directamente como con isótopos, cromóforos, luminóforos, cromógenos o se marcan indirectamente tal como con biotina a la cual se puede unir posteriormente un complejo de estreptavidina. Mediante el ensayo para determinar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada.

Un “marcador” es una composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen, pero sin limitación, los siguientes: ³²P, colorantes fluorescentes, reactivos de densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, como se usan comúnmente en un ELISA), biotina, dioxigenina o haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales.

Una “sonda de ácido nucleico marcada” es una sonda de ácido nucleico que está unida, covalentemente, a través de un engarzador, o a través de enlaces electroestáticos, de van der Waals o de hidrógeno a un marcador de forma que la presencia de la sonda se puede detectar detectando la presencia del marcador unido a la sonda.

La expresión “se hibrida selectivamente (o específicamente) a” se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla de complejo (por ejemplo, ADN o ARN celular total o una biblioteca).

La expresión “condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a condiciones en las cuales una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía exhaustiva a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica en un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) en la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas se ocupan en equilibrio). Las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 de ión sodio, típicamente aproximadamente concentración de ión sodio de 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición agentes desestabilizantes tales como formamida. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que ellos codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codón máxima permitida por el código genético.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoácídicos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, medido usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineamiento manual e inspección visual. Cuando porcentaje de identidad de secuencias se usa con referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticos con frecuencia difieren en sustituciones conservativas de aminoácidos, donde los restos aminoácídicos se sustituyen por otros restos aminoácídicos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambia las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los especialistas en la técnica conocen bien los medios para realizar este ajuste. Típicamente, esto implica valorar una sustitución conservativa como una falta de coincidencia parcial en lugar de completa, aumentando de ese modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservativa se da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, de acuerdo con un algoritmo conocido.

La expresión “sustancialmente idéntico”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a secuencias o subsecuencias que tienen una identidad de nucleótido o de resto aminoácídico de al menos el 60%, preferiblemente el 80%, más preferiblemente del 90-95% cuando se alinean para correspondencia máxima medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineamiento manual e inspección visual. Esta definición también se refiere al complemento de una secuencia de ensayo, que tiene una complementariedad de secuencia o subsecuencia sustancial cuando la secuencia de ensayo tiene una identidad sustancial con una secuencia de referencia.

Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia después calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de

estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineamiento manual e inspección visual.

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos y de par en par para mostrar la relación y el porcentaje de identidad de secuencias. El mismo también representa un árbol o dendrograma que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987). El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineamiento múltiple comienza con el alineamiento de par en par de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Después, este grupo sea alineado con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una extensión sencilla del alineamiento de par en par de dos secuencias individuales. El alineamiento final se consigue mediante una serie de alineamientos progresivos y de par en par. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencia y designando los parámetros de programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia se puede comparar con otras secuencias de ensayo para determinar el porcentaje de relación de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos finales ponderados.

Otro ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). El software para realizar análisis de BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencia de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen alguna puntuación de umbral valorada en positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. A T se refiere como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col., mencionado anteriormente). Estas coincidencias iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Las coincidencias de palabra se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta tan lejos como se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabra en cada dirección se interrumpe cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad X desde su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa cae a cero o por debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos con puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5877 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad total ($P(N)$), que proporciona un indicio de la probabilidad mediante la cual ocurriría una coincidencia entre dos secuencias de nucleótido o aminoácidos aleatoriamente. Por ejemplo, se considera que un ácido nucleico es similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad total en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, preferiblemente menos de aproximadamente 0,01 y más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Un indicio de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene reactividad cruzada inmunológicamente con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se ha descrito más adelante. Por tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos péptidos difieren sólo en sustituciones conservativas. Otro indicio de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que dos moléculas y/o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas, como se ha descrito más adelante.

“Variaciones conservativamente modificadas” de una secuencia de ácido nucleico particular se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o básicamente idénticas o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias básicamente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG todos codifican el aminoácido arginina. Por tanto, en todas las posiciones en las que se especifique una arginina por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son “variaciones silentes”, que son una especie de “variaciones conservativamente modificadas”. Cada secuencia de ácido nucleico en este documento que codifica un polipéptido también describe cualquier variación silente posible. Un especialista reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas convencionales. Por consiguiente, cada “variación silente” de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita. Además, un especialista reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales que alteran, añaden o suprimen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos (típicamente menos del 5%, más típicamente menos del 1%) en una secuencia codificada son “variaciones conservativamente modificadas” donde

ES 2 331 595 T3

las alteraciones dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la técnica. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas el uno del otro:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

El término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina o fragmentos del mismo. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como una miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon las cuales, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables de reconocimiento de antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Existen anticuerpos, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que tiene una cadena ligera unida a V_H-C_H1 mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región de bisagra convirtiendo de ese modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es básicamente un Fab con parte de la región de bisagra (véase Fundamental Immunology (Paul, ed., 3ª ed., 1993), que se incorpora en este documento como referencia, para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Aunque diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un especialista apreciará que tales fragmentos Fab' se pueden sintetizar *de novo* químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en este documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante.

Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de forma que el sitio de unión a antígeno (región variable) se enlaza a una región constante de una clase diferente o alterada, función de efector y/o de especie, o una molécula completamente diferente que confiere propiedades nuevas al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

El término “inmunoensayo” es un ensayo que utiliza un anticuerpo para unirse específicamente a un analito. El inmunoensayo se caracteriza por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, dirigir y/o cuantificar el analito.

La expresión “se une específicamente (o selectivamente)” a un anticuerpo o “específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con”, cuando se refiera a una proteína o péptido, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. Por tanto, en condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces el fondo y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede necesitar que un anticuerpo se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, anticuerpos generados para ADN F III con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 ó 3 se pueden seleccionar para obtener sólo aquellos anticuerpos que sean específicamente inmunorreactivos con esos polipéptidos y no con otras proteínas, excepto por variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecie de ADN F III. Esta selección se puede conseguir sustrayendo anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas como ADN F I. Se puede usar una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, rutinariamente se usan

inmunoensayos de ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que se pueden usar para determinar inmunorreactividad específica). Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal de fondo o ruido y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo.

Un anticuerpo “anti-ADNF III” es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido codificado por el ácido nucleico de ADNF III descrito en este documento.

Un “vector de expresión” incluye un casete de expresión recombinante que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se puede transcribir y traducir mediante una célula. Un “casete de expresión recombinante” es una construcción de ácido nucleico, generada recombinantemente o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El vector de expresión puede ser parte de un fragmento de plásmido, virus o ácido nucleico. Típicamente, la parte de casete de expresión recombinante del vector de expresión incluye un ácido nucleico que se tiene que transcribir y un promotor. En algunas realizaciones, el casete de expresión incluye adicionalmente, por ejemplo, un origen de replicación y/o elementos de integración de cromosoma. Un “promotor” es una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en este documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. El promotor también incluye elementos potenciadores o represores distales que pueden estar localizados tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Un promotor “inducible” responde a un estímulo extracelular. La expresión “unido operativamente” se refiere a enlace funcional entre una secuencia de control expresión de ácido nucleico (tal como un promotor o serie de sitios de unión de factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia a una célula indica que la célula replica o expresa un ácido nucleico o expresa un péptido o proteína codificado por un ácido nucleico cuyo origen es exógeno a la célula. Las células recombinantes pueden expresar genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden expresar genes encontrados en la forma nativa de la célula donde los genes se reintroducen en las células mediante medios artificiales, por ejemplo, bajo el control de un promotor heterólogo.

Una “composición inmunógena” es una composición que provoca la producción de un anticuerpo que se une a un componente de la composición cuando se administra a un mamífero, o que provoca la producción de una respuesta inmune mediada por célula frente a un componente de la composición.

Un “epítipo antigénico” en el contexto de un polipéptido es una subsecuencia polipeptídica que, cuando se presenta como un inmunógeno, o como una parte de un inmunógeno (por ejemplo, con una proteína transportadora o adyuvante o sobre la superficie de un vector viral), provoca un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de longitud completa.

La expresión “biológicamente activo” se refiere a una secuencia peptídica que interaccionará con moléculas biológicas de origen natural para activar o inhibir la función de esas moléculas *in vitro* o *in vivo*. La expresión “biológicamente activo” se usa más comúnmente en este documento para referirse a polipéptidos de ADNF III que muestran acción neuroprotectora/neurotrófica sobre neuronas que se originan en el sistema nervioso central tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, la presente invención proporciona subsecuencias polipeptídicas que tienen la misma o una actividad similar a ADNF III cuando se ensayan en comparación con ADNF III usando, por ejemplo, cultivos de corteza cerebral tratados con una neurotoxina (véase, Gozes y col., *Proc. Nat’l Acad. Sci. EE.UU.* 93: 427-432 (1996)).

La expresión “constituido básicamente por” se usa en este documento para excluir cualquier elemento que podría alterar sustancialmente las propiedades esenciales de los polipéptidos de ADNF III a los que se refiere la expresión. Por tanto, la descripción de un polipéptido que “está constituido básicamente por” excluye cualquier sustitución, adición o supresión de aminoácidos que alteraría sustancialmente la actividad biológica de ese polipéptido.

El término “contactar” se usa en este documento de forma intercambiable con los siguientes: combinar con, añadir a, mezclar con, pasar sobre, incubar con, fluir sobre, etc. Además, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden “administrar” mediante cualquier procedimiento convencional tal como, por ejemplo, vías parenteral, oral, tópica e inhalación. En realizaciones preferidas en este documento, se emplean las vías parenteral y de inhalación nasal.

“Una cantidad suficiente” o “una cantidad eficaz” es esa cantidad de un polipéptido de ADNF III dado que muestra la actividad neuroprotectora/neurotrófica de interés o, que proporciona un alivio subjetivo de un síntoma o varios síntomas o una mejora que se puede identificar objetivamente observada por el médico u otro observador cualificado. El intervalo de dosis varía con el polipéptido de ADNF III usado, la vía de administración y la potencia del polipéptido de ADNF III particular.

ES 2 331 595 T3

Los términos “ADNF III” o “ADNP” se refieren a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que son variantes polimórficas, homólogos interespecie (preferiblemente homólogos de mamífero) y alelos de ADNF III que: (1) se unen a anticuerpos generados frente a un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variantes conservativamente modificadas de las mismas; o (2) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a una secuencia seleccionada del grupo constituido por SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 y variantes conservativamente modificadas de las mismas; o (3) se amplifican mediante cebadores que se hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a la misma secuencia que un conjunto de cebadores que comprende cebadores seleccionados entre el grupo constituido por SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 9 o (4) tienen identidad/complementariedad de secuencia o subsecuencia sustancial con una secuencia seleccionada entre el grupo constituido por SEC ID N°: 1-4 y variantes conservativamente modificadas de las mismas.

Los aminoácidos a los que hace referencia este documento se describen mediante denominaciones abreviadas de la forma siguiente:

TABLA I

<u>Nomenclatura de Aminoácido</u>		
Nombre	3-letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Sulfóxido de Metionina	Met (O)	-
Metilsulfonio de Metionina	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

La presente invención se refiere al descubrimiento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido neuroprotector novedoso, es decir, Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad III (ADNF III), también conocido como Proteína Neuroprotectora Dependiente de Actividad (ADNP). Basándose en la homología reconocida entre ADNF I y hsp60, una proteína de choque térmico y PIF1, una proteína reparadora de ADN, estos dos epítopes se utilizaron para preparar anticuerpos que, a su vez, se usaron para seleccionar una biblioteca de expresión de ADNc de ratón para identificar el nuevo polipéptido neuroprotector ADNF III. El ADNc de ratón está constituido por aproximadamente 2418 pares de bases de una fase de lectura abierta, que codifican un polipéptido de ADNF III de aproximadamente 806 aminoácidos, pl 5,85. Una secuencia de ocho aminoácidos de ADNF III (polipéptido de ADNF III-8) muestra similitud estructural con el sitio activo de ADNF I (el homólogo de la proteína de choque térmico 60), con identidad del 77,8% en el nivel de ARN en comparación con secuencias que codifican proteína de choque térmico 60. Además, dos secuencias de aminoácidos a lo largo de la estructura de ADNc, una de cinco aminoácidos y la otra de nueve aminoácidos, muestran una identidad del 72% y del 77,8% con secuencias que codifican PIF1, respectivamente. El análisis de secuencia comparativo adicional reveló la firma de la familia de transportadores ABC: proteínas de unión a ATP implicadas en el transporte activo de moléculas hidrófilas pequeñas a través de la membrana citoplasmática; un sitio de unión GTP/ATP; y un sitio activo de aldehído deshidrogenasa. También se ha clonado un ADNc que codifica ADNF III humano y se proporciona por la presente invención. Por tanto, la presente invención proporciona ADNF III, homólogos interespecie (preferiblemente homólogos de mamífero), variantes polimórficas y alelos, así como subsecuencias polipeptídicas que tienen la misma actividad o actividad similar a ADNF III cuando se ensayan en comparación con ADNF III usando, por ejemplo, cultivos de corteza cerebral tratados con una neurotoxina (véase, Gozes y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)).

Mediante el uso de tecnología RT-PCR, inicialmente se identificó ARNm que codificaba ADNF III en astrocitos de rata obtenidos a partir de la corteza cerebral. El tamaño del transcrito de ARN de longitud completa en hibridación de transferencia de northern fue de aproximadamente 5300 ± 200 pares de bases, sugiriendo una cola poli (A) larga. Además, la determinación de ARNm asistida por PCR indicó que el ARNm que codifica ADNF III se expresaba en astrocitos, pero no en fibroblastos. Además de expresarse en astrocitos, el ARNm se identificó en el cerebro, incluyendo corteza, cerebelo, hipocampo, lóbulo frontal, médula oblonga, núcleo subtalámico, médula espinal y rombencéfalo. El ARNm de ADNF III también se expresa en tejidos fetales, especialmente el pulmón y en tejidos endocrinos. Pequeñas cantidades de ARNm eran detectables en el riñón, bazo y pulmón y no se detectó una cantidad significativa en el tracto intestinal. La PCR de ADNc a partir de neuroblastoma humano indicó que material humano expresa ARNm de ADNF III. Se clonó un ADNc de ADNF III y el análisis de secuencia reveló una similitud del 87% en el nivel de nucleótido y una similitud del 93% e identidad del 92% en el nivel de aminoácido con el ácido nucleico de ADNF III de ratón. La hibridación con transferencia de western indicó adicionalmente que la inmunorreactividad similar a ADNF III (aproximadamente 90 kDa) se secreta a partir de células astrogiales incubadas con VIP.

Basándose en la homología entre ADNF I y hsp60 con ADNF III, se sintetizó un polipéptido de ADNF III que mostraba homología estructural a hsp60 y al péptido activo descrito previamente SALLRSIPA (SEC ID N°: 5). Este polipéptido de ADNF III tiene 8 aminoácidos de longitud y tiene la secuencia NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) (denominada NAP o ADNF III-8). Una vez sintetizado, el polipéptido de ADNF III, es decir, NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) y la "proteína expresada" se seleccionaron para determinar su capacidad de evitar la muerte de células neuronales. Al hacer esto, se observó que la "proteína expresada" (ADNF III de longitud completa expresado a partir del clon 25) evita la muerte de células neuronales asociada con péptido β -amiloide en cultivos de corteza cerebral (los experimentos se realizaron como se ha descrito por Gozes y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)). Además, se observó que el polipéptido de ADNF III, es decir, NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6), evita la muerte de células neuronales asociada con el péptido β -amiloide en cultivos de corteza cerebral.

Además, se observó que la "proteína expresada" a partir del material clonado evita la muerte de células neuronales asociada con bloqueo eléctrico (tetrodotoxina $1 \mu\text{M}$) en cultivos de corteza cerebral (se realizaron experimentos como se ha descrito en Brenneman y Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2237 (1996)). De forma similar, el polipéptido de ADNF III-8 identificado, es decir, NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6), evita la muerte de células neuronales asociada con bloqueo eléctrico en cultivos de corteza cerebral. Además, el polipéptido de ADNF III-8 también proporciona protección frente a deficiencias del aprendizaje y la memoria asociadas con bloqueo colinérgico.

Considerando lo anterior, la presente invención proporciona, entre otros, secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de ADNF III; polipéptidos de ADNF III codificados por tales secuencias de ácido nucleico, y el uso de tales polipéptidos de ADNF III para el tratamiento de deficiencias neurológicas y para la prevención de muerte celular asociada con (1) gp120, la proteína de envuelta de VIH; (2) ácido *N*-metil-D-aspartico (excito-toxicidad); (3) tetrodotoxina (bloqueo de actividad eléctrica); y (4) péptido β -amiloide, una sustancia relacionada con degeneración neuronal en enfermedad de Alzheimer.

A. Procedimientos de Clonación para el Aislamiento de Secuencias de Ácido Nucleico que Codifican Polipéptidos de ADNF III

En este documento se describen varios ácidos nucleicos específicos que codifican polipéptidos de ADNF III. Estos ácidos nucleicos se pueden preparar usando técnicas recombinantes o sintéticas convencionales. Dados los ácidos

nucleicos de la presente invención, un especialista puede construir una diversidad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que codifican el mismo polipéptido. Las metodologías de clonación para conseguir estos fines y los procedimientos de secuenciación para verificar la secuencia de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación apropiadas e instrucciones suficientes para dirigir a especialistas a través de muchos ejercicios de clonación se observan en Sambrook y col., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y col., eds., 1994).

Además, la información de producto de fabricantes de reactivos biológicos y equipo experimental también proporciona información útil en procedimientos biológicos conocidos. Tales fabricantes incluyen la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (San Diego, CA) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por un especialista.

Las composiciones de ácido nucleico de esta invención, ya sea ARN, ADNc, ADN genómico o un híbrido de las diversas combinaciones, se aíslan a partir de fuentes biológicas o se sintetizan *in vitro*. Los ácidos nucleicos de la invención están presentes en células transformadas o transfectadas, en lisados celulares transformados o transfectados o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Se conocen técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar secuencias para uso como sondas moleculares o generar fragmentos de ácido nucleico para subclonación posterior. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a especialistas a través de tales procedimientos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), la amplificación por Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA), se encuentran en Berger, Sambrook y col. y Ausubel y col., mencionados anteriormente, así como en la Patente de Estados Unidos N° 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds., 1990); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research 3: 81-94 (1991); Kwoh y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 1173 (1989); Guatelli y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87: 1874 (1990); Lomell y col., J. Clin. Chem 35: 1826 (1989); Landegren y col. Science 241: 1077-1080 (1988); Van Brunt, Biotechnology 8: 291-294 (1990); Wu y Wallace, Gene 4: 560 (1989); Barringer y col., Gene 89: 117 (1990); y Sooknanan y Malek, Biotechnology 13: 563-564 (1995). Los procedimientos mejorados para clonar ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.426.039. Los procedimientos mejorados para amplificar ácidos nucleicos grandes se resumen en Cheng y col., Nature 369: 684-685 (1994) y las referencias en el mismo. Un especialista apreciará que básicamente cualquier ARN se puede convertir en un ADN de doble hélice adecuado para digestión por restricción, expansión por PCR y secuenciación usando transcriptasa inversa y una polimerasa.

Los oligonucleótidos para uso como sondas, por ejemplo, con procedimientos de amplificación de ácido nucleico de ADN III *in vitro*, o para uso como sondas de ácido nucleico para detectar ácidos nucleicos de ADN III, típicamente se sintetizan químicamente de acuerdo con el procedimiento de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts., 22(20): 1859-1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, por ejemplo, como se describe en Nedham-VanDevanter y col., Nucleic Acids Res. 12: 6159-6168 (1984). También se pueden preparar y encargar de forma personalizada oligonucleótidos a partir de una diversidad de fuentes comerciales conocidas por los especialistas en la técnica. La purificación de oligonucleótidos, cuando es necesaria, típicamente se realiza mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa o mediante una HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson y Regnier, J. Chrom. 255: 137-149 (1983). La secuencia de los oligonucleótidos sintéticos se puede verificar usando el procedimiento de degradación química de Maxam y Gilbert, en Methods in Enzymology 65: 499-560 (Grossman y Moldave, eds. 1980).

Un especialista reconocerá muchas maneras de generar alteraciones en una secuencia de ácido nucleico dada. Tales procedimientos bien conocidos incluyen mutagénesis dirigida, amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados, exposición de células que contienen el ácido nucleico a agentes mutagénicos o radiación, síntesis química de un oligonucleótido deseado (por ejemplo, junto con ligamiento y/o clonación para generar ácidos nucleicos grandes) y otras técnicas bien conocidas (véase, Gilman y Smith, Gene 8: 81-97 (1979); Roberts y col. Nature 328: 731-734 (1987); y Sambrook y col. Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2ª ed. 1989)).

B. Expresión/Síntesis de Polipéptidos de ADN III

En una realización, los polipéptidos o subsecuencias de los mismos, se sintetizan usando metodología de ADN recombinante. En general, ésta implica crear una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína, colocar el ácido nucleico en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en una célula huésped, aislar la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizar la proteína.

Una vez que un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se aísla y se clona, el ácido nucleico opcionalmente se expresa en células modificadas por ingeniería genética recombinantemente conocidas por los especialistas en la técnica. Los ejemplos de tales células incluyen, pero sin limitación, bacterias, levaduras, plantas, hongos filamentosos, insectos (especialmente que emplean vectores baculovirales) y células de mamífero. Los ácidos

nucleicos recombinantes están unidos operativamente a secuencias de control apropiadas para expresión en el huésped seleccionado. Para *E. coli*, la secuencias de control de ejemplo incluyen los promotores T7, trp o lambda, un sitio de unión a ribosoma y, preferiblemente, una señal de terminación de transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control típicamente incluyen un promotor y, preferiblemente, un potenciador obtenido a partir de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación y puede incluir secuencias donadoras y aceptoras de corte y empalme.

Los plásmidos de la invención se pueden transferir a la célula huésped elegida mediante procedimientos bien conocidos. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, el procedimiento de transformación de cloruro de calcio para *E. coli* y el tratamiento de fosfato de calcio o procedimientos de electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo y hyg.

Una vez expresados, los polipéptidos recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, incluyendo precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véanse, por ejemplo, Scopes, *Polypeptide Purification* (1982) y Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Polypeptide Purification* (1990)). Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, entonces los polipéptidos de ADNF III se pueden usar, por ejemplo, para evitar muerte de células neuronales o como inmunógenos para producción de anticuerpos.

Además de las técnicas recombinantes anteriores, los polipéptidos de la invención se preparan opcionalmente sintéticamente a través de una amplia diversidad de técnicas bien conocidas. Los polipéptidos de tamaño relativamente corto típicamente se sintetizan en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Merrifield, *Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154 (1963)). En el mercado están disponibles diversos sintetizadores y secuenciadores automáticos y se pueden usar de acuerdo con protocolos conocidos (véase, por ejemplo, Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª ed. 1984)). El procedimiento preferido para la síntesis química de los polipéptidos de esta invención es la síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C terminal de la secuencia se fija a un soporte insoluble seguido por adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Las técnicas para síntesis en fase sólida se describen por Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A.; Merrifield y col., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156 (1963); y Stewart y col., *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª ed. 1984).

Después de síntesis química, expresión biológica o purificación, el polipéptido o los polipéptidos pueden poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, es útil desnaturalizar y reducir el polipéptido y después provocar que el polipéptido se vuelva a plegar en la conformación preferida. Los procedimientos para reducir y desnaturalizar polipéptidos e inducir re-plegamiento son bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase Debinski y col., *J. Biol. Chem.* 268: 14065-14070 (1993); Kreitman y Pastan, *Bioconjug. Chem.* 4: 581-585 (1993); y Buchner y col., *Anal. Biochem.* 205: 263-270 (1992)). Debinski y col., por ejemplo, describen la desnaturalización y reducción de polipéptidos de cuerpo de inclusión en guanidina-DTE. Después, el polipéptido se vuelve a plegar en un tampón de oxidación reducción que contiene glutatión oxidado y L-arginina.

Un especialista reconocerá que se pueden realizar modificaciones a los polipéptidos sin disminuir su actividad biológica. Se pueden realizar algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula de dirección en un polipéptido de fusión. Tales modificaciones son conocidas por los especialistas en la técnica e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de inicio o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción o codones de terminación o secuencias de purificación localizados de forma conveniente.

C. Modificaciones Conservativas de los Ácidos Nucleicos y Polipéptidos de ADNF III

Un especialista apreciará que muchas variaciones conservativas de las secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas proporcionadas en este documento producen productos funcionalmente idénticos. Por ejemplo, debido a la degeneración del código genético, las "sustituciones silentes" (es decir, sustituciones de una secuencia de ácido nucleico que no dan como resultado una alteración en un polipéptido codificado) son una característica implícita de cada secuencia de ácido nucleico que codifica un aminoácido. De forma similar, "sustituciones conservativas de aminoácidos", en uno o algunos aminoácidos en una secuencia de aminoácidos se sustituyen con diferentes aminoácidos con propiedades altamente similares (véase la sección de definiciones mencionada anteriormente), también se identifican fácilmente como que son altamente similares a una secuencia de aminoácidos descrita o a una secuencia de ácido nucleico descrita que codifica un aminoácido.

Un especialista reconocerá muchas maneras de generar alteraciones en una secuencia de ácido nucleico dada. Tales procedimientos bien conocidos incluyen mutagénesis dirigida, amplificación por PCR usando oligonucleótidos degenerados, exposición de células que contienen el ácido nucleico a agentes mutagénicos o radiación, síntesis química de un oligonucleótido deseado (por ejemplo, junto con ligamiento y/o clonación para generar ácidos nucleicos grandes) y otras técnicas bien conocidas (véase, Gilman y Smith, *Gene* 8: 81-97 (1979); Roberts y col., *Nature* 328: 731-734 (1987)).

Más comúnmente, las secuencias polipeptídicas se alteran cambiando la secuencia de ácido nucleico correspondiente y que expresa el polipéptido. Sin embargo, las secuencias de polipéptido también se generan opcionalmente sintéticamente usando sintetizadores peptídicos disponibles en el mercado para producir cualquier polipéptido deseado (véase, Merrifield, mencionado anteriormente, y Stewart y Young, mencionado anteriormente).

Un especialista puede seleccionar un ácido nucleico o polipéptido deseado de la invención basándose en las secuencias proporcionadas y a través de conocimiento en la técnica que se refiere a proteínas en general. El conocimiento con referencia a la naturaleza de proteínas y ácidos nucleicos permite a un especialista seleccionar secuencias apropiadas con actividad similar o equivalente a los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en este documento. La sección de definiciones, mencionada anteriormente, describe sustituciones de aminoácidos conservativas ejemplares.

Finalmente, la mayoría de las modificaciones a los ácidos nucleicos y polipéptidos de ADNF III se evalúan mediante técnicas de selección de rutina en ensayos adecuados para la característica deseada. Por ejemplo, se pueden detectar cambios en el carácter inmunológico de un polipéptido mediante un ensayo inmunológico apropiado. Las modificaciones de otras propiedades tales como hibridación de ácido nucleico a un ácido nucleico diana, oxidación, reducción o estabilidad térmica de una proteína, hidrofobicidad, sensibilidad a proteólisis o la tendencia a agregarse se ensayan de acuerdo con técnicas convencionales.

Más particularmente, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden seleccionar fácilmente para determinar actividad neuroprotectora/neurotrófica empleando el siguiente ensayo de SNC. Se preparan cultivos de células de corteza cerebral usando las técnicas descritas por Forsythe y Westbrook, J. Physiol. Lond. 396: 515 (1988) con las siguientes modificaciones. Se usa corteza cerebral en lugar de hipocampo y se usan ratas recién nacidas en lugar de ratones E16. Después de nueve días de crecimiento *in vitro*, se realiza un cambio completo de medio a los cultivos y se tratan con el polipéptido de ADNF III de interés (disuelto en solución salina tamponada con fosfato) durante cinco días adicionales. Para finalizar, las células se fijan en inmunocitoquímica y las neuronas identificadas con anticuerpos frente a NSE (es decir, enolasa específica de neuronas, un marcador específico neuronal). Se realizan recuentos celulares en 30 campos, con un área total de aproximadamente 15 mm². Las neuronas se recuentan sin conocimiento de tratamiento. Los recuentos de control no tratados con cualquier fármaco se deben desarrollar con propósitos de comparación.

Usando este ensayo, un especialista en la técnica puede preparar fácilmente un gran número de polipéptidos de ADNF III de acuerdo con los contenidos de la presente invención y, a su vez, seleccionarlos usando el ensayo anterior para encontrar polipéptidos de ADNF III, además de los expuestos en este documento, que posean la actividad neuroprotectora/neurotrófica de factor de crecimiento ADNF III intacto. Por ejemplo, usando ADNF III-8 (es decir, Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEC ID N°: 6)) como un punto de partida, se puede añadir sistemáticamente, por ejemplo, Gly-, Gly-Gly-, Leu-Gly-Gly al extremo N de ADNF-8 y, a su vez, seleccionar cada uno de estos polipéptidos de ADNF III en el ensayo anterior para determinar si los mismos poseen actividad neuroprotectora/neurotrófica. Al hacer esto, se observará que se pueden añadir aminoácidos adicionales tanto al extremo N como al extremo C del sitio activo recientemente descubierto, es decir, Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln (SEC ID N°: 6)), sin pérdida de actividad biológica como se evidencia mediante el hecho de que el factor de crecimiento ADNF III intacto muestra actividad biológica extraordinaria.

D. Selección de Ácidos Nucleicos de ADNF III y el Uso de Ácidos Nucleicos de ADNF III como Sondas Moleculares

Además de su utilidad para codificar los polipéptidos descritos en este documento, los ácidos nucleicos de la invención son útiles como sondas moleculares. Se dispone de una amplia variedad de formatos y marcadores y son apropiados para la hibridación de ácidos nucleicos, incluyendo los que se revisan en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes (1993); y Methods in Molecular Biology, Volumen 33-In Situ Hybridization Protocols (Choo, ed., 1994) (véanse también otros libros en la serie de *Methods in Molecular Biology*); véase especialmente el Capítulo 21 de Choo, mencionado anteriormente, "Detection of Virus Nucleic Acids by Radioactive and Nonisotopic *in Situ* Hybridization".

Por ejemplo, rutinariamente se usan PCR, LCR y otras técnicas de amplificación para detectar ácidos nucleicos de ADNF III en muestras biológicas. Por consiguiente, en una clase de realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención se usan como cebadores o moldes, o como controles positivos en reacciones de amplificación para la detección de ADNF III en una muestra biológica tal como células astrogiales. En resumen, ácidos nucleicos con identidad o complementariedad de secuencia o subsecuencia con la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 4 o los complementos de las mismas, se usan como moldes para producir sintéticamente oligonucleótidos de aproximadamente 15-25 nucleótidos con secuencias similares o idénticas al complemento de una subsecuencia de ácido nucleico de ADNF III seleccionada. Después, los oligonucleótidos se usan como cebadores en reacciones de amplificación tales como PCR para detectar ácidos nucleicos de ADNF III seleccionados en muestras biológicas, tales como células astrogiales. Opcionalmente, también se usa un ácido nucleico de la invención (es decir, un ácido nucleico clonado correspondiente a la región que se tiene que amplificar) como un molde de amplificación en reacciones separadas como un control positivo para determinar que los reactivos de amplificación y las condiciones de hibridación son apropiados.

Otros procedimientos para la detección de ácidos nucleicos en muestras biológicas que usan ácidos nucleicos de la invención incluyen transferencias de Southern, transferencias de northern, hibridación *in situ* (incluyendo hibridación

in situ fluorescente (FISH), y una diversidad de técnicas distintas revisadas en Choo (mencionado anteriormente)). También son apropiadas una diversidad de técnicas de detección en fase sólida automatizada. Por ejemplo, se usan series de polímeros inmovilizados a una escala muy grande (VLSIPS™) para la detección de ácidos nucleicos (véase Tijssen (mencionado anteriormente), Fodor y col., *Science* 251: 767-777 (1991); Sheldon y col., *Clinical Chemistry* 39(4): 718-719 (1983); y Kozal y col., *Nature Medicine* 2(7): 753-759 (1996)).

E. Anticuerpos frente a uno o más Polipéptidos de ADN III Seleccionados

Se generan anticuerpos frente a polipéptidos de ADN III seleccionados de la presente invención, incluyendo variantes individuales, alélicas, de cepa o de especie, y fragmentos de los mismos, tanto en su forma de origen natural (longitud completa) como en formas recombinantes. Adicionalmente, se generan anticuerpos frente a estos polipéptidos de ADN III en sus configuraciones nativas o en configuraciones no nativas. También se pueden generar anticuerpos anti-idiotípicos. Los especialistas en la técnica conocen muchos procedimientos para preparar anticuerpos. La siguiente descripción se presenta como una visión de conjunto general de las técnicas disponibles; sin embargo, un especialista reconocerá que se conocen muchas variaciones de los siguientes procedimientos.

Se usan varios inmunógenos para producir anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de ADN III que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 3. Los polipéptidos recombinantes o sintéticos de 8 aminoácidos de longitud o mayores, típicamente de 20 aminoácidos de longitud o mayores, más típicamente de 30 aminoácidos de longitud o mayores, seleccionados entre subsecuencias de aminoácidos de un polipéptido de ADN III que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 3 son los inmunógenos polipeptídicos preferidos para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. En una clase de realizaciones preferidas, también se incluye un conjugado peptídico inmunogénico como un inmunógeno. También se usan polipéptidos de origen natural en forma pura o impura. Un dominio antigénico normalmente tiene aproximadamente 3 aminoácidos de longitud, con frecuencia al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, generalmente al menos aproximadamente 9 aminoácidos de longitud y con frecuencia al menos aproximadamente 15 aminoácidos de longitud. El dominio antigénico normalmente incluye el sitio de unión para un anticuerpo, que típicamente varía de 3 a aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, y que generalmente es de aproximadamente 8 a 12 aminoácidos de longitud.

Los polipéptidos de ADN III recombinantes se expresan en células eucariotas o procariotas y se purifican usando técnicas convencionales. El polipéptido, o una versión sintética del mismo, después se inyecta en un animal capaz de producir anticuerpos. Se pueden generar anticuerpos monoclonales o policlonales para uso posterior en inmunoensayos para medir la presencia y cantidad del polipéptido.

Los especialistas en la técnica conocen procedimientos para producir anticuerpos policlonales. En resumen, un inmunógeno (antígeno), preferiblemente un polipéptido de ADN III purificado, un polipéptido de ADN III acoplado a un vehículo apropiado (por ejemplo, GST, hemocianina de lapa californiana, etc.), o un polipéptido de ADN III incorporado en un vector de inmunización, tal como un virus vaccinia recombinante (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.722.848), se mezcla con un adyuvante y se inmunizan animales con la mezcla. La respuesta inmune del animal a la preparación de inmunógeno se controla tomando muestras de sangre de ensayo y determinando el título o reactividad al polipéptido de interés. Cuando se obtienen títulos apropiadamente altos de anticuerpo al inmunógeno, se recoge sangre del animal y se prepara el antisero. Cuando se desea, se realiza un fraccionamiento adicional de los antiseros para enriquecer en anticuerpos reactivos con el polipéptido (véase, por ejemplo, Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991) y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1989)).

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones recombinantes de cadena única de los mismos, frente a fragmentos enteros o predeterminados de polipéptidos de ADN III seleccionados se generan inmunizando animales, por ejemplo, con conjugados de los fragmentos con proteínas portadoras como se ha descrito anteriormente. Típicamente, el inmunógeno de interés es un péptido de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, más típicamente el péptido tiene 20 aminoácidos de longitud, generalmente, el fragmento tiene 25 aminoácidos de longitud y con frecuencia el fragmento tiene 30 aminoácidos de longitud o más. Los péptidos se acoplan opcionalmente a una proteína portadora (por ejemplo, como una proteína de fusión) o se expresan de manera recombinante en un vector de inmunización. Los determinantes antigénicos en polipéptidos de ADN III seleccionados a los que se unen anticuerpos típicamente tienen de 3 a 10 aminoácidos de longitud.

Se preparan anticuerpos monoclonales a partir células que secretan el anticuerpo deseado. En estos anticuerpos se explora la unión a polipéptidos normales o modificados o se explora la actividad agonista o antagonista, por ejemplo, la actividad mediada a través de un polipéptido de ADN III seleccionado. Los anticuerpos monoclonales y policlonales específicos habitualmente se unirán con una K_D de al menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente al menos aproximadamente 50 μ M y preferiblemente al menos aproximadamente 1 μ M o mejor.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de diversos huéspedes de mamífero, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales se encuentra en, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology* (Stites y col., eds. 4ª ed.) y referencias citadas en la misma; Harlow y Lane, mencionado anteriormente; Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1996); y Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975). En resumen, este procedimiento transcurre inyectando a un animal un inmunógeno. Después el animal se sacrifica y se toman células de su bazo, que se fusionan

con células de mieloma. Esto da como resultado una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse *in vitro*. Después, la población de hibridomas se selecciona para aislar clones individuales, de los que cada uno secreta una especie de anticuerpo única contra el inmunógeno. De esta manera, las especies de anticuerpo individuales obtenidas son los productos de células B únicas inmortalizadas y clonadas a partir del animal inmune generadas en respuesta a un sitio específico reconocido sobre la sustancia inmunógena.

Los procedimientos alternativos de inmortalización incluyen transformación con Virus de Epstein Barr, oncogenes o retrovirus u otros procedimientos conocidos en la técnica. En las colonias que surgen a partir de células inmortalizadas únicas se explora la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseada por el antígeno, y la producción de los anticuerpos monoclonales producidos por tales células se mejora mediante diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado (preferiblemente mamífero). Los polipéptidos de la presente invención y anticuerpos descritos en este documento se usan con o sin modificaciones e incluyen anticuerpos quiméricos tales como anticuerpos murinos humanizados.

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos recombinantes en vectores de fagos o similares (véase, por ejemplo, Huse y col., Science 246: 1275-1281 (1989); Ward y col., Nature 341: 544-546 (1989); y Vaughan y col., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996)).

Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán mediante unión, covalente o no covalente, a una sustancia que proporcione una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se describen exhaustivamente en la bibliografía tanto científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen, pero sin limitación, radionucleótidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimoluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que describen el uso de tales marcadores incluyen las Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. También se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Queen y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA: 86: 10029-10033 (1989)).

Los anticuerpos de esta descripción también se usan para cromatografía por afinidad en el aislamiento de polipéptidos de ADN III naturales o recombinantes. Por ejemplo, se preparan columnas con los anticuerpos unidos a un soporte sólido o partículas sólidas, tales como agarosa, Sephadex o similares, donde un lisado celular se hace pasar a través de la columna, se lava y se trata con concentraciones crecientes de un desnaturalizante suave, mediante lo cual se liberan los polipéptidos purificados.

Se pueden usar los anticuerpos para explorar bibliotecas de expresión para encontrar productos de expresión particulares tales como polipéptidos de ADN III normales o anormales, o para encontrar polipéptidos relacionados con referencia a un polipéptido de ADN III seleccionado. Opcionalmente, los anticuerpos en un procedimiento de este tipo se marcan con un resto que permita la detección fácil de la presencia del antígeno mediante unión a anticuerpo.

Los anticuerpos generados frente a polipéptidos también se pueden usar para generar anticuerpos anti-idiotípicos. Tales anticuerpos son útiles para detectar o diagnosticar diversas afecciones patológicas relacionadas con la presencia de los antígenos respectivos.

Los anticuerpos de esta descripción también se pueden administrar a un organismo (por ejemplo, un paciente humano) con propósitos terapéuticos. Los anticuerpos administrados a un organismo diferente de la especie en la que se han generado pueden ser inmunógenos. Por lo tanto, por ejemplo, anticuerpos murinos administrados a un ser humano pueden inducir una respuesta inmune frente al anticuerpo (por ejemplo, la respuesta de anti-anticuerpo de ratón de humano (HAMA)), particularmente después de administraciones múltiples. Las propiedades inmunógenas de los anticuerpos se reducen alterando partes, o todo, el anticuerpo en secuencias característicamente humanas, produciendo de ese modo anticuerpos quiméricos o humanos respectivamente.

Los anticuerpos humanizados (quiméricos) son moléculas de inmunoglobulina que comprenden una parte humana y no humana. La región de combinación con el antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico humanizado se obtiene a partir de una fuente no humana (por ejemplo, murina) y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere función efectora biológica, tal como citotoxicidad, a la inmunoglobulina) se obtiene a partir de una fuente humana. El anticuerpo quimérico humanizado tiene la especificidad de unión a antígeno de molécula de anticuerpo no humana y la función efectora conferida por la molécula de anticuerpo humano. Los especialistas en la técnica conocen una gran cantidad de procedimientos para generar anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431 y 4.975.369).

En general, los procedimientos usados para producir estos anticuerpos quiméricos consisten en las siguientes etapas (el orden de algunas etapas es intercambiable): (a) identificar y clonar el segmento de gen correcto que codifica la parte de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo; este segmento de gen (conocido como las regiones VDJ, variable, de diversidad y de unión para cadenas pesadas, o regiones VJ, variable y de unión para cadenas ligeras (o simplemente como la región V o Variable) puede estar en la forma de ADNc o genómica; (b) clonar los segmentos de gen que codifican la región constante o una parte deseada de los mismos; (c) ligar la región variable con la región constante de forma que el anticuerpo quimérico completo esté codificado en una forma transcribible y traducible; (d) ligar esta construcción en un vector que contenga un marcador seleccionable y regiones de control de gen tales como promotores,

potenciadores y señales de adición de poli(A); (e) amplificar esta construcción en una célula huésped (por ejemplo, bacteria); y (f) introducir el ADN en células eucariotas (transfección), con mayor frecuencia linfocitos de mamífero.

Se han manipulado anticuerpos de varias especificidades de unión a antígeno diferentes mediante estos protocolos para producir proteínas quiméricas (por ejemplo, anti-TNP; Boulianne y col., *Nature* 312: 643 (1984); y antígenos anti-tumorales: Sahagan y col., *J. Immunol.*, 137: 1066 (1986)). Análogamente, se han conseguido varias funciones efectoras diferentes enlazando secuencias nuevas a las que codifican la región de unión a antígeno. Algunos de estos efectores incluyen enzimas (Neuberger y col., *Nature* 312: 604 (1984)), regiones constantes de inmunoglobulina de otras especies y regiones constantes de otra cadena de inmunoglobulina (Sharon y col., *Nature* 309: 364 (1984); Tan y col., *J. Immunol.* 135: 3565-3567 (1985)).

En una realización preferida, se usa un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo. El nuevo vector de ADN recombinante contiene un "gen de reemplazo" para reemplazar todo o una parte del gen que codifica la región constante de inmunoglobulina en la línea celular (por ejemplo, un gen de reemplazo puede codificar todo o una parte de una región constante de una inmunoglobulina humana, una clase de inmunoglobulina específica, o un enzima, una toxina, un péptido biológicamente activo, un factor de crecimiento, inhibidor o un péptido engarzador para facilitar la conjugación a un fármaco, toxina u otra molécula, *N*) y una "secuencia diana" que permite la recombinación homóloga dirigida con secuencias de inmunoglobulina dentro de la célula productora de anticuerpo.

En otra realización, se usa un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo que tiene una función efectora deseada (por ejemplo, una región constante de una inmunoglobulina humana), en cuyo caso el gen de reemplazo contenido en el vector recombinante puede codificar todo o una parte de una región de un anticuerpo y la secuencia diana contenida en el vector recombinante permite la recombinación homóloga y la modificación de gen dirigida dentro de la célula productora de anticuerpo. En cualquier realización, cuando se reemplaza sólo una parte de la región variable o constante, el anticuerpo quimérico resultante puede definir el mismo antígeno y/o tener la misma función efectora y sin embargo estar alterado o mejorado de forma que el anticuerpo quimérico pueda demostrar una mayor especificidad de antígeno, mayor constante de unión por afinidad, mayor función efectora o mayor secreción y producción por la línea celular productora de anticuerpo transfectada, etc. Independientemente de la realización que se ha puesto en práctica, se pueden usar un procedimiento de selección para ADN integrado (a través de un marcador seleccionable), selección para producción de anticuerpo quimérico y clonación celular para obtener un clon de células que producen el anticuerpo quimérico.

Por tanto, un trozo de ADN que codifica una modificación para un anticuerpo monoclonal se puede dirigir directamente al sitio del gen de inmunoglobulina expresado dentro de una célula B o línea de células de hibridoma. Pueden usarse construcciones de ADN para cualquier modificación particular para alterar el producto proteico de cualquier línea celular o hibridoma. Un procedimiento de este tipo evita la tarea de clonar los genes de región variable de cadena tanto pesada como ligera de cada clon de células B que expresa una especificidad de antígeno útil. Además de evitar el procedimiento de clonar genes de región variable, el nivel de expresión de anticuerpo quimérico es mayor cuando el gen está en su emplazamiento cromosómico natural, en lugar de tener una posición aleatoria en el genoma. Se pueden encontrar procedimientos detallados para preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) en la Patente de Estados Unidos N° 5.482.856.

En otra realización, esta descripción proporciona anticuerpos completamente humanos frente a polipéptidos de ADN III seleccionados. Los anticuerpos humanos consisten completamente en secuencias de inmunoglobulina característicamente humanas. Los anticuerpos humanos de esta invención se pueden producir usando una amplia diversidad de procedimientos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.001.065, para una revisión).

En una realización preferida, los anticuerpos humanos de la presente descripción se producen inicialmente en células de trioma. Los genes que codifican los anticuerpos después se clonan y expresan en otras células, tales como células de mamífero no humano.

El enfoque general para producir anticuerpos humanos mediante tecnología de trioma se describe por Ostberg y col., *Hybridoma* 2: 361-367 (1983); Patente de Estados N° 4.634.664; y Patente de Estados Unidos N° 4.634.666. Las líneas de células productoras de anticuerpo obtenidas mediante este procedimiento se denominan triomas debido a que descienden de tres células; dos humanas y una de ratón. Se ha observado que los triomas producen anticuerpos más establemente que hibridomas normalmente preparados a partir de células humanas.

La preparación de células de trioma requiere una fusión inicial de una línea de células de mieloma de ratón con linfocitos B periféricos humanos no inmortalizados. Esta fusión genera una célula híbrida xenogénica que contiene cromosomas tanto humanos como de ratón (véase Engelman, mencionado anteriormente). Se seleccionan células xenogénicas que han perdido la capacidad de secretar anticuerpos. Preferiblemente se selecciona una célula xenogénica que sea resistente a un marcador seleccionable tal como 8-azaguanina. Las células que poseen resistencia a 8-azaguanina no pueden propagarse en medios de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) o azaserina-hipoxantina (AH).

La capacidad de secretar anticuerpos se confiere mediante una fusión adicional entre las células xenogénicas y linfocitos B inmunizados frente a un polipéptido de ADN III seleccionado o un epítipo del mismo. Los linfocitos B

se obtienen a partir del bazo, sangre o ganglios linfáticos de un donante humano. Si se desean anticuerpos frente a un antígeno o epítipo específico, es preferible usar ese antígeno o epítipo como el inmunógeno en lugar de un polipéptido de longitud completa. Como alternativa, se obtienen linfocitos B a partir de un individuo no inmunizado y estimulado con un polipéptido, o un epítipo del mismo, *in vitro*. En una variación adicional, se obtienen linfocitos B a partir de un individuo infectado, o inmunizado de otra manera, y después hiperinmunizado mediante exposición a un polipéptido de ADN III seleccionado durante aproximadamente siete a catorce días, *in vitro*.

Los linfocitos B inmunizados preparados mediante uno de los procedimientos anteriores se fusionan con una célula híbrida xenogénica por procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, las células se tratan con polietilenglicol al 40-50% de PM 1000-4000, a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 5-10 min. Las células se separan de la mezcla de fusión y se propagan en medio selectivo para los híbridos deseados. Cuando la célula híbrida xenogénica es resistente a 8-azaguanina, las células de trioma inmortalizadas se seleccionan convenientemente mediante pases sucesivos de células en medio HAT o AH. Por supuesto, son posibles otros procedimientos selectivos dependiendo de la naturaleza de las células usadas en la fusión. Los clones que secretan anticuerpos que tienen la especificidad de unión necesaria se identifican ensayando el medio de cultivo de triomas para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido de ADN III seleccionado o un epítipo del mismo. Los triomas que producen anticuerpos humanos que tienen la especificidad deseada se subclonan, por ejemplo, mediante la técnica de dilución limitante y se cultivan *in vitro*, en medio de cultivo, o se inyectan en animales huésped seleccionados y se cultivan *in vivo*.

Las líneas de células de trioma obtenidas después se ensayan para determinar la capacidad de unirse a un polipéptido o a un epítipo del mismo. Los anticuerpos se separan del medio de cultivo resultante o líquidos corporales mediante procedimientos de fraccionamiento de anticuerpo convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de DEAE celulosa y cromatografía de afinidad.

Aunque los triomas son genéticamente estables, no producen anticuerpos en niveles muy altos. Los niveles de expresión se pueden aumentar clonando genes de anticuerpo a partir del trioma en uno o más vectores de expresión y transformando con el vector una línea celular tal como las líneas celulares usadas típicamente para expresión de inmunoglobulinas recombinantes o humanizadas. Además de aumentar la producción de anticuerpo, esta estrategia ofrece la ventaja adicional de que se obtienen inmunoglobulinas a partir de una línea celular que no tiene un componente humano y, por lo tanto, no necesita someterse a la selección viral exhaustiva necesaria para líneas celulares humanas.

Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas secretadas por líneas de células de trioma se clonan de acuerdo con procedimientos, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa, conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, mencionado anteriormente, y Berger y Kimmel, mencionado anteriormente). Por ejemplo, se clonan genes que codifican cadenas pesada y ligera a partir de un ADN genómico de trioma o ADNc producido mediante transcripción inversa del ARN del trioma. La clonación se consigue mediante técnicas convencionales incluyendo el uso de cebadores de PCR que hibridan con las secuencias que flanquean o solapan con los genes, o segmentos de los genes, que se tienen que clonar.

Típicamente, las construcciones recombinantes comprenden segmentos de ADN que codifican una cadena pesada de inmunoglobulina humana completa y/o una cadena ligera de inmunoglobulina humana completa de una inmunoglobulina expresada por una línea de células de trioma. Como alternativa, se producen segmentos de ADN que codifican sólo una parte de los genes de anticuerpo primarios, partes que poseen actividades de unión y/o efectoras. Otras construcciones recombinantes contienen segmentos de genes de inmunoglobulina de línea de células de trioma fusionados a segmentos de otros genes de inmunoglobulina, particularmente segmentos de otras secuencias de región constante humana (cadena pesada y/o ligera). Se pueden seleccionar secuencias de región constante humana a partir de diversas fuentes de referencia incluyendo, pero sin limitación, las enumeradas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services (1987).

Además de los segmentos de ADN que codifican inmunoglobulinas anti-ORF o fragmentos de las mismas, se pueden diseñar fácilmente otras inmunoglobulinas modificadas sustancialmente homólogas y prepararse utilizando diversas técnicas de ADN recombinante conocidas por los especialistas en la técnica tales como mutagénesis dirigida (véase, Gillman y Smith, *Gene* 8: 81-97 (1979); Roberts y col., *Nature* 328: 731-734 (1987)). Tales segmentos modificados habitualmente conservarán capacidad de unión a antígeno y/o función efectora. Además, los segmentos modificados habitualmente no están tan cambiados de las secuencias genómicas de trioma originales como para evitar la hibridación con estas secuencias en condiciones rigurosas. Debido a que, como muchos genes, los genes de inmunoglobulina contienen regiones funcionales separadas, teniendo cada una, una o más actividades biológicas diferentes, los genes se pueden fusionar a regiones funcionales procedentes de otros genes para producir proteínas de fusión (por ejemplo, inmunotoxinas) que tengan propiedades novedosas o combinaciones novedosas de propiedades.

Las construcciones polinucleotídicas recombinantes típicamente incluirán una secuencia de control de expresión unida operativamente a las secuencias codificantes, incluyendo regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Preferiblemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas. Una vez que un vector se ha incorporado en el huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para niveles altos de expresión de las secuencias de nucleótidos y la recolección y purificación de las inmunoglobulinas humanas.

Estos vectores de expresión típicamente son replicables en los organismos huésped bien sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, resistencia a ampicilina o resistencia a higromicina, para permitir la detección de esas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. En general, se usan células procariotas o eucariotas para clonar las secuencias de ADN que codifican una cadena de inmunoglobulina humana.

Otros enfoques incluyen inmunización *in vitro* de sangre humana. En este enfoque, se producen linfocitos de sangre humana capaces de producir anticuerpos humanos. Se recoge sangre periférica humana del paciente y se trata para recuperar células mononucleares. Después, las células T supresoras se retiran y las células restantes se suspenden en un medio de cultivo tisular al cual se añade el antígeno y suero autólogo y, preferiblemente, un activador linfocítico inespecífico. Después, las células se incuban durante un periodo de tiempo para que produzcan el anticuerpo específico deseado. Después las células se pueden fusionar a células de mieloma humano para inmortalizar la línea celular, para permitir de ese modo la producción continua de anticuerpo (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.716.111).

En otro enfoque, se preparan hibridomas de ratón-humano que producen anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.506.132). Otros enfoques incluyen inmunización de ratones transformados para expresar genes de inmunoglobulina humana, y selección de presentación en fagos (Vaughan y col., mencionado anteriormente).

Por tanto, considerando lo anterior, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que los anticuerpos frente a polipéptidos de ADNFI III tienen numerosos usos. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos frente a los polipéptidos de ADNFI III para purificar los polipéptidos de ADNFI III de la presente invención usando cromatografía de afinidad, para detectar la presencia de un polipéptido de ADNFI III en una muestra (por ejemplo, en suero o líquido cerebroespinal (CSF)), para tratar o bloquear crecimiento tumoral. Como tales, los anticuerpos frente a los polipéptidos de ADNFI III tienen utilidades tanto de diagnóstico como terapéuticas.

F. Detección de ADNFI III

Frecuentemente, se desea determinar la presencia o ausencia de ADNFI III o cuantificar la expresión de polipéptidos o ácidos nucleicos de ADNFI III en una muestra. La detección de ADNFI III o antisueros frente a ADNFI III se consigue ensayando los productos de los ácidos nucleicos de ADNFI III de la invención, los propios ácidos nucleicos o los anticuerpos frente a polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos.

El ácido nucleico o el producto de ácido nucleico de ADNFI III seleccionado (es decir, un ARNm o polipéptido) se detecta preferiblemente y/o se cuantifica en una muestra biológica. Tales muestras incluyen, pero sin limitación, células astrogiales, cerebro, bazo, riñón o tejido pulmonar o muestra de biopsia extraída con aguja fina. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como secciones congeladas tomadas para propósitos histológicos.

La muestra se puede pretratar cuando sea necesario mediante dilución en una solución tampón apropiada o concentrarse, si se desea. Puede usarse cualquiera de varias soluciones tampón acuosas convencionales, empleando uno de una diversidad de tampones, tales como fosfato, Tris o similares, a pH fisiológico.

En una realización, la presente invención proporciona procedimientos para detectar y/o cuantificar la expresión génica de ADNFI III ensayando el gen subyacente (o un fragmento del mismo) o ensayando el transcrito del gen (ARNm). El ensayo puede ser para la presencia o ausencia del gen o del producto génico o para la cuantificación de los niveles de transcripción de los productos génicos.

En una realización preferida, se realizan ensayos de ácido nucleico con una muestra de ácido nucleico aislada a partir del organismo que se tiene que ensayar. En la realización más sencilla, dicha muestra de ácido nucleico es el ARNm total aislado a partir de una muestra biológica. El ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARNm genómico) se puede aislar a partir de la muestra de acuerdo con cualquiera de varios procedimientos conocidos por los especialistas en la técnica.

Los procedimientos de aislamiento de ADN o ARNm total son bien conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se describen con detalle procedimientos de aislamiento y purificación de ácidos nucleicos en el Capítulo 3 de Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes: Theory and Nucleic Acid Preparation* (1993).

Con frecuencia, es deseable amplificar la muestra de ácido nucleico antes de la hibridación. Los especialistas en la técnica conocen bien los procedimientos de amplificación "cuantitativa". Por ejemplo, la PCR cuantitativa implica co-amplificar simultáneamente una cantidad conocida de una secuencia de control usando los mismos cebadores. Esto proporciona un patrón interno que se puede usar para calibrar la reacción de PCR. Los protocolos detallados para PCR cuantitativa se proporcionan en *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (Innis y col., eds., 1990). Otros procedimientos de amplificación adecuados incluyen, pero sin limitación, los que se han descrito anteriormente.

Los especialistas en la técnica conocen bien los ensayos basados en amplificación (véase, por ejemplo, Innis, mencionado anteriormente). Las secuencias de ácido nucleico de ADNFI III proporcionadas son suficientes para enseñar

a un especialista a seleccionar de forma rutinaria cebadores para amplificar cualquier parte del gen. Se espera que un especialista esté familiarizado minuciosamente con la teoría y práctica de hibridación de ácidos nucleicos y selección de cebadores. La siguiente referencia proporciona una guía básica para la hibridación de ácidos nucleicos: *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (Gait, ed., 1984); *Kuijpers Nucleic Acids Research* 18(17): 5197 (1994); *Dueholm, J. Org. Chem.* 59: 5767-5773 (1994); y *Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* (1993). Innis, mencionado anteriormente, proporciona una visión de conjunto de la selección de cebadores. Además, los productos de amplificación de PCR se seleccionan opcionalmente en una matriz de polímero como se ha descrito en Fodor y col., *Science* 251: 767-777 (1991); Sheldon y col., *Clinical Chemistry* 39(4): 718-719 (1993); and Kozal y col., *Nature Medicine* 2(7): 753-759 (1996).

Más típicamente, los cebadores de amplificación tienen entre 8 y 100 nucleótidos de longitud, y preferiblemente entre aproximadamente 10 y 30 nucleótidos de longitud. Más típicamente, los cebadores están entre aproximadamente 15 y 25 nucleótidos de longitud.

Un especialista reconocerá que el extremo 3' de un cebador de amplificación es más importante para la PCR que el extremo 5'. Los investigadores han señalado productos de PCR en los que sólo unos pocos nucleótidos en el extremo 3' de un cebador de amplificación eran complementarios a un ADN que se tenía que amplificar. A este respecto, los nucleótidos en el extremo 5' de un cebador pueden incorporar características estructurales no relacionadas con el ácido nucleico diana; por ejemplo, en una realización preferida, se incorpora un sitio de hibridación de cebador de secuenciación (o un complemento para un cebador de este tipo, dependiendo de la aplicación) en el cebador de amplificación, donde el cebador de secuenciación se obtiene a partir de un cebador usado en un kit de secuenciación convencional, tal como uno que usa un cebador M13 o SP6 universal biotinilado o marcado con colorante. Como alternativa, los cebadores opcionalmente incorporan sitios de endonucleasas de restricción. Los cebadores se seleccionan de forma que no exista complementariedad entre ninguna secuencia conocida que sea probable que exista en la muestra que se tiene que amplificar y ninguna región de cebador constante. Un especialista apreciará que las regiones constantes en secuencias de cebador son opcionales.

Típicamente, todas las secuencias de cebador se seleccionan para hibridar sólo con un ADN perfectamente complementario, con la posibilidad de hibridación con falta de coincidencia más próxima de secuencias de ADN conocidas con probabilidad de existir en la muestra que se tiene que amplificar que tienen al menos aproximadamente del 50 al 70% de falta de coincidencia de hibridación, y preferiblemente el 100% de falta de coincidencia para los 5 nucleótidos terminales en el extremo 3' del cebador.

Los cebadores se seleccionan de manera que no se forme una estructura secundaria del cebador. Los cebadores autocomplementarios tienen malas propiedades de hibridación, debido a que las partes complementarias de los cebadores se autohibridan (es decir, forman estructuras de horquilla). Los cebadores también se seleccionan de manera que los cebadores no hibriden entre sí, evitando de ese modo la formación de dúplex de los cebadores en solución y la posible concatenación de los cebadores durante la PCR. Si existe más de una región constante en el cebador, las regiones constantes del cebador se seleccionan de forma que no se autohibriden o formen estructuras de horquilla.

Cuando los conjuntos de cebadores de amplificación (es decir, los cebadores 5' y 3' usados para la amplificación exponencial) son de una longitud única, los cebadores se seleccionan de forma que tengan aproximadamente la misma y preferiblemente exactamente la misma composición de bases global (es decir, la misma proporción de A+T a G+C de ácidos nucleicos): Cuando los cebadores son de longitudes diferentes, la proporción de A+T a G+C se determina seleccionando una temperatura de fusión térmica para la hibridación de ADN con cebador y seleccionando una proporción de A+T a G+C y longitud de sonda para cada cebador que tenga aproximadamente la temperatura de fusión térmica seleccionada.

Un especialista reconocerá que existe una diversidad de formas posibles de realizar las etapas de selección anteriores, y que son apropiadas las variaciones en estas etapas. Más típicamente, las etapas de selección se realizan usando programas informáticos sencillos para realizar la selección como se ha descrito anteriormente; sin embargo, opcionalmente todas las etapas se realizan manualmente. Un programa informático disponible para la selección de cebadores es el programa MacVector de Kodak. Además de programas disponibles en el mercado para la selección de cebadores, un especialista puede diseñar fácilmente programas sencillos para cualquiera de las etapas de selección preferidas. Los cebadores de amplificación se pueden seleccionar para proporcionar productos de amplificación que abarcan supresiones, truncamientos e inserciones específicas en una diana de amplificación, facilitando de ese modo la detección de anomalías específicas tales como la inserción de un transposón como se ha descrito en este documento.

Cuando se desea cuantificar el nivel de transcripción (y, por lo tanto la expresión) de un gen de ADN III en una muestra, la muestra de ácido nucleico es una en la que la concentración del transcrito o los transcritos de ARNm del gen, o la concentración de los ácidos nucleicos obtenidos a partir del transcrito o los transcritos de ARNm, es proporcional al nivel de transcripción (y, por lo tanto, el nivel de expresión) de ese gen. De forma similar, se prefiere que la intensidad de la señal de hibridación sea proporcional a la cantidad de ácido nucleico hibridado. Aunque se prefiere que la proporcionalidad sea relativamente estricta (por ejemplo, una duplicación en el índice de transcripción da como resultado una duplicación en el transcrito de ARNm en el grupo de ácido nucleico de muestra y una duplicación en la señal de hibridación), un especialista apreciará que la proporcionalidad puede ser más relajada e incluso no lineal. Por tanto, por ejemplo, un ensayo en el que una diferencia de 5 veces en la concentración de un ARNm diana da como resultado una diferencia de 3 a 6 veces en intensidad de hibridación es suficiente para la mayoría

de los propósitos. Cuando se requiere una cuantificación más precisa, se pueden ejecutar controles apropiados para corregir las variaciones introducidas en la preparación de muestra e hibridación como se ha descrito en este documento. Además, se pueden usar diluciones seriadas de ARNm diana “convencionales” para preparar curvas de calibración de acuerdo con métodos conocidos por los especialistas en la técnica. Por supuesto, cuando se desea una simple detección de la presencia o ausencia de un transcrito, no se requieren un control o calibración elaborados.

Además de lo anterior, la expresión de polipéptidos de ADNF III seleccionados también se puede detectar y/o cuantificar detectando o cuantificando el polipéptido expresado. Los polipéptidos se pueden detectar y cuantificar mediante cualquiera de varios procedimientos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitación, procedimientos bioquímicos analíticos tales como electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión y similares, o diversos procedimientos inmunológicos tales como reacciones de precipitina en líquido o en gel, inmunodifusión (única o doble), inmunoelectroforesis, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, transferencia de western y similares.

En una realización particularmente preferida, los polipéptidos de ADNF III se detectan en una separación electroforética de proteínas, más preferiblemente en una electroforesis de dos dimensiones, mientras que en una realización más preferida, los polipéptidos se detectan usando un inmunoensayo.

Como se usa en este documento, un inmunoensayo es un ensayo que utiliza un anticuerpo para unirse específicamente al analito (por ejemplo, un polipéptido de ADNF III que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N° 3). Por tanto, el inmunoensayo se caracteriza por la detección de la unión específica de un polipéptido a un anticuerpo anti-polipéptido, a diferencia del uso de otras propiedades físicas o químicas para aislar, fijar como objetivo y cuantificar el analito.

Como se ha indicado anteriormente, la presencia o ausencia de polipéptidos en una muestra biológica se puede determinar usando métodos electroforéticos. Los medios para detectar proteínas usando técnicas electroforéticas son bien conocidos por los especialistas en la técnica (véase, en general, Scopes, *Protein Purification* (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification* (1990)).

En una realización preferida, los polipéptidos de ADNF III se detectan y/o cuantifican usando cualquiera de varios ensayos de unión inmunológica bien reconocidos (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168) (para una revisión de los inmunoensayos generales, véase *Methods in Cell Biology* Volumen 37: *Antibodies in Cell Biology* (Asai, ed., 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites y Terr, eds., 7ª ed., 1991)). Los ensayos de unión inmunológicos (o inmunoensayos) típicamente utilizan un “agente de captura” para unirse específicamente y con frecuencia inmovilizar al analito. El agente de captura es un resto que se une específicamente al analito. En una realización preferida, el agente de captura es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido o polipéptidos o a subsecuencias polipeptídicas (por ejemplo, dominios antigénicos que se unen específicamente al anticuerpo). En una segunda realización preferida, el agente de captura es el polipéptido y el analito es antisuero que comprende un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido.

Los inmunoensayos con frecuencia utilizan un agente marcador para unirse específicamente y marcar al complejo de unión formado por el agente de captura y el analito. El agente marcador puede ser uno de los restos que constituye el complejo anticuerpo/analito. Por lo tanto, el agente marcador puede ser un polipéptido marcado o un anticuerpo anti-polipéptido marcado. Como alternativa, el agente marcador puede ser un tercer resto, tal como otro anticuerpo, que se une específicamente al complejo anticuerpo/polipéptido.

En una realización preferida, el agente marcador es un segundo anticuerpo que porta un marcador. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador pero, a su vez, puede unirse a un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie a partir de la cual se ha obtenido el segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, al cual se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como una estreptavidina marcada con enzima.

También se pueden usar como agente marcador otras proteínas capaces de unirse específicamente a regiones constantes de inmunoglobulina, tales como proteína A o proteína G estreptocócica. Estas proteínas son constituyentes normales de las paredes celulares de bacterias estreptocócicas. Muestran una reactividad no inmunógena marcada con regiones constantes de inmunoglobulina de una diversidad de especies (véase, en general, Kronval y col., *J. Immunol.* 111: 1401-1406 (1973), y Akerstrom y col., *J. Immunol.* 135: 2589-2542(1985)).

A lo largo de los ensayos se realizan opcionalmente etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferiblemente de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato de ensayo, analito, volumen de solución, concentraciones y similares. Habitualmente, los ensayos se realizarán a temperatura ambiente, aunque se pueden realizar en un intervalo de temperaturas, tales como 10°C a 40°C.

Los inmunoensayos para detectar polipéptidos puede ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son ensayos en los que la cantidad del analito capturado se mide directamente. En un ensayo de “sándwich” preferido, por ejemplo, el agente de captura se puede unir directamente a un sustrato sólido en el que

se inmoviliza. Este agente de captura inmovilizado después captura el analito presente en la muestra de ensayo. El analito inmovilizado de este modo después se une a un agente marcador, tal como un segundo anticuerpo que porta un marcador. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede carecer de un marcador pero puede unirse, a su vez, a un tercer anticuerpo marcado específico para anticuerpos de la especie de la que se obtiene el segundo anticuerpo. El segundo se puede modificar con un resto detectable, tal como biotina, a la cual se puede unir específicamente una tercera molécula marcada, tal como una estreptavidina marcada con enzima.

En ensayos competitivos, la cantidad inicial de analito presente en la muestra se mide indirectamente midiendo la cantidad de un analito añadido (exógeno) desplazado (o desplazado por competición) de un agente de captura mediante el analito presente en la muestra. En un ensayo competitivo, una cantidad conocida de, en este caso, analito se añade a la muestra y la muestra después se pone en contacto con el agente de captura. La cantidad de analito exógeno unido al agente de captura es inversamente proporcional al analito inicial presente en la muestra.

Los inmunoensayo en el formato de unión competitiva también se pueden usar para determinaciones de reactividad cruzada. Por ejemplo, una proteína al menos parcialmente modificada por la SEC ID N°: 1 ó 3, se puede inmovilizar a un soporte sólido. Se añaden proteínas relacionadas (por ejemplo, ADNF I) al ensayo que compiten por la unión del antisuero al antígeno inmovilizado. La capacidad de las proteínas añadidas de competir por la unión del antisuero a la proteína inmovilizada se compara con la capacidad del polipéptido de ADNF III codificado por la SEC ID N°: 1 ó 3 de competir consigo mismo. El porcentaje de reactividad cruzada para las proteínas anteriores se calcula usando cálculos convencionales. Los antisueros con menos del 10% de reactividad cruzada con cada una de las proteínas añadidas se seleccionan y se agrupan. Los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada se retiran opcionalmente del antisuero agrupado mediante inmunoabsorción con las proteínas consideradas añadidas, por ejemplo, homólogos relacionados de manera distante.

Después, los antisueros inmunoabsorbidos y agrupados se usan en un inmunoensayo de unión competitiva como se ha descrito anteriormente para comparar una segunda proteína, que se cree que tal vez es un alelo, homólogo interespecie o variante polimórfica de ADNF III con la proteína inmunógena (es decir, ADNF III de SEC ID N°: 1 ó 3). Para realizar esta comparación, cada una de las dos proteínas se ensaya en una amplia variedad de concentraciones y se determina la cantidad de cada proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión del antisuero a la proteína inmovilizada. Si la cantidad de la segunda proteína necesaria para inhibir el 50% de la unión es menor que 10 veces la cantidad de la proteína codificada por la SEC ID N°: 1 ó 3 que se necesita para inhibir el 50% de unión, entonces se dice que la segunda proteína se une específicamente a los anticuerpos policlonales generados para un inmunógeno de ADNF III.

En una realización preferida, se usa análisis de transferencia de western (inmunotransferencia) para detectar y cuantificar la presencia de polipéptidos de ADNF III seleccionados en la muestra. La técnica comprende generalmente separar proteínas de muestra mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir las proteínas separadas a un soporte sólido adecuado, (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nylon o filtro de nylon derivatizado) e incubar la muestra con los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido seleccionado. Los anticuerpos se unen específicamente al polipéptido en el soporte sólido. Estos anticuerpos opcionalmente se marcan directamente o, como alternativa, opcionalmente se detectan posteriormente usando anticuerpos marcados (por ejemplo, anticuerpos de oveja anti-ratón marcados) que se unen específicamente al polipéptido seleccionado.

Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayo de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (por ejemplo, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los químicos liberados después se detectan de acuerdo con técnicas convencionales (véase, Monroe y col., Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41 (1986)). También se prefieren ensayos ligados a enzimas (por ejemplo, ensayos ELISA).

Los ensayos de esta invención se puntúan (como positivo o negativo para ADNF III o un polipéptido de ADNF III seleccionado) de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos por los especialistas en la técnica. El procedimiento particular de puntuación dependerá del formato de ensayo y la elección de marcador. Por ejemplo, un ensayo de transferencia de western se puede puntuar visualizando el producto coloreado producido por el marcador enzimático. Una banda o punto coloreado claramente visible en el peso molecular correcto se puntúa como un resultado positivo, mientras que la ausencia de un punto o banda claramente visible se puntúa como un negativo. En una realización preferida, un ensayo positivo mostrará una intensidad de señal (por ejemplo, cantidad de polipéptido) al menos el doble de la del fondo y/o el control y más preferiblemente al menos 3 veces o incluso al menos 5 veces mayor que el fondo y/o el control negativo.

Un especialista en la técnica entenderá que con frecuencia es deseable reducir la unión no específica en inmunoensayos. Particularmente, cuando el ensayo implica un antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios para reducir tal unión no específica se conocen bien por los especialistas en la técnica. Típicamente, esto implica revestir el sustrato con una composición proteínica. En particular, composiciones de proteína tales como albúmina sérica bovina (BSA), leche en polvo desnatada y gelatina.

El marcador particular o grupo detectable usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Tales marcadores detectables se han

desarrollado bien en el campo de inmunoensayos y, en general, se puede aplicar la mayoría de cualquier marcador útil en tales procedimientos a la presente invención. Por tanto, un marcador es cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo de texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Como se ha indicado anteriormente, se puede emplear una amplia diversidad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el compuesto, necesidades de estabilidad, instrumentación disponible y disposiciones de desechos.

Con frecuencia, los marcadores no radiactivos se fijan por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. Después, el ligando se une a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que se puede detectar intrínsecamente o está unida covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Se pueden usar varios ligandos y anti-ligandos. Cuando un ligando tiene un anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, el mismo se puede usar junto con los anti-ligandos marcados de origen natural. Como alternativa, se puede usar cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo.

Las moléculas también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señal, por ejemplo, mediante conjugación con una enzima o un fluoróforo. Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glucosidasas u óxidoreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazinodionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas marcadores o productores de señal que se puedan usar, véase la Patente de Estados Unidos N° 4.391.904).

Los medios para detectar marcadores se conocen bien por los especialistas en la técnica. Por tanto, por ejemplo, cuando el marcador es un marcador radiactivo, los medios para detección incluyen un contador de escintilación o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar excitando el fluorocromo con la longitud de onda apropiada de luz y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos acoplado por carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, los marcadores enzimáticos se puede detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, los marcadores colorimétricos sencillos se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Por tanto, en diversos ensayos de varilla, el oro conjugado con frecuencia parece rosa, mientras que diversas perlas conjugadas parecen del color de la perla.

Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, se pueden usar ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, partículas revestidas con antígenos se aglutinan mediante muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, ninguno de los componentes necesita marcarse y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante inspección visual sencilla.

Como se ha mencionado anteriormente, dependiendo del ensayo, se pueden unir diversos componentes, incluyendo el antígeno, anticuerpo diana o anti-anticuerpo, a una superficie sólida. En la técnica se conoce muchos procedimientos para inmovilizar biomoléculas a una diversidad de superficies sólidas. Por ejemplo, la superficie sólida puede ser una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), una placa de microtitulación (por ejemplo, PVC, polipropileno o poliestireno), un tubo de ensayo (vidrio o plástico), una varilla (por ejemplo, vidrio, PVC, polipropileno, poliestireno, látex y similares), un tubo de microcentrífuga o una perla de vidrio o plástico. El componente deseado se puede unir covalentemente o fijar no covalentemente mediante unión no específica.

Se puede emplear una amplia diversidad de polímeros orgánicos e inorgánicos, tanto naturales como sintéticos, como el material para la superficie sólida. Los polímeros ilustrativos incluyen polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), rayón, nylon, poli(vinil butirato), difluoruro de polivinilideno (PVDF), siliconas, poliformaldehído, celulosa, acetato de celulosa, nitrocelulosa y similares. Otros materiales que se pueden emplear incluyen papel, vidrios, cerámicos, metales, metaloides, materiales semiconductores, cementos o similares. Además, se incluyen sustancias que forman geles, tales como proteínas (por ejemplo, gelatinas), se pueden usar lipopolisacáridos, silicatos, agarosa y poli(acrilamidas). Los polímeros que forman varias fases acuosas, tales como dextranos, polialquilenglicoles o tensioactivos, tales como fosfolípidos, sales de alquil amonio de cadena larga (12-24 átomos de carbono) y similares también son adecuados. Cuando la superficie sólida es porosa, se pueden emplear diversos tamaños de poro dependiendo de la naturaleza del sistema.

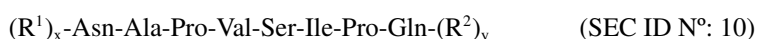
En la preparación de la superficie se puede emplear una pluralidad de materiales diferentes, particularmente como laminados, para obtener diversas propiedades. Por ejemplo, se pueden usar revestimientos de proteína, tales como gelatina, para evitar unión no específica, simplificar la conjugación covalente, mejorar la detección de señal o similares.

Si se desea unión covalente entre un compuesto y la superficie, habitualmente la superficie será polifuncional o capaz de polifuncionalizarse. Los grupos funcionales que pueden estar presentes en la superficie y usarse para el enlace pueden incluir ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etilénicos, grupos hidroxilo, grupos mercapto y similares. La manera de enlazar una amplia diversidad de compuestos a diversas superficies se conoce bien y se ilustra ampliamente en la bibliografía (véase, por ejemplo, *Immobilized Enzymes* (Chibata, ed. 1978); y Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.* 245: 3059 (1970)).

Además de enlace covalente, se pueden usar diversos procedimientos para unir de forma no covalente un componente de ensayo. La unión no covalente típicamente es absorción no específica de un compuesto a la superficie. Típicamente, la superficie se bloquea con un segundo compuesto para evitar la unión no específica de componentes de ensayo marcados. Como alternativa, la superficie se diseña de forma que se une de forma no específica a un componente pero no se une significativamente a otro. Por ejemplo, una superficie que lleva una lectina tal como Concanavalina A se unirá a un compuesto que contiene hidrato de carbono pero no a una proteína marcada que carece de glucosilación. Diversas superficies sólidas para el uso en fijación no covalente de componentes de ensayo se revisan en las Patentes de Estados Unidos N° 4.447.576 y 4.254.082.

G. Procedimientos Para Evitar Muerte de Células Neuronales Usando Polipéptidos de ADNF III Neurotróficos

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento para evitar muerte de células neuronales, comprendiendo el procedimiento poner en contacto las células neuronales con un polipéptido de Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III en una cantidad suficiente para evitar muerte de células neuronales. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:



y variaciones conservativamente modificadas de la misma.

En la fórmula anterior, R^1 es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos en la que cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo constituido por aminoácidos de origen natural. La expresión “seleccionado independientemente” se usa en este documento para indicar que los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^1 pueden ser idénticos o diferentes (por ejemplo, todos los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos pueden ser treonina, etc.). Además, como se ha explicado previamente, los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^1 pueden ser aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos adecuados que se pueden usar para formar la secuencia de aminoácidos R^1 incluyen, pero sin limitación, los enumerados en la Tabla I, anteriormente.

Como con R^1 , R^2 , en la fórmula anterior, es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos en la que cada aminoácido se selecciona independientemente entre el grupo constituido por aminoácidos de origen natural.

Además, como con R^1 , los aminoácidos que forman la secuencia de aminoácidos R^2 pueden ser idénticos o diferentes, y pueden ser aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos adecuados que se pueden usar para formar R^2 incluyen, pero sin limitación, los enumerados en la Tabla I, anteriormente.

Dentro de la fórmula anterior, x e y se seleccionan independientemente y son iguales a cero o uno. La expresión seleccionados independientemente se usa en este documento para indicar que x e y pueden ser idénticos o diferentes. Por ejemplo, x e y pueden ser ambos cero o, como alternativa, x e y pueden ser ambos uno. Además, x puede ser cero e y puede ser uno, o, como alternativa, x puede ser uno e y puede ser cero. Además, si tanto x como y son uno, las secuencias de aminoácidos R^1 y R^2 pueden ser las mismas o diferentes. Como tal, las secuencias de aminoácidos R^1 y R^2 se seleccionan independientemente. Si R^1 y R^2 son iguales, las mismas son idénticas en términos tanto de longitud de cadena como de composición de aminoácidos. Por ejemplo, tanto R^1 como R^2 pueden ser Val-Leu-Gly-Gly-Gly (SEC ID N°: 13). Si R^1 y R^2 son diferentes, éstas puedan diferir entre sí en términos de longitud de cadena y/o composición de aminoácidos y/o orden de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, R^1 puede ser Val-Leu-Gly-Gly-Gly (SEC ID N°: 13), mientras que R^2 puede ser Val-Leu-Gly-Gly (SEC ID N°: 14). Como alternativa, R^1 puede ser Val-Leu-Gly-Gly-Gly (SEC ID N°: 13), mientras que R^2 puede ser Val-Leu-Gly-Gly-Val (SEC ID N°: 15). Como alternativa, R^1 puede ser Val-Leu-Gly-Gly-Gly, mientras que R^2 puede ser Gly-Val-Leu-Gly-Gly (SEC ID N°: 16).

Dentro del campo de aplicación de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente se prefieren polipéptidos de ADNF III en los que x es uno, R^1 es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Glu-Gly; y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18); y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Se pueden añadir aminoácidos adicionales tanto al extremo N como al extremo

C del sitio activo recién descubierto sin pérdida de actividad biológica como se prueba mediante el hecho de que el factor de crecimiento de ADNF III intacto muestra actividad biológica extraordinaria.

Como se ha explicado previamente, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se puedan usar en el tratamiento de deficiencias neurológicas y para la prevención de muerte de células neuronales. Por ejemplo, tales polipéptidos de ADNF III se pueden usar para evitar la muerte de células neuronales incluyendo, pero sin limitación, neuronas de la médula espinal, neuronas del hipocampo, neuronas de la corteza cerebral y neuronas colinérgicas. Más particularmente, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden usar en la prevención de muerte celular asociada con (1) gp120, la proteína de envuelta de VIH; (2) ácido *N*-metil-D-aspartico (excito-toxicidad); (3) tetrodotoxina (bloqueo de actividad eléctrica); y (4) péptido β -amiloide, una sustancia relacionada con degeneración neuronal en enfermedad de Alzheimer. Cada uno de los diversos procedimientos para usar los polipéptidos de ADNF III de la presente invención para evitar la muerte o la lesión de células neuronales se explicará con mayor detalle más adelante en este documento. A partir de estos ejemplos, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden usar de una manera similar para evitar muerte de células neuronales asociada con varias enfermedades o deficiencias neurológicas diferentes.

Con respecto a esto, ahora se ha descubierto que los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se pueden usar para evitar muerte de células neuronales inducida por gp120. Por tanto, administrando una cantidad eficaz de un polipéptido de ADNF III de la presente invención a un paciente infectado con el virus VIH-1, se puede evitar la muerte de células neuronales inducida por gp120. Como tal, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar muerte de células neuronales en un paciente infectado con virus de inmunodeficiencia humana, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente un polipéptido de Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III en una cantidad suficiente para evitar la muerte de células neuronales y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

(R¹)_x-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-(R²)_y (SEC ID N°: 10).

El análisis anterior que concierne a R¹, R², x e y se puede aplicar completamente a los polipéptidos de ADNF III usados en este procedimiento de la presente invención y, por lo tanto, no se repetirá con respecto a este procedimiento particular. Dentro del alcance de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Leu-Gly-Gly-; y es uno; y R² es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y es uno; y R² es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18); y es uno; y R² es -Gln-Ser.

Además, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que usando los contenidos que se han expuesto anteriormente con respecto al diseño y la síntesis de polipéptidos de ADNF III y el ensayo de Brenneman, y col., Nature 335: 636 (1988), cuyos contenidos se incorporan de este modo en su totalidad como referencia, un especialista habitual en la técnica puede identificar otros polipéptidos de ADNF III que se pueden usar para evitar la muerte celular asociada con gp120.

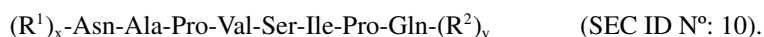
Además de lo anterior, también se ha descubierto que los polipéptidos de ADNF III se pueden usar para evitar la muerte de células neuronales asociada con toxicidad por NMDA en cultivos de corteza cerebral disociados. Como tal, en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar muerte de células neuronales asociada con excito-toxicidad inducida por estimulación con *N*-metil-D-aspartato, comprendiendo el procedimiento poner en contacto estas células neuronales con un polipéptido de Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III en una cantidad suficiente para evitar muerte de células neuronales. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

(R¹)_x-Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln-(R²)_y (SEC ID N°: 10).

El análisis anterior que concierne a R¹, R², x e y se puede aplicar completamente a los polipéptidos de ADNF III usados en este procedimiento de la presente invención y, por tanto, no se repetirá con respecto a este procedimiento particular. Dentro del alcance de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Leu-Gly-Gly-; y es uno; y R² es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y es uno; y R² es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R¹ es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18); y es uno; y R² es -Gln-Ser.

Además, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que usando los contenidos que se han expuesto anteriormente con respecto al diseño y la síntesis de polipéptidos de ADNF III y el ensayo de Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996), un especialista habitual en la técnica puede identificar otros polipéptidos de ADNF III que se pueden usar para evitar la muerte celular asociada con excito-toxicidad inducida por estimulación con *N*-metil-D-aspartato.

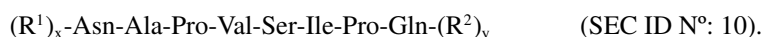
Además de lo anterior, también se ha descubierto que los polipéptidos de ADNF III de la presente invención pueden evitar la muerte de células neuronales asociada con la enfermedad de Alzheimer. Se ofrece un modelo *in vitro* para la enfermedad de Alzheimer por neurotoxicidad por β -amiloide. Como tal, en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para evitar muerte de células neuronales inducida por el péptido β -amiloide en un paciente aquejado o afectado por enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente un polipéptido de Factor Neutrónico Dependiente de Actividad (ADNF) III en una cantidad suficiente para evitar muerte de células neuronales y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:



El análisis anterior que concierne a R^1 , R^2 , x e y se puede aplicar completamente a los polipéptidos de ADNF III usados en este procedimiento de la presente invención y, por tanto, no se repetirá con respecto a este procedimiento particular. Dentro del alcance de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Gly-Gly-; y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18); y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser.

Además, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que usando los contenidos que se han expuesto anteriormente con respecto al diseño y la síntesis de polipéptidos de ADNF III y los ensayos expuestos por Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996), un especialista habitual en la técnica puede identificar otros polipéptidos de ADNF III que se pueden usar para evitar la muerte celular inducida por el péptido β -amiloide en un paciente aquejado o afectado por enfermedad de Alzheimer.

Además de lo anterior, también se ha descubierto que los polipéptidos de ADNF III de la presente invención pueden aliviar la alteración del aprendizaje producida por bloqueo colinérgico. Como tal, en otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para aliviar la alteración del aprendizaje producida por bloqueo colinérgico en un paciente aquejado o afectado por enfermedad de Alzheimer, comprendiendo el procedimiento administrar al paciente un polipéptido de Factor Neutrónico Dependiente de Actividad III en una cantidad suficiente para evitar muerte de células neuronales y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y variaciones conservativamente modificadas de las mismas. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:



El análisis anterior que concierne a R^1 , R^2 , x e y se puede aplicar completamente a los polipéptidos de ADNF III usados en este procedimiento de la presente invención y, por tanto, no se repetirá con respecto a este procedimiento particular. Dentro del alcance de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Gly-Gly-; y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno; R^1 es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18); y y es uno; y R^2 es -Gln-Ser.

Además, será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que usando los contenidos que se han expuesto anteriormente con respecto al diseño y la síntesis de polipéptidos de ADNF III y los ensayos expuestos por Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93: 427-432 (1996), un especialista habitual en la técnica puede identificar otros polipéptidos de ADNF III que se pueden usar para aliviar la alteración del aprendizaje producida por bloqueo colinérgico en un paciente aquejado o afectado por enfermedad de Alzheimer.

Además de lo anterior, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención son útiles en el tratamiento y diagnóstico de patologías neurodegenerativas que incluyen, pero sin limitación, las que surgen a partir de una patología y/o que tienen un mecanismo excitotóxico/isquémico. Por ejemplo, los cerebros post-mortem de Alzheimer demuestran expresión aumentada de ARNm de ADNF III en comparación con tejido cerebral sin Alzheimer.

ES 2 331 595 T3

Las patologías que se beneficiarían de las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico de esta invención incluyen afecciones (enfermedades y lesiones) que conducen a muerte de células neuronales y/o patología neuronal sub-lethal que incluyen, por ejemplo, las siguientes:

- 5 patologías neurodegenerativas que implican múltiples sistemas neuronales y/o tronco cerebral incluyendo enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA.

En aún otro aspecto más, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno de los polipéptidos de ADNF III que se han descrito previamente en una cantidad suficiente para mostrar actividad neuroprotectora/neutrófica y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, el polipéptido de ADNF III tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC ID N° 1, SEC ID N° 3. En otra realización, el polipéptido de ADNF III comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

15 $(R^1)_x$ -Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln- $(R^2)_y$ (SEC ID N°: 10).

El análisis previo con referencia a R^1 , R^2 , x e y se puede aplicar completamente a los polipéptidos de ADNF III usados en este procedimiento de la presente invención, y por tanto, no se repetirá con respecto a este procedimiento particular. Dentro del alcance de la fórmula anterior, se prefieren determinados polipéptidos de ADNF III, concretamente aquellos en los que tanto x como y son cero (es decir, ADNF III-8). Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno, R^1 es Gly-Gly; e y es cero. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno, R^1 es Leu-Gly-Gly-; y es uno y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno, R^1 es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17); y es uno; y R^2 es -Gln-Ser. Igualmente preferidos son los polipéptidos de ADNF III en los que x es uno, R^1 es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly (SEC ID N°: 18); y es uno; y R^2 es Gln-Ser.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para el uso en una diversidad de sistemas de administración de fármaco. Las formulaciones adecuadas para el uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences (17ª ed., 1985)), inc. Además, para una breve revisión de procedimientos para suministro de fármacos, véase Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Debido a su capacidad de aumentar el crecimiento y supervivencia de neuronas, los polipéptidos de ADNF III tienen amplios usos en el tratamiento de deficiencias neurológicas que se producen, por ejemplo, por desarrollo neuronal, envejecimiento, enfermedades neurodegenerativas o lesión de médula espinal. Como tal, la presente invención proporciona composiciones terapéuticas o medicamentos que comprenden uno o más de los polipéptidos de ADNF III descritos en este documento anteriormente en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en los que la cantidad del polipéptido de ADNF III es suficiente para proporcionar un efecto terapéutico.

En una aplicación terapéutica, los polipéptidos de ADNF III de la presente invención se incorporan en composiciones farmacéuticas que tienen por objeto administración parenteral, tópica, oral o local. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intradérmica, o por vía intramuscular o por vía intranasal. Por tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de un polipéptido de ADNF III, como se ha descrito anteriormente, disuelto o suspendido en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, incluyendo, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas o, las mismas se pueden filtrar a esterilidad. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para uso tal cual o liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se necesite para aproximarse a las condiciones fisiológicas incluyendo agentes de ajuste de pH y tamponamiento, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos convencionales no tóxicos sólidos que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Para administración oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable se forma incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como los vehículos que se han enumerado previamente, y en general el 10-95% de ingrediente activo y más preferiblemente a una concentración del 25%-75%.

Para administración en aerosol, los polipéptidos de ADNF III se suministran preferiblemente en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propulsor. El tensioactivo tiene que ser, por supuesto, no tóxico y preferiblemente soluble en el propulsor. Los agentes representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. También se pueden emplear ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. También se puede incluir un vehículo, según se desee, como con, por ejemplo, lecitina para administración intranasal.

En aplicaciones terapéuticas, los polipéptidos de ADNF III de la invención se administran a un paciente en una cantidad suficiente para evitar muerte de células neuronales. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como “dosis terapéuticamente eficaz”. Las cantidades eficaces para este uso dependerán, por ejemplo, del polipéptido de ADNF III particular empleado, del tipo de muerte o lesión de células neuronales que se tiene que evitar, de la manera de administración, del peso y estado general de salud del paciente y del criterio del médico tratante. Por ejemplo, para la prevención de muerte de células neuronales, una cantidad de polipéptido de ADNF III que está dentro del intervalo de una dosis de 100 ng a 10 mg proporcionada por vía intranasal una vez al día (por ejemplo, por la tarde) sería una cantidad terapéuticamente eficaz.

La invención se describirá con mayor detalle a modo de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos y no tienen por objeto limitar la invención de ninguna manera. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que se pueden cambiar o modificar para producir básicamente los mismos resultados.

Ejemplos

A. Materiales y procedimientos

1. Cultivos Celulares

a. Astrocitos: se prepararon astrocitos de ratas de 1 día de edad (Sprague-Dawley). Las cortezas cerebrales de 10-12 crías se disecaron rápidamente en medio HBSS estéril (solución salina equilibrada de Hanks). Después de que se hubieran retirado las meninges cuidadosamente, las células se disociaron mecánicamente y después se trataron con tripsina al 0,125% durante 20 min. Finalmente se añadió medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal de ternero al 10%. Después de la mezcla, la suspensión de células se sembró en matraces de 75 cm² a una concentración de 15x10⁵ células por matraz y se incubó con CO₂ al 10% a 37°C. El medio en el sistema de cultivo estaba constituido por DMEM, FBS al 10%, 50 mg/ml de gentamicina y una mezcla de sal de sodio de penicilina G, sulfato de estreptomicina y nistatina (100 ml/100 ml de medio de una solución madre de 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 1250 U/ml de nistatina). El medio de cultivo se cambió 2 y 5 días después de la siembra. Seis días después de la siembra, para extraer las neuronas y/u oligodendrocitos residuales, las células se separaron 1:1. Éstas se trataron de nuevo con tripsina, se extrajeron del matraz y se suspendieron en suero fetal de ternero al 10%/DMEM. Los cultivos se sembraron de nuevo en matraces de 75 cm² y cuatro días después se usaron como una fuente de medio acondicionado. Los cultivos de dos semanas de edad se lavaron tres veces con 15 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se incubaron durante 3 horas con 15 ml de PBS que contenía VIP 0,25 nM (una solución madre contenía 1 mg de VIP disuelto en 0,3 ml de ácido acético 0,01 N y diluido después de esto). El medio acondicionado se recogió, los medios se centrifugaron durante 10 min a 1000xg para sedimentar células intactas y se almacenó a -20°C hasta el uso.

b. línea celular de Neuroblastoma: los cultivos, preparados como anteriormente (Lilling, J. Mol. Neurosci. 5: 231-239 (1994/5)), se lavaron tres veces con 15 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se incubaron durante un periodo de 3 horas con 15 ml de PBS que contenía VIP 0,25 nM (una solución madre contenía 1 mg de VIP disuelto en 0,3 ml de ácido acético 0,01 N como anteriormente). El medio acondicionado se recogió como anteriormente.

2. Purificación de ADNF

El ADNF se purificó de acuerdo con el procedimiento descrito por Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996)). En resumen, cultivos astrogliales de 2 semanas de edad (matraces confluentes de 75 cm²) se lavaron tres veces con PBS y se recogió medio acondicionado (10 ml de PBS/matraz) durante una incubación de 3 h con VIP 0,1 nM (una cantidad que se había demostrado previamente que era óptima para liberar actividad neurotrófica de células astrogliales). El medio se centrifugó (3.000 xg durante 10 min) y se dializó (punto de corte 3,5 kD) frente a tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, 4°C. La neuroprotección se ensayó inicialmente en cultivos de médula espinal bloqueada con tetrodotoxina. La razón para elegir células de cultivo bloqueadas con tetrodotoxina para ensayos de actividades promotoras de supervivencia secretadas de células gliales en presencia de VIP era que el tratamiento con tetrodotoxina 1 µM bloqueaba la actividad sináptica espontánea, inhibiendo de este modo la síntesis (Agostan y col., Mol. Brain. Res. 10: 235-240 (1991)) y liberación (Brenneman y col., Peptides 6(2): 35-39 (1985)) de VIP endógeno, convirtiendo el sistema en dependiente de VIP exógeno.

La primera etapa de purificación en el aislamiento de ADNF fue cromatografía en DEAE-Sephacel (Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Suecia) de medio acondicionado de astroglia estimulado con VIP (300 ml, 6-8 mg de proteína) se cargó en una columna de DEAE-Sephacel (0,75 cm de diámetro y 3 cm de longitud) preequilibrada con tampón pirofosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. La columna se lavó secuencialmente con 40 ml de tampón pirofosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) y después el mismo tampón complementado con concentraciones crecientes de NaCl, 0,1 M, 0,26 M, 0,5 M, 1,0 M, 2 M y 3 M. Las fracciones de columna, después de diálisis frente a agua (1:10.000), se añadieron junto con tetrodotoxina 1 µM a los cultivos de ensayo de médula espinal. La actividad neuroprotectora se

determinó evaluando los efectos sobre el número de neuronas de médula espinal supervivientes. En el eluato de NaCl 2 M se observaron aumentos significativos en recuentos de células neuronales. La segunda etapa de purificación fue separación por tamaño de la fracción de DEAE activa (eluato de NaCl 2 M) en cromatografía líquida de resolución rápida (FPLC: Pharmacia Diagnostics AB). La fracción de NaCl 2 M (correspondiente a 300 ml de preparación de medio acondicionado original) se dializó frente a agua, se liofilizó y se resuspendió en 0,5 ml de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,3) que contenía NaCl 0,15 M. Se cargaron alícuotas de 0,25 ml en una FPLC de 12 columnas (preenvasadas HR 10/30) Superose™ (Pharmacia Diagnostics AB). Se recogieron fracciones (0,5 ml, 0,4 ml/min) de la columna, se diluyeron (1:10.000) y se ensayaron en el ensayo de supervivencia neuronal. Se observaron aumentos significativos en recuentos de células neuronales en las fracciones de columna 22 y 31. Una tercera etapa de purificación de la actividad neuroprotectora de bajo peso molecular incluyó FPLC de interacción hidrófoba (Alkyl-Superose™ HR5/5, Pharmacia Diagnostics AB). La columna se lavó con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) y se equilibró con tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) que contenía (NH₄)₂SO₄ 2,0 M. La muestra (0,5 ml de la fracción 31 eluida de la FPLC de fraccionamiento por tamaño) se dializó exhaustivamente frente a agua desionizada, se liofilizó y se resuspendió en tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0, que contenía (NH₄)₂SO₄ 1,43 M. La elución (fracciones de 1 ml, 0,5 ml/min) se realizó con un gradiente lineal de eliminación de sal (2,0-0 M) iniciado 10 min después de la inyección y que duró 50 min. Las muestras de proteína se dializaron exhaustivamente frente a agua desionizada y se analizaron para determinar concentraciones de proteína (ensayo de proteína: BioRad Laboratories, Richmond, CA). Después de cromatografía de interacción hidrófoba, la cantidad de proteína en la fracción activa se determinó mediante análisis de aminoácidos totales en un instrumento (modelo 7300, Beckman Instrs., Fullerton, CA) después de hidrólisis (24 h/110°C) en HCl 6 N que contenía fenol al 0,2%. Las muestras eluidas de la columna de interacción hidrófoba mediante eliminación de sal se ensayaron para determinar actividad biológica y absorbancia a 280 nm después de diálisis frente a agua.

3. Secuenciación de Péptido

- a. Digestión con proteasa V8: Para secuenciación de péptidos, el ADNf eluido por HPLC (3-5 µg) se sometió a digestión con proteasa V8 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La reacción se realizó en carbonato de hidrógeno de amonio 50 mM, pH 7,8, con una proporción de enzima a sustrato de 1:50 a 37°C durante 16 h. Los péptidos resultantes se separaron mediante HPLC como se ha descrito por Brenneman & Gozes, J. Clin. Invest., 97(10): 2299-2307 (1996) y se secuenciaron en el Modelo 470 y 477 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Para la secuenciación, los péptidos se secaron en filtros de cartuchos revestidos con Biobrene (Applied Biosystems Inc.) y el tubo que contenía el péptido se enjuagó con 30 µl de ácido trifluoroacético, que también se secó encima del filtro. Para la síntesis peptídica se usó la estrategia de fase sólida que emplea protección de cadena lateral óptima (Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996); Gozes y col., Endocrinology 134: 2121-2125 (1994); Gozes y col., J. Pharmacol. Esp. Ther. 173: 161-167 (1995)). Los productos se purificaron en Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y aminoácidos de fase inversa.
- b. Digestión con CNBr: La proteína se diluyó en ácido fórmico al 70%. Se disolvió CNBr (5x en peso) lentamente en oscuridad en ácido fórmico al 70%. La digestión se realizó a temperatura ambiente, en oscuridad, con una proporción de CNBr:proteína de 1:1. Después de incubación durante una noche, la proteína digerida se concentró usando un speedvac con cuatro lavados con agua secuenciales. Después de esto, los péptidos se separaron mediante HPLC como se ha descrito por Brenneman & Gozes (J. Clin. Invest. 97: 2299-2307 (1996)).

Las secuencias obtenidas están relacionadas con la proteína de levadura PIF1:

- (a) PQLISEXSFXQ (SEC ID N°: 19) (X indica desconocido); y
- (b) IQLEXEIXEXQII (SEC ID N°: 20).

4. Anticuerpos contra ADNf

- a. Preparación de anticuerpos: Se prepararon anticuerpos en conejos después de la fusión de la secuencia obtenida, es decir, la secuencia relacionada con ADNf1/PIF1 (IQLETEIQEKQII, (SEC ID N°: 20)) con KLH. De forma similar se prepararon anticuerpos en conejos después de la fusión de las secuencias obtenidas, es decir, la secuencia relacionada con ADNf I/hsp60 (CVLGGSALLRSIPA, (SEC ID N°: 21)), con KLH y también en un experimento paralelos con BSA por un resto de cisteína en el extremo N. Se realizó cromatografía de afinidad en una columna sephadex con CVLGGSALLRSIPA (SEC ID N°: 21) conjugada o columnas que contenían CSALLRSIPA (SEC ID N°: 22) (ambas conjugadas por el resto de cisteína). Se generaron anticuerpos frente a bandas de proteína de ADNf III aisladas extraídas de geles de poliácridamida en ratones (Gozes y col., Developmental Brain Research 99: 167-175 (1997); McManaman y col., J. Biol. Chem. 12: 5890-5897(1988)).

ES 2 331 595 T3

- b. Purificación de los anticuerpos para secuencia relacionada con PIF1: la precipitación de anticuerpos se realiza comúnmente con sulfato de amonio. Se tomaron 5 ml del suero de conejo y se centrifugaron a 3.000 xg durante 30 min. El sobrenadante después se transformó a un tubo apropiado y se agitó suavemente. Mientras la solución de anticuerpos se agitaba suavemente, se añadió un volumen de 0,5 de sulfato de amonio saturado. Después de que se hubiera añadido todo el sulfato de amonio, el recipiente se movió a 4°C para una incubación durante una noche y después se centrifugó a 3000 xg durante 30 minutos. Después, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se repitió el procedimiento anterior una segunda vez. El precipitado final se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y se desechó y el sedimento se escurrió bien. El sedimento se resuspendió en 2,5 ml de PBS. La solución de anticuerpos se transfirió a tubos de diálisis (hervidos previamente con EDTA 10 mM durante 10 minutos, seguido de 3 lavados con agua) y se dializó frente a 3 cambios de PBS durante una noche durante 2 días. La solución de anticuerpo después se centrifugó para retirar cualquier resto remanente.
- c. Purificación por afinidad de anticuerpos para secuencia relacionada con hsp60: la columna se lavó con NaCl 0,5 M en PBS seguido de un lavado con PBS. El suero se añadió (10 ml a 1 ml de resina) y se dejó incubar, con agitación durante 16 horas a 4°C. La columna se lavó con 10 volúmenes de PBS y después con PBS que contenía NaCl 0,5 M (hasta que ningún material que absorbe a A₂₆₀ se eluye). La elución de los anticuerpos se realizó con glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5. Las fracciones eluidas se neutralizaron con 0,1 volúmenes de Tris 2 M pH = 8,0. Los anticuerpos en primer lugar se purificaron frente a VLGGGSALLRSIPA (SEC ID N°: 23) y después dos tipos de afinidades se separaron en la columna de SALLRSIPA (SEC ID N°: 5).
- d. Transferencia puntual: se realizaron estudios de especificidad adicionales utilizando el péptido homólogo de hsp60 VLGGGCALRCIPA (SEC ID N°: 24), y péptidos más cortos, es decir, VLGGG (SEC ID N°: 13) y LGGGS (SEC ID N°: 11), y los anticuerpos mostraron especificidad por SALLRSIPA (SEC ID N°: 5). También se realizaron estudios de especificidad para distinguir entre el péptido SALLRSIPA y el péptido IQLETEIQEKQII.

5. Estrategia de Clonación

Se usó una biblioteca de expresión que utiliza P19-, una línea celular de carcinoma embrionario de ratón inducida para diferenciarse en glía y neuronas mediante ácido retinoico y se clonó utilizando Uni-Zap™ XR (Stratagene). La biblioteca original eran 2x10⁶ unidades formadoras de placas (UFP) y 2x10¹⁰ después de la primera amplificación. Las bacterias usadas para transformación fueron XLI-Blue. El kit de detección no radiactiva de Amersham (ECL) para anticuerpos se usó para detectar placas positivas. El procedimiento de clonación fue el siguiente: se tomó una sola colonia de la cepa XLI-Blue de *E. coli* del medio que contenía 12,5 mg/ml de tetraciclina y se cultivó durante una noche a 37°C en medio LB líquido que contenía maltosa al 0,2% y MgSO₄ 10 mM. El número de placas que se necesitó para explorar toda la biblioteca para obtener un clon positivo se calculó que era 50, suponiendo 2x10⁴ placas por placa de 90 mm. Una mezcla bacteriana de cien microlitros se dividió en alícuotas en 50 tubos. En cada tubo, se mezclaron 0,1 ml de las bacterias sembradas con 0,1 ml de SM que contenía 2x10⁴ UFP de la biblioteca de expresión UniZAP XR, y se incubaron durante 20 min a 37°C. Después, cada tubo recibió 3 ml de agarosa superior fundida y se vertió inmediatamente sobre una placa de agar LB. Las placas infectadas después se incubaron durante 3,5 horas a 37°C. Los filtros de nitrocelulosa se numeraron con bolígrafo y se empaparon en una solución de isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) (10 mM en agua destilada) durante algunos minutos. Usando pinzas de extremos romos, los filtros se retiraron de la solución y se dejó que se secaran a temperatura ambiente. Las placas se retiraron de la incubadora y rápidamente se cubrieron con los filtros de nitrocelulosa impregnados en IPTG y después se incubaron durante 4 horas a 37°C. Después de esta incubación, las tapas se retiraron de las placas y la incubación continuó durante 20 minutos adicionales a 37°C, después, las placas se movieron a temperatura ambiente. Cada uno de los filtros se marcó en al menos tres emplazamientos asimétricos perforando a través del mismo y del agar subyacente con una aguja de calibre 18 unida a una jeringa que contenía tinta negra resistente al agua. Después los filtros se despegaron de las placas e inmediatamente se sumergieron en un volumen grande de TNT (Tris Cl 10 mM (pH=8,0) NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%). Cuando todos los filtros se retiraron y enjuagaron, los mismos se transfirieron para una incubación durante una noche a 4°C a una bandeja de vidrio que contenía tampón de bloqueo (7,5 ml para cada filtro de leche baja en grasa al 10%-1% en TNT) para bloquear unión inespecífica. Después, los filtros se transfirieron a una bandeja de vidrio nueva que contenía el anticuerpo principal (mencionado anteriormente). Los anticuerpos se diluyeron 1:250-1000 en tampón de bloqueo (7,5 ml para cada filtro) y después que todos los filtros se sumergieron, los mismos se incubaron durante una noche a 4°C. Después los filtros se lavaron 3 veces en un tampón de bloqueo nuevo durante 15 minutos cada vez a temperatura ambiente. Después los filtros se transfirieron a una bandeja de vidrio nueva que contenía el anticuerpo secundario (anti-Conjugado IgG de conejo-Peroxidasa de cabra, Sigma Immuno Chemicals A-6154) diluido 1:30.000 en tampón de bloqueo (7,5 ml para cada filtro). Los filtros se sumergieron e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después los filtros se lavaron como se ha descrito anteriormente. El kit de detección no radiactiva Amersham (ECL) para anticuerpos se usó para detectar placas positivas. Cada placa positiva que se identificaba se sacó del agar usando el extremo largo de una pipeta de Pasteur y se transfirió a 1 ml de SM (NaCl, 5,8 g/l; MgSO₄-7H₂O, 2 g/l; Tris-HCl 1 M, pH 7,5, 50 ml/l; gelatina al 2%, 5 ml/l) que contenía 2 gotas de cloroformo. Después se dejó que las partículas de bacteriófago se eluyeran del agar mediante incubación durante una noche a 4°C. El título del bacteriófago se determinó y se realizó una nueva siembra en placa a 1000 placas por placa de 90 mm. Después las placas se re-seleccionaron y se sembraron hasta que se obtuvo una población homogénea del bacteriófago recombinante inmunopositivo.

6. Preparación de Plásmido

Para eliminar el pBluescript SK- del vector ZAPII lambda, se empleó el protocolo de extirpación *in vivo* usando el sistema ExAssist™ (Stratagene). Se realizaron experimentos de acuerdo con el manual de la Compañía. La placa de interés se sacó de la placa de agar y se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril que contenía 500 µl de tampón SM y 2 gotas de cloroformo. El tubo se mezcló para liberar las partículas de fago en el tampón de SM y se incubó durante una noche a 4°C. En un tubo cónico de 50 ml, se combinó lo siguiente:

200 µl de D.O.₆₀₀ = 1,0 células XLI-Blue

100 µl de reserva de fago (que contenía > 1 X 10⁵ partículas de fago)

1 µl de fago auxiliar ExAssist (>1 X 10⁶ UFP/ml)

Después la mezcla se incubó a 37°C durante 15 minutos. A la mezcla anterior, se añadieron 5 µl de medio 2XYT (16 g/l de bacto-triptona, 10 g/l de extracto de bacto-levadura y 5 g/l de NaCl) y se incubó durante 2-2,5 horas a 37°C con agitación. Después los tubos se calentaron a 70°C durante 20 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 xg. Los sobrenadantes resultantes se decantaron en tubos estériles y se almacenaron a 4°C. Para sembrar el fagémido recuperado, se añadieron 200 µl de células XLI-Blue a 2 tubos. Se añadieron 10 µl de la reserva de fago a un tubo y 20 µl de dilución 1:100 de la reserva de fago se añadieron al otro tubo. Después los tubos se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Después, 100 µl de cada tubo se sembraron en placas de LB-ampicilina (100 mg/ml) y se incubaron durante una noche a 37°C. Las colonias que aparecieron en la placa contenían el fagémido pBluescript SK- de doble hélice con el inserto de ADN clonado de p25 (ADNF III). Una colonia única se tomó a partir de la placa y se cultivó durante una noche a 37°C en un medio de LB líquido que contenía 100 mg/ml de ampicilina. El cultivo durante una noche de *E. coli* después se sometió al Sistema de Purificación de ADN Wizard Midi-prep (Promega). El ADN purificado se eluyó de la columna de Midi-prep en agua libre de cualquier sal o contaminante macromolecular. El plásmido purificado después se usó directamente para secuenciación de ADN.

7. Expresión para Clonación Funcional

E. coli que portaban el clon de plásmido se cultivaron a D.O.₆₀₀ = 0,2, seguido de incubación con IPTG (1 mM) hasta que se obtuvo D.O.₆₀₀ = 1,0. Un sedimento bacteriano (1500 xg, 15 min) se resuspendió en guanidina HCl 4 M, KCl 100 mM; Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; MgCl₂ 12,5 mM; NP-40 al 0,1%; y una mezcla de inhibidores de proteasa: fenil-metil-sulfonil-fluoruro, aprotinina y leupeptina. El procedimiento implicó además sonicación en hielo 2 veces cada una durante 10 s, agitando durante 30 min a 4°C, centrifugando a 27.000 xg a 4°C, seguido de formación de alícuotas y almacenamiento a -80°C.

8. Actividad Biológica

La actividad biológica se ensayó en cultivos de corteza cerebral como anteriormente (véase, por ejemplo, Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93. 427-432 (1996)). Después de nueve días *in vitro*, se proporcionó a los cultivos un cambio completo de medio y se trataron con tetrodoxina 1 mM o con péptido β-amiloide 25 mM (25-35) y concentraciones variables de aislado de proteína fraccionado a partir de *E. coli* que portaba el plásmido que contenía el inserto de p25 (ADNF III) y uno que no portaba el inserto, durante cinco días adicionales. Se condujeron recuentos de celulares neuronales después de identificación inmunocitoquímica con antisueros frente a enolasa específica de neuronas. Los recuentos se realizaron en 40 campos a partir de emplazamientos de coordenadas predeterminadas sin conocimiento del grupo de tratamiento.

9. Secuenciación

Se realizó secuenciación directa utilizando secuenciación de ADN automatizada (Applied Biosystems). Para secuencia completa, se usaron los oligodesoxinucleótidos sintéticos o el kit Erase a Base, que genera múltiples fragmentos con secuencias compartidas. Comenzando con digestión doble de 10 µg de ADN circular cerrado con 2 enzimas de restricción diferentes: Apa I, que genera una protrusión 3' de 4 bases que protege el sitio de unión a cebador debido a que las mismas son resistentes a digestión con Exonucleasa III (ExoIII) y Xho I, que deja una protrusión 5' adyacente al inserto a partir del cual tienen que transcurrir las supresiones. La velocidad uniforme de digestión de ExoIII permite que las supresiones de longitudes predeterminadas se realicen simplemente retirando alícuotas cronometradas a partir de la reacción (25 puntos de tiempo a 32°C cada 1 minuto). Las muestras de la digestión con ExoIII se retiraron en intervalos cronometrados y se añadieron a tubos que contenían nucleasa S1, que retira las colas de hélice única restantes. Después de neutralización e inactivación por calor de la nucleasa S1, se añadió ADN polimerasa Klenow para nivelar los extremos, que después se ligan para circularizar los vectores que contienen supresión. La mezcla de ligamiento se usó directamente para transformar células competentes. Cada punto de tiempo sucesivo produce un grupo de subclones que contienen supresiones agrupadas que se prolongan hasta el inserto original. Después, varios subclones de cada punto de tiempo se exploraron para seleccionar intervalos apropiados entre supresiones. El análisis de secuencia se realizó con cebador promotor T7.

ES 2 331 595 T3

10. *Determinación de Motivo*

La determinación de motivos en la nueva secuencia de ADN se realizó usando los programas GCG (Wisconsin Package Version 8.1 UNIX, agosto 1995, en la búsqueda usada sólo se permitió una falta de coincidencia).

11. *Aislamiento de ARN*

Se preparó ARN a partir de astrocitos y células de neuroblastoma a continuación de un tratamiento de tres horas con VIP 0,1 nM en PBS a temperatura ambiente (como se usó para preparación de medio acondicionado que contenía ADNf secretado (véase Brenneeman y Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2237 (1996)). También se preparó ARN a partir de fibroblastos obtenidos de las meninges de ratas recién nacidas, así como a partir de corteza cerebral, cerebelo, rombencéfalo, riñón, bazo, pulmón y tracto intestinal de ratón. El ARN se aisló a través del uso de RNA NOWTM (Biological Industries Co. Beit-Haemek (1990) LTD). La cuantificación de ARN se realizó mediante mediciones de absorbancia a 260-280 nm.

12. *Hibridación de Transferencia de northern*

a. Electroforesis en gel: Cantidades similares de ARN desnaturalizado (10-30 mg) se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (SeKeam, FMC), seguido de transferencia a membrana de nitrocelulosa (Scheleicher y Schuell) durante una noche (véase Gozes, Basic Principles of Gene Expression, ETP/ENA/IBRO, Practical Course on Molecular Neuroanatomy págs. 35-55 (Van Leeuwen y col., eds. 1987); y también Techniques and Behavioral and Neural Sciences Series págs. 3-24 (Huston ed., 1989)). La membrana se reticuló mediante exposición a radiación UV de onda corta (12000 mJ/cm²).

b. Hibridación: Las transferencias se prehibridaron durante dos horas a 55°C y se hibridaron con una sonda de ADN complementaria específica para el ADNc de ADNf III de ratón (un producto de PCR obtenido usando los siguientes cebadores: 61-79 y la hebra complementaria desde la posición 438-455, que se describen con detalle más adelante). La sonda marcada se preparó mediante cebado aleatorio y se incubó con la transferencia durante 16 horas a 55°C. Las soluciones de prehibridación e hibridación (12 ml/transferencia) contenían lo siguiente: formamida al 50% (deionizada usando resina de lecho mixto, Sigma), tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 6,5), NaCl 0,8 M, EDTA 1 mM, reactivo de Denhart 5X (BSA al 0,05%, polivinilpirrolidona al 0,05% y Ficoll al 0,05%), SDS al 0,1% y 200 mg/ml de poli(A). La sonda marcada se disolvió en 12 ml de solución de hibridación y se añadió a la mezcla de prehibridación. Después de la hibridación la transferencia se lavó en 2X SSC (20X SSC= NaCl 3 M, citrato trisódico 0,3 M) y SDS al 0,1% durante 30 minutos, a 65°C y se expuso a película Kodak XAR5 durante 16-20 horas a -70°C usando pantallas intensificadoras Du Pont Cronex.

13. *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)*

Los cebadores usados para amplificación de ADNc de ADNf III fueron los siguientes:

para cebador sentido:

5' TCCAATGTTACCTGCAG 3' (SEC ID N°: 7); y

para cebador antisentido:

5' GCTCGTTACAGATTGTAC 3' (SEC ID N°: 8),

que corresponden a los pares de bases 61-79 y 438-455, respectivamente, para el ADNc de ADNf III de ratón. El producto de PCR se obtuvo del fagémido de doble hélice pBluescript SK⁻ con el inserto de ADN clonado de p25 (ADNF III). Los procedimientos se realizaron de acuerdo con procedimientos de libros de texto descritos en biología molecular (véase, por ejemplo, Sambrook, J. y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989). Se realizaron treinta y cinco ciclos de PCR (1 min a 94°C, 1 min a 56°C y 1 min a 72°C). 10 ml de cada producto de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1,5% teñido con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz U.V.

14. *Recuperación de ADN*

90 ml de cada producto de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa TAE al 1,5% teñido con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz U.V. La banda correspondiente se cortó del gel de agarosa y se sometió a GenEluteTM Agarose Spin Columns (Supelco).

15. *Sondas de ADN Marcadas*

25 ng de ADN de molde eluido a partir de gel de agarosa se marcaron en una reacción de cebado aleatorio usando el Kit NEBlot (New England BioLabs) y un ^{32}P dCTP (3.000 Ci/mmol, 50 mCi). Después, el ADN marcado se sometió a Columnas NICK (Pharmacia Biotech) para separación de nucleótidos marcados con ^{32}P no incorporados.

16. *RT-PCR*

Se obtuvo ADNc mediante transcripción inversa de 2 mg de ARN total con la Transcriptasa Inversa MLV de Gibco-BRL (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después el ADNc se usó para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la ADN Polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los cebadores usados para amplificación del ADNc de ADNf III fueron los mismos que los que se han descrito en la sección de PCR, mencionada anteriormente. Como un control negativo, se preparó ARN a partir de fibroblastos en cultivos hermanos para los astrocitos usados anteriormente preparados a partir de las meninges de las ratas recién nacidas.

17. *Electroforesis en Gel de SDS-Poliacrilamida*

- a. Electroforesis en gel: Medio acondicionado de astrocitos tratados con VIP se sometió a electroforesis a través de una placa de gel de poliácridamida al 10% (BioRad) que contenía SDS al 0,1%. La muestra se mezcló con volumen 1:1 de 2x tampón de carga de gel SDS (Tris Cl 100 mM (pH 6,8), ditiotritol 200 mM, SDS al 4% (de uso para electroforesis), azul de bromofenol al 0,2%, glicerol al 20%, Ditiotritol 200 mM). Las determinaciones de peso molecular se obtuvieron mediante el análisis paralelo de marcadores de peso molecular (Sigma).
- b. Tinción de Azul Brillante de Coomassie: Se realizó tinción de Azul Brillante de Coomassie usando condiciones convencionales en electroforesis en gel de poliácridamida SDS al 10% (Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989).
- c. Hibridación de transferencia de western: Se realizó transferencia de western usando condiciones convencionales en electroforesis en gel de poliácridamida SDS al 10% (Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989) con anticuerpos preparados frente a VLGGGSALLRSIPA (SEC ID N°: 18), generados en conejos como se ha indicado anteriormente y purificados sobre columnas de afinidad que contenían SALLRSIPA (SEC ID N°: 5) como el ligando de unión. Los anticuerpos purificados por afinidad se calibraron para la dilución correcta y el que se usó para el experimento fue 1:250.

18. *Reacción en Cadena de Polimerasa de Imitación*

Usando los cebadores: 5', posición 71 (20 unidades) Td= 59,3; 5' ACCTGCAGCAAAACA ACTAT 3' (SEC ID N°: 9); y cebador 3', posición 423 (23 unidades) y un producto de imitación (comenzando desde la posición 1165, letra pequeña) que contenía el cebador 5' también: 5' ACCTGCAGCAAAACA ACTATTTCCATCCCTCAACAGT 5' (SEC ID N°: 25), cuando se usa este cebador híbrido de imitación da como resultado un producto de supresión que contiene el mismo 5' que el ADNc, pero que le falta un tramo de bases en las posiciones 90-165. El producto de supresión se prepara en gran cantidad y se usa como un patrón para la reacción de PCR que permite la cuantificación relativa. Además, se cuantificó ARNm de ciclofilina (cebador superior: posición, 348: 5' ATGGCACAGCAG GAAAGAGC 3' (SEC ID N°: 26), cebador inferior: 5' TTGCCGGAGTGCACAATGAT 3' (SEC ID N°: 27) dando un producto de 279 bases y el cebador de imitación: 5' ATGGCACAGGAGGAAAGAGCAATGCAGGCAAAGA CACC 3' (SEC ID N°: 25) y los resultados se representan como la proporción con ARNm de ciclofilina cuantificado en las mismas muestras de la misma manera. La expresión se determina en embriones, embriones de ratón de 9,5 días de edad incubados *in vitro* durante cuatro horas como anteriormente (Gressens y col., Nature 362: 155-158 (1993)).

19. *Síntesis de Péptido*

Para síntesis de péptido, se usó la estrategia en fase sólida que emplea protección de cadena lateral óptima (Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996); Gozes y col., Endocrinology 134: 2121-2125 (1994); Gozes y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 173: 161-167 (1995)). Los productos se purificaron en Sephadex G-25 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y aminoácidos de fase inversa.

20. *Aprendizaje y Memoria*

Se evaluó la protección frente a deficiencias de aprendizaje y memoria asociadas con bloqueo colinérgico. El bloqueo colinérgico se obtuvo en ratas mediante la administración de la colinotoxina AF64A, NAPVSIPQ (SEC ID

Nº 6), que se administró por vía intranasal y se realizaron los experimentos de laberinto de agua como anteriormente (Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)).

21. Modelo de ratón deficiente en Apolipoproteína E (ApoE)

Ratones knockout para ApoE y los controles normales fueron un regalo del difunto Prof. Shlomo Eisenberg de la Universidad de Tel Aviv, proporcionados originalmente por el Dr. J. L. Breslow (Plump y col., Cell 71: 343-353 (1992)). Los ratones knockout de ApoE se obtuvieron a partir de células madre embrionarias OLA 129 en ratones C57B6 x FVB (como se ha descrito). Los controles de edad igual fueron ratones C57B6 endogámicos. Grupos de crías de ratón se trataron desde el nacimiento hasta la edad de 14 días. Las inyecciones subcutáneas diarias incluían: 20 ml de solución salina (días 1 a 4), 40 ml de solución salina (días 5 a 10) y 80 ml de solución salina (días 11-14). Los péptidos (sintetizados como anteriormente, Gozes y col., J. Neurobiol. 33: 329-342 (1997) y Gozes y Brenneman, J. Molec. Neurosci. 7: 235-244 (1996)) se disolvieron hasta una concentración final de 25 g/ml antes de la administración. Para obtener soluciones homogéneas de péptidos, se realizó solubilización inicial en dimetil sulfoxido (DMSO, 1 mg/30 ml) seguido de diluciones seriadas en solución salina. Los animales de control recibieron solución salina. El vehículo (DMSO diluido en solución salina) no tuvo ningún efecto y los resultados obtenidos con éste fueron similares a los resultados obtenidos con la solución salina sola.

22. Análisis estadísticos

Se uso comparación múltiple ANOVA con Student-Neuman-Kuel de medios de ensayo para evaluar los resultados.

B. Resultados

Se exploró una biblioteca de expresión de ADNc a partir de una línea de células de carcinoma embrionarias de ratón P19- inducidas para diferenciarse en glía y neuronas mediante ácido retinoico (en Uni-Zap™ XR (Stratagene) para expresión de ADNF III. Se usaron dos tipos de anticuerpo, uno frente a SALLRSIPA-BSA y uno frente a PIF1, los cuales se han descrito anteriormente. Después de obtener 9 bacteriófagos recombinantes inmunopositivos con los anticuerpos frente a SALLRSIPA (SEC ID Nº: 5), la siguiente etapa determina si uno de estos bacteriófagos reaccionaría con anticuerpos preparados frente a PIF1. Después las placas se volvieron a sembrar en 9 placas diferentes y se sometieron adicionalmente al mismo procedimiento con anticuerpos anti-PIF1. En esta etapa, sólo una de las 9 placas diferentes dio un resultado positivo y se le asignó el nombre "p25". El fragmento de ADN de p25 clonado en el pBluescript SK⁻ fue de aproximadamente 3 kb de longitud y, por tanto, era demasiado largo para secuenciar de forma conveniente a partir de un sitio de unión de cebador único en el vector. Una manera eficaz de secuenciar un inserto de ADN largo de este tipo era generar un conjunto anidado de supresiones en el ADN diana, moviendo eficazmente el sitio de cebado más próximo a la secuencia de interés. De este modo se obtuvo la secuencia completa de ADNF III de ratón. El ADNc contiene 2418 pares de bases de fase de lectura abierta que codifican 806 aminoácidos, pl:5,85 (Figura 1). Las similitudes entre hsp60 y PIF1 con ADNF III también se exponen en la Figura 1.

La determinación de motivos en la secuencia de ADN nueva se realizó usando los programas GCG que muestran la presencia de muchos motivos conservados en la región más 5'. Se ha de observar que esto está en la región que contiene la secuencia del péptido NAPVSIPQ activo, que se describe con más detalle en este documento más adelante. Los motivos incluyen la firma de familia de transportadores ABC: proteínas de unión a ATP implicadas en transporte activo de moléculas hidrófilas pequeñas a través de la membrana citoplasmática; motivo A de sitio de unión a ATP/GTP (bucle P); y sitio activo de aldehído deshidrogenasa.

Una secuencia de nueve aminoácidos de clon p25 (GGNAPVSIP, SEC ID Nº: 28) mostró una similitud de estructura limitada a un péptido activo de ADNF I (VLGGGSALLRSIPA, SEC ID Nº: 23) y a la región homóloga en hsp60 (VLGGGCALLRCIPA, SEC ID Nº: 24) con identidad de ácido nucleico subyacente del 77,8% con hsp60 de rata e identidad del 70,4% con hsp60 de ratón (Peralta y col., Nucleic Acid Res. 18: 7162 (1994); Venner y Gupta, Biochem Biophys. Acta 1087: 336-338 (1990)). La similitud estructural limitada se observó también con PIF1 (Figura 1). El análisis de secuencia comparativo adicional reveló un dominio de dedo de cinc (Figura 1 en negrita) (Rosenfeld y Margalit, J. Biomol. Struct. Dyn. 11: 557-570 (1993)). Dentro de esta secuencia, también se observó²⁰ una homología con el sitio activo de glutarredoxina (una tiol transferasa). El análisis global utilizando la predicción de Chou-Fasman (Chou y Fasman, Adv. Enzymology 47: 45-148 (1978)) indicó que la proteína era una molécula hidrófila flexible con múltiples sitios antigénicos y hélices alfa y láminas beta mezcladas. Nueve sitios de glicosilación potencial sugirieron una proteína que estaba asociada o que era secretada por membrana. La naturaleza hidrófila era coherente con una proteína secretada. Un péptido señal putativo de 18 aminoácidos que comprende aminoácidos hidrófobos, polares y básicos sin grupos ácidos se identificó en el extremo N de la molécula (carga neta +2). El tramo largo de restos de ácido glutámico en la región de extremo C de la molécula (Figura 1) podría mediar interacciones con moléculas básicas extracelulares, tales como poliaminas, o servir como un sitio para escisión proteolítica (Chang y col., J. Biol. Chem. 262: 11901-11903 (1987) y Chestukhin y col., J. Biol. Chem. 272: 3153-3160 (1997)). Otros sitios de procesamiento potencial encontrados fueron restos dibásicos, asociados comúnmente con escisión de neuropéptido, concretamente KKRRK (aminoácidos 425-428) y KRKK (aminoácidos 504-507). Las secuencias que contienen abundantes prolínas, glicinas, leucinas, glutaminas, alaninas y serinas se observaron en la parte del extremo N de la proteína, sugiriendo interacciones macromoleculares (Taira y col., Dev. Biol. 159: 245-256 (1993)).

Las siguientes etapas se realizaron en un intento de obtener tantos datos como fuera posible con respecto a la caracterización de ADNF III. En primer lugar, el ARNm se identificó en astrocitos de ratas mediante tecnología de RT-PCR. Los astrocitos se trataron durante tres horas con VIP 0,1 nM en PBS a temperatura ambiente (como se usó para preparación de medio acondicionado que contenía ADNF secretado (véase, Brenneman y Gozes, J. Clin. Invest. 97: 2299-2237 (1996))). La amplificación por PCR se realizó como se ha descrito anteriormente. Como un control negativo, se preparó ARN a partir de fibroblastos en cultivos hermanos a los astrocitos usados anteriormente preparados a partir de las meninges de ratas recién nacidas. La Figura 2 representa electroforesis en gel de agarosa (2%) teñida con bromuro de etidio: M= marcadores de tamaño de ADN, 1. Producto de PCR obtenido de ARN de fibroblastos, 2. Producto de PCR obtenido de ARN de astrocito. El tamaño del transcrito de ARN de longitud completa en hibridación de transferencia de northern fue de aproximadamente 5300 ± 200 pares de bases, sugiriendo una cola poli (A) larga. El ARNm se identificó en astrocitos así como en el cerebro, incluyendo corteza, cerebelo, hipocampo, lóbulo frontal, médula oblonga, núcleo subtalámico y el rombencéfalo, así como en la médula espinal. La expresión de ARNm también se observó en tejido fetal, especialmente en el pulmón y en el tejido endocrino. Cantidades bajas fueron detectables en el riñón, bazo y pulmón y en el tracto intestinal no hubo una cantidad detectable.

La Figura 3 muestra reacción en cadena de la polimerasa mimética. La expresión se determina en embriones, embriones de ratón de 9,5 días de edad incubados *in vitro* durante cuatro horas como anteriormente (Gressens y col., Nature, 362: 155-158 (1993)). Los resultados muestran un aumento de aproximadamente dos veces en ARNm de ADNF III a continuación de tratamiento con VIP. El ensayo t de Student indicó una diferencia significativa tras el tratamiento con VIP ($P < 0,0096$). Los experimentos de hibridación *in situ* localizaron la expresión al sistema nervioso en desarrollo del embrión de ratón.

La expresión génica del clon 25 estuvo enriquecida en astrocitos en comparación con fibroblastos (Figura 2). Para investigar la secreción de la nueva proteína a partir de astrocitos, se realizaron análisis de transferencia de western. El primer anticuerpo ($\alpha 1$), detectó el antígeno SALLRSIPA (SEC ID N°: 5) y NAPVSIQ (SEC ID N°: 6) (NAP, secuencia de clon 25) pero no LGGS (SEC ID N°: 11), la parte obtenida de hsp60 del antígeno (Figura 4A, transferencia puntual). Este anticuerpo identificó específicamente la proteína de clon 25 expresada bacterianamente mediante transferencia de western (~89 kD, Figura 4A, p25). El extracto bacteriano transformado que no contenía el inserto clonado se usó como un control negativo (Figura 4A, pBS). Se identificó una banda de proteína adicional (~60 kD) mediante el anticuerpo, tanto en p25 como en pBS. La purificación parcial (15 veces) de la proteína de fusión de β -galactosidasa clonada se consiguió mediante cromatografía en una columna de afinidad de p-aminobenzil 1-tio- β -D-galactopiranosido (Figura 4A, E1), dando como resultado una proteína enriquecida que mostraba la misma inmunoespecificidad que el extracto bacteriano original. Por tanto, la banda de proteína de 60 kD puede representar tanto un producto de degradación de ADNF III, como también un homólogo bacteriano. La expresión aumentada (varias veces) de las proteínas tanto de ~89 kD como la de ~60 kD se obtuvo a continuación de la inducción de isopropilo- β -tiogalactopiranosido (IPTG) en el clon 25.

Las mismas proteínas inmunorreactivas de 89 kD y de 60 kD (ADNF III) se extrajeron del gel de poliácridamida y se inyectaron en ratones para preparación de anticuerpo anti-ADNF III ($\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente). Los tres anticuerpos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), reconocieron bandas de proteína en el intervalo de 60 kD en el medio extracelular de astrocitos (Figura 4B). El anticuerpo $\alpha 1$ reconoció una proteína adicional de ~14 kD (el ADNF I putativo) y $\alpha 2$ (preparado frente a la proteína del clon 25 de ~89 kD) también reconoció una proteína de ~37 kD, que puede representar un producto de degradación. La especificidad de $\alpha 1$ se determinó adicionalmente mediante competición de la unión del anticuerpo con la proteína del clon 25 enriquecida (E1, Figura 4B). La viabilidad celular se evaluó mediante mediciones de deshidrogenasa láctica. En conjunto, los resultados sugieren procesamiento post-traducciona para formas secretadas de la proteína. El material inmunorreactivo obtenido de astrocitos intracelular incluía bandas de alto peso molecular (Figura 4B) con una banda de 89 kD, que representa la holoproteína de ADNF III putativa, una banda de 144 kD, una forma modificada post-traduccionalmente putativa y la forma secretada putativa de ~60 kD. Se observó un aumento aparente (hasta 2 veces) en la inmunoreactividad similar a ADNF de 60 kD en presencia de VIP.

La Figura 5A ilustra PCR de ADNc de neuroblastoma humano (Lilling y col., J. Molec. Neurosci. 5: 231-239 (1995)). Los cebadores utilizados fueron las bases 71-90 (sentido): ACCTGCAGCAAAACA ACTAT (SEC ID N°: 9); y las bases 438-455 (antisentido) 5' GCTCGTTACAGATTGTAC 3' (SEC ID N°: 8). El tamaño esperado correcto del producto (similar al esperado en ratones) se muestra (véase la Figura 5B). El material humano expresa el ARNm de ADNF III y el análisis de secuencia reveló una similitud del 87% en el nivel de nucleótido y una similitud del 93% y una identidad del 92% en el nivel de aminoácido con el ADNc de ratón (véase la Figura 5C).

La actividad biológica de la "proteína expresada" se evaluó en cultivos de corteza cerebral obtenidos a partir de ratas recién nacidas (Gozes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 427-432 (1996)) usando dos neurotoxinas: 1. tetrodotoxina, un bloqueante de actividad eléctrica, que potencia la apoptosis en el 30-50% de las neuronas incluyendo la población colinérgica; 2. el péptido β -amiloide, una toxina asociada con la enfermedad de Alzheimer, que proporciona una reducción del 50-70% en recuentos de células neuronales. La neuroprotección frente a las dos toxinas (Figura 6A) se obtuvo en diluciones extremadamente altas (10^{-14} $P < 0,0001$) de un extracto de proteína de *E. coli* de 1 mg/ml, que contenía clon p25 expresado. Se obtuvo neuroprotección similar con las bandas de proteína inmunorreactiva aisladas (87 kD y 60 kD en p25, Figura 4A). La dosis-respuesta en forma de campana, con una disminución brusca a concentra-

ciones crecientes, es una respuesta farmacológica de factores de crecimiento y neuropéptidos en una amplia variedad de tejidos. Los recuentos celulares totalizaron sobre el 100% de control debido a que el tratamiento evitó la muerte de células neuronales que ocurría de forma natural en los cultivos. Un extracto de control a partir de un fagémido que carecía de un inserto (pBS) no fue neuroprotector (Figura 6A, cuadrados cerrados).

Los resultados previos con ADNF I identificaron un péptido neuroprotector de acción femtomolar de 14 aminoácidos. Como NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) (NAP o ADNF III-8) de ADNF III mostró similitud estructural e inmunológica al péptido ADNF I activo (Figura 1 y Figura 4A), se ensayó adicionalmente para determinar actividad biológica. NAP mimetizaba la actividad de la proteína entera, proporcionando protección frente a neurotoxicidad asociada con el péptido β -amiloide y frente a bloqueo eléctrico (Figura 6B). Un péptido de control fue inactivo (Figura 6B, cuadrados cerrados). Por tanto, no se requiere toda la estructura de ADNP para neuroprotección.

Fue evidente una amplitud considerable de actividad con respecto a que NAP también protegía neuronas frente a toxicidad asociada con gp120, la proteína de envuelta del virus de inmunodeficiencia humana, de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y de muerte celular de origen natural (Figura 6C). El intervalo de concentraciones neuroprotectoras frente a NMDA fue 10^{-16} M a 10^{-8} M, límites excepcionalmente amplios de eficacia. Además, ya que la toxicidad asociada a NMDA puede ser una ruta común subyacente a la muerte neuronal a partir de muchas causas (Lipton y col., *Neuron* 7: 111-118 (1991)), se deduce una aplicación amplia para NAP en neuroprotección.

Las Figuras 7A y 7B representan estudios de estructura-actividad e identifican NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) como el péptido más activo, mostrando de nuevo dos concentraciones de pico óptimas, es decir, 10^{-16} - 10^{-14} M y 10^{-11} - 10^{-10} M. Las adiciones de aminoácidos a cualquier lado del péptido volvían al péptido menos activo, aunque seguía siendo útil como una proteína neuroprotectora.

También se investigó la capacidad de los polipéptidos de ADNF III de proteger frente a las deficiencias de aprendizaje y memoria asociadas con bloqueo colinérgico. El bloqueo colinérgico se obtuvo en ratas mediante la administración de la colinotoxina AF64A, NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) (denominada NAP en la Figura 8). NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) se administró por vía intranasal y se realizaron los experimentos de laberinto de agua como anteriormente (Gozes y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 427-432 (1996)). Como se observa en la Figura 8, se observó una diferencia significativa entre los animales tratados con AF64A y los animales tratados con AF64A y NAPVSIPQ (SEC ID N°: 6) al tercer día de entrenamiento. Por tanto, los animales que estaban colinérgicamente deteriorados cuando se trataron con el péptido mostraron mejora en sus capacidades de aprendizaje y memoria y se comportaron como animales de control.

La eficacia *in vivo* de NAP se evaluó en ratones homocigotos deficientes en apolipoproteína E (ApoE), un sistema de modelo útil para estudios de neurodegeneración y neuroprotección (Plump y col., *Cell* 71: 343-353 (1992); Gordon y col., *Neuroscience Letters* 199: 1-4 (1995), Gozes y col., *J. Neurobiol.* 33: 329-342 (1997)). ApoE de cerebro coordina la movilización y redistribución de colesterol en asociación con reparación, crecimiento, mantenimiento y plasticidad (Masliah y col., *Exp. Neurol.* 136: 107-122 (1995)). Uno de los tres alelos comunes de ApoE, el alelo ApoE4, se identificó como un gen de sensibilidad principal para enfermedad de Alzheimer (Weisgraber y col., *Current Opinion in Structural Biology* 4: 507-515 (1994)). ApoE4 promueve el ensamblaje del péptido β -amiloide en filamentos tóxicos, mientras que ApoE2 inhibe la agregación tóxica de péptido β -amiloide. Estudios previos han identificado la destrucción neuronal y el deterioro de la memoria en los ratones deficientes en ApoE, que puede mimetizar el genotipo de ApoE4 en el hombre (Oitzl y col., *brain Res.* 752: 189-196 (1997)).

La hibridación por transferencia de northern ha identificado un ARNm de ADNF III de 5,5 kb único (Figura 9) en el cerebro de ratón (28 días de edad), que aumentó en el 36% ($n=5$, $P<0,04$) en ratones deficientes en ApoE (Figura 9). La comparación de tejidos diferentes de roedor adulto reveló un enriquecimiento en estructuras obtenidas de cerebro (corteza cerebral, cerebelo y rombencéfalo) y abundancia baja en el hígado, riñón, bazo y pulmón (datos no mostrados). En conjunto, el aumento observado en los ratones deficientes puede representar un mecanismo compensatorio. Los mismos animales previamente han demostrado que muestran una reducción en ARNm de VIP que puede estar asociada con función neuronal disminuida. Las inyecciones diarias (durante las dos primeras semanas de vida) de NAP a crías recién nacidas deficientes en ApoE no cambió el contenido de ARNm de ADNP en los ratones de 28 días de edad (Figura 9).

Sin embargo, se observaron mejoras marcadas de funciones cognitivas una semana después del cese del tratamiento con péptido (en ratones de 21 días de edad expuestos a un protocolo de entrenamiento de ocho días, Figura 10). Se examinaron procedimientos de memoria de trabajo intactos mediante rendimiento en laberinto de agua, midiendo el tiempo necesario para encontrar una plataforma escondida en el segundo de dos experimentos diarios (véase, Gordon y col., *Neuroscience Letters* 199: 1-4 (1995)). El emplazamiento de la plataforma y el punto de partida en el que se colocaba el animal en el agua se mantuvieron constantes dentro de cada par de experimentos diarios, pero ambos emplazamientos se cambiaron cada día. Los ratones deficientes en ApoE eran significativamente retardados en comparación con ratones de control, incluso después de ocho días de entrenamiento (Figura 10). Por el contrario, los animales deficientes en ApoE tratados con NAP se comportaron tan bien como los animales de control en todos los días de ensayo. Las mediciones de actividad de acetilcolina transferasa en los cerebros de ratones de 21 días de edad indicaron que era significativamente reducida en los animales deficientes, mientras que los animales tratados con péptido mostraron valores que no se podían distinguir de los controles (datos no mostrados). Además e inesperadamente, el tratamiento crónico de animales de control con NAP también mejoró su comportamiento (Figura 10). Se obtuvieron

resultados similares en un modelo de rata de deficiencia colinérgica (con la colinotoxina AF64A) a continuación de administración intranasal de NAP (datos no mostrados).

La presente invención representa la primera identificación de un ADNc clonado que expresa una proteína neuro- protectora de acción femtomolar con un péptido de núcleo de ocho aminoácidos que protege frente a la neurotoxicidad por β -amiloide y deficiencias de memoria asociadas con las deficiencias colinérgicas relacionadas con Alzheimer.

Se debe apreciar que la descripción anterior tiene por objeto ser ilustrativa y no limitante. Muchas realizaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica tras la lectura de la descripción anterior. Por lo tanto, el alcance de la invención se debe determinar no con referencia a la descripción anterior, sino en lugar de ello se debe determinar con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

Análisis de la Lista de Secuencias Adjunta

La información para las secuencias de ácido nucleico se presenta como información de secuencia de ADN. Un especialista apreciará fácilmente que las partes de las secuencias también describen completamente ARN codificados por la secuencia (por ejemplo, mediante sustitución de restos T con restos U correspondientes), y una diversidad de variaciones conservativamente modificadas, incluyendo sustituciones silentes de las secuencias.

Aunque típicamente se muestra sólo una hebra única de información de secuencia, un especialista apreciará inmediatamente que la secuencia complementaria correspondiente completa se describe completamente mediante comparación con las secuencias dadas. Por consiguiente, cada secuencia de ácido nucleico comprende opcionalmente la hebra complementaria a la secuencia representada.

Serán evidentes para un especialista una diversidad de variaciones conservativamente modificadas de las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la lista de secuencias. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Cada uno de los siguientes seis grupos contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas el uno del otro:

1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);

2) Ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);

3) Asparagina (N), Glutamina (Q);

4) Arginina (R), Lisina (K);

5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W)

(véase también, Creighton, Proteins (1984)).

Un especialista también reconocerá que una gran variedad de secuencias de ácido nucleico codifican cada uno de los polipéptidos dados debido a la degeneración de codón presente en el código genético. Cada uno de los ácidos nucleicos que codifica el polipéptido dado se describe por comparación con la secuencia de aminoácidos y traducción a través del código genético. Por consiguiente, un especialista puede generar cada secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier secuencia de aminoácidos dada.

ES 2 331 595 T3

SEC ID N°: 1

1 MVNRLSIPKP NLNSTGVNMM SSVHLQQNNY GVKSVGQGY S VGQSMRLGLG
5 51 GNAPVSIPQQ SQSVKQLLPS GNGRSYGLGS EQRSQAPARY SLQSANASSL
101 SSGHLKSPSL SHSQASRVLG QSSSKPAAAA TGPPPGNTSS TQKWICTIC
151 NELFPENVYS VHFEKEHKA E KVPVANYIM KIHNFSTKCL YCNRYLPTDT
201 LLNHMLIHGL SCPYCRSTFN DVEKMAAHMR MVHIDEEMGP KTDSTLSFDL
10 251 TLQQGSHTNI HLLVTTYNLR DAPAESVAYH AQNNPPVPPK PPKVQEKAD
301 IPVKSSPQAA VPKKDVGKT LCPLCFSILK GPISDALAH LRRHQVIQT
351 VHPVEKKLTY KCIHCLGVYT SNMTASTITL HLVHCRGVGK TQNGQDKTNA
15 401 PSRLNQSPSL APVKRTYEQM EFPLLKKRKL DDDSDSPSFF EEKPEEPVVL
451 ALDPKGHEDD SYEARKSFLT KYFNKQPYPT RREIEKLAAS LWLWKS DIAS
501 HFSNKRKKCV RDCEKYKPGV LLGFNMKELN KVKHEMDFDA EWL FENHDEK
20 551 DSRVNASKTA DKKLN LGKED DSSSDSFENL EEESNESGSP FDPVFEVEPK
601 ISNDNPEEHV LKVIPEDASE SEEKLDQKED GSKYETIHLT EEPTKLMHNA
651 SDSEVDQDDV VEWKDGASPS ESGPGSQQVS DFEDNTCEMK PGTWSESSQ
701 SEDARSSKPA AKKKATMQGD REQLKWKNS YGKVEGFWSK DQSQWKNASE
25 751 NDERLSNPQI EWQNSTIDSE DGEQFDNMTD GVTEPMHGSL AGVKLSSQQA
801 *VPGSLALVT CCSLEL*SPV *LQSCLLTGT AL*VLVGLWG MWPLQFQWLF
851 LSL*QDRFL LQNLL*QTR* LNVKNQ*AGD S*ILTRKSRG LFLSAFSTFL
30 901 SLCEMIGQMS LRSVKLIHMV V*GQHTSYQS NVYSRLWEKR FFFMYSF*IV
951 EMYICTVF*T YSK*CS*SCY CVPIIDFFF* CCPCCVINAL SSLPSKSSKL

35

SEC ID N°: 2

1 ATGGTGAATC GACTCTCAAT ACCAAAGCCT AACTTAAATT CTACAGGAGT
40 51 CAACATGATG TCCAGTGTTT ATCTGCAGCA GAACAACAT GGAGTCAAAT
101 CTGTAGGCCA GGGTTACAGT GTTGGTCAGT CAATGAGACT GGGTCTAGGT
151 GGCAACGCAC CAGTTTCCAT TCCTCAACAA TCTCAGTCTG TAAAGCAGTT
45 201 ACTTCCAAGT GGAAACGGAA GGTCTTATGG GCTTGGGTCA GAGCAAAGGT
251 CCCAaGCACC AGCAAGATAC TCCCTGCAGT CTGCTAATGC CTCTTCTCTC
301 TCATCGGGCC AcTTAAAGTC TCCTTCCCTC TCTCATTAC AGGCATCtag
50 351 AGTGTTAGGT CagTCCAGTT CCAAACCTGC TGCaGCTGCC ACAGGCCCTC
401 CCCCAGGTAA CACTTCCTCA ACTCAAAAGT GGAAAATATG TACAATCTGT
451 AATGAGCTTT TTCCTGAAAA TGTCTATAGT GTGCACTTCG AAAAAAGAACA
501 TAAAGCTGAG AAAGTCCCAG CAGTAGCCAA CTACATTATG AAAATACACA
55 551 ATTTTACTAG CAAATGCCTC TACTGTAATC GCTATTTACC CACAGATACT
601 CTGCTCAACC ATATGTTAAT TCATGGTCTG TCTTGTCAT ATTGCCGTTT
651 AACTTTCAAT GATGTGGAAA AGATGGCCGC ACACATGCGG ATGGTTTACA
60 701 TTGATGAAGA GATGGGACCT AAAACAGATT CTACTTTGAG TTTTGATTTG
751 ACATTGCAGC AGGGTAGTCA CACTAACATC CATCTCCTGG TAACTACATA
801 CAATCTGAGG GATGCCCCAG CTGAATCTGT TGCTTACCAT GCCCAAAATA
65 851 ATCCTCCAGT TCCTCCAAAG CCACAGCCAA AGGTTTCAAG AAAGGCAGAT
901 ATCCCTGTAA AAAGTTCACC TCAAGCTGCA GTGCCCTATA AAAAAAGATGT

ES 2 331 595 T3

5 951 TGGGAAAACC CTTTGTCTC TTTGCTTTTC AATCCTAAAA GGACCCATAT
 1001 CTGATGCACT TGCACATCAC TTACGAGAGA GGCACCAAGT TATTGAGACG
 1051 GTTCATCCAG TTGAGAAAAA GCTCACCTAC AAATGTATCC ATTGCCCTGG
 1101 TGTGTATACC AGCAACATGA CCGCCTCAAC TATCACTCTG CATCTAGTTC
 1151 ACTGCAGGGG CGTTGGAAAG ACCCAAAATG GCCAGGATAA GACAAATGCA
 1201 CCCTCTCGGC TTAATCAGTC TCCAAGTCTG GCACCTGTGA AGCGCACTTA
 10 1251 CGAGCAAATG GAATTTCCCT TACTGAAAAA ACGAAAGTTA GATGATGATA
 1301 GTGATTCACC CAGCTTCTTT GAAGAGAAGC CTGAAGAGCC TGTTGTTTTA
 1351 GCTTTAGACC CCAAGGGTCA TGAAGATGAT TCCTATGAAG CCAGGAAAAG
 1401 CTTTCTAACA AAGTATTTCA ACAAACAGCC CTATCCCACC AGGAGAGAAA
 15 1451 TTGAGAAGCT AGCAGCCAGT TTATGGTTAT GGAAGAGTGA CATCGCTTCC
 1501 CATTTTAGTA ACAAAGGAA GAAGTGTGTC CGTGATTGTG AAAAGTACAA
 1551 GCCTGGCGTG TTGCTGGGGT TTAACATGAA AGAATTAAAT AAAGTCAAGC
 1601 ATGAGATGGA TTTTGATGCT GAGTGGCTAT TTGAAAATCA TGATGAGAAG
 20 1651 GATTCCAGAG TCAATGCTAG TAAGACTGCT GACAAAAAGC TCAACCTTGG
 1701 GAAGGAAGAT GACAGTTCCCT CAGACAGTTT TGAAAATTTG GAAGAAGAAT
 1751 CCAATGAAAG TGGTAGCCCT TTTGACCCTG TTTTGAAGT TGAACCTAAA
 1801 ATCTCTAACG ATAACCCAGA GGAACATGTA CTGAAGGTAA TTCCTGAGGA
 25 1851 TGCTTCAGAA TCTGAGGAGA AGCTAGACCA AAAAGAGGAT GGTTCAAAT
 1901 ACGAAACTAT TCATTTGACT GAGGAACCAA CCAAATAAT GCACAATGCA
 1951 TCTGATAGTG AGGTTGACCA AGACGATGTT GTTGAGTGA AAGACGGTGC
 2001 TTCTCCATCT GAGAGTGGGC CTGGATCCCA ACAAGTGTC GACTTTGAGG
 30 2051 ACAATACCTG CGAAATGAAA CCAGGAACCT GGTCTGACGA GTCTTCCCAA
 2101 AGCGAAGATG CAAGGAGCAG TAAGCCAGCT GCCAAAAAAA AAGCTACCAT
 2151 GCAAGGTGAC AGAGAGCAGT TGAATGGAA GAATAGTTCC TATGGAAGG
 35 2201 TTGAAGGGTT TTGGTCTAAG GACCAGTCA AGTGGAAGAA TGCATCTGAG
 2251 AATGATGAGC GCTTATCTAA CCCCAGATT GAGTGGCAGA ATAGCACAAAT
 2301 TGACAGTGAG GATGGGGAAC AGTTTGACAA CATGACTGAT GGAGTAACTG
 2351 AGCCCATGCA TGGCAGCTTA GCCGGAGTTA AACTGAGCAG CCAACAGGCC
 40 2401 TAAGTGCCAG GTTCCCTGGC GTTGGTGACA TGCTGCAGCC TGGAACCTG
 2451 ATCTCCAGTG TGAATGCAA GCTGTCTTCT CACTGGTACT GCCTTGTGAG
 2501 TACTGGTTGG ACTGTGGGGC ATGTGGCCGC TGCAGTTCCA GTGGTTATTT
 2551 CTAAGTCTAT GACAGGACAG GCTGTTCTTG CTTCAGAACC TTCTCTGACA
 45 2601 GACACGGTAA CTAATGTGA AAAACCAATA AGCTGGTGAC TCATGAATAC
 2651 TCACGAGGAA AAGCAGAGGT TTATTTTCTAT CTGCCTTTTC AACATTTCTT
 2701 TCCCTCTGTG AAATGATTGG TCAGATGTCT TTGAGAAGTG TTAAACTAAT
 2751 TCACATGGTA GTGTAGGGCC AACATACAAG CTACCAGTCT AATGTGTATA
 50 2801 GTAGACTTTG GGAAGAGCGA TTTTTTTCA TGTATTCATT CTGAATAGTT
 2851 GAAATGTATA TTTGTACAGT CTTTGTAGACC TATTCCTAAGT GATGCTCATG
 2901 ATCCTGTTAC TGTGTGCCA TCATAGATTT CTTTTTTTAG TGTTGCCCTT
 2951 GCTGTGTAAT AAACGCTCTA TCTAGTTTAC CTAGCAAAAG CTCAAACTG
 55 3001 CGCTAGTATG GACTTTTGG ACAGACTTAG TTTTTCACA TAACCTTGTA
 3051 CAATCTTGCA ACAGAGGCCA GCCACGTAAG ATATATATCT GGACTCTCTT
 3101 GTATTATAGG ATTTTCTTGG TTCTGAATAT CCTTGACATT ACAGCTGTCA
 3151 AAAACAAAAA CTGGTATTTT AGATCTGTTT TCTGAAATCT TTAAAGCTAA
 60 3201 AATCACATGC AAGAATTGAC TTTGCAGCTA CTAATTTTGA CACCTTTTAG

65

ES 2 331 595 T3

3251 ATCTGTATAA AAGTGTGTTG TGTTGAAGCA GCAAACCAAT GAGTGCTGCA
 3301 TTTTGGATAT TTAGTTTTAT CTTTAGTTCA ACACCATCAT GGTGGATTCA
 5 3351 TTTATACCAT CTAATATATG ACACACTGTT GTAGTATGTA TAATTTTGTG
 3401 ATCTTTATTT TCCCTTTGTA TTCATTTTAA GCATCTAAAT AAATTGCTGT
 3451 ATTGTGCTTA ATGTAAAAA AAAAAAAAAA AAACCTGACC GTGTGGGATG
 10 3501 AGGCCGAGCA AGATGGAATT GGGGAGGAGG TGCTCAAGAT GTCCACGGAG
 3551 GAGATCATCC AGCGCACACG GCTGCTGGAC AGTGAGATCA AGATCATGAA
 3601 GAGTGAAGTG TTGAGAGTCA CCCATGAGCT CCAAGCCATG AAGGACAAGA
 3651 TAAAAGAGAA CAGTGAGAAA ATCAAAGTGA ACAAGACCTT GCCGTACCTT
 15 3701 GTCTCCAACG TCATCGAGCT CCTGGATGTT GATCCTAATG ACCAAGAGGA
 3751 GGATGGTGCC AATAeTGACC TGGACTCCCA GAGGAAGGGC AAGTGTGCTG
 3801 TGATCAAAAC eTeTACACGA CAGACGTA CTCTTCTGT GATTGGGTTG
 20 3851 GTGGATGCTG AAAAGCTAAA GCCAGGAGAC CTGGTGGGTG TGAACAAAGA
 3901 CTCCTATCTG ATCCTGGAGA CGCTGCCCAC AGAGTATGAC TCGCGGGTGA
 3951 AGGCCATGGA GGTAGACGAG AGGCCACGG AGCAATACAG TGACATTGGG
 25 4001 GGTTTGGACA AGCAGATCCA GGAGCTGGTG GAGGCCATTG TCTTGCCAAT
 4051 GAACCACAAG GAGAAGTTTG AGAACTTGGG GATCCAACCT CCAAAAGGGG
 4101 TGCTGATGTA TGGGCCCCCA GGGACGGGgA AGACCeTccT GGCCCGGGCC
 4151 TGTGCcGCAC AGAcTAAGGC CACCTTCcTA AAGCTGGcTG GCCCCAGcT
 30 4201 GGTGCAGAtG eTTcATTGGA GAtGGTGCCA AGcTAGTCCG GGAtGCCTTT
 4251 GCCCTGGCCA AGGAGAAAGc GCCcTcTATc ATcTTcATTG ATGAGtTGGA
 4301 eGCCATcGGC ACCAAGCGCT TTGACAGTGA GAAGGcTGGG GACCGGGAGG
 35 4351 TGCAGAGGAc AATGCTGGAG cTTcTGAACC AGcTGGATGG cTTCCAGCCC
 4401 AAcACCCAAG TTAAGGTAAT TGCAGCCAcA AACAGGGTGG AcATcctGGA
 4451 CCCC GCCcTT CTTcCCGTTC GGGCCGCCTT GACCGCAAGA TAGAGTTCCC
 4501 GATGCCCAAT GAGGAGGCCC GGGCCAGAAT CATGCAGATC CAcTCCCGAA
 40 4551 AGATGAATGT CAGTCCTGAc GTGAAATACG AGGAGCTGGC CCGCTGCACA
 4601 GATGAATTCA ATGGGGCCCA GTGCAAGGCT GTGTGTGTGG AGGCGGGCAT
 4651 GATCGCAhTG CGCAGGGGTG CCACGGAGCT CACCCACGAG GACTACATGG
 45 4701 AAGGCATTCT GGAGGTGCAG GCCAAGAAGA AAGCCAACCT ACAATACTAC
 4751 GCCTAGGGCA CACAGGCCAG CCCcAGTTTC ACGGCTGAAG TCGCAATAA
 4801 AAGATGGTTT AGGGTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 4851 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

ES 2 331 595 T3

SEC ID Nº: 3

5 M V N R L S I P K P N L N S T G V N M M S N V H L
Q Q N N Y G V K S V G Q S Y G V G Q S V R L G L G
G N A P V S I P Q Q S Q S V K Q L L P S G N G R S
F G L G A E Q R P P A A A R Y S L Q T A N T S L P
10 P G Q V K S P S V S Q S Q A S R V L G Q S S S K P
P P A A T G P P P S N H C A T Q K W K I C T I C N
E L F P E N V Y S V H F E K E H K A E K V P A V A
N Y I M K I H N F T S K C L Y C N R Y L P T D T L
15 L N H M L I H G L S C P Y C R S T F N D V E K M A

20 A H M R M V H I D E E M G P K T D S T L S F D L T
L Q Q G S H T N I H L L V T T Y N L R D A P A E S
V A Y H A Q N N A P V P P K P Q P K V Q E K A D V
25 P V K S S P Q A A V P Y K K D V G K T L C P L C F
S I L K G P I S D A L A H H L R E R H Q V I Q T V
H P V E K K L T Y K C I H C L G V Y T S N M T A S
T I T L H L V H C R G V G K T Q N G Q D K T N A P
30 S R L N Q S P G L A P V K R T Y E Q M E F P L L K
K R K L E E D A D S P S C F E E K P E E P V V L A
L D P K G H E D D S Y E A R K S F L T K Y F N K Q
P Y P T R R E I E K L A A S L W L W K S D I A S H
35 F S N K R K K C V R D C E K Y K P G V L L G F N M
K E L N K V K H E M D F D A E W L F E N H D E K D
S R V N A S K T V D K K H N L G K E D D S F S D S
40 F E H L E E E S N G S G S P F D P V F E V E P K I
P S D N L E E P V P K V I P E G A L E S E K L D Q
K E E E E E E E E D G S K Y E T I H L T E E P A
K L M H D A S D S E V D Q D D V V E W K D G A S P
45 S E S G P G S Q Q I S D F E D N T C E M K P G T W
S D E S S Q S E D A R S S K P A A K K K A T V Q D
D T E Q L K W K N S S Y G K V E G F W S K D Q S Q
50 W E N A S E N A E R L P N P Q I E W Q N S T I D S
E D G E Q F D S M T D G V A D P M H G S L T G V K
L S S Q Q A *

55

60

65

ES 2 331 595 T3

SEC ID N°: 4

5 ATGGTAAACCGATTGTCAATACCAAAGCCCAACTTAAATTCAACGGGAGTCAACATGATGTCCAATGTTACCT
 GCAGCAAAACAACCTATGGAGTCAAATCTGTGGGCCAGAGCTATGGTGTGGCCAGTCAGTGAGGCTGGGACTAG
 GTGGCAATGCTCCAGTTTCCATCCCTCAACAGTCTCAGTCCGTGAAACAGTTACTTCCAAGTGGGAATGGGAGG
 TCTTTTGGGCTAGGTGCTGAGCAGAGGCCCCCAGCAGCAGCCAGGTACTCCCTGCAGACTGCCAACACCTCTCT
 10 ACCCCCAGGCCAAGTGAAGTCTCCCTCTGTGTCTCAGTCACAGGCATCTAGAGTATTAGGTCAGTCCAGTTCTA
 AACCTCCACCAGCCGCCACAGGCCCTCCTCCAAGCAACCACTGTGCCACTCAGAAGTGGAAAATCTGTACAATC
 TGTAACGAGCTTTTCCCTGAGAATGTCTATAGCGTTCAC TTCGAAAAGGAGCATAAAGCTGAGAAAGTCC CAGC
 CGTAGCTAACTACATTATGAAAAACACAATTTTACTAGCAAATGCCTCTACTGTAATCGCTATTTGCCTACAG
 15 ATACCCTACTCAACCATATGTTAATTCATGGTCTGTCTTGTCCGTATTGCCGTTCCACCTTCAATGATGTAGAG
 AAGATGGCAGCACACATGCGAATGGTTCATATTGATGAAGAGATGGGGCTAAAACGGATTCTACTTTGAGCTT
 TGATTTGACATTGCAACAGGGCAGTCACACCAACATTCATCTCCTGGTGACCACATACAACCTGAGGGATGCCC
 20 CGGCTGAATCAGTTGCTTACCATGCCCCAAAATAATGCCCCAGTTCCTCCAAAGCCACAACCAAAAGTTCAGGAA
 AAAGCAGATGTCCCGGTTAAAAGTTCACCTCAAGCTGCAGTGCCCTATAAAAAAGATGTTGGGAAGACCCTTTG
 CCCTCTTTGCTTTTCAATACTAAAAGGACCCATATCTGATGCACTTGCACATCATTTACGAGAAAGACACCAAG
 TTATTTCAGACAGTTCATCCGGTTGAGAAAAAGCTAACTTACAAATGTATCCATTGCCTTGGTGTGTATACTAGC
 25 AACATGACAGCCTCAACCATCACTCTGCATCTAGTCCACTGCAGGGGTGTTGGAAAAACCAGAATGGC CAGGA
 CAAGACAAACGCACCTTCTCGGCTCAATCAGTCTCCAGGCCTGGCCCCCTGTGAAGCGCACGTATGAGCAGATGG

30 AGTTTCCACTGCTAAAAAGCGGAAGCTGGAGGAGGATGCTGATTCCTCTAGCTGCTTTGAAGAGAAGCCAGAA
 GAGCCTGTTGTTTTAGCTTTAGACCCCAAGGGTCATGAAGATGATTCTTATGAGGCTAGGAAAAGCTTTCTCAC
 35 AAAGTACTTCAACAAACAGCCCTATCCCACCAGGAGAGAAATTGAGAAGTTAGCTGCCAGTCTATGGCTATGGA
 AGAGTGACATTGCCTCCCATTTCAGTAACAAGAGGAAGAAGTGTGTCCGCGACTGTGAAAAGTACAAGCCTGGT
 GTGCTGCTAGGTTTTAACATGAAGAATTAAATAAAGTCAAACACGAGATGGATTTTGATGCTGAGTGGCTGTT
 TGAAAATCACGATGAGAAAGACTCAAGAGTCAATGCTAGCAAGACTGTTGACAAAAAGCATAACCTTGGGAAAG
 40 AAGATGATAGCTTCTCAGATAGTTTTGAACATTTGGAAGAAGAATCCAATGGAAGCGGGAGTCCTTTTGACCCT
 GTCTTTGAAGTTGAGCCTAAAATTTCCAGTGATAATTTAGAGGAGCCTGTACCGAAGGTTATTCCGGAAGGTGC
 TTTGGAATCTGAGAAGCTAGACC AAAAAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGGTTCAAAATATGAAA
 45 CTATCCATTTGACTGAGGAACCAGCCAAATTAATGCATGATGCCTCTGATAGTGAGGTAGACCAAGATGATGTA
 GTTGAGTGGAAAGATGGTGCTTACCCTCTGAGAGTGGGCCTGGTTCCCAACAAATCTCAGACTTTGAGGATAA
 TACATGTGAAATGAAACCAGGAACCTGGTCTGATGAGTCTTCCAGAGTGAAGATGCAAGGAGCAGTAAGCCAG
 CTGCCAAAAAAAAGGCTACAGTGCAAGATGACACAGAGCAGTTAAAATGGAAGAATAGTTTCTATGGA AAAAGTT
 50 GAAGGGTTTTGGTCCAAGGACCAGTCACAGTGGGAAAATGCATCTGAGAATGCAGAGCGCTTACCAAAACCCACA
 GATTGAGTGGCAGAATAGCACAATTGACAGTGAGGACGGGGAGCAGTTTGACAGCATGACTGACGGAGTTGCTG
 ATCCCATGCATGGCAGCTTAAGTGGAGTGAAGCTGAGCAGCCAGCAAGCCTGA

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de ADNF III que evita la muerte de células neuronales, en el que dicho ácido nucleico aislado hibrida específicamente, en condiciones rigurosas, a un gen de ADNF III en presencia de una biblioteca genómica humana, teniendo dicho gen de ADNF III una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 2.

2. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico aislado tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 2 o su complemento.

3. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de ADNF III que evita la muerte de células neuronales, en el que dicho ácido nucleico aislado hibrida específicamente, en condiciones rigurosas, a un gen de ADNF III en presencia de una biblioteca genómica murina, teniendo dicho gen de ADNF III una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 4.

4. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho ácido nucleico aislado tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 4 o su complemento.

5. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3, en el que dicho ácido nucleico comprende además un vector recombinante.

6. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de ADNF III que evita la muerte de células neuronales, en el que el ácido nucleico se amplifica mediante cebadores que hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosas a la misma secuencia que un conjunto de cebadores que comprende cebadores seleccionados entre el grupo constituido por:

sentido 5'TCCAATGTTACCTGCAG 3' (SEC ID N°: 7)

sentido 5' ACCTGCAGCAAAACAACCTAT 3' (SEC ID N°: 9) y

antisentido 5' GCTCGTTACAGATTGTAC 3' (SEC ID N°: 8)

7. Un polipéptido de ADNF III aislado que evita la muerte de células neuronales, estando dicho ADNF III codificado por un ácido nucleico de la reivindicación 1 ó 3.

8. El polipéptido de ADNF III aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de ADNF III, tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 1.

9. El polipéptido de ADNF III aislado de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de ADNF III, tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 3.

10. El polipéptido de ADNF III aislado de la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de ADNF III está codificado por un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEC ID N°: 2.

11. El polipéptido de ADNF III aislado de la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido de ADNF III se reproduce de forma recombinante.

12. Un polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III, comprendiendo dicho polipéptido la siguiente secuencia de aminoácidos:

$(R^1)_x$ -Asn-Ala-Pro-Val-Ser-Ile-Pro-Gln- $(R^2)_y$ (SEC ID N°: 10),

en el que:

R^1 es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos en la que cada aminoácido se selecciona independientemente;

R^2 es una secuencia de aminoácidos que comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos en la que cada aminoácido se selecciona independientemente; y

x e y se seleccionan independientemente y son iguales a cero o uno.

ES 2 331 595 T3

13. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

x e y son ambos cero.

14. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

x es uno;

R¹ es Gly-Gly-; e

y es cero.

15. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

x es uno;

R¹ es Leu-Gly-Gly-;

y es uno; y

R² es -Gln-Ser.

16. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

x es uno;

R¹ es Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 17);

y es uno; y

R² es -Gln-Ser.

17. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12 en el que:

x es uno;

R¹ es Ser-Val-Arg-Leu-Gly-Leu-Gly-Gly- (SEC ID N°: 18);

y es uno; y

R² es -Gln-Ser.

18. El polipéptido de ADNF III de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dichos polipéptidos de ADNF III tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3.

19. El polipéptido de ADNF III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, para uso en terapia.

20. Uso del polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF III) de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

21. El polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF III) de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 para uso en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.

22. Uso del polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en la preparación de un medicamento para la prevención de muerte de células neuronales inducida por el péptido β -amiloide en un paciente aquejado con enfermedad de Alzheimer.

23. El polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 para uso en la prevención de muerte de células neuronales inducida por el péptido β -amiloide en un paciente aquejado con enfermedad de Alzheimer.

ES 2 331 595 T3

24. Uso del polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en la preparación de un medicamento para la prevención de muerte neuronal en un paciente infectado con virus de inmunodeficiencia humana.

5 25. El polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 para uso en la prevención de muerte neuronal en un paciente infectado con virus de inmunodeficiencia humana.

10 26. Uso del polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en la preparación de un medicamento para aliviar el deterioro del aprendizaje producido por bloqueo colinérgico en un paciente aquejado con enfermedad de Alzheimer.

15 27. El polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 para uso en el alivio del deterioro del aprendizaje producido por bloqueo colinérgico en un paciente aquejado con enfermedad de Alzheimer.

28. Una composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el polipéptido Factor Neurotrófico Dependiente de Actividad (ADNF) III de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Subrayado sencillo - homologías con HSP60 de ADNP
Subrayado de puntos - homologías con PIF1 de ADNP
Subrayado doble - sitio de glicosilación (aminoácido N° 96-98, 183-185, 371-373, 404-406, 554-556, 584-586, 734-736, 753-755, 770-772)
Negrita + *Cursiva* - representa dos motivos:
1. Sitio activo de glutarredoxina (aminoácido N° 211-221)
2. Dominio de dedos de cinc de tipo C2h2 (aminoácido N° 211-232)

Fig. 1

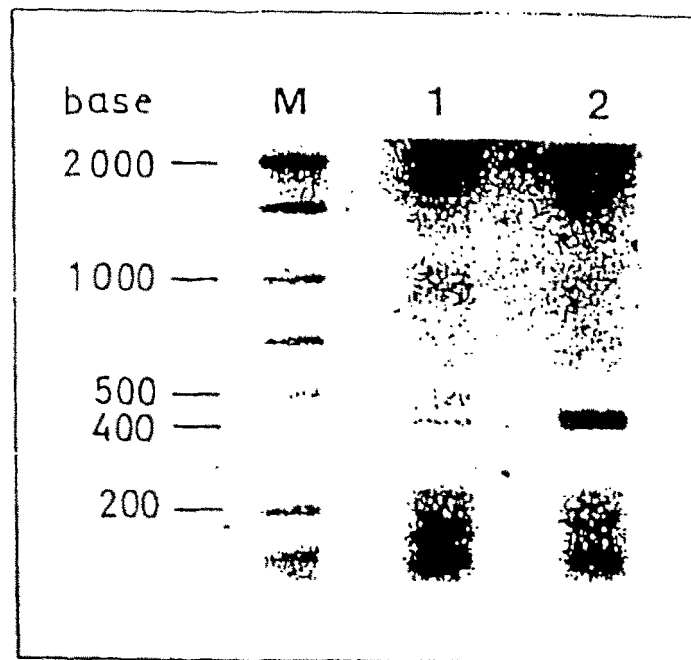


FIG. 2

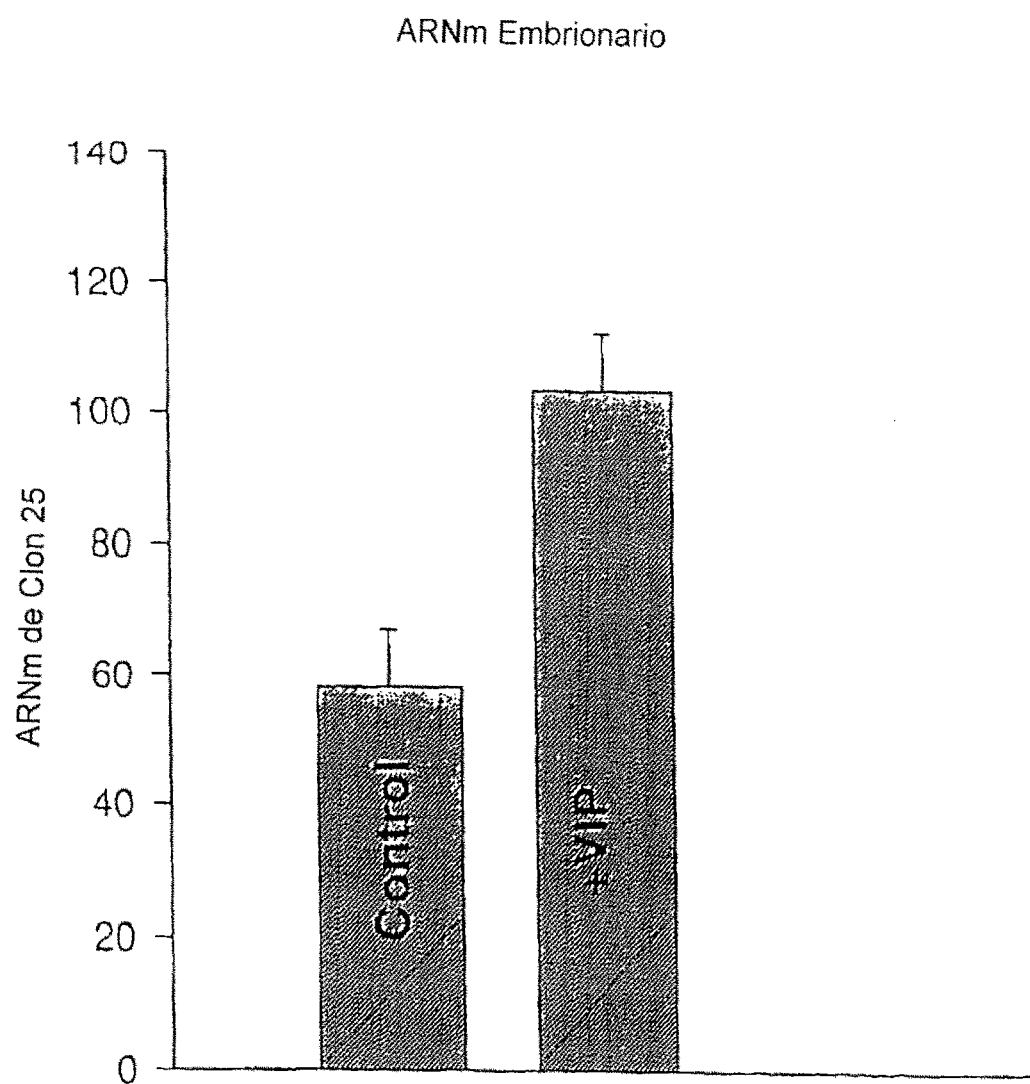


FIG. 3

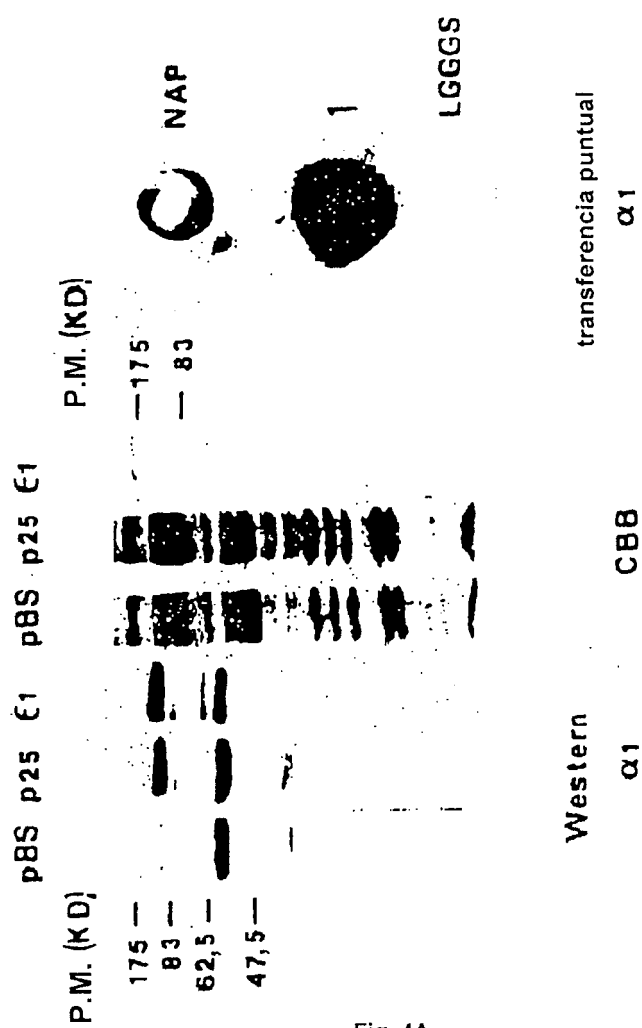


Fig. 4A



Fig. 4B

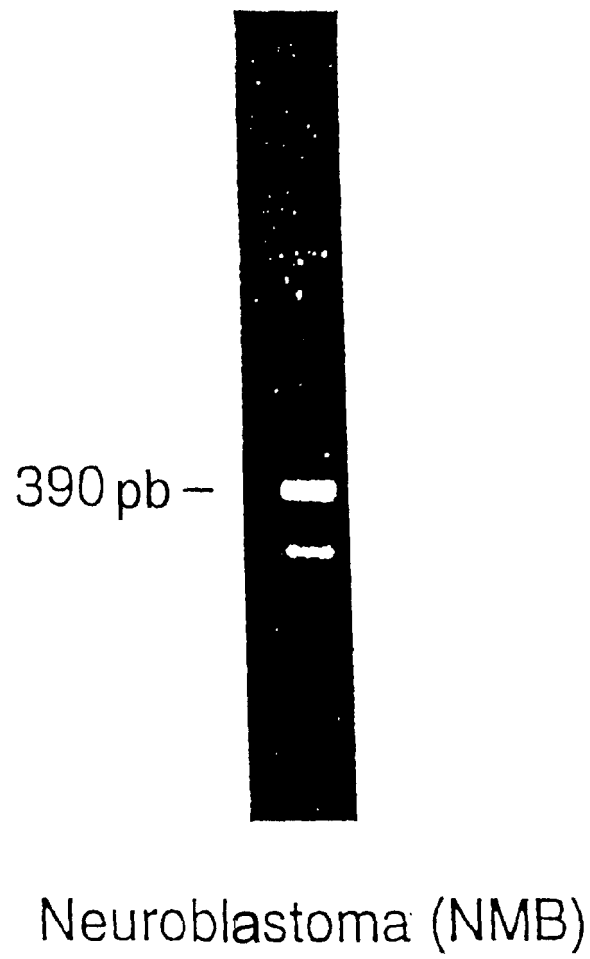


FIG. 5A

SENTIDO

your ID: p25nb-27.1478 ** our Ref: SampleB-1478 24SampleB-1478 24.Seq
 LENGTH: 837 Mon, 10 Jun 1996 11:58 AM CHECK: 5926 ..
 1 CATTGGGCGG ACGTGGCATG CTCCCGGCGG CCAAGGCGCG GGGATGACCT
 51 GCAGCAAAAC AACTATGGAG TCAAAATCTG AGGCCAGGGT TACAGTGTTG
 101 CTCAGTCAAT GAGACTGGGT CTAGGTGGCA AGGCAGCAGT TTCCATTCCT
 151 CAACAACTTC AGTCTGTAAZ GCAGTACTT CCAAGTGGAA ACGBAGGTTC
 201 TTAAGGGCTT GGGTCAGAGC AGAGGTCCCA GGCAGCAGCA AGATACTCCC
 251 TGCAGTCTGC TAAAGGCTCT TCTCTCTCAT CGGGCCAGTT AAAGTCTCCT
 301 TCCCTCTCTC AGTCACAGGC ATCCAGAGTG TTAGGTCACT CCAGTTCCAA
 351 AACTGCTGCA GCTGCCACAG GCCCTCCCCC AGGTAAACAT TCCCTCACTC
 401 AAAAGTGGAA AATATGTACA ATCTGTACG AGGTATCACT AGTGGGCGG
 451 CCTGCAGGTC GACCAATATG GAGAGCTCCC AACGCGTTGG ATGCATAGCT
 501 TGAATATCTT AATAGTGTAC CTAAATAGCT TGGCTAATTC ATSGTCATAG
 551 CTGTTTCCTG TGTGAATTTG TTATCCGCTC ACAATTCCTC ACACATACG
 601 AACCGGAASC AATAAGTETA AAGCTGGGG TGGCTAATGA ATGAGCTAAC
 651 TCACATTAAT TGGCTTGGCG TCACTGCCG CTTCCTCAATC NGGAACTGT
 701 CGTGGCAACT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAA AAGCGGTTTG
 751 CgTaTTGGGC GCTCTTCCGC CTCTCGCTC AATGAATCCC TGCGCTCNGT
 801 CCTTCCGNTG CGGNAACCG TATCACTCAC TCAATT

ANTISENTIDO

your ID: p25nb-sp6.1478 ** our Ref: SampleB-1478 25SampleB-1478 25.Seq
 LENGTH: 850 Mon, 10 Jun 1996 11:58 AM CHECK: 5336 ..
 1 ACATATGCACT AGCTATGCAZ CCAACGCTT GGGAGCTCTC CCATATGGTC
 51 GACCTSCAGG CGGCCGCACZ AGTGAATTCZ CGTTACAGAT TGTAGTATTT CEBADOR 44
 101 TTCCACTTTT GAGTTGAGGA AGTGTTAATZ GGGGAGGGG CTGTGGCAGC
 151 TGCAGCAGGT TTGGAACTGG ACTGACCTAA CACTCTGGAT GCTGTGACT
 201 GAGAGAGGGA AGGAGACTTT AACTGSCCCG ATGAGAGAGA AGAGGCATTA
 251 GCAGACTGCA GGGAGTACCT TGGTGGTGCC TGGGACCTCT GCTCTGACCC
 301 AAGCCATRA GACCTTCCGT TTCCACTTGG AAGTAACTGC TTACAGACT
 351 GAGATCTGTG AGGATAGGAA ACTGGTGGGT TGGCACCTAG ACCCACTCTC
 401 ATGACTGAC CAACACTGTA ACCCTGGCCT ACAGATTTGA CTCCATAGTT - CEBADOR 105
 451 GTTTTGTCTC AGGTAAATCC GCGGCCATGG CCGCCGGGAG CATGCGACGT
 501 CGGGCCCAAT TCGCCCTATA GTGAGTCTGA TTACAATTCA CTGGCCCTCG
 551 TTTTACAGAG TCGTGAATGG GAFAACCTG GCGTTACCCA ACTTAAATCC
 601 CTTGCAGGAC ATCCCTCTTT CgCAGCTGG CTTAATPAZ GAAgAAGCCC
 651 GCACCGATCG CCTTCCCAZ CAGTTGCGCA GCTGAAATGG CGAATGGAGg
 701 CgCCTGTTAZ cGCGCTTAA ACCCGGCGGG TGTGTGTGTT ACgCGCAGC
 751 GTGACCGCTA CATTTGCCAC CCGCTAACSC CCGCTCCTTT CCTTTTCTTC
 801 CCTCCTTCTT CGCAGgTCC CCGGNTTTC CCGTCCAACT CTAAATCGGT

FIG. 5B

ES 2 331 595 T3

[illegible]

Fig. 5C

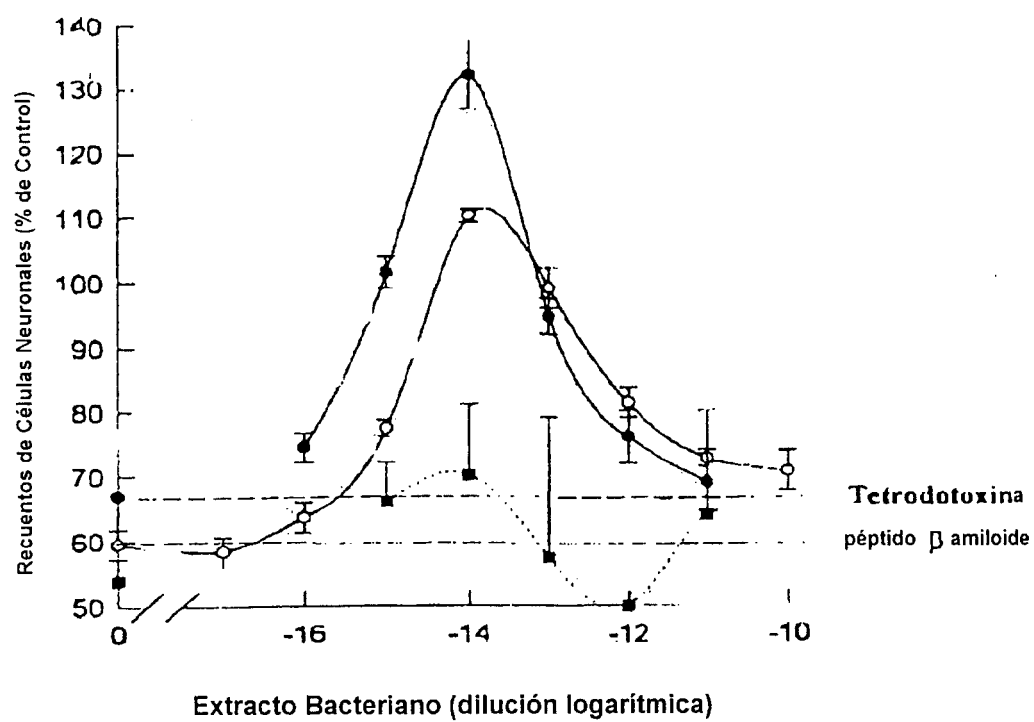


Fig. 6A

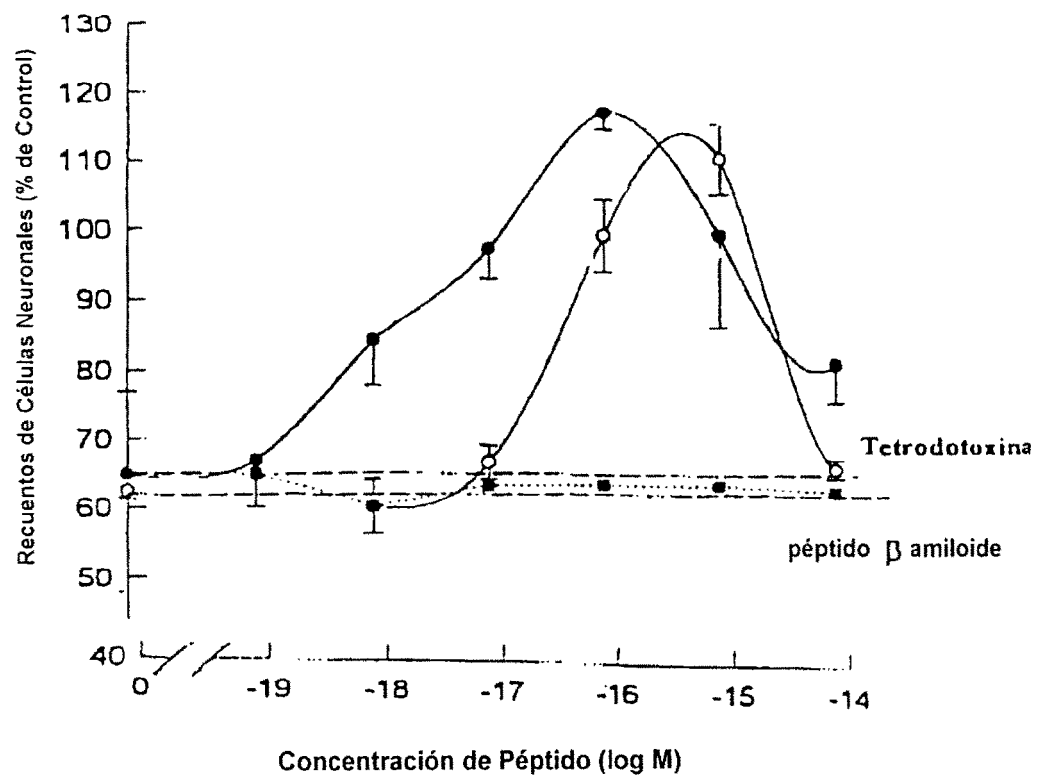


Fig. 6B

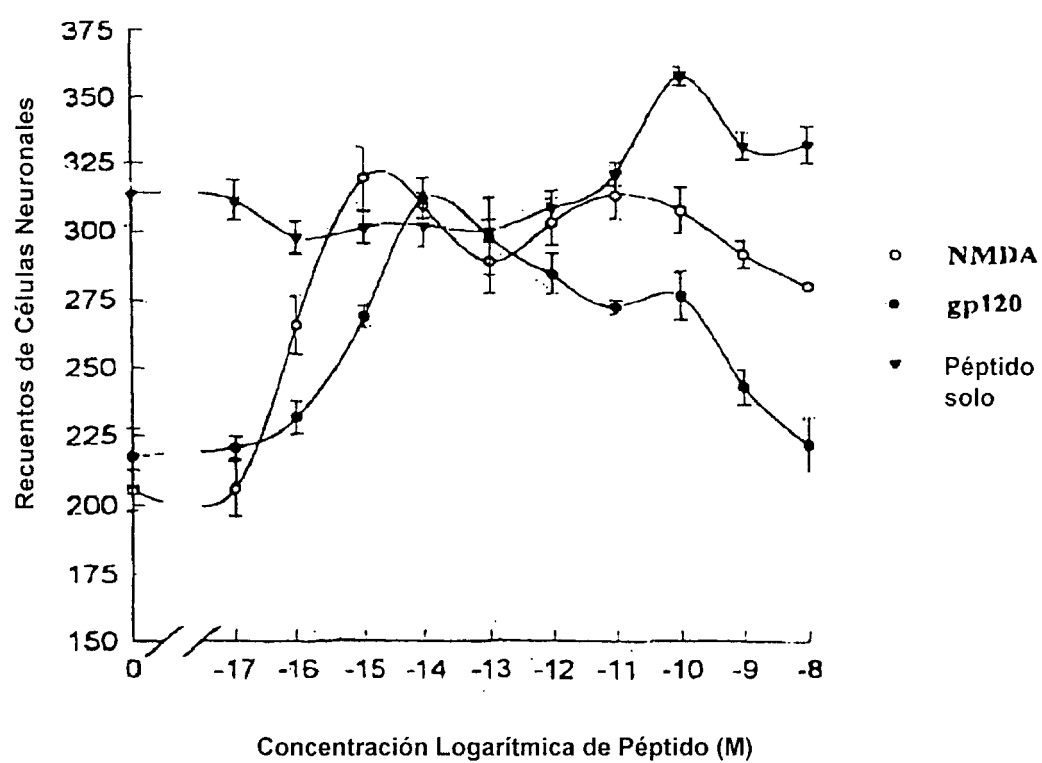


Fig. 6C

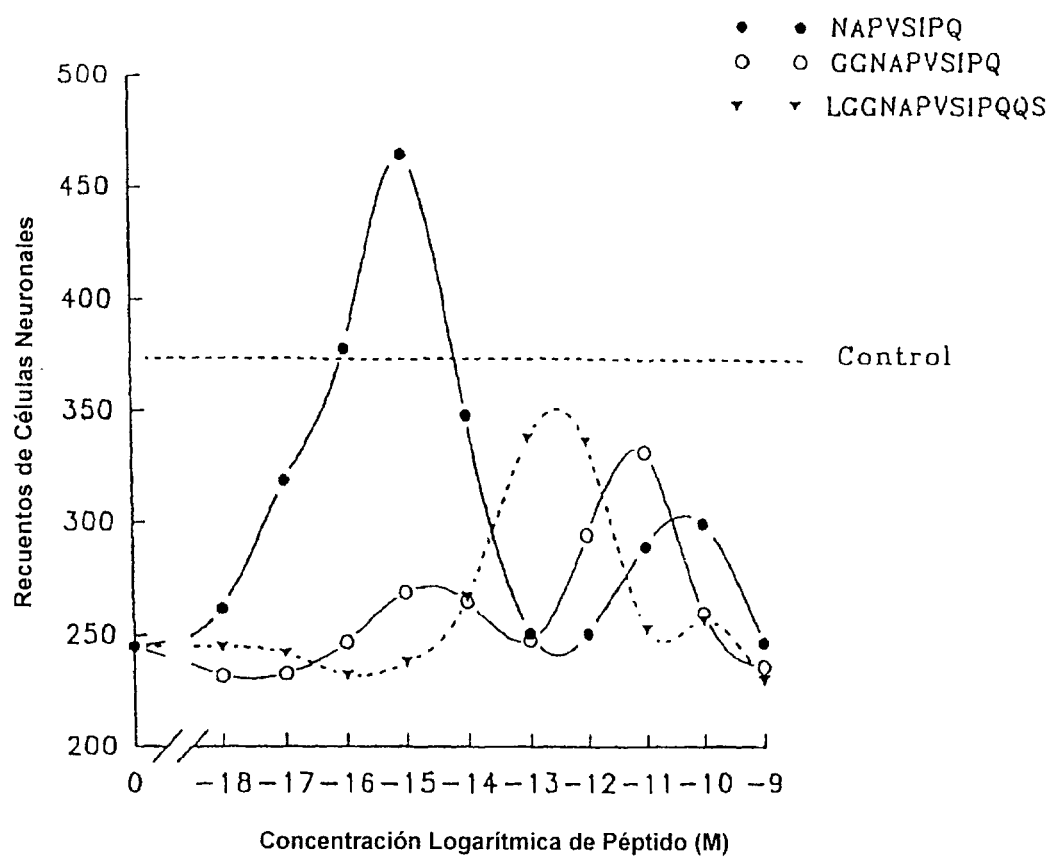


FIG. 7A

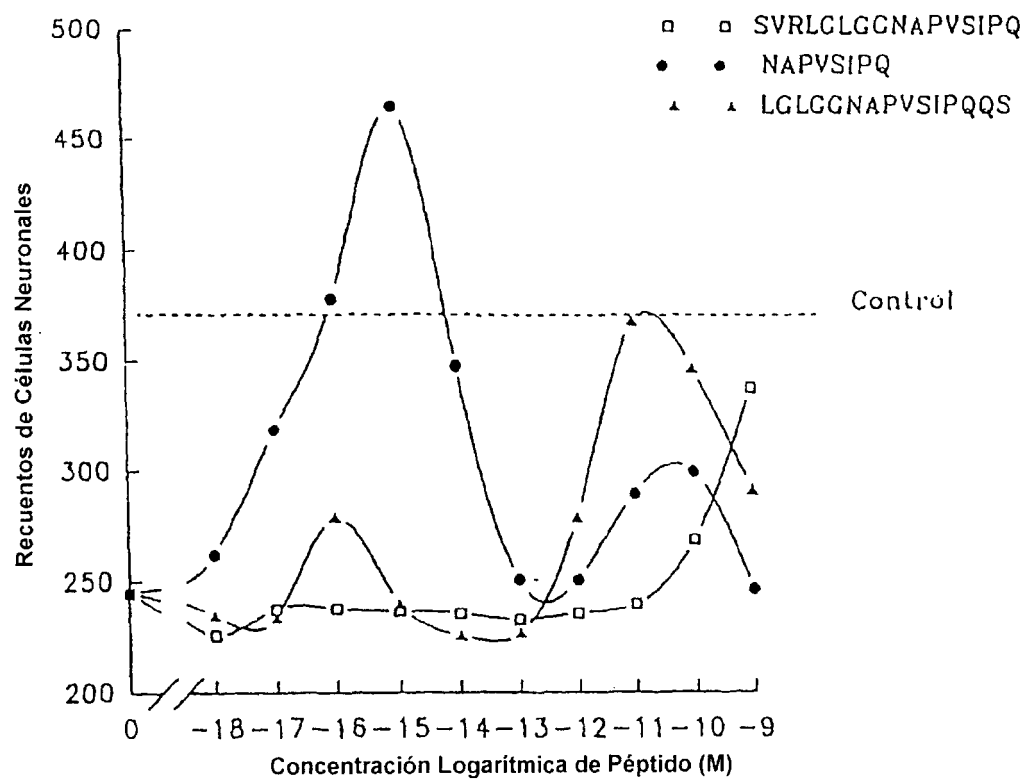


FIG. 7B

El efecto de NAPVSIPQ(NAP) sobre aprendizaje y memoria

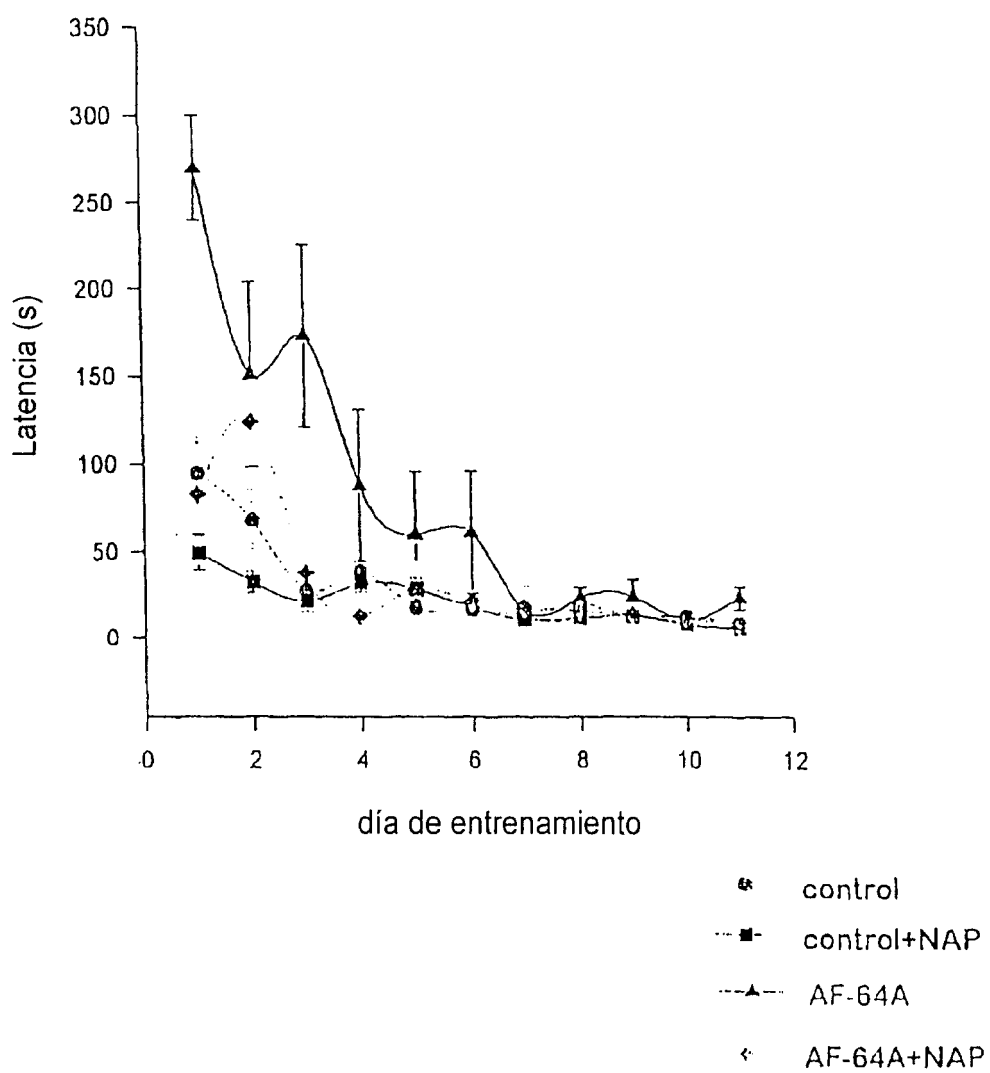


FIG. 8

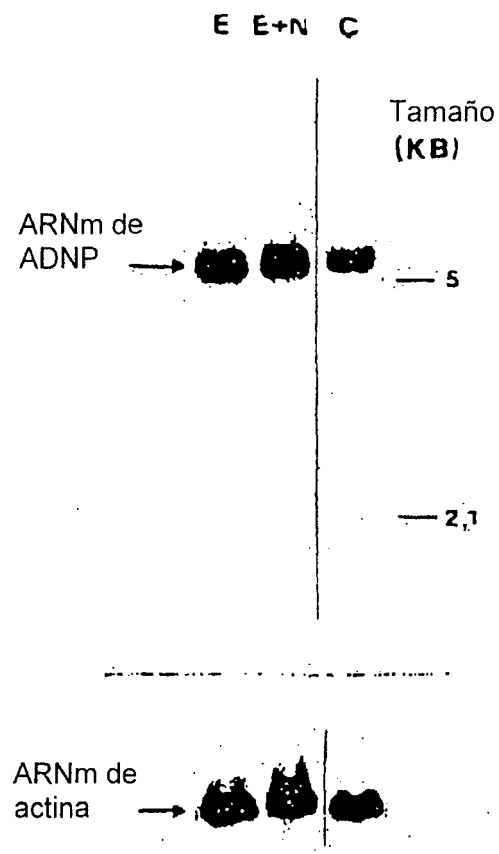


Fig. 9

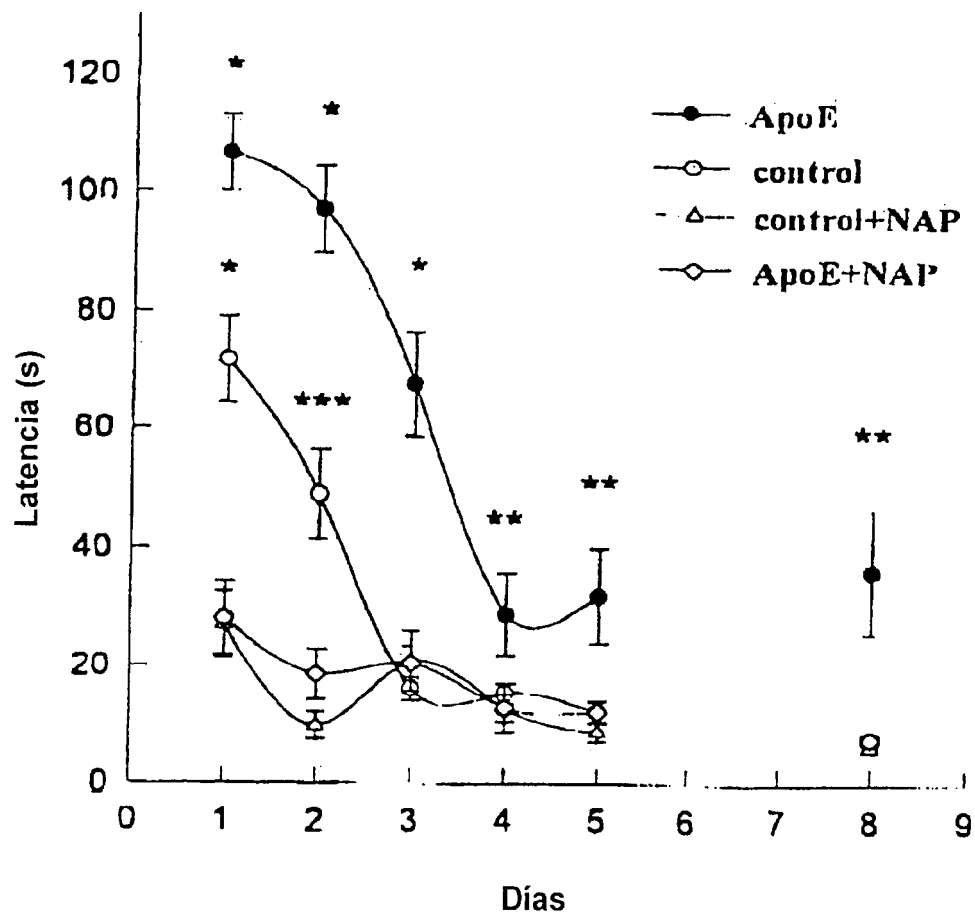


Fig. 10